Cytomégalovirus : réponse des lymphocytes T $\gamma\delta$ et impact sur le développement tumoral

Layal Massara

▶ **To cite this version:**

Layal Massara. Cytomégalovirus : réponse des lymphocytes T $\gamma\delta$ et impact sur le développement tumoral. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. ⟨NNT : 2018BORD0165⟩. ⟨tel-03505891⟩

HAL Id: tel-03505891

https://theses.hal.science/tel-03505891v1

Submitted on 1 Jan 2022

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.

HAL Authorization

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Cancérologie, hématologie, immunologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 1 Octobre 2018

Par Layal Laura Massara

Née le 29 Septembre 1991

Le Cytomégalovirus : réponse des lymphocytes T $\gamma\delta$ et impact sur le développement tumoral

Sous la direction de : Dr. Julie DECHANET-MERVILLE
co-directrice: Dr. Myriam CAPONE

Membres du jury :

Mme la professeure LAFON Marie-Edith	PU-PH, Université de Bordeaux	Président
M. le Docteur HERBELIN André	DR INSERM, Université de Poitiers	Rapporteur
Mme le Docteur POUPOT Mary	DR INSERM, Université de Toulouse	Rapporteur
M. le Docteur PAGET Christophe	DR INSERM, Université de Tours	Examinateur

Cytomégalovirus : réponse des lymphocytes T γδ et impact sur le développement tumoral : Le cytomégalovirus (CMV), un β-herpes virus, est considéré comme un modèle d'immuno-évasion virale. Il s'agit d'un agent pathogène opportuniste fréquent chez les patients immunodéprimés et une cause majeure de malformations congénitales lors de l'acquisition in utero. Le CMV code pour des protéines (i) qui empêchent la présentation de l'antigène aux lymphocytes T αβ notamment par l'inhibition de l'expression des molécules HLA-I et (ii) qui suppriment les fonctions des cellules NK en imitant ou en régulant à la baisse les ligands des récepteurs NK (NKR). Ces mécanismes d'évasion ne devraient pas affecter les lymphocytes T $\boldsymbol{\gamma\delta}$ dont la reconnaissance antigénique est indépendante du HLA-I, et d'ailleurs leur réponse au CMV a été largement rapportée dans de nombreux contextes physiopathologiques. Notre objectif était de comprendre comment les mécanismes d'immuno-évasion du CMV affectent la réponse des lymphocytes T $\boldsymbol{\gamma\delta}$. Nous avons utilisé des adénovirus recombinants exprimant chacun des quatre gènes du CMV impliqués dans l'inhibition de l'expression du HLA-I, et un mutant du HCMV déficient pour ces 4 gènes (CMV-ΔUS). Nous avons observé une induction de l'expression de HLA-I par l'adénovirus control, et une inhibition par US2, US3 et US11. Lors de l'utilisation de CMV-ΔUS, les cellules infectées exprimaient beaucoup plus de HLA-I que les cellules infectées par CMV-WT. De façon intéressante et à l'opposé des lymphocytes T αβ, les lymphocytes T $\boldsymbol{\gamma\delta}$ produisent plus d'IFN$\boldsymbol{\gamma}$ en présence de fibroblastes infectés par le CMV-WT, qu'avec des fibroblastes infectés par CMV-ΔUS. Ces résultats indiquent que les molécules HLA-I régulent les lymphocytes T $\boldsymbol{\gamma\delta}$ grâce à des mécanismes qui sont en cours d'investigation dans notre équipe. Les processus d'échappement immunitaire développés par le CMV pourraient ainsi favoriser la réponse des lymphocytes T $\boldsymbol{\gamma\delta}$ par rapport à celle des lymphocytes T αβ et expliquer le rôle important des cellules T $\boldsymbol{\gamma\delta}$ dans le contrôle du virus chez les individus immunodéprimés. D'autre part, les acides nucléiques et les protéines du HCMV ont été trouvés dans les tissus tumoraux, mais la relation précise entre le HCMV et le cancer reste un sujet de débat. La plupart du temps, HCMV est décrit comme un virus oncomodulateur avec un rôle pro-tumoral. Notre objectif était d'utiliser le modèle de la souris pour tester in vivo l'impact de CMV de souris (MCMV) sur la croissance des cellules tumorales. Nous avons observé que MCMV pourrait inhiber la croissance de tumeurs sous-cutanées de côlon MC38 chez les souris immunodéficientes. Encore plus surprenant lorsque l'on considère la spécificité d'espèce des CMV, l'infection par le MCMV inhibe de la même façon la croissance des cellules cancéreuses du côlon humain HT29, qui n'est pas affectée par le HCMV. In vitro, les protéines MCMV précoces (IE-1) sont détectées dans des cellules cancéreuses humaines et murines après l'infection. Cependant, peu de cellules cancéreuses sont retrouvées positives pour le MCMV dans les tumeurs HT29 prélevées sur des souris infectées par le MCMV. De manière surprenante, le MCMV inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de côlon humain contrairement au HCMV. De plus, la transcription de l'interféron β humain est induite après une infection par le MCMV. Cette induction n'a pas été observée après l'infection par le HCMV. En conclusion, nos données suggèrent un potentiel effet anti-tumoral de MCMV sur les cellules cancéreuses du côlon humain (HT29), qui pourrait être au moins partiellement médiée par l'interféron β. Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation potentielle du MCMV en tant que traitement du cancer du côlon humain.

Mots clés : Cytomegalovirus, Lymphocytes Tγδ, Lymphocytes T αβ, HLA, Free heavy chain HLA, Stress

---

Cytomegalovirus: response of γδ T cells and impact on tumor development: Cytomegalovirus (CMV), a β-Herpesviridae, is considered as a paradigm for viral evasion from immune control. It is a frequent opportunistic pathogen in immunocompromised patients and a major cause of congenital birth defects when acquired in utero. CMV encodes molecules to prevent antigen presentation to αβ T cells through inhibition of MHC Class I expression and to suppress NK cell functions by mimicking or down-regulating ligands of NK receptors (NKR). These evasion mechanisms are not expected to affect $\boldsymbol{\gamma\delta}$ T cells and, as a matter of fact, their response to CMV has been widely reported in many different physiopathological contexts as well as in CMV-seropositive healthy donors. Our aim was to understand how CMV immune evasion mechanisms affect $\boldsymbol{\gamma\delta}$ T cell response. We used recombinant adenoviruses expressing each of the four CMV genes involved in HLA-I downregulation (US2, US3, US6 and US11), and a mutant HCMV deleted for these 4 genes (CMV-ΔUS). We observed an induction of HLA-I expression by the control adenovirus, and an inhibition by US2, US3 and US11. When using CMV-ΔUS, infected cells expressed much more HLA-I than CMV-WT infected cells. Interestingly and in sharp contrast to αβ T cells, $\boldsymbol{\gamma\delta}$ T cell were activated to produce IFNγ when cultured with fibroblasts infected with CMV-WT, but not when fibroblasts were infected with CMV-ΔUS. These results indicate that HLA-I molecules regulate $\boldsymbol{\gamma\delta}$ T cells through mechanisms that are under investigation in our team. The immune escape processes developed by CMV could thus promote $\boldsymbol{\gamma\delta}$ over αβ T cell response and explain the important response of $\boldsymbol{\gamma\delta}$ T cells to the virus in immunosuppressed individuals. On the other hand, HCMV nucleic acids and proteins have been found in tumour tissues, but the precise relationship between HCMV and cancer remains a matter of debate. Most of time, HCMV is described as an oncomodulatory virus with a pro-tumor role. Our goal was to use the mouse model to test in vivo the impact of mouse CMV (MCMV) on tumor cell growth. We observed that MCMV could inhibit the growth of subcutaneous colonic tumors MC38 in immunodeficient mice. Even more surprising when considering the species-specificity of CMVs, MCMV infection similarly inhibited the growth of human HT29 colon cancer cells but not HCMV. In vitro, MCMV early (IE-1) proteins were expressed in both murine and human cancer cells post-infection. However, few cancer cells were positive for MCMV infection in HT29 tumors retrieved from MCMV-infected mice. Surprisingly MCMV inhibited human colon cancer cell proliferation in contrast to HCMV. Moreover, human Interferon β transcription was induced after MCMV infection. This induction was not observed after HCMV infection. In conclusion, our data suggest a potential anti-tumor effect of MCMV on human colon cancer cells (HT29), that could be at least partially mediated by interferon β. These results pave the way toward the potential use of mouse CMV as a treatment for human colon cancer.

Keywords : Cytomegalovirus, γδ T cells, tumor growth, αβ T cells, HLA, Free heavy chain HLA, Stress

« Un pessimiste voit la difficulté dans chaque opportunité, un optimiste voit l'opportunité dans chaque difficulté »

Winston Churchill

Sommaire :

Remerciements : **7**
Abréviations : **9**

Introduction. **11**
I- Généralités. **12**
II- Le Cytomegalovirus Humain. **13**
a) Généralités. 13
b) Structure et cycle viral. 15
c) Le CMV et le cancer. 19
d) Le CMV murin. 20
e) La spécificité d'espèces du CMV. 21
III- Réponse de l'hôte à l'infection par le CMV. **22**
a) Réponse cellulaire intrinsèque. 22
1. Présentation des interférons. 22
2. Mécanisme d'induction de l'IFN type I par le HCMV. 23
3. Une voie régulée par l'IFN : la Voie ND10. 26
b) Acteurs immunitaires de la réponse anti-CMV. 27
(i) Réponse Innée. 29
1. Les cellules dendritiques. 29
2. Les cellules NK. 29
(ii) Réponse adaptative. 30
1. La réponse humorale. 30
2. Réponse des lymphocytes T αβ. 31
1) Généralités. 31
2) Place des lymphocytes T dans la réponse anti-CMV. 34
IV- Les mécanismes d'expression des molécules HLA. **36**
(a) Expression et Structure des molécules HLA-I. 36
(b) Les molécules HLA-I dénaturées. 39
(c) La présentation via les molécules du HLA-II. 39
V- Les Mécanismes du CMV pour échapper à la réponse de l'hôte. **40**
(a) Evasion de la signalisation IFN. 40
(b) Evasion du contrôle par les lymphocytes. 42
VI- Réponse des lymphocytes T gamma-delta humains. **46**
a) Introduction générale. 46
Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 46
Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 négatifs 48
b) Fonctions des lymphocytes T γδ 49
1- Rôle cytotoxique 50
2- Production de cytokines 50
3- Fonction CPA 50
c) Lymphocytes T γδ et CMV. 51
d) Régulation des lymphocytes T γδ. 52
1. Les récepteurs de cytokines. 53
2. Les corécepteurs activateurs. 54
3. Les corécepteurs inhibiteurs KIR. 54

Objectifs **56**

Résultats **60**

Projet I **61**

Projet n°1 : Etude de l'impact du HCMV sur l'expression des molécules HLA-I et conséquences sur l'activation des lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2. 62
I. Contexte de travail et problématique. 62
II- Matériel et méthodes. 63
1. Cellules et virus utilisés. 63
2. Infection virale. 63
3. Evaluation de l'expression des HLA-I. 63
4. Marquage intracellulaire : tag V5. 64
5. Sang et isolement des PBMC. 64
6. Amplification des lymphocytes T gamma-delta avec l'IL2 et l'IL15. 65
7. Depletion des lymphocytes T γδ. 65
a. Tri par cytométrie en flux (FACS ARIA). 65
b. Tri immunomagnétique. 66
8. Test fonctionnel des JRT3 et des lymphocytes. 66
9. Analyses statistiques. 67
III- Résultats. 67
1) Tests de l'infection des fibroblastes par les Adénovirus recombinants exprimant les immunoévasines. 67
2) Les gènes US inhibent l'expression des molécules HLA-I et HLA modifié à l'exception de US6. 68
3) L'inhibition du HLA n'a pas d'impact sur la reconnaissance des cellules cibles par le TCR γδ. . 71
4) Le CMV-ΔUS induit l'expression des différentes molécules de HLA. 73
5) L'augmentation de l'expression des HLA-I modifiés est associée à une réactivité accrue du TCR 26 Vγ9Vδ3. 74
6) Régulation de la réactivité du clone 3 Vγ9Vδ3 par la modulation de l'expression des molécules HLA-I par le HCMV. 75
7) Spécificité de la réponse et blocage KIR 79
IV- Discussion et perspectives. 84

Article I 90
Abstract: 91
Introduction: 91
Materials and Methods: 93
Generation of γδ T cell clones 93
Generation of JRT3-26 93
β-2-microglobulin silencing 94
Expression of HLA alleles 94
T cell Functional assays 94
Generation of LSM mAbs 94
Immunoprecipitation with LSM mAbs 95
Florescent microscopy 95
Characterization of HLA allele specificity of LSM mAbs 95
Determination of LSM binding region on HLA-I 95
HLA typing of tumor cell lines and clones 96
Results: 96
Vγ9Vδ3 TCR dependent recognition of target cells 96
Generation of LSM mAbs that inhibit Vγ9Vδ3 TCR activation 97
LSM mAbs recognize the alpha-2 helix of HLA class I molecules 98
Target cells of vγ9vδ3 TCR express β2-microglobuline free HLA-I heavy chain (FHC) 99
Increase of FHC expression is associated with enhanced Vγ9Vδ3 TCR reactivity 100
FHC is a direct ligand for TCR 26 102
Clone 26 reactivity is modulated by HLA-inhibitory NK receptors 102
Shared recognition of FHC by other Vδ2^{neg} γδ T cells. 103
Discussion: 104
Supplementary information: 107

References : 112

Projet 2 126

I. Projet n°2 : Etude de l'impact de MCMV sur le développement des tumeurs coliques humaines HT29 127

A- Contexte de travail et problématique 127

Article 2 : 130

ABSTRACT 131
INTRODUCTION 132
RESULTS 133
Dose-dependent inhibition of mouse cancer cells growth in immunodeficient mice 133
Cancer cells show different permissiveness to MCMV 134
MCMV affects survival of both mouse and human cancer cells 135
Increased host defense mechanisms in MCMV vs HCMV-infected HT29 cells 136
MCMV affects human colon cancer cells in vitro, in contrast to HCMV 137
MCMV-restricted inhibition of human colon cancer cells growth in mice 138
Inhibition of human cancer cells growth by local MCMV-therapy 140
DISCUSSION 141
MATERIALS AND METHODS 143
Cell lines and viral stocks 143
Implantation of tumor cells and infection of mice 143
Infection of cells and detection of viral proteins in vitro 143
Supernatant transfer experiments 144
Analyses of biopsies 144
Viability of post-infected cells 144
RT-qPCR 144
Cell cycle analysis 145
Annexin V detection 145
Wound healing assay 145
Statistical analyses 146
FUNDING 146
AKNOWLEDGMENTS 146
REFERENCES 146

B- Conclusion et perspectives 150

Conclusion 153

Bibliographie 156

Annexe I 171

Curriculum vitae 181

TABLEAUX

TABLE 1: CLASSIFICATION, SITES PRIVILÉGIÉS ET MALADIES ASSOCIÉES AUX VIRUS DE L'HERPÈS SPÉCIFIQUES À L'HOMME. 14
TABLE 2: EFFETS CLINIQUES DE L'INFECTION PAR LE CYTOMEGALOVIRUS. 15
TABLE 3: PRODUITS DES GENES D'EVASION IMMUNITAIRE CODES PAR LE HCMV 43
TABLE 4: RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS ET L'INTERPRETATION. 80

Figures

FIGURE 1: ANNOTATION DU GENOME DU HCMV POUR LA SOUCHE MERLIN (GENBANK ACCESSION NC_006273). 16
FIGURE 2: CYCLE DE REPLICATION LYTIQUE. 18
FIGURE 3: STIMULATION DES CELLULES PAR LES IFN-A/B. 23
FIGURE 4: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE DETECTION DU HCMV INTRACELLULAIRE ET DE LA SIGNALISATION PAR L'IFN. 25
FIGURE 5: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE ND10. 27
FIGURE 6: SCHÉMA GLOBAL DE LA MISE EN PLACE DES DIFFÉRENTS EFFECTEURS DE LA RÉPONSE IMMUNE SPÉCIFIQUE DU HCMV. 28
FIGURE 7: MECANISMES D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T αβ CD8+. 33
FIGURE 8: LA VOIE DE PRESENTATION DE L'ANTIGENE DU CMH DE CLASSE I. 38
FIGURE 9: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BLOCAGE DE LA REPONSE A L'IFN TYPE I PAR LE CMV. 41
FIGURE 10: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'ACTION DE CMV SUR LES DIFFERENTS SOUS UNITES DE ND10. 42
FIGURE 11: MECANISMES D'INHIBITION DE LA PRESENTATION PEPTIDIQUE PAR LES MOLECULES DU HLA-I DEVELOPPES PAR LE HCMV. 44
FIGURE 12: LIGANDS IDENTIFIES DE TCRS GAMMA DELTA NON Vγ9-Vδ2 HUMAINS 49
FIGURE 13: LES RECEPTEURS EXPRIMES A LA SURFACE D'UN LYMPHOCYTE T γδ. 53
FIGURE 14: LES RECEPTEURS KIRS ET LIRS ET LEURS LIGANDS. 55
FIGURE 15: VERIFICATION DE L'INFECTION PAR LES ADENOVIRUS. 68
FIGURE 16: EXPRESSION MEMBRANAIRE DE DIFFERENTES FORMES DE HLA SUR DES HFF-CAR APRES EXPRESSION DES PROTEINES US. 69
FIGURE 17: EXPRESSION MEMBRANAIRE DE DIFFERENTES FORMES DE HLA SUR DES HFF-CAR APRES INFECTION A DIFFERENTS MOI. 70
FIGURE 18: LE RATIO DE L'EXPRESSION DES MOLECULES HLA DENATUREES/HLA NATIVES A LA SURFACE DES CELLULES INFECTEES PAR LES RAD-US. 71
FIGURE 19: REACTIVITE DES DIFFERENTES JRT3 TRANSDUITES AVEC DES TCR γδ VIS-A-VIS DES HFF-CAR TRAITES PAR LES ADENOVIRUS EXPRIMANT LES GENES US. 72
FIGURE 20: TEST DE L'INFECTION DES HFF-TERT AVEC LES SOUCHES RECOMBINANTES DE HCMV SUITE A UNE INFECTION DE 4 JOURS A LA MOI 25. 73
FIGURE 21: EXPRESSION MEMBRANAIRE DE DIFFERENTES FORMES DE HLA SUR DES HFF APRES INFECTION AVEC CMV-WT OU CMV-ΔUS. 74
FIGURE 22: REACTIVITE DES JRT3-26 VIS-A-VIS DES HFF PRIMAIRES TRAITES PAR LES CMV-WT ET CMV-ΔUS. 75
FIGURE 23: QUANTIFICATION DE LA SECRETION D'IFNΓ PAR LE CLONE T 3 Vγ9VΔ3 APRES CO-CULTURE AVEC DES FIBROBLASTES PRIMAIRES INFECTEES PAR LES DIFFERENTES SOUCHES DE HCMV. 76
FIGURE 24: QUANTIFICATION DE LA SECRETION D'IFN-Γ PAR LES LYMPHOCYTES Tγδ NONVγ9Vδ2 APRES CO-CULTURE AVEC DES FIBROBLASTES PRIMAIRES INFECTES PAR LE CMV. 78
FIGURE 25: COMPARAISON DE LA REACTIVITE DES LYMPHOCYTES Tγδ NONVγ9Vδ2 (A) ET DES LYMPHOCYTES Tαβ CD8+(B) CONTRE LES CELLULES INFECTEES PAR LE CMV-WT ET CMV-ΔUS. 79
FIGURE 26: PROCESSUS D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T γδ. 80
FIGURE 27: PHENOTYPE D'EXPRESSION DES RECEPTEURS KIR A LA SURFACE DES LYMPHOCYTES T γδ. 81
FIGURE 28: QUANTIFICATION DE LA SECRETION D'IFN-Γ PAR LES LYMPHOCYTES Tγδ NONVγ9Vδ2 APRES CO-CULTURE AVEC DES FIBROBLASTES PRIMAIRES INFECTEES PAR LE CMV. 82
FIGURE 29: TAUX D'INHIBITION DE LA PRODUCTION D'IFN-γ PAR LES LYMPHOCYTES T γδ NON Vγ2Vγ9 EN PRESENCE DES HFF INFECTEES PAR LE CMV-ΔUS PAR RAPPORT AUX HFF INFECTEES PAR LE CMV-WT. 83
FIGURE 30: PRESENTATION 3D DES PEPTIDES RECONNUS PAR LSM ET LES RECEPTEURS KIR. 88
FIGURE 31: –L'INJECTION DU MCMV INHIBE LA CROISSANCE TUMORALE CHEZ LES SOURIS CD3E-/-. 128
FIGURE 32: IMPACT DE MCMV SUR LES METASTASES COLIQUES HUMAINES. 152

Remerciements :

Il est très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de beaucoup de personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je tiens à remercier le Professeur Marie Edith Lafon, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie le Docteur André Herbelin, le Docteur Mary Poupot et le Docteur Christophe Paget d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, Julie Dechanet-Merville, pour m'avoir accueillie au sein de son groupe et pour m'avoir donné l'occasion d'être impliquée dans cette étude. Julie, c'est à tes côtés que j'ai compris ce que rigueur et précision voulaient dire. Je te suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de tes compétences, de ton dynamisme, et de ton efficacité. Mais également je te remercie énormément pour avoir été à mes côtés tout le long de mon hospitalisation. Merci d'avoir veillé sur moi.

Je tiens également à remercier ma co-directrice Myriam Capone, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant de m'intégrer à son projet. Myriam, je te remercie également pour tes multiples conseils et pour toutes les heures que tu as consacrées à diriger ce projet. J'aimerais également te dire à quel point j'ai apprécié ta grande disponibilité. Je n'oublierai jamais nos discussions scientifiques et surtout ton humour que je n'ai pas toujours comprise, enfin pas au premier abord. Merci énormément pour tous ces moments, je m'en souviendrai toute ma vie.

Jonathan, mille mercis pour tout l'aide que tu m'as apportée et pour m'avoir guidée durant mon master 2 et durant ma thèse. Merci pour toutes les explications sur les molécules HLA. Par contre je ne comprends toujours pas comment tu peux rester en T-shirt en plein hiver ☺.

J'exprime ma gratitude à Vincent Pitard, qui m'as accompagnée tout au long des expériences. Sans tes conseils et ta formation, je ne serais pas là.

Je remercie le Professeur Jean-François Moreau, pour ses précieux conseils.

Charlotte, je te remercie pour ton amitié et ton extrême gentillesse. Durant mon hospitalisation, j'ai eu des moments difficiles et à chacun de ces moments tu étais là pour me réconforter. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je souhaite remercier le plus chaleureusement possible les Docteurs Christophe Richez et Marie-Elise Truchet de m'avoir accueillie dans le service à l'hôpital. Vous étiez à mon côté tout le long de mon traitement. Sans vous je n'aurais pas pu continuer ma thèse.

Maria, je te remercie infiniment pour ta patience. Pour le temps que tu as consacré à me guider pour mes futurs projets, pour les discussions, qu'elles soient scientifiques ou non. J'ai beaucoup aimé ta spontanéité et ton efficacité.

Je remercie les membres de l'animalerie, particulièrement Benoît et Julien pour leur aide précieuse et leurs conseils qui ont grandement participé au bon déroulement de ma thèse.

Je remercie également Xavier, pour m'avoir formé le long de ma thèse.

Some friendships are like Tom and Jerry. They tease each other, knock down each other but can't live without each other. A ma petite Natalou merci pour ces très bons moments passer avec toi au labo. T'étais comme ma sœur.

Je remercie également…
Isabelle, tu as tellement veillé sur ma santé et tu m'as donné beaucoup de conseils que ce soit pour les « manipes » ou pour la vie en quotidien. Merciiii

Annie, merci pour avoir été à mes côtés que ce soit à l'hôpital ou au laboratoire. Merci pour tes conseils. Merci pour toute les séances de grammaire, conjugaison…

Mes collègues de bureau, Emeline, Nat et Nathalie, Isa, Camille, … Merci pour tous les moments, les fous rires, Merci de m'avoir supportée, surtout toi Emeline ☺

Mes amis thésards, post-doc et master 2, Lynn, Hannah, Pao, Andréa, Aurelie, Angela, Mél, Sonia, Gabriel, Fred (ou devrais-je dire Jambon et mini-Jambon), Maxime, Jenny, … Merci à vous tous, vous m'avez permis d'avancer chaque jour. Merci pour tous les moments à l'océan, au Crous, les soirées dansantes…. Et surtout pour les corrections en français.
Tous les membres du « labo » ImmunoConCEpT, merci pour ces moments inoubliables.

Mes amis libanais en France, Judy, Bourak, Mahmoud, Mona, Mohamad, Ali[3], Ahmad, Hussein merci d'être là. Vous avez rendu mes années bordelaises inoubliables.

A ma famille, mes proches, je ne sais pas comment vous remercier. Malgré les pays qui nous séparent vous m'avez donné toute la force et la motivation dont j'ai eu besoin au cours de cette thèse.

A mes parents de cœur, Khodor et May, Merci beaucoup pour tout votre soutien et encouragement.

Nathalia, Aya, Sara, et mes petits jumeaux mille merci pour tout ; vous êtes la meilleure famille du monde. Je serai plus disponible les prochaines années, c'est promis.

Maman, Papa c'est votre thèse aussi. Vous êtes mes héros.
من علمني حرفاً كنت له عبداً وأنتم علمتموني الحياة وكنتم دائماً بجانبي رغم كل المسافات هذه الاطروحة هي تعبكم وجهدكم أمي وابي أمل أن أكون فخراً لكم .

Abréviations :

ADCC : Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APC : Cellule Présentatrice D'antigène

ARN : Acide RiboNucléique

BCR : B Cell Receptor

CBP : Cirrhose Biliaire Primaire

CD : Cluster of Differentiation

CLIP : Class II Invariant Chain Associated Peptid

CMV : Cytomegalovirus

CTLA 4: Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4

DC : Cellules Dendritiques

EBV : Epstein Bar Virus

FHC: Free Heavy Chain

GB, GH : Glycoprotéine B Et H

GFP: Green Fluorescent Protein

HCV : Hepatite C Virus

HLA : Human Leucocyte Antigen

HSV : Herpès Simplex Virus

iDC : Cellules Dendritiques Immatures

IE : Immediate Early

IFN : Interféron

IFNAR : Récepteur A L'interféron

IL : Interleukine

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine Based Activatory Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine Based Inhibitory Motif

KIR : Killer Immunoglobulin-Like Receptors

KSHV: Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus

MDC : Cellules Dendritiques Matures

NB : Nuclear Body

NK : Natural Killer

ND10 : Domaine Nucléaire 10

NKG2 : Natural Killer Group 2

NKR : Natural Killer Receptor

OAS : 2’-5’ Oligo-Adenylate Synthétase

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD1 : Programmed Cell Death

PP : Phosphoprotéine

PKR : Protéine Kinase Dépendante De L’arn Db

PR : Récepteurs De Reconnaissance Des Motifs Innés

RE : Reticulum Endoplasmique

SCT : Transplantation Cellules Souches Hématopoïétiques

SIDA : Syndrome d’ImmunoDéficience Aquise

SOT : Transplantation D’organes Solides

TCR : T Cell Receptor

TLR : Toll Like Récepteur

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-Alpha.

UL : Unique Long

US : Unique Short

VZV : Virus Du Zona

Introduction.

I- Généralités.

L'organisme humain est menacé sur deux fronts. Le premier consiste en des facteurs externes tels que les infections ; le second, interne, est dû à une reprogrammation de certains processus cellulaires qui peuvent ainsi provoquer des maladies auto-immunes, génétiques ou des dérégulations aboutissant au cancer. Pour se préserver et se défendre, le corps dispose de deux systèmes complémentaires : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée, dite naturelle ou naïve, confère une protection immédiate et non spécifique contre les pathogènes. Les principaux activateurs de l'immunité innée sont les récepteurs de reconnaissance de motifs innés (PRR), qui comprennent des récepteurs de type toll (TLR) principalement exprimés par les cellules myéloïdes innées (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, etc..). Le système immunitaire inné joue également un rôle essentiel dans l'activation du système immunitaire adaptatif, qui agit plus tardivement (Luster, 2002). L'immunité adaptative est spécifique des antigènes et acquise à long terme. Cette spécificité repose sur l'expression des récepteurs spécifiques des antigènes (dit TCR= T Cell Receptor ou BCR=B Cell Receptor) qui sont exposés à la surface des lymphocytes T (TCR) ou B (BCR). Le TCR ne reconnait pas les éléments étrangers sous leur forme native : les antigènes doivent d'abord être dégradés à l'intérieur d'une cellule, apprêtés puis exposés à la surface par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA pour l'Homme). Ce sont les complexes HLA- peptide qui sont reconnus par les TCR.

Les lymphocytes T γδ sont à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Ce sont des lymphocytes T dits non conventionnels et dont la spécificité du TCR est peu connue. Contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$, les antigènes des TCR γδ sont reconnus indépendamment des molécules HLA. Malgré leur découverte à la fin des années 1980, les caractéristiques des lymphocytes T γδ restent assez mal comprises, et très peu d'antigènes ont été caractérisés. L'équipe que j'ai intégrée pour préparer ma thèse s'intéresse depuis longtemps à ces lymphocytes dans deux contextes pathologiques : l'infection par le Cytomegalovirus (CMV) et le Cancer. Ma thèse s'inscrit dans cette thématique et vise à comprendre les mécanismes d'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$.

Ainsi mon projet de thèse se divise en deux objectifs :

1- L'étude de l'impact de l'inhibition de l'expression des molécules de HLA (un mécanisme mis en place par le CMV pour échapper aux lymphocytes T $\alpha\beta$) sur la réponse antivirale médiée par les lymphocytes T $\gamma\delta$.

2- L'étude de l'impact du CMV sur le développement tumoral et l'induction de la réponse T $\gamma\delta$ anti-tumorale.

II- Le Cytomegalovirus Humain.

a) Généralités.

Le CMV humain (HCMV) appartient à la famille des Herpesviridae, qui comprend par ailleurs le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) ou 2 (HHV-2 ou HSV-2), le virus du zona (VZV), et les virus herpes 6, 7 et 8 (HHV-6, HHV-7 et HHV-8). Le CMV partage plusieurs propriétés avec les autres virus herpes, notamment au niveau du génome, de la structure des virions et de la capacité d'induire une infection persistante à l'état latent (Davison, 2002). Pendant la phase aiguë de l'infection, le HCMV peut infecter une large gamme de cellules dans son hôte, y compris les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules neuronales, les hépatocytes, les trophoblastes, les monocytes / macrophages, et les cellules dendritiques (DCs) (Sinzger et al., 2008). Le CMV latent est retrouvé dans les monocytes, les cellules souches hématopoiétiques, les cellules endothéliales et épithéliales (table 1).

Le HCMV peut être transmis par la salive, le contact sexuel, le placenta, l'allaitement maternel, la transfusion sanguine, la transplantation des organes solides (SOT) ou la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (SCT) (Sia and Patel, 2000). Les infections par le HCMV concernent un grand nombre de personnes et varient en fonction des zones géographiques. Par exemple dans les pays industrialisés et notamment l'Europe, 60% de la population est infectée alors que dans les pays en voie de développement, le taux d'infection avoisine les 100%. Le HCMV est responsable d'infections passant le plus souvent inaperçues. Son caractère pathogène survient surtout chez des patients dont les défenses immunitaires ont été affaiblies, tels ceux traités par immunosuppresseurs ou souffrant du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA), et lors d'infections *in utero* ou périnatales (Fields et al.,

2001). Ce virus peut dans ce cas causer des handicaps permanents chez l'enfant, tels que les pertes auditives, perte de vision, retard mental (table 2).

Famille	Nom	Maladies	Tropisme	
			primo-infection	Latence
α	virus Herpes Simplex de type I (HSV-1)	Herpés orolabial et génital	cellules épithéliales des muqueuses	ganglions des nerfs sensoriel et cranien
	virus Herpes Simplex de type II (HSV-2)	Herpés génital		
	Virus Varicelle-Zona (VZV)	Varicelle, Zona		
β	cytomégalovirus (HCMV ou HHV5)	syndrome mononucléosique, rétinite	cellules épithéliales, fibroblastes, monocytes	cellules souches hématopoeïtiques CD34+ , monocytes, cellules endothéliales
	virus de l'herpes humain de type 6 A ou B (HHV-6-A/B)	Roséole infantile		Monocytes, macrophages
	virus de l'herpes humain de type 7 (HHV-7)			lymphocytes T CD4+
γ	Virus d'Epstein-barr (EBV ou HHV4)	Mononucléose infectieuse, lymphone de Burkitt, carcinome nasopharingé, lymphome primaire du systéme du systéme nerveux centrale et leucoplasie chevelue buccale associé au VIH	cellules épithéliales des muqueuses, lymphocytes B	lymphocytes B
	virus de l'herpés associé au sarcome de Kaposi (KSHV)	sarcome de Kaposi, lymphome effusif primaire, maladie de Castelman	Non déterminé	

Table 1: Classification, sites privilégiés et maladies associées aux virus de l'herpès spécifiques à l'Homme.

Patient	Effets cliniques	Référence
Sain	Habituellement asymptomatique ; rarement mononucléose avec fièvre, myalgie, adénopathie, splénomégalie	(Sissons and Carmichael, 2002) (Gandhi and Khanna, 2004)
Atteint du VIH / SIDA	Rétinite ; entérocolite, œsophagite, ou gastrite	(Gallant et al., 1992)(Steininger et al., 2006)
Receveur d'organe solide	Maladie fébrile avec leucopénie et malaise ; pneumonie ; entérocolite, œsophagite ou gastrite ; hépatite ; rétinite ; autre maladie invasive tissulaire (néphrite, cystite, myocardite, pancréatite)	(Humar et al., 2006)(Sagedal et al., 2002)
Receveur cellules souches hématopoïétique	Pneumonie ; entérocolite, l'œsophagite ou la gastrite	(Li et al., 1994) (Nichols et al., 2002)(Broers et al., 2000)
Fœtus / nourrisson avec infection congénitale	Jaunisse, hépatosplénomégalie, pétéchies, microcéphalie, hypotonie, crises, léthargie, déficits sensoriels	(Fowler and Boppana, 2006)(Ross and Boppana, 2005)

Table 2: effets cliniques de l'infection par le cytomegalovirus.

b) Structure et cycle viral.

Le HCMV possède le plus grand génome parmi les herpes virus. Il est composé d'une molécule d'ADN linéaire bi-caténaire de 230 kb, contenue dans une nucléocapside de 162 capsomères, elle-même entourée par un tégument dont le composant majeur est la phosphoprotéine 65 (pp65), également appelée unique long 83 (UL83) (figure 1) (Varnum et al., 2004). L'enveloppe virale est principalement composée de glycoprotéines : les glycoprotéines B (gB, produit de UL55) et gH (UL75), et les produits des gènes UL128 et UL131 (figure 1).

Les protéines du tégument peuvent être séparées en deux classes selon leurs fonctions : (i) les protéines qui jouent un rôle structural et sont importantes pour l'assemblage des virions et la dissociation de la particule au cours de l'entrée et (ii) les protéines qui modulent la réponse de la cellule hôte à l'infection. Parmi celles-ci : la gB, la protéine pp71 (produit du gène UL82), la protéine pp150 (produit du gène UL32), la plus grande protéine de tégument (produit de gène UL48), et la pp28 codée par UL99 (Varnum et al., 2004) (voir plus loin).

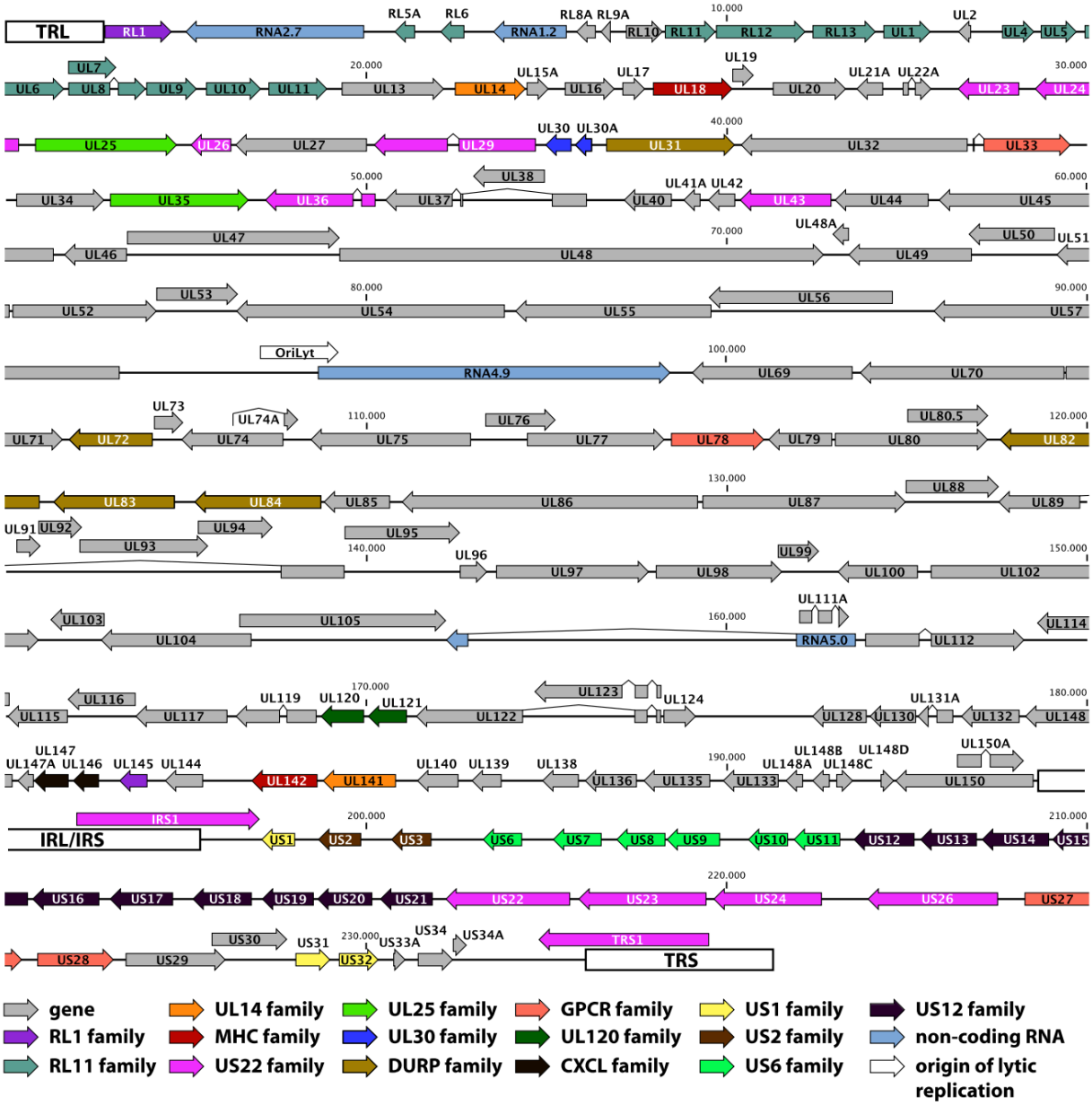


Figure 1: Annotation du génome du HCMV pour la souche Merlin (GenBank accession NC_006273).

Le génome ADNdb est visualisé en une seule ligne ; les positions sont données en paires de base (bps). Les régions répétées terminales et internes (TRL, IRL / IRS et TRS) sont indiquées avec des boîtes blanches. Les flèches représentent les gènes ; différentes familles de gènes sont désignées avec différents codes de couleur. Les quatre ARN non codants et l'origine de la réplication lytique sont également représentés (Sijmons et al., 2014).

Il a été clairement établi que les deux principaux types cellulaires constituant les muqueuses oropharyngées et génitales, les kératinocytes et les fibroblastes, permettent la réplication complète du HCMV (Hai et al., 2006). Mais, comme nous l'avons vu, de nombreux types cellulaires sont permissifs au CMV, parmi lesquels les cellules endothéliales et épithéliales.

La réplication du CMV se décompose en plusieurs étapes : dans un premier temps, l'infection de la cellule hôte puis dans un second temps l'ADN viral est transporté dans le noyau. Selon le type de cellule, le virus pénètre dans la cellule par fusion membranaire ou par endocytose dépendant du pH. Le premier processus est réalisé dans les fibroblastes et médié par le complexe protéique gH / gL / gO. L'endocytose est typique des cellules épithéliales et endothéliales et nécessite le complexe pentamère gH / gL / UL128 / UL130 / UL131 (Ryckman et al., 2008) .

Les gènes sont ensuite exprimés à 3 temps différents : très précoce, précoce et tardif. Les gènes de la phase précoce et très précoce codent notamment pour des facteurs de transcription qui sont impliqués dans l'expression des protéines des phases suivantes. Les protéines de la phase tardive seront impliquées dans la structure et l'assemblage des particules virales. L'ADN viral et les protéines néo-synthétisées de la capside sont assemblés dans le noyau. Il s'en suit une migration de la capside vers le cytoplasme et plus précisément le réticulum endoplasmique, où elle sera enveloppée par le tégument. La particule arrive ensuite vers l'appareil de golgi, et est expulsée vers l'extérieur à travers le transporteur vésiculaire en conservant une membrane contenant des glycoprotéines virales et des protéines de l'hôte. Le cycle lytique complet varie entre 48h et 72h (figure 2).

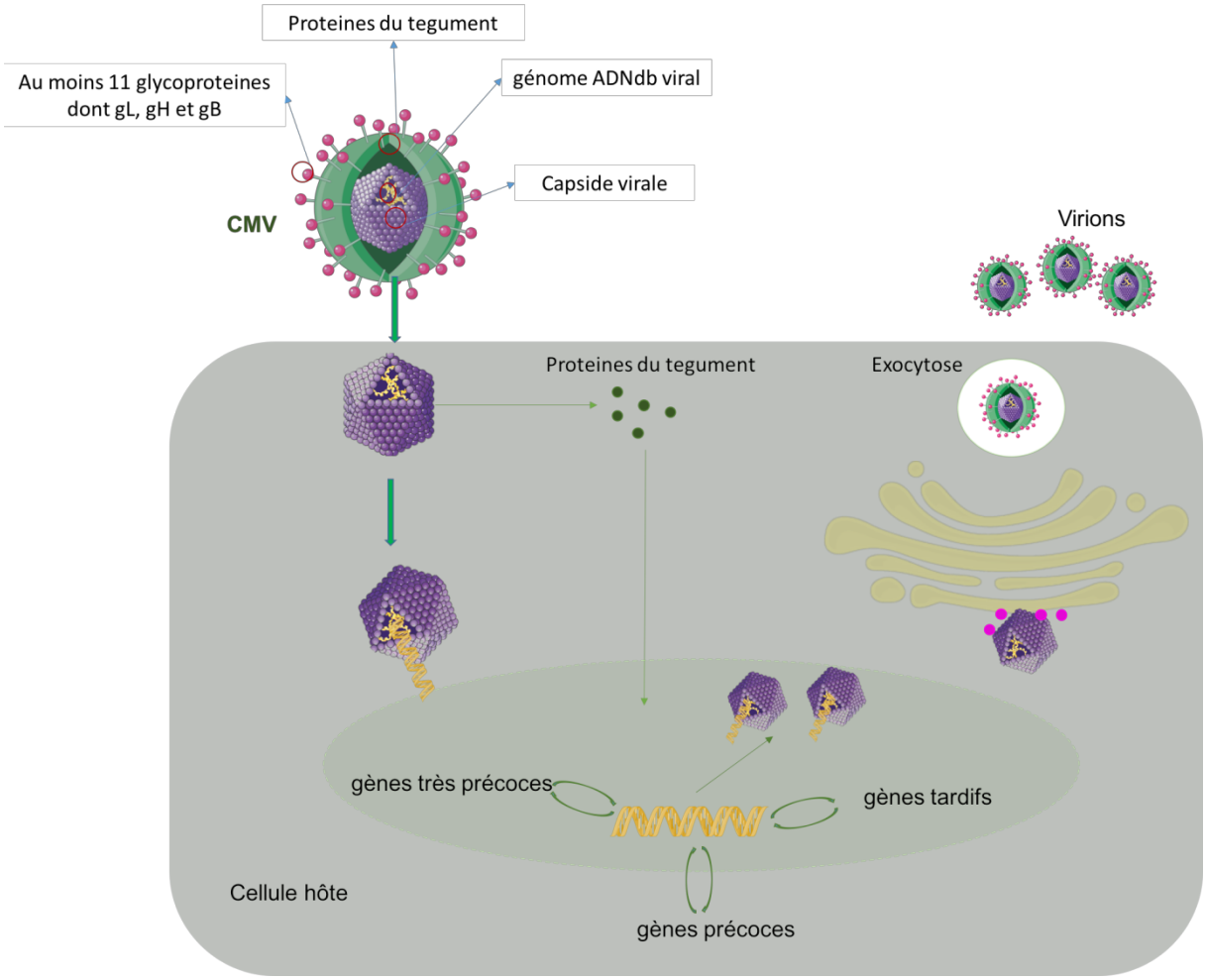


Figure 2: cycle de réplication lytique.

Les virions sont composés d'un ADN double-brin, d'une capside icosaédrique, d'une structure protéique entourant la capside appelée tégument, et d'une enveloppe lipidique dérivée de l'appareil transgolgien de la cellule hôte dans laquelle des glycoprotéines virales sont encerclées. Les particules virales entrent dans la cellule par endocytose ou fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Les protéines du tégument sont libérées dans le cytoplasme et la capside transportée jusqu'à la membrane nucléaire, où l'ADN viral est libéré dans le noyau. La réplication est ensuite initiée par l'expression des gènes très précoces qui codent des protéines responsables de l'expression des autres gènes viraux et de l'évasion immune. Il s'en suit l'expression des protéines précoces, permettant la réplication du génome viral, puis des protéines tardives, composant la capside, le tégument et les protéines de l'enveloppe. Les protéines tardives vont s'associer avec l'ADN répliqué pour former de nouveaux virions qui sont libérés par exocytose ou lyse de la cellule hôte.

Pour créer un environnement optimal à l'expression de ses gènes et sa réplication, le CMV module la cellule hôte en agissant à différents niveaux tels que l'inhibition du cycle cellulaire (Spector, 2015), de l'apoptose (Browne et al., 2001) et en contrecarrant la réponse de l'hôte que je détaillerai un peu plus loin dans mon introduction.

L'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules infectées par le HCMV est multifactoriel. Suite à l'infection par HCMV des cellules pendant la phase G0 / G1, le cycle cellulaire est bloqué avant la réplication de l'ADN cellulaire et l'expression des protéines cycline-dépendantes est déstabilisée. HCMV inhibe l'expression de la cycline D et de la cycline A, mais favorise l'accumulation de taux élevés de cycline E et de cycline B (Sanchez et al., 2003). La protéine très précoce IE1 a la capacité de bloquer le cycle cellulaire dans les phases S et G2 / M, tandis que IE2 peut bloquer le cycle à l'interface G1 / S (Castillo et al., 2000, 2005).

c) Le CMV et le cancer.

Dans les années 1970, Geder KM et ses collègues suggèrent que le HCMV peut transformer des cellules embryonnaires humaines normales in vitro (Geder et al., 1976). Des études ultérieures utilisant des cellules de rongeur normales ont montré que le HCMV peut induire des mutations dans des gènes critiques pour la transformation maligne (Boldogh et al., 1994). Depuis, une évolution des techniques de détection a permis la mise en évidence de l'ADN viral, de l'ARNm et / ou des antigènes du CMV dans différents tissus tumoraux, suggérant un rôle potentiel de l'infection à CMV dans l'étiologie des cancers. Cependant, certaines tumeurs sont exemptes d'ADN viral. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que le HCMV pouvait contribuer à l'oncogenèse par un mécanisme de « hit and run » (Shen et al., 1997). Cependant, cette hypothèse est difficile à prouver car elle suppose que les acides nucléiques viraux ne sont pas retenus dans les cellules transformées. C'est ainsi que l'équipe de Doer HW propose le concept d'oncomodulation dans lequel le HCMV peut favoriser la progression tumorale sans être un virus oncogène, expliquant ainsi la présence fréquente de HCMV dans les tissus tumoraux (Cinatl et al., 1996). Aujourd'hui, il est généralement admis que l'infection des cellules permissives normales par le HCMV n'entraîne pas de transformation maligne, de sorte que le virus n'est pas considéré comme oncogène.

En accord avec le concept d'oncomodulation, plusieurs groupes de recherche ont décrit une augmentation de la malignité des lignées cellulaires tumorales humaines infectées par le HCMV (Soroceanu et al., 2015). Cependant, le rôle oncogène du HCMV a été rediscuté dans un rapport récent, montrant que la culture à long terme des cellules épithéliales mammaires (HMEC) en présence de HCMV induisait leur transformation (Kumar et al., 2018).

En ce qui concerne le cancer colorectal, l'association du HCMV avec ce type de cancer a été évoquée pour la première fois en 1978 par Huang et Roche (Huang and Roche, 1978). En

2002, le groupe de Cobbs publie dans le journal *Lancet* la présence d'acides nucléiques et de protéines du CMV au sein de tumeurs coliques (Harkins et al., 2002). En 2016, une méta-analyse incluant 11 études conforte l'idée d'un rôle pro-tumoral du CMV dans le cadre des cancers colorectaux (Bai et al., 2016). Cependant, la relation entre CMV et cancer colorectal reste encore floue, car il existe des rapports contradictoires sur l'effet du CMV (pro- ou anti-tumoral) qui pourraient être dus à l'âge des patients. En effet, la présence du HCMV dans les tumeurs colorectales a été associée à une survie sans maladie plus courte chez les patients âgés de ≥ 65 ans (Chen et al., 2014) et à une évolution favorable chez les patients non âgés (Chen et al., 2016). Une des hypothèses évoquées pour expliquer cette différence est une implication du système immunitaire qui aurait un effet inhibiteur sur le développement des cancers dans le cas des patients plus jeunes. Cet effet pourrait être inhibé chez les patients âgés du fait de l'expression de molécules inhibitrices telles que PD-1 ou CTLA-4.

In vitro, peu d'études analysent l'impact du CMV sur les propriétés des cellules tumorales coliques humaines. Une publication très récente de l'équipe de Chan décrit une augmentation significative de la prolifération et de la viabilité des cellules HT29, SW480 infectées par le HCMV (souche AD169) in vitro (Teo et al., 2017).

d) Le CMV murin.

Les CMVs sont retrouvés chez de nombreux mammifères, et sont caractérisés par une spécificité d'espèce étroite, ce qui suggère une grande adaptation à l'hôte acquise au cours de l'évolution. Malgré cette spécificité d'espèce, ils partagent encore des similarités remarquables à la fois en termes de pathologie et d'organisation de leurs génomes. L'infection de souris par le cytomégalovirus murin (MCMV) est un modèle très utilisé pour l'étude de la pathogénèse et de la réponse immunitaire antivirale. L'ADN viral comprend 200 cadres de lecture prédits (Brocchieri et al., 2005). D'un point de vue génomique, le MCMV et le HCMV présentent 45,2% d'identité (Rawlinson et al., 1996). Parmi les protéines codées par ces gènes se trouvent des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN, à la maturation des virions ou à leur conformation. De même que pour l'infection par le HCMV, les changements pathologiques et les manifestations de la maladie au cours de l'infection par le MCMV dépendent principalement du statut du système immunitaire de la souris.

e) La spécificité d'espèces du CMV.

Plusieurs mécanismes délimitent la spécificité d'espèce d'un virus, c'est-à-dire son incapacité à se répliquer efficacement dans des hôtes hétérologues. Ces mécanismes peuvent agir à plusieurs niveau: (A) inhibition de l'entrée du virus qui se traduit par l'absence d'un récepteur d'entrée approprié sur la surface cellulaire (Baranowski et al., 2003); et/ou (B) une inhibition intrinsèque; c'est-à-dire que le virus peut infecter des cellules d'autres espèces mais nécessite des facteurs spécifiques à l'espèce pour se répliquer (par exemple des facteurs de transcription). Cette inhibition intrinsèque pourrait aussi être due à l'incapacité du virus à contrecarrer les mécanismes de défense de l'hôte. Une fois à l'intérieur de la cellule, les virus doivent en effet surmonter plusieurs défenses immunitaires intrinsèques afin de se répliquer et de se propager efficacement. Ceux-ci comprennent la signalisation des récepteurs de type Toll (Tabeta et al., 2004), le déclenchement de la réponse interféron (Hengel et al., 2005), l'activation des réponses au stress cellulaire (Gaspar and Shenk, 2006) et l'induction de l'apoptose (Goldmacher et al., 1999).

Pour les CMV, on sait qu'ils peuvent infecter des cellules d'autres espèces ; il n'y a donc pas de récepteur spécifique à l'espèce qui limiterait une infection inter-espèce. Plusieurs analyses de la spécificité des espèces CMV ont indiqué que la restriction de la cellule hôte à la réplication du CMV observée dans les cellules non permissives est le résultat d'un blocage de l'expression du génome viral et non d'un défaut d'entrée dans les cellules (Kim and Carp, 1972) (Fioretti et al., 1973)(Plummer, 1973) (Lafemina and Hayward, 1988). En 2006, Jurak et al. montrent que l'apoptose constitue une barrière importante de l'infection inter-espèce (Jurak et al. Embo J, 2006).

L'adaptation des CMV à une espèce spécifique est encore plus prononcée au niveau de l'animal (in vivo). Ces virus codent pour un grand nombre de facteurs immunomodulateurs qui augmentent l'efficacité de l'infection, la propagation, la réactivation et l'infection persistante chez l'hôte, modulant à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative. Au cours de l'évolution, les systèmes immunitaires des différentes espèces ont divergé quelque peu, et les virus ont co-évolué avec leurs hôtes et acquis des mécanismes spécifiques qui parfois ne fonctionnent pas dans d'autres espèces.

III- Réponse de l'hôte à l'infection par le CMV.

a) Réponse cellulaire intrinsèque.

1. Présentation des interférons.

Décrits par Isaacs et Liednmann en 1957 en tant que protéines inhibant la réplication virale (Isaacs and Lindenmann, 1957), les interférons (IFN) sont produits au tout début des infections, dans le but de bloquer la propagation de l'infection virale dans l'organisme. En plus de leurs effets antiviraux, les IFNs ont des effets plus profonds sur de nombreux aspects de la physiologie cellulaire (Sen, 2001). Toutes ces actions des IFNs sont assurées par des centaines de protéines induites par l'IFN qui ne sont généralement pas synthétisées dans les cellules au repos. Les IFNs appartiennent au réseau complexe des cytokines et sont impliqués dans la réponse immunitaire. Ils sont naturellement produits par les cellules du système immunitaire, mais également par d'autres types cellulaires (fibroblastes, cellules épithéliales, etc.) en fonction des sous types.

Il existe trois types d'IFN, les types I, II (Kotenko, 2011) et III (Uze and Monneron, 2007); ils présentent des modes d'expression distincts et différents rôles dans l'immunité antivirale. Dans ce manuscrit, je porterai mon attention sur les IFN de type I dits « antiviraux » (Takaoka and Yanai, 2006).

Les interférons de type I (IFN α / β) forment une famille de cytokines apparentées comprenant INFα, β, ε / σ, φ, ξ (humain) et limitin (souris) (Krause and Pestka, 2005). La sécrétion d'IFN I constitue un élément clé de la réponse cellulaire intrinsèque, déclenchée après l'entrée du virus. Les IFN α / β exercent une activité antivirale puissante, de contrôle de prolifération cellulaire et de modulation du système immunitaire. Ils stimulent les cellules de manière autocrine et paracrine, voire de manière endocrine, et activent un statut antiviral global (figure 3)(Sen, 2001).

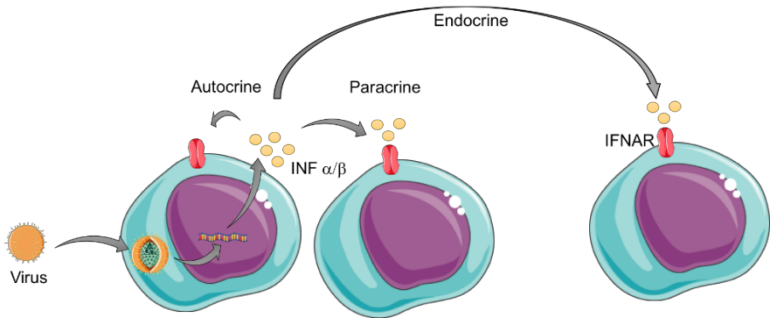


Figure 3: Stimulation des cellules par les IFN-α/β.

Suite à une infection virale, les cellules synthétisent et secrètent les IFN-α/β qui vont stimuler, par l'intermédiaire d'un récepteur de surface IFNAR, la cellule elle-même ainsi que les cellules avoisinantes. Ils vont ainsi y induire un état cellulaire antiviral et limiter la dispersion du virus au sein du tissu.

2. Mécanisme d'induction de l'IFN type I par le HCMV.

Une des premières lignes de défense de la cellule hôte est la détection de l'agent pathogène lors de l'entrée de ce dernier dans la cellule. Les cellules expriment un certain nombre de PRR (Takeuchi and Akira, 2010) qui détectent des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes étrangers (PAMP) avec le potentiel de déclencher des réponses immunitaires innées profondes. Le CMV induit plusieurs réponses de l'immunité innée chez les patients immunocompétents et immunodéprimés. Cette induction est rapide et ne nécessite pas de transcription des particules virales (Isaacson et al., 2008).

Après infection de la cellule par les particules virales, le virus libère son génome dans le cytoplasme (figure 4-1). La détection de l'ADN viral est une stratégie centrale par laquelle l'hôte détecte l'infection et déclenche une immunité protectrice. Plusieurs récepteurs sont impliqués dans cette détection d'ADN viral tel cGAS, l'IFI16, et l'ADN-PK. Ils activent la signalisation innée conduisant à la transcription de l'IFN et d'autres cytokines antivirales (Wu and Chen, 2014). Un régulateur central de la détection de l'ADN cytosolique est la GMP-AMP cyclique (cGAMP) synthase (cGAS). Cette dernière est une nucléotidyl transférase décrite comme étant régulée positivement par l'IFN et possédant une large activité antivirale (Sun et al., 2013). Une boucle d'activation au sein de cette molécule lie l'ADNdb indépendamment de

la séquence et subit des réarrangements qui favorisent la dimérisation de cGAS (Zhang et al., 2014). Ensuite cGAS catalyse la production de cGAMP, une petite molécule, qui à son tour se lie à la protéine adaptatrice, STING, située au niveau du réticulum endoplasmique (RE). STING activé interagit avec TBK1, phosphorylant par la suite IRF3. L'IRF3 phosphorylée se dimérise et se déplace dans le noyau favorisant ainsi la transcription de l'IFN-β et des gènes de réponse à l'IFN (ISG)(Lio et al., 2016).

L'IFNα / β sécrété se lie à son récepteur sur les cellules cibles, déclenchant une cascade de signalisation impliquant deux membres de la famille Janus kinase (Jak1 / Tyk2) et des transducteurs de signal (STAT1 / STAT2) (Aaronson and Horvath, 2002). Après phosphorylation de la tyrosine de STAT2 et STAT1 par Jak1 et Tyk2, respectivement, les protéines STAT s'hétérodimérisent et se déplacent vers le noyau, où elles se lient au facteur de régulation de l'IFN 9 (IRF9) pour former ISGF3. L'ISGF3, à son tour, se lie spécifiquement à la séquence ISRE induisant ainsi la transcription de plusieurs gènes de la famille ISG (figure 4-2).

Toutes les étapes du cycle viral, l'entrée, la transcription, la maturation, et la génération des virions, peuvent être inhibées par les IFN de type I. Cependant l'IFN n'agit pas directement mais induit la transcription de différents gènes codant pour des protéines qui ont des effets antiviraux. Il induit plus de 200 protéines dont les fonctions sont loin d'être toutes décrites. Parmi ces gènes, on trouve une batterie de gènes cellulaires qui vont avoir un impact sur la réplication virale, tel la protéine kinase dépendante de l'ARN db PKR (García et al., 2007), la 2'-5' oligo-adénylate synthétase/ RNaseL (OAS) (Bisbal and Silverman, 2007) et les protéines associées au domaine nucléaire ND10.

Ces protéines agissent à diffèrents niveaux, par exemple la protéine PKR s'active par autophosphorylation, puis elle phosphoryle le facteur d'initiation de la synthèse protéique eIF2a. En phosphorylant eIF2a, elle le rend inactif, bloquant ainsi l'induction de la traduction (García et al., 2007). Quant à la voie 2'5'A synthétase/RNaseL, deux enzymes sont mises en jeu : la 2'5'oligoAdénylate synthétase et la RNase L. Suite à son activation par de l'ARNdb, la OAS catalyse à partir de l'ATP la synthèse d'oligoadénylates (2'5'A) ayant une liaison phosphodiester 2'-5' avec un résidu triphosphate en position 5' (Hovanessian and Justesen, 2007). Le rôle connu des 2'5'A est l'activation d'une endoribonucléase constitutive, la RNase L, qui dégrade uniquement, mais sans aucune spécificité, les ARN simple brin et conduit ainsi

à l'inhibition de la synthèse protéique. Ces ARN issus de l'activité de la RNase L ont été impliqués à leur tour dans la production d'IFN (Malathi et al., 2007).

Durant ma thèse nous nous sommes intéressés plus particulièrement au domaine ND10, décrit ci-après, de par son importante implication dans les réponses intrinsèques antivirales.

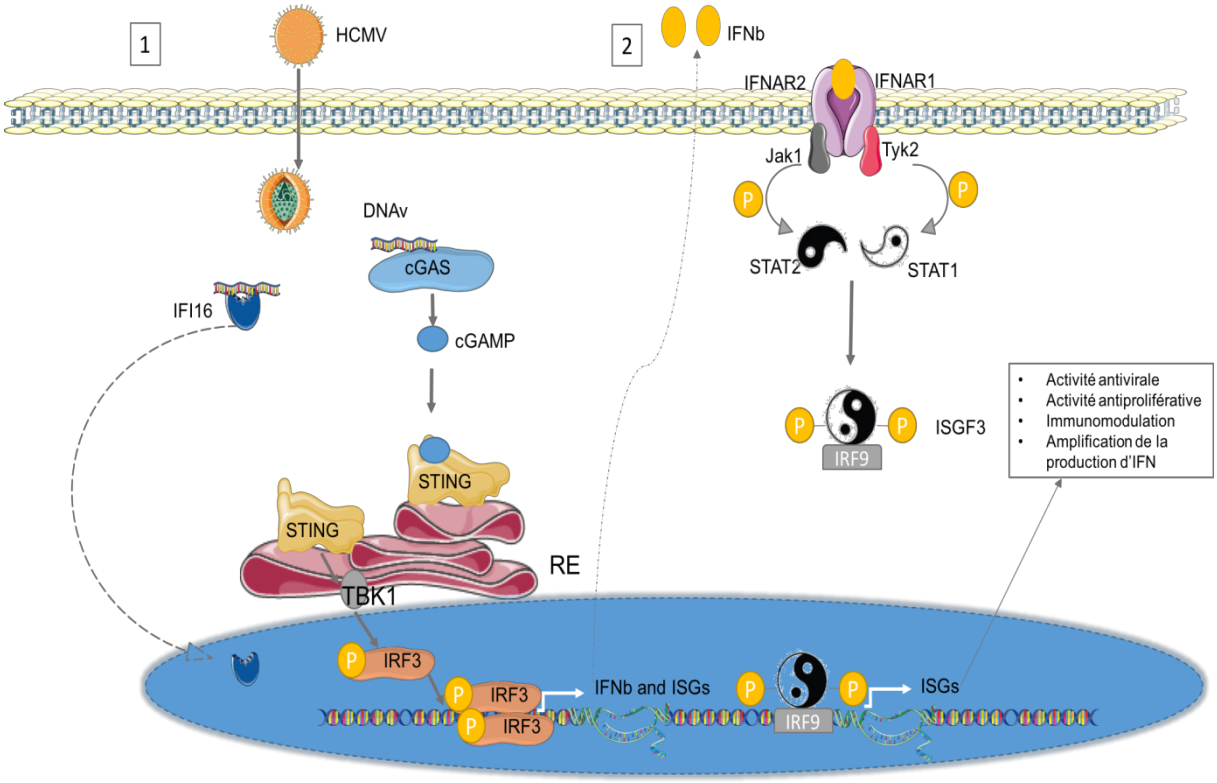


Figure 4: Représentation schématique de la voie de détection du HCMV intracellulaire et de la signalisation par l'IFN.

(1) Le HCMV libère son génome dans le cytoplasme, où résident les capteurs innés des acides nucléiques. Le récepteur cGAS reconnaît l'ADNdb et catalyse la synthèse de cGAMP, l'agoniste primordial de la protéine adaptatrice STING. Un autre capteur, IFI16, peut recruter STING en réponse à l'ADN cytoplasmique, grâce à un mécanisme moléculaire qui reste à décrire. STING stimule les cascades de signalisation en aval qui impliquent plusieurs kinases et conduisent finalement à la phosphorylation de IRF3 et à la translocation nucléaire. La principale conséquence de ces voies de détection du virus est l'induction de gènes stimulés par l'IFN de type I et l'IFN. (2) Apres sécrétion, l'IFN se fixe à un récepteur hétérodimérique composé des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 et active Jak1 et Tyk2. Les facteurs STAT1 et STAT2, phosphorylés par ces kinases forment un hétérodimère qui s'associe ensuite avec le facteur IRF9 (aussi dit p48) pour former le complexe ISGF3. Translocalisé dans le noyau, il active la transcription de plus de 300 gènes (ISG) impliqués dans la défense antivirale, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la modulation de la réponse immune ou l'amplification de la production d'IFN.

3. *Une voie régulée par l'IFN : la Voie ND10.*

Les domaines nucléaires 10 (ND10), aussi appelés les corps PML et POD, consistent en une agrégation de plusieurs protéines, notamment PML et Sp100. PML est primordial pour la formation de ND10 et pour le recrutement d'autres protéines tels SP100 et Daxx.

La protéine Sp100 a été identifiée comme la première composante de ND10 en utilisant des sérums de patients atteints de la maladie auto-immune appelée cirrhose biliaire primaire (CBP) (Szostecki et al., 1990). Ensuite, PML a été découverte comme facteur déterminant de ND10. Elle fonctionne comme une sorte de protéine d'échafaudage responsable de l'assemblage et de la maintenance des PML-NB et recrutant d'autres protéines associées à ND10 comme hDaxx (Ishov et al., 1999)(Zhong et al., 2000). Etant la composante clé du complexe du ND10, la perte de PML conduit à une dispersion des protéines résidant dans ND10 comme observé dans les fibroblastes PML-null ou les fibroblastes humains PML-kd (Everett et al., 2006).

La protéine PML connue aussi sous le nom TRIM9 a été identifiée chez des patients atteints de leucémie aigue promyélocytaire (APL)(Kakizuka et al., 1991). Cette protéine appartient à la famille de motifs RBCC (TRIM); elle est composée d'un domaine circulaire en doigt de zinc, d'une ou deux boîtes B (motifs riches en cystéine / histidine) et d'un domaine α-hélicoïdal (Jensen et al., 2001).

Comme décrit dans la figure 5, le gène PML et le gène sp100 sont directement induits par l'IFN. Leurs promoteurs contiennent les éléments de réponse à l'IFN de type I (ISRE) et à l'IFN de type II (Gas). Les souris déficientes en PML sont viables mais l'apoptose induite par l'IFN est réduite (Wang et al., 1998).

Les structures ND10 pourraient illustrer des agrégations de protéines qui compromettent la croissance des virus et qui sont donc ciblées par le virus pour être inactivées. ND10 est un puissant mécanisme de défense antivirale intrinsèque de la cellule qui lutte efficacement contre les infections à CMV. En effet les trois principales composantes de ND10, la PML, la Sp100 et le hDaxx constituent des facteurs d'hôte ayant des activités antivirales. Ceci est clairement confirmé par la démonstration d'une infection accrue du HCMV en l'absence de l'un de ces constituants basiques du ND10 (Tavalai et al., 2006).

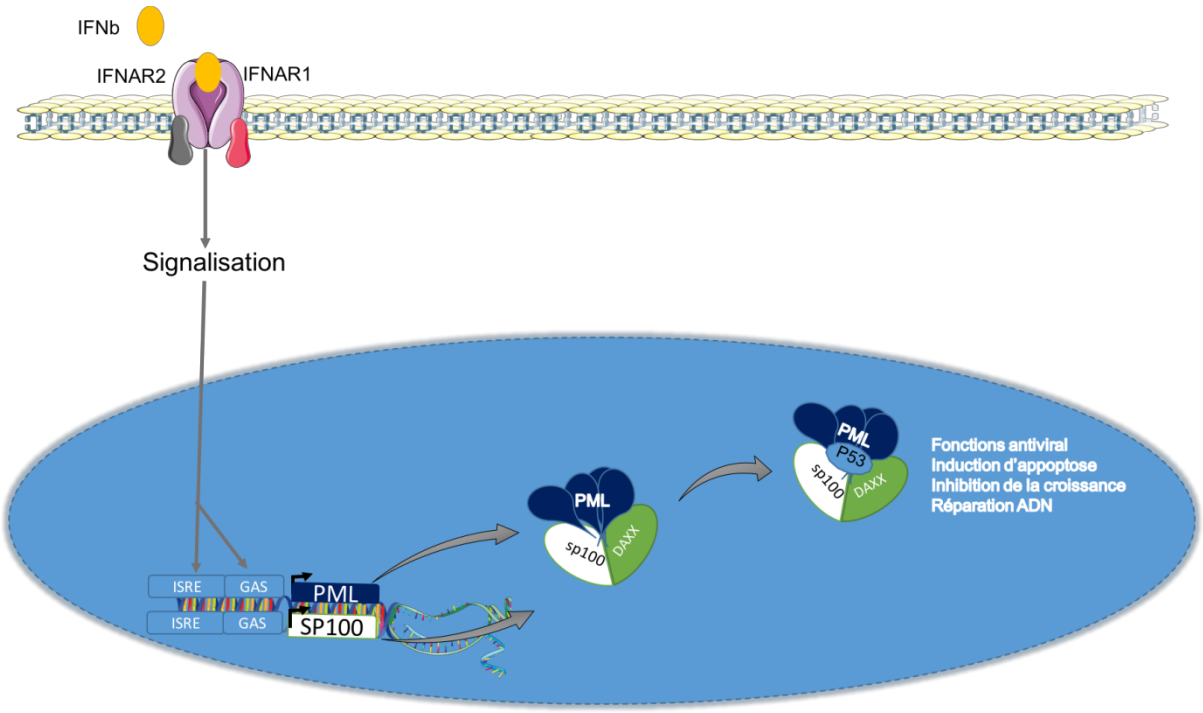


Figure 5: Représentation schématique de la voie ND10.

Induit par l'IFN de type I, PML permet le recrutement d'autres protéines telles que Daxx et SP100. Ce complexe est impliqué dans différents processus cellulaires dont l'apoptose, la sénescence, la différenciation, la stabilité génomique, la réponse à l'IFN et la défense antivirale.

b) Acteurs immunitaires de la réponse anti-CMV.

La réponse immunitaire contre le CMV est à la fois humorale et cellulaire. La figure 6 présente les principaux acteurs de la réponse immunitaire anti-CMV.

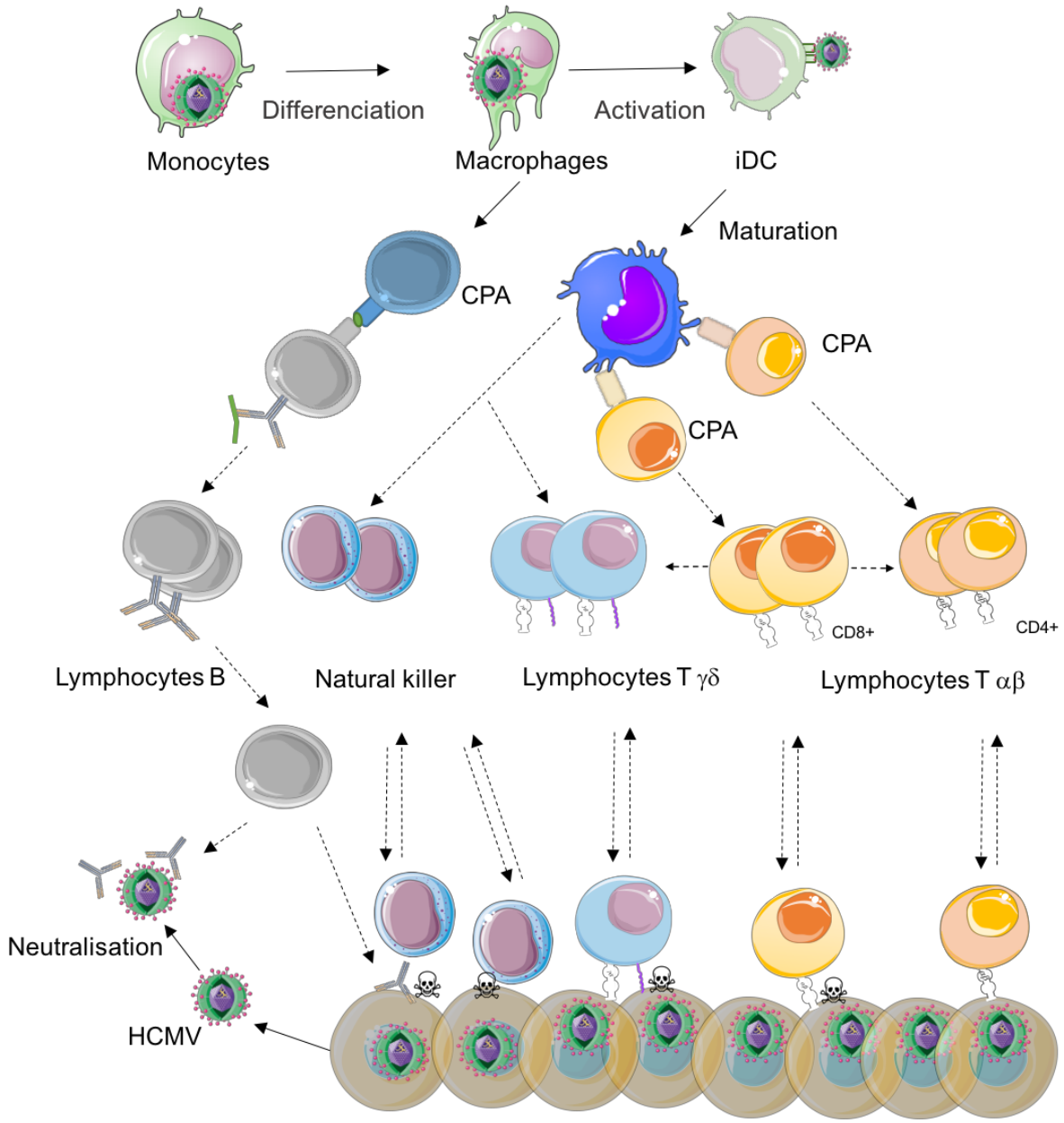


Figure 6: Schéma global de la mise en place des différents effecteurs de la réponse immune spécifique du HCMV.

Suite à une primo-infection et à la reconnaissance de PAMP issus du HCMV, les macrophages et les DC sont activés via leur TLR. Ceci induit la sécretion des cytokines pro-inflammatoires qui déclenchent l'activation des cellules NK et des lymphocytes T γδ (LT γδ). La reconnaissance directe des cellules infectées par le HCMV exprimant des ligands de stress stimulent les cellules NK et LT γδ. La présentation d'antigènes viraux via les molécules HLA-I et -II aux LT naïfs αβ CD8+ et αβ CD4+, respectivement, induit leur activation. La capture et la présentation d'Ag du HCMV par les lymphocytes B (LB) aux LT αβ CD4+ permettent leur co-activation. Cela induit leurs expansions. Suite à leur activation, les fonctions effectrices des éléments immuns de la réponse immune anti-HCMV se mettent en place. Les cellules NK, T αβ CD8+ et T γδ peuvent lyser et éliminer les cellules infectées par le HCMV. Elles peuvent également contrôler la réplication du HCMV par la sécrétion de cytokines anti-virales (IFN-γ, TNF-α), tout comme les LT αβ CD4+. Les Lymphocytes B se différencient en plasmocytes, qui vont sécréter des Ac

spécifiques du HCMV. Ces Ac ont pour fonctions soit de lier des proteines de l'enveloppe virale et neutraliser la dissémination du virus au sein de l'organisme, soit d'opsoniser les cellules infectées et favoriser leur élimination par ADCC via des cellules effectrices NK CD16+.

(i) Réponse Innée.

La réponse immunitaire innée dirigée contre le CMV joue un rôle important dans la régulation de l'infection virale.

1. Les cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques (DC), rapidement activées après une infection, sont la principale source d'interférons de type I (IFN-α / β) lors de l'infection virale chez l'homme (Siegal et al., 1999). Plus particulièrement, les sous-populations CD141+ et CD1c+ jouent un rôle prépondérant dans la réponse précoce et le déclenchement des réponses immunitaires innées et adaptatives dirigées contre le HCMV. En plus de leurs capacités de secréter des cytokines antivirales dont l'IFN-α / β et l'IL-12, les DC CD141+ et CD1c ont la capacité à présenter et cross-présenter des antigènes aux lymphocytes T $\alpha\beta$ (Jongbloed et al., 2010)(Bachem et al., 2010).

2. Les cellules NK.

Les cellules natural killer ou NK sont des lymphocytes cytotoxiques impliqués dans une réponse non spécifique contre les cellules tumorales et les pathogènes lors d'une infection (Vivier et al., 2008). En tant que premiers répondeurs parmi les lymphocytes, les cellules NK doivent être capables de réagir rapidement à une grande variété de stimuli, impliquant un effet cytolytique rapide qui nécessite un mécanisme de contrôle finement régulé. La capacité à épargner les tissus normaux, mais pas les cellules transformées, est connue sous le nom de « missing self » , proposé il y a plus de 25 ans par Ljunggren et Karre (Ljunggren and Kärre, 1990). Ce phénomène est déterminé par des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules HLA-I ou apparentées aux molécules HLA-I qui dominent fonctionnellement les potentiels de déclenchement induits par les récepteurs activateurs qui reconnaissent généralement des signaux de stress à la surface des cellules cibles. En effet, les cellules NK expriment plusieurs récepteurs et co-récepteurs régulant leur activité, dont des protéines activatrices telles que

NKG2D, et des récepteurs inhibiteurs tels que les KIR (Killer Immunoglobulin-like receptor) (Orr and Lanier, 2010). L'ensemble de ces récepteurs agit en synergie, permettant aux cellules NK de reconnaître les menaces potentielles et de coordonner les réponses avec d'autres cellules immunitaires. Le fait qu'une cellule NK attaque ou tolère une cellule tumorale ou une cellule cible infectée dépend de l'équilibre net des signaux transmis par ce groupe de récepteurs. Si les signaux d'activation prévalent, les cellules NK peuvent tuer la cellule cible par lyse ou induction de l'apoptose et / ou peuvent sécréter des cytokines et des chimiokines pour activer d'autres branches du système immunitaire (Kadri et al., 2016). Bien que les cellules NK expriment différentes combinaisons de récepteurs, ils sont normalement maintenus dans un état de repos *in vivo* par des signaux inhibiteurs reçus principalement de molécules de HLA-I autologues.

L'implication des cellules NK dans la réponse immunitaire contre le CMV chez l'homme a été premièrement décrite par Biron et al. en 1989 (Biron et al., 1989). Mais ces résultats n'ont jamais été confirmés. Plus tard, l'infection par le CMV humain a été caractérisée par l'accumulation de sous-ensembles hautement différenciés de cellules NK. En effet, Il y a plus de dix ans, Guma et al. décrivent une accumulation des cellules NK matures exprimant CD94 / NKG2C+ chez des individus HCMV+ (Gumá et al., 2004). Cette augmentation a également été observée dans divers contextes pathologiques d'infection à HCMV en corrélation avec une protection contre la maladie à HCMV, plus précisément chez les patients greffés de CSH (Foley et al., 2012), les receveurs d'organes (Redondo-Pachón et al., 2017), les femmes enceintes primo-infectées ou ayant eu une réactivation virale durant leur grossesse (Bayard et al.). L'induction de NK CD57+NKG2C+ semble spécifique au HCMV puisqu'elle n'a pas lieu lors d'une infection par l'EBV (Hendricks et al., 2014). Le contrôle du HCMV par les cellules NK est médié soit par la production de cytokines inflammatoires (IFN-γ, TNF-α) soit par lyse directe et indirecte - par ADCC - des cellules infectées suite à leur reconnaissance (Costa-Garcia et al., 2015).

(ii) Réponse adaptative.

1. *La réponse humorale.*

La réponse humorale joue un rôle important dans la lutte contre l'infection virale. En effet la majorité de la réponse humorale est dirigée contre des protéines présentes sur l'enveloppe virale telles que : gH/gL/UL128/UL130/UL131A, et une petite fraction contre gB ou les complexes gH/gL. En réalité une faible proportion des anticorps anti-HCMV sont impliqués dans la neutralisation des particules virales. Ceux qui le sont empêchent l'attachement - et ainsi l'entrée - du HCMV dans leur cellule hôte *in vitro* (Fouts et al., 2012). Un grand ensemble d'anticorps monoclonaux neutralisants (MAb), dirigés contre gH, gB et de multiples composants du pentamère, ont été développés ; ils neutralisent l'entrée du virus dans les cellules épithéliales et ainsi la dissémination des particules virales dans l'environnement (Cui et al., 2017). Cependant, ces anticorps ne vont pas empêcher la transmission virale par contact cellulaire, processus très important de la propagation du CMV. En effet, aucun anticorps neutralisant ne semble prévenir la dissémination virale au sein de fibroblastes *in vitro* (Cui et al., 2017).

Concernant le rôle du complément dans le contrôle de l'infection au HCMV, les recherches sont peu nombreuses. Néanmoins, il a été montré que les protéines du complément sont impliquées dans le contrôle de l'infection à HCMV chez les patients ayant développé des anticorps neutralisants circulants anti-HCMV (Ohta et al., 2009).

2. *Réponse des lymphocytes T αβ.*

1) Généralités.

Les lymphocytes T sont constitués de 2 sous-populations : les lymphocytes T αβ et les lymphocytes T γδ. Les lymphocytes T αβ ont été largement étudiés et sont considérés comme les LT « conventionnels ». Les lymphocytes T αβ forment une partie essentielle du système immunitaire adaptatif et ont un certain nombre de fonctions, y compris la fonction « helper », la cytotoxicité et la régulation.

Contrairement aux anticorps, qui peuvent se lier directement aux antigènes, le récepteur T (TCR) αβ ne reconnait pas les éléments étrangers sous leur forme native : les antigènes doivent d'abord être dégradés à l'intérieur d'une cellule, apprêtés puis exposés à sa surface par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Townsend and Bodmer, 1989). Chez les humains, le locus du CMH est appelé locus de l'antigène des leucocytes humains (HLA), tandis que chez les souris, il est appelé complexe d'histocompatibilité 2 (H-2). Ces

molécules du CMH sont des récepteurs de surface liés à la membrane sur des cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques et les macrophages.
Les lymphocytes T conventionnels sont classés par leur expression des corécepteurs CD4+ ou CD8+.

Les lymphocytes T CD8+, plutôt décrits comme cytotoxiques, reconnaissent les peptides présentés par les molécules du HLA-I, trouvées sur toutes les cellules nucléées. Ils jouent un rôle primordial dans les infections virales (Wherry and Ahmed, 2004). L'hétérodimère CD8 se lie à une partie conservée (la région α3) du HLA-I (HLA-A, B et C chez l'homme) lors des interactions lymphocyte T/antigène-cellule présentatrice. Lorsqu'un lymphocyte T CD8+ reconnaît son antigène et s'active, il dispose de trois mécanismes majeurs pour tuer les cellules infectées ou malignes. Le premier est la sécrétion de cytokines, principalement le TNF-α et l'IFN-γ, qui ont des effets anti-tumoraux, anti-viraux et anti-microbiens. La deuxième fonction majeure est la production et la libération de granules cytotoxiques. Ces granules, également présents dans les cellules NK, contiennent deux familles de protéines, la perforine et les granzymes. La perforine forme un pore dans la membrane de la cellule cible, semblable au complexe d'attaque de la membrane du complément. Ce pore permet aux granzymes également contenus dans les granules cytotoxiques d'entrer dans la cellule infectée ou maligne. Les granzymes sont des sérines protéases qui clivent les protéines à l'intérieur de la cellule, arrêtant la production de protéines virales et aboutissant finalement à l'apoptose de la cellule cible (figure 7).

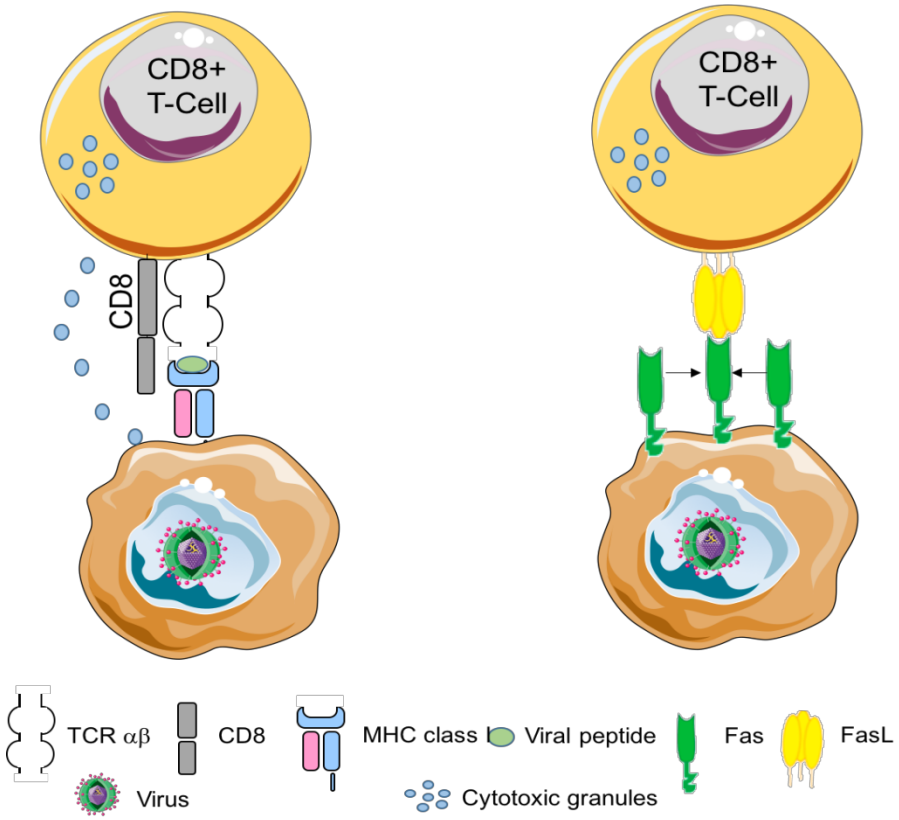


Figure 7: Mécanismes d'activation des lymphocytes T αβ CD8+.

Suite à une infection, la cellule infectée induit l'activation des lymphocytes T αβ via la reconnaissance TCR et HLA-I + peptide viral ou via l'interaction Fas récepteur et FasL exprimé à la surface des cellules infectées. Une fois activés, les lymphocytes T αβ sécrètent des granules cytotoxiques dans le but d'éliminer ces cellules infectées.

Les granules cytotoxiques sont libérés uniquement dans la direction de la cellule cible, alignés le long de la synapse immunitaire, pour éviter les dommages occasionnés non spécifiques aux tissus sains environnants. La troisième fonction majeure des lymphocytes T CD8+ est la destruction des cellules infectées *via* les interactions Fas / FasL. Les lymphocytes T CD8+ activées expriment FasL sur la surface cellulaire, qui se lie à son récepteur, Fas, sur la surface de la cellule cible. Cette liaison provoque la trimérisation des molécules Fas sur la surface de la cellule cible, ce qui permet de rassembler les molécules de signalisation. Ces molécules de signalisation entraînent l'activation de la cascade des caspases, ce qui entraîne également l'apoptose de la cellule cible.

Les lymphocytes T CD4+ aussi dit auxiliaires, produisent également des cytokines et des chemokines et participent au recrutement d'éosinophiles, de basophiles et de neutrophiles sur le site de l'inflammation (Zhu and Paul, 2008). Ils reconnaissent les peptides générés par les pathogènes extracellulaires présentés par les molécules du CMH de classe II, qui se trouvent sur les cellules présentatrices d'antigènes (APC), et peuvent être subdivisées en sous-populations de lymphocytes T auxiliaires, en fonction du profil des cytokines qu'elles produisent.

2) Place des lymphocytes T dans la réponse anti-CMV.

L'infection primaire à CMV est caractérisée par une réplication virale intense et une réponse profonde des lymphocytes T pouvant durer plusieurs mois (Antoine et al., 2012). Les lymphocytes T spécifiques du HCMV sont identifiables en moyenne 7 jours après la détection de l'ADN viral dans le sang (Rentenaar et al., 2000). Ils jouent un rôle central dans la résolution de l'infection primaire aiguë et la maintenance de la mémoire à long terme au cours de la latence virale. La lyse des cellules infectées par le CMV est principalement assurée par les lymphocytes T CD8+, bien que les lymphocytes T CD4+ aient également cette capacité. Le HCMV a un impact important sur le répertoire des TCR des lymphocytes T.

Depuis longtemps les études chez l'homme et la souris ont montré le rôle central des lymphocytes T CD8+ dans la réponse antivirale (Quinnan et al., 1984) (Riddell et al., 1992)(Davignon et al., 1996)(Gamadia et al., 2003) (Krmpotic et al., 2003). Au cours de l'infection primaire par le HCMV, les lymphocytes T CD8+ sont activés, prolifèrent et se différencient pour devenir des lymphocytes effecteurs et mémoires. L'activation et la différenciation des lymphocytes T CD8+ au cours de l'infection virale sont associées à l'expression de marqueurs membranaires spécifiques. En effet Appay et al. ont suivi le phénotype des lymphocytes T CD8+ au cours de l'infection par quatre virus : le VIH, l'EBV, le virus de l'hepatite C (HCV) et le HCMV. Cette étude a permis de montrer que contrairement au trois autres virus, les lymphocytes T CD8+ anti-HCMV vont avoir préférentiellement un phénotype effecteur/mémoire (Appay et al., 2002). Un lymphocyte T CD8+ naif (CD45RA+, CD28+, CD27+, CD62L+, CCR7+) va rencontrer l'antigène. A ce moment, deux phénotypes bien

distincts vont apparaitre : les centraux mémoires (CD45RO+, CD28+, CD27+, CD62L+, CCR7+) et les effecteurs mémoires. Ces derniers subissent 3 étapes de différenciation : précoce (CD45RO+, CD28-, CD27+, CD62L+/-, CCR7-) ensuite tardive (CD45RO+, CD28-, CD27+/-, CD62L+, CCR7-) et enfin terminale CD45RA+ ou dit aussi TEMRA (CD45RA+, CD28-, CD27-, CD62L-, CCR7-).

Les lymphocytes T effecteurs / mémoire CD8+ possèdent une activité cytotoxique et la capacité de libérer des facteurs ayant une action antivirale, tels que l'interféron-γ (IFN-γ) (Hamann et al., 1997). Dans les infections virales persistantes, l'expression de HLA-DR sur les lymphocytes T CD8+ reflète l'activation immunitaire (Rich et al., 1997).

Les réponses de lymphocytes T CD8+ à l'infection par le HCMV restent majoritairement dirigées contre des épitopes immunodominants issus des protéines virales UL123 (IE72) et UL83 (pp65) (Sylwester et al., 2016). Parmi les autres antigènes induisant une réponse cellulaire cytotoxique : la protéine gB et les phosphoprotéines pp150, mais ces réponses ne sont observées que chez une partie des patients (Gyulai et al., 2000) (ENGSTRAND et al., 2003).

Pendant longtemps les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8+ semblaient être les cellules les plus importantes dans la réponse anti-HCMV. Cependant en 2005, Sylvester et al. ont publié une analyse complète de la reconnaissance des antigènes du HCMV par les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Ces auteurs ont ainsi montré qu'environ 4% de la population CD4+ totale reconnait des peptides du HCMV, et qu'environ 9,1% des CD4+ mémoires sont dirigés contre le HCMV (Sylwester et al., 2005) et au cours de la dernière décennie, les lymphocytes T CD4+ ont été impliquées dans la réponse cytotoxique spécifique au HCMV (Mason et al., 2013). De nombreuses études montrent que les deux peptides antigéniques majeurs reconnus par les lymphocytes T CD4+ sont IE1 et pp65 (Gyulai et al., 2000). Mais pas uniquement, plus de 50% des individus séropositifs pour le HCMV développent des réponses T CD4+ dirigées contre des épitopes issus des protéines virales UL55 (gB), UL83 (pp65), UL86 (MCP), UL99 (pp28) et UL122 (IE86) (Sylwester et al., 2005). Différentes études ont montré que lorsque des lymphocytes T CD4+ issus d'individus sains sont mis au contact de lysats de HCMV, on observe une augmentation d'une sous-population T CD4+ particulière : CD45RO+, CD27- CD62L- $CD11a^{high}$ et CCR7-. Cette population est spécifique de la réponse T CD4+ dirigée contre le HCMV. Ces LT CD4+ vont sécréter majoritairement de l'IFN-γ, et du TNF-α.

IV- Les mécanismes d'expression des molécules HLA.

(a) Expression et Structure des molécules HLA-I.

Comme décrit ci-dessous, la capacité des lymphocytes T CD8+ à détecter les tumeurs ou les pathogènes intracellulaires nécessite un affichage étendu de peptides antigéniques par le CMH de classe I sur la surface de la cible potentielle. Les molécules HLA-I vont avoir pour rôle principal de présenter des peptides antigéniques endogènes.

Cette présentation est atteinte en fusionnant deux voies distinctes : une permet de générer les molécules HLA-I dans le réticulum endoplasmique (RE) et une autre de générer le pool de peptides antigéniques dans le cytoplasme. Ces deux étapes sont très liées. En effet, les peptides cytoplasmiques sont transloqués dans le RE par le transporteur associé au traitement antigénique (TAP) et sont mis à la disposition des molécules du HLA-I.

La voie qui génère le HLA-I réceptif au peptide implique plusieurs étapes et plusieurs composantes clés.

Les molécules HLA-I consistent en une glycoprotéine intégrée à la membrane, qui est le produit polymorphique de l'un des gènes de classe I du CMH. La région extracellulaire de la chaîne lourde se divise en trois domaines (α 1, α 2 et α 3), et la β2-microglobuline (β2m) (Jones, 1997). Les domaines α 1 et α 2 forment le site de liaison peptidique : il s'agit d'un sillon sur la surface supérieure de la molécule du CMH de classe I, qui se lie aux peptides antigéniques de 8 ± 10 acides aminés. Les molécules HLA présentent des peptides dérivés de toutes les protéines, parmi lesquelles des protéines virales ou mutées. En effet une cellule saine généralement présente des molécules dite du soi. Et d'une manière surprenante, la majorité des peptides présentés par les molécules du CMH de classe I ne sont pas dérivés du renouvellement des anciennes protéines. Au lieu de cela, la plupart des peptides présentés par les molécules du CMH de classe I sont dérivés de produits de traduction ribosomiques défectueux, qui sont dégradés par les protéasome (Rock et al., 1994). Mais suite à une infection, les cellules infectées telle que les fibroblastes, les DC, les cellules endothéliales… dans le cas du CMV, vont présenter les peptides des protéines virales qui se trouvent dans le cytoplasme. Quelle que soit la cellule, infectée ou non, le mécanisme de chargement des molécules HLA à la surface est comme décrit ci-dessous.

Les molécules du CMH classe I s'assemblent au sein du réticulum endoplasmique. Par conséquent, il est nécessaire de transporter les peptides du cytosol vers la lumière du RE grâce

au récepteur TAP (Abele and Tampé, 1999). TAP agit également comme un échafaudage pour l'étape finale de l'assemblage des molécules du HLA-I, plus précisément le chargement peptidique. Les protéines chaperonnes résidant dans le RE facilitent le repliement des molécules du CMH de classe I naissantes. Les molécules du CMH de classe I (chaîne lourde et β2M) se lient à TAP pour former un complexe avec les chaperonnes calreticuline et ERP57 (Antoniou et al., 2003). Une protéine indispensable pour cette interaction est la tapasine. Elle agit comme une molécule de pontage entre le complexe MHC classe I / chaperonne et TAP. La tapasine ne lie pas simplement les molécules CMH de classe I naissantes à la TAP, mais elle est également nécessaire pour faciliter la liaison des peptides de haute affinité à la molécule du CMH de classe I (Williams et al., 2002). Après le chargement des peptides, les molécules du CMH de classe I se dissocient sur la membrane du réticulum endoplasmique où ils sont sélectivement recrutés dans des vésicules pour le transport vers l'appareil de Golgi. Ces molécules stabilisées seront ensuite transportées vers la membrane cytoplasmique (figure 8).

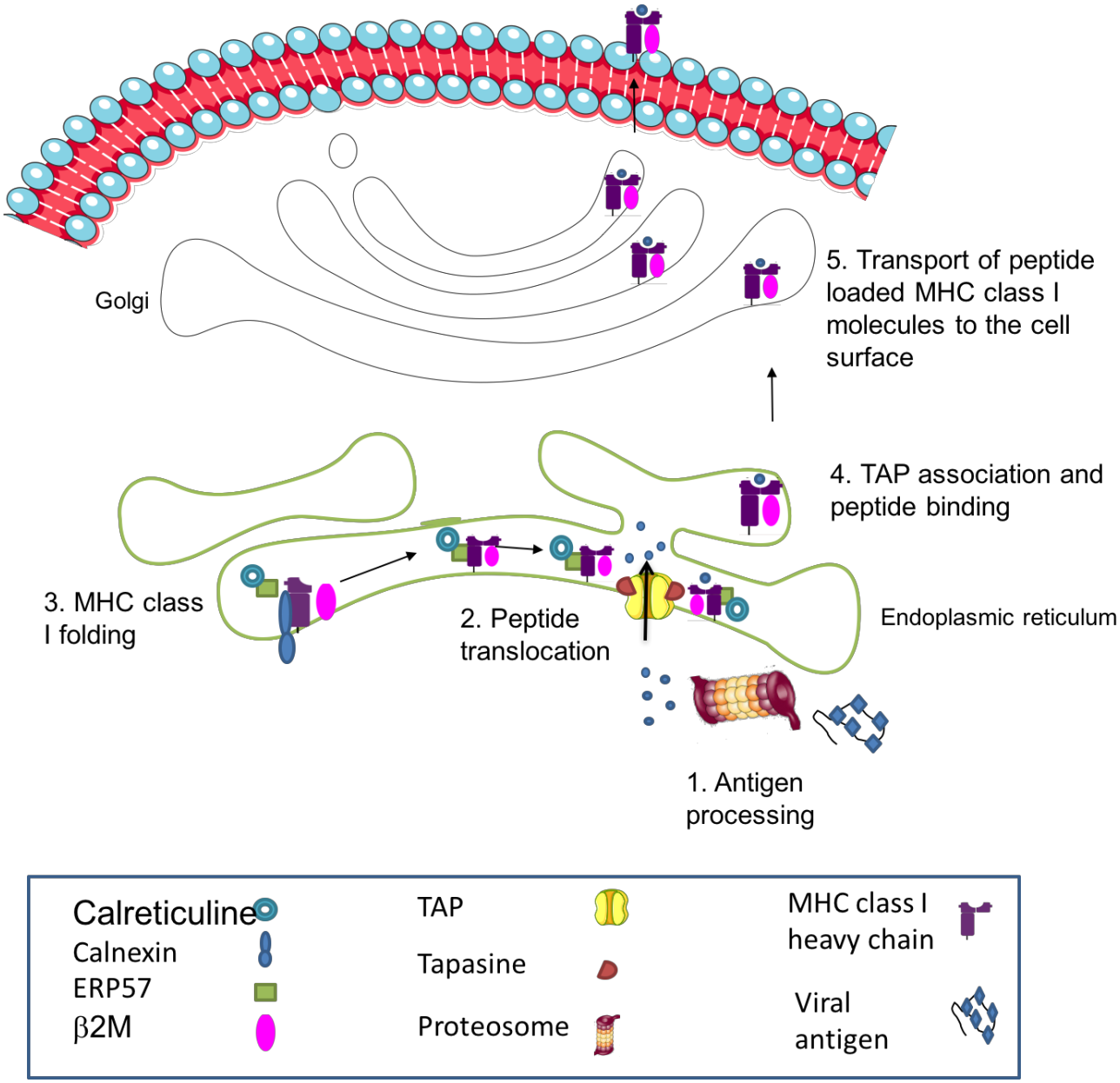


Figure 8: La voie de présentation de l'antigène du CMH de classe I.

(1) Les protéines sont dégradées dans le cytosol par le protéasome. (2) Les peptides générés par le protéasome sont transloqués dans la lumière du RE par le récepteur TAP. (3) Les molécules du CMH de classe I (chaîne lourde et β2M associée) se replient et s'assemblent dans la lumière du RE à l'aide des chaperonnes de CAL calnexine, calreticuline et ERP57. (4) La molécule du CMH de classe I dans un complexe avec la calreticuline associés à ERP57 et en présence de la tapasine et le récepteur TAP facilite la fixation du peptide dans sa poche. (5) Les molécules de classe I du CMH chargées de peptides se dissocient du récepteur TAP et sont transportées à travers golgi vers la membrane plasmique.

(b) Les molécules HLA-I dénaturées.

Récemment, il a été mis en évidence des molécules HLA-I « dénaturées » ou Free Heavy chains (FHC), résultant de changements majeurs de conformation de la molécule HLA-I suite à la perte du peptide et/ou de la β2m. Cette altération de la conformation protéique entraîne la perte de la fonction de présentation antigénique par ces molécules HLA (Dausset, 1958).
Les chaînes lourdes de HLA-I nouvellement synthétisées sont maintenues dans le RE jusqu'à ce qu'elles forment un complexe stable et ensuite progressent vers la surface cellulaire (Blum et al., 2013). Bien que l'expression de la molécule HLA-I soit contrôlée par un complexe de chargement de peptides (PLC) bien organisé au sein du RE, une forme altérée de molécules HLA de classe I sans peptide et / ou β2m peut exister sur la surface cellulaire sous certaines conditions de stress (Theodossis, 2013). En effet à la surface de la cellule, la β2m et le peptide peuvent se dissocier, laissant le FHC lié à la membrane.
En présence d'un stimulus inflammatoire, l'expression de ces molécules est up-régulée. Les fonctions et l'expression cellulaire de ces molécules dénaturées sont encore peu étudiées. Elles sont notamment surexprimées à la surface de cellules B lymphoblastoides ou de cellules T activées. Elles constitueraient des antigènes de stress cellulaire ou de danger. En effet, elles stimulent une réponse immunitaire via les Lymphocytes NK et les récepteurs de la famille NKR ou via les lymphocytes T à TCR γδ non restreints par les molécules HLA (R. Marlin et J. Déchanet-Merville, travaux non publiés du laboratoire).

(c) La présentation via les molécules du HLA-II.

Si les molécules HLA-I sont présentes sur toutes les cellules de l'organisme à des densités variables, les molécules du HLA-II ne sont exprimées constitutivement que sur les APC. Les antigènes présentés par ces molécules sont des antigènes extracellulaires qui entrent dans la cellule par phagocytose ou endocytose. Dans le RE, ils sont associés à la chaine invariante Ii. Suite à leur passage vers l'appareil de Golgi, ces molécules sont transportées vers le compartiment des molécules de classe II, qui fusionnera avec l'endosome. Le pH acide et les protéases telles les cathepsines B, D et S, induisent la dissociation de la chaine Ii et subit une

protéolyse laissant le peptide CLIP (Class II Invariant chain associated peptid) associé au HLA-II. La protéine HLA-DM à son tour induit la dissociation du complexe CLIP/molécules class II et le chargement du peptide antigénique. Ensuite ce complexe antigénique/HLA-II va être transporté et exprimé à la surface via les voies d'exocytose. Ces complexes vont alors interagir avec les lymphocytes T CD4+ qui, suite à leurs activation, vont devenir des lymphocytes T auxiliaires effecteurs chargés d'activer les lymphocytes B (Guermonprez et al., 2002).

V- Les Mécanismes du CMV pour échapper à la réponse de l'hôte.

(a) Evasion de la signalisation IFN.

Les IFN constituent un mécanisme très efficace de contrôle de la réplication virale ; pour cette raison la plupart des virus se sont adaptés en sélectionnant des gènes d'échappement à la réponse IFN. D'une manière générale, ces gènes atténuent soit la production d'IFN soit les protéines induites par les IFN. Plus de 300 gènes sont stimulés par l'IFN (ISG) dont beaucoup codent pour des protéines importantes dans l'amplification de la réponse IFN, telles que les composants du complexe ND10. Bien que le rôle de nombreux ISG ne soit pas encore connu, plusieurs d'entre eux constituent une part importante de la réponse cellulaire antivirale. Comme décrit ci-dessus, dès les premières heures de l'infection, les IFN produits par l'hôte inhibent d'une façon très robuste la propagation du virus.

Afin d'échapper à la réponse des IFN de type I, le CMV agit sur les cibles des voies JAK-STAT, y compris STAT1, STAT2 et STAT3. En effet, STAT1 et STAT2 ont un effet anti-viral du fait de leur rôle essentiel dans la signalisation IFN (Teijaro, 2016). En conséquence, la plupart des virus et surtout le CMV antagonisent STAT1 ou STAT2 (Kumari et al., 2015). La protéine précoce virale IE1 interagit en se liant directement avec STAT2 ; elle bloque également l'interaction de ISGF3 avec des éléments ISRE dans le noyau, empêchant la régulation positive des gènes stimulés par les IFN-α / β (Kim and Ahn, 2015). Ainsi IE1 en se liant a STAT2 contribue à l'inhibition d'une réponse antivirale de l'hôte par la voie de signalisation IFN de type I (Paulus et al., 2006) (figure 9).

Cependant, l'effet du HCMV sur STAT2 serait dépendant de la souche virale. Ainsi, STAT2 est dégradé lors de l'infection de fibroblastes par AD169, alors que la souche Towne n'affecte pas les niveaux de STAT2 (Le et al., 2008).

Pour STAT3, le rôle dans les infections virales semble être plus complexe. Ainsi, les virus affectent positivement ou négativement l'expression ou l'activité de STAT3 (Kuchipudi, 2015).

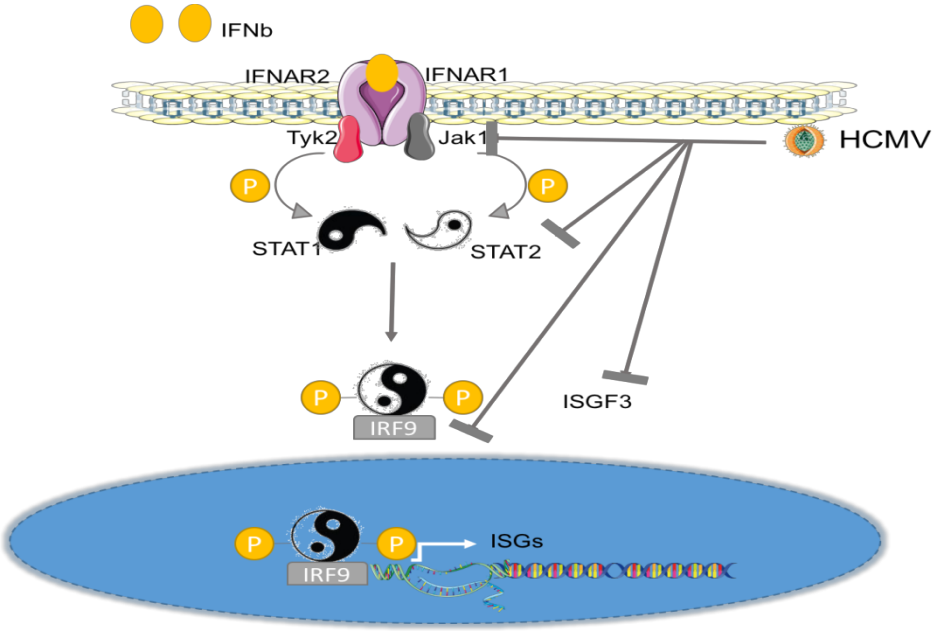


Figure 9: Représentation schématique du blocage de la réponse à l'IFN type I par le CMV.

Afin d'échapper à la réponse IFN-I, le HCMV interagit avec différentes protéines de la voie JAK-STAT, bloque ISGF3 et IRF9 inhibant la transcription d'autres ISG qui agissent à différents niveaux.

Enfin, le CMV interagit directement avec les structures ND10 par le biais de plusieurs protéines (figure 10). IE1 perturbe le complexe ND10 dans un laps de temps très limité (Ahn and Hayward, 1997). La nature de cette perturbation reste énigmatique.

L'interaction des protéines de HCMV avec ND10 n'est pas exclusive aux protéines IE1 et IE2. La protéine du tégument viral pp71 s'accumule également au niveau de ND10 immédiatement après infection par le HCMV et même avant la production de protéines IE (Hofmann et al., 2002). Connu pour son effet inhibiteur de l'expression de IE1, hDaxx est inhibée suite à l'interaction avec pp71 (Preston and Nicholl, 2006).

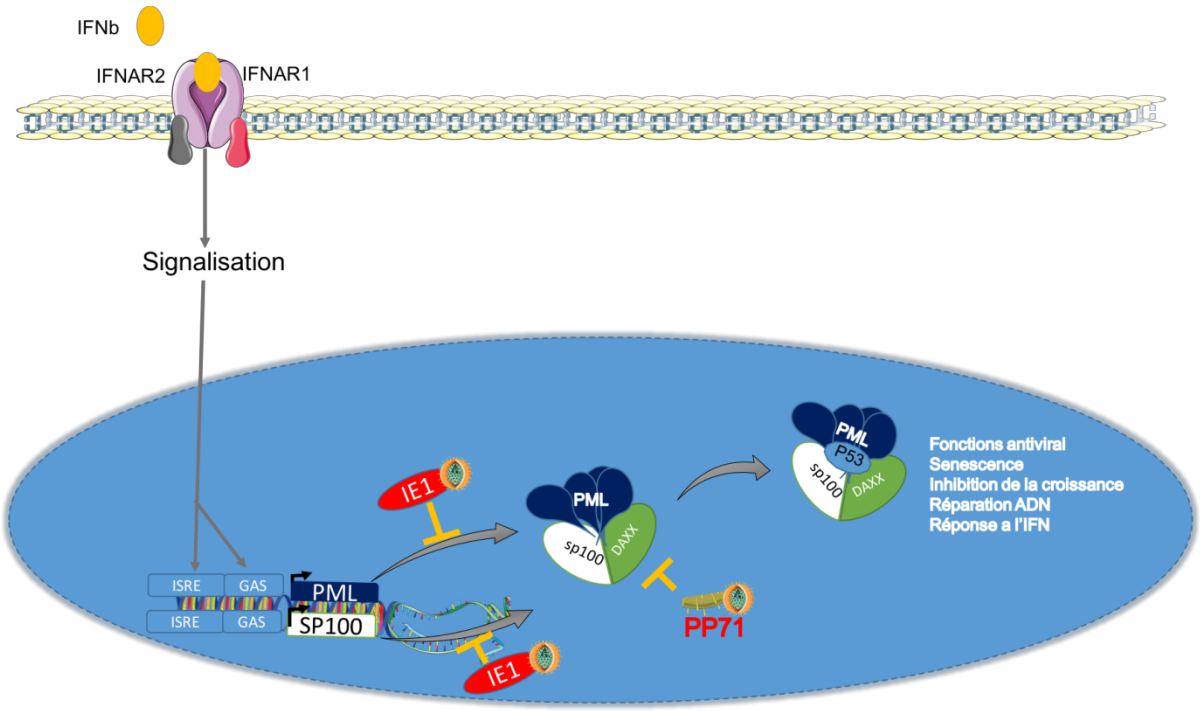


Figure 10: Représentation schématique d'action de CMV sur les différents sous unités de ND10.

Le système antiviral ND10 semble être restreint chez les mammifères ; il ne cible que les virus à ADN se répliquant dans le noyau. En effet la plupart des virus à réplication nucléaire inhibent le système antiviral ND10. Le CMV inhibe ce complexe notamment par IE1 et pp71 qui agissent à différent niveau de formation de ce complexe.

(b) Evasion du contrôle par les lymphocytes.

La plupart des agents infectieux tels que les herpes virus ont évolué en même temps que leur hôte, sélectionnant ainsi des gènes leur permettant d'échapper au système immunitaire de leur hôte (Marrack and Kappler, 1994). Ainsi, le HCMV possède de nombreux gènes limitant la surveillance des lymphocytes, entraînant des infections latentes permanentes.

Les effets de ces mécanismes immuno-évasifs, sont de perturber la reconnaissance du HCMV par les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes T CD4+. L'apprêtement des peptides viraux par la voie du CMH I et du CMH II et la reconnaissance des protéines du CMH par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont les mécanismes les plus importants du HCMV pour échapper à la clairance

efficace de l'hôte. Ainsi, les protéines virales issues des gènes US2, US3, US6, US10, US11 sont impliquées dans la modulation de l'expression des molécules HLA-I (Furman et al., 2002).

Le tableau ci- après décrit la fonction majeure de protéines du HCMV inhibant la présentation antigénique et la fonction des lymphocytes.

Protéine	Fonction majeure
US2	Translocation des molécules HLA-I vers le cytoplasme
US3	Retient les molécules HLA-I dans le réticulum endoplasmique
US6	Bloque le récepteur TAP du côté intrinsèque du réticulum endoplasmique
US11	Induit la dégradation des chaines lourdes du HLA- I
gpUL18	Se lie à LIR1, récepteur inhibiteur du HLA-I
gpUL40	Code pour un peptide chargé par HLA-E, qui se lie au récepteur inhibiteur CD94 / NKG2A
gpUL16	Se lie au CMH non-classique (MICB, ULBP1 et ULBP2), afin de prévenir l'activation du récepteur NKG2D, un récepteur activateur des lymphocytes
UL83	Inhibe l'élimination de IE1 par le protéasome
gpUL111a	25% d'homologie avec l'IL10 humaine. Réduit l'expression du CMH de classe I / II. Régule la prolifération des lymphocytes

Table 3: produits des gènes d'évasion immunitaire codés par le HCMV

Les produits des gènes US2 et US11 induisent la dégradation des chaînes lourdes des molécules HLA nouvellement synthétisées. Ces glycoprotéines virales, localisées dans le RE, induisent la translocation inverse des molécules de classe I naissantes du RE vers le cytosol où elles sont captées puis dégradées par le protéasome (Wiertz et al., 1996). Les glycoprotéines issues de US2 ou de US11 interfèrent avec différents types de chaînes lourdes et semblent répondre au polymorphisme du CMH.

US3 est capable de lier la tapasine, et inhibe ainsi le chargement peptidique de nombreux variant alléliques HLA-I (Park et al. 2004).

La protéine virale US6, qui est beaucoup plus tardive, empêche le changement de conformation dépendant du recepteur TAP (Transporter associated with antigen processing). En effet, Le récepteur TAP représente une cible très importante pour l'inhibition virale, car la plus grande majorité des peptides présentés par les molécules du CMH de classe I sont générées dans le cytosol et nécessitent une translocation à travers la membrane du RE. Ainsi US6 bloque la translocation des peptides antigéniques du cytoplasme dans le RE, empêchant ainsi le chargement et la stabilisation nécessaires à l'expression membranaire normale des HLA-I dans les cellules infectées, malgré une augmentation de l'expression des molécules constituant le système TAP (Ahn et al. 1997; Lehner et al. 1997; Hengel et al. 1997; Hewitt et al. 2001).

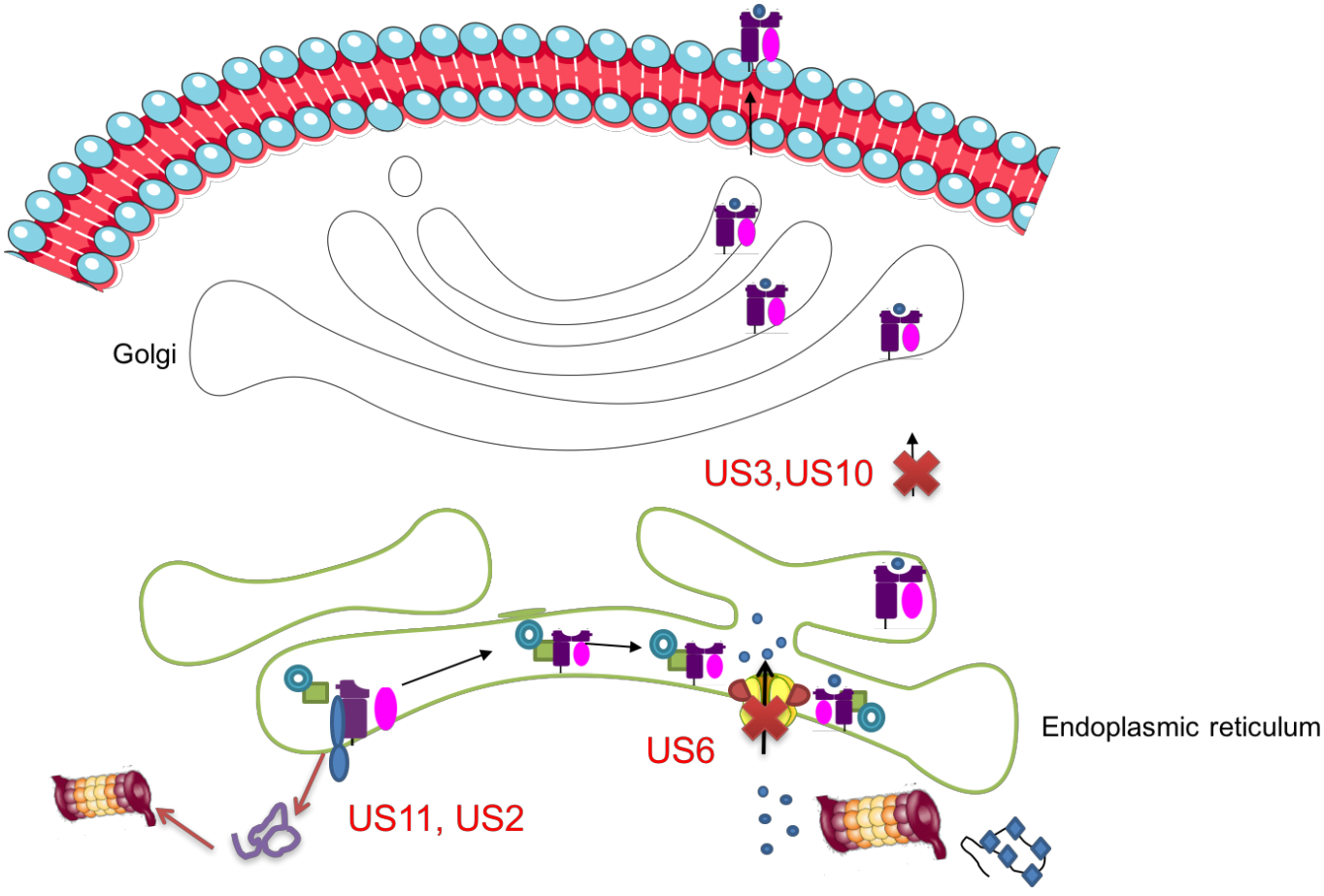


Figure 11: Mécanismes d'inhibition de la présentation peptidique par les molécules du HLA-I développés par le HCMV.

Suite à l'infection au HCMV, la cellule exprime différent gènes US qui agissent à diffèrent niveaux de fabrication des molécules HLA-I. En effet US6 inhibe la fonction du récepteur TAP et donc le transport de peptides du cytoplasme vers le RE. US3 et US10 déstabilisent le chargement de peptides et US2 et US11 permettent la translocation des molécules HLA du RE vers le cytoplasme et ainsi leur dégradation par les protéasome.

Lorsque l'expression des molécules HLA est inhibée, les cellules peuvent devenir sensibles à la lyse par les cellules NK. En effet, l'inhibition des molécules HLA-I lève l'inhibition induite par les récepteurs KIR au niveau des cellules NK. En revanche, la synthèse de certains ligands activant les cellules NK inductibles par le stress est augmentée, y compris les chaînes apparentées au CMH de classe I (MIC) A et B, la protéine de liaison UL16 humaine (ULBP) 1, ULBP2, et ULBP3 (Rölle et al., 2003). Les protéines MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, et ULBP3 sont des ligands du récepteur NKG2D activant les cellules NK (Bauer et al., 1999). La diminution de HLA-I endogène combinée à l'augmentation des ligands activant la NK favorise une attaque des cellules NK. Cependant, le HCMV code pour un nombre impressionnant de protéines qui agissent pour supprimer la reconnaissance des cellules NK. Le produit du gène UL16 bloque MICB, ULBP1 et ULBP2 dans le réticulum endoplasmique (Welte et al., 2003). Un peptide dérivé de la séquence de HCMV gpUL40 stimule l'expression de la surface cellulaire de la molécule non classique du HLA-I, HLA-E, qui se lie au récepteur inhibiteur des cellules NK CD94 / NKG2A (Welte et al., 2003). La protéine du tégument pp65 (ppUL83) inhibe la cytotoxicité des cellules NK en dissociant la chaîne CD3ζ liée du récepteur NKp30 activant la NK (Arnon et al., 2005) (figure 11).

Au cours de ma thèse je me suis intéressée à une autre sous-population de lymphocytes T, activée par des antigènes en cours de caractérisation, et dont la reconnaissance n'implique pas la voie classique de présentation HLA-dépendante : les lymphocytes T $\gamma\delta$.

VI- Réponse des lymphocytes T gamma-delta humains.

a) Introduction générale.

Le système immunitaire est souvent présenté comme une entité séparée en un système immunitaire inné et un système immunitaire adaptatif. Mais il existe une troisième « famille » de leucocytes qui partagent à la fois des caractéristiques et phénotypes de cellules innées et adaptatives. Ces cellules permettent d'établir un lien entre l'immunité innée et adaptative. Ces lymphocytes T dits « non conventionnels » (NKT, γδT et MAIT) forment ainsi un troisième « système » appelé immunité transitionnelle.

A la différence des autres populations de lymphocytes T non conventionnels (NKT et MAIT) dont la découverte reste assez récente, la première description d'une population lymphocytaire exprimant un TCR différent du TCR αβ date de plus de 30 ans (Borstet al., 1984).

Peu connus, les lymphocytes T γδ appartiennent à la famille des leucocytes au sein de laquelle ils constituent avec les lymphocytes T αβ, la population des cellules T. Ils tiennent leur nom du récepteur antigénique TCR (T-Cell Receptor) qu'ils expriment, composé d'un dimère protéique fait d'une chaîne γ et d'une chaîne δ. La très grande majorité des LTγδ sont générés dans le thymus. Ils ont un tropisme important pour les tissus épithéliaux où ils peuvent atteindre 50% de la population totale des cellules T. Chez l'homme, leur distribution tissulaire apparait étroitement associée à la nature de la chaine delta du TCR. En effet, la sous population exprimant l'association des segments variables V delta 2 et V gamma 9 est majoritaire dans le compartiment sanguin, tandis que l'essentiel des lymphocytes T $\gamma\delta$ intra-épithéliaux exprime le segment variable V delta 1 ou V delta 3 associées à n'importe quelle chaine V gamma (population que nous appelons globalement lymphocytes T non-Vγ9Vδ2) (Hayday, 2000).

Les lymphocytes T Vγ9Vδ2

Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 sont impliqués dans plusieurs réponses telles que tuberculose, salmonellose, paludisme, toxoplasmose...

Ce sous-type de lymphocyte T γδ reconnait des phosphoantigènes, correspondant plus précisément à des petites molécules non peptidiques phosphorylées issues de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. Ces molécules peuvent activer ce sous-groupe de lymphocytes T à des très faibles doses. Cette reconnaissance se fait via le TCR mais de manière

indépendante des molécules HLA (Morita et al., 1995). Le principal antigène caractérisé est l'hydroxyméthylbutényl pyrophosphate (HMBPP, également appelé HDMAPP), un métabolite produit par de nombreuses bactéries et parasites Apicomplexan par la voie biochimique du phosphate de méthyl-érythritol (MEP, également appelée voie DOXP) conduisant à l'isopentényl pyrophosphate (IPP), précurseur de la synthèse d'isoprénoïdes et de stéroïdes (Gober et al., 2003). La surexpression de l'IPP chez l'homme est un signe de réponse à un stress cellulaire. Un analogue a été synthétisé, le bromohydrin diphosphate (BrHPP), qui active les lymphocytes T de manière puissante. Chez l'Homme, les cellules utilisent plutôt la voie du mévalonate pour synthétiser l'isoprénoïde et l'IPP. Les niveaux d'IPP intracellulaires peuvent être augmentés de manière thérapeutique par l'administration de bisphosphonates (pamidronate, zoledronate).

Le pamidronate (PAM) et l'acide zolédronique (ZOL) inhibent la fonction des ostéoclastes en agissant en tant qu'inhibiteurs de l'enzyme farnésyl diphosphate (FPP) synthase dans la voie de biosynthèse du cholestérol (ou du mévalonate). L'activité de la FPP synthase est essentielle au maintien d'un pool intracellulaire de lipides isoprénoïdes tels que le FPP et le géranylgéranyl diphosphate (GGPP), nécessaires à la modification post-traductionnelle (isoprénylation) de petites protéines liant le GTP telles que Rho, Rac et Cdc42. En conséquence, l'inhibition de la FPP synthase par ces molécules entraîne une régulation défectueuse des processus dépendant de l'activité de la GTPase, tels que le réarrangement cytosquelettique et le trafic vésiculaire d'ostéoclastes.

Les molécules de butyrophiline 3A1 (BTN3A1 ou CD277) jouent également un rôle important dans l'activation antigénique des lymphocytes T Vγ9Vδ2 (Harly et al., 2012). Diverses études suggèrent que BTN, ainsi que les molécules de type BTN (BTNL), sont impliquées dans certains processus de régulation en déclenchant des voies encore peu claires (Rhodes et al., 2016)(Boutin and Scotet, 2018).

Enfin, la stimulation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 nécessite également des molécules de costimulation, telles que des récepteurs de type NKR comme NKG2D, qui reconnaissent sur les cellules tumorales des ligands comme ULBP1 (UL16-binding protein 1) et ULBP4. Ils peuvent également exprimer des récepteurs de la famille du CD28 ou des récepteurs de la famille du TNF (comme CD27). L'implication du CD28 est importante puisqu'il permet de baisser le seuil d'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ et d'augmenter leur activation (Wu et al.,

2014). Le CD27 est exprimé par environ 80% des LT Vγ9Vδ2 et joue un rôle à plusieurs niveaux. Ainsi, il permet la production d'INF-γ avec peu d'IL-17, favorise la survie et la prolifération de la cellule, active la voie non canonique du NFkB, augmentant ainsi l'expression de molécules anti-apoptotiques, et enfin protège les cellules de la mort cellulaire induite par l'activation après avoir interagi avec le phosphoantigène.

Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 négatifs

La population de lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 nous intéresse plus particulièrement du fait de son implication dans la réponse anti-CMV. Contrairement aux précédents, ceux reconnus par ce sous-groupe de lymphocyte T γδ sont peu connus.

En effet seuls quelques TCRs exprimés par ces cellules ont été décrits comme reconnaissant des antigènes particuliers, tels que MICA (Xu et al., 2011), EPCR (Willcox et al., 2012), CD1 (Spada et al., 2000) (Roy et al., 2016)(Cotton et al., 2018), et l'Annexine A2 (Marlin et al., 2017) (figure 12). Ces ligands n'ont à priori pas besoin d'être apprêtés par les molécules de CMH I et II classiques, contrairement aux lymphocytes T αβ. De plus, les lymphocytes T γδ possèdent des caractéristiques des cellules de l'immunité innée, d'une part, par leur localisation au niveau des barrières épithéliales qui leur confèrent un rôle de première barrière de défense dans la réponse immunitaire, d'autre part, par l'expression de récepteurs tels que les TLRs et les NKRs (Natural Killer Receptors) activateurs (NKG2D…) et inhibiteurs tels que les KIRs (Killer Immunoglobulin-like Receptors), décrits ci-après.

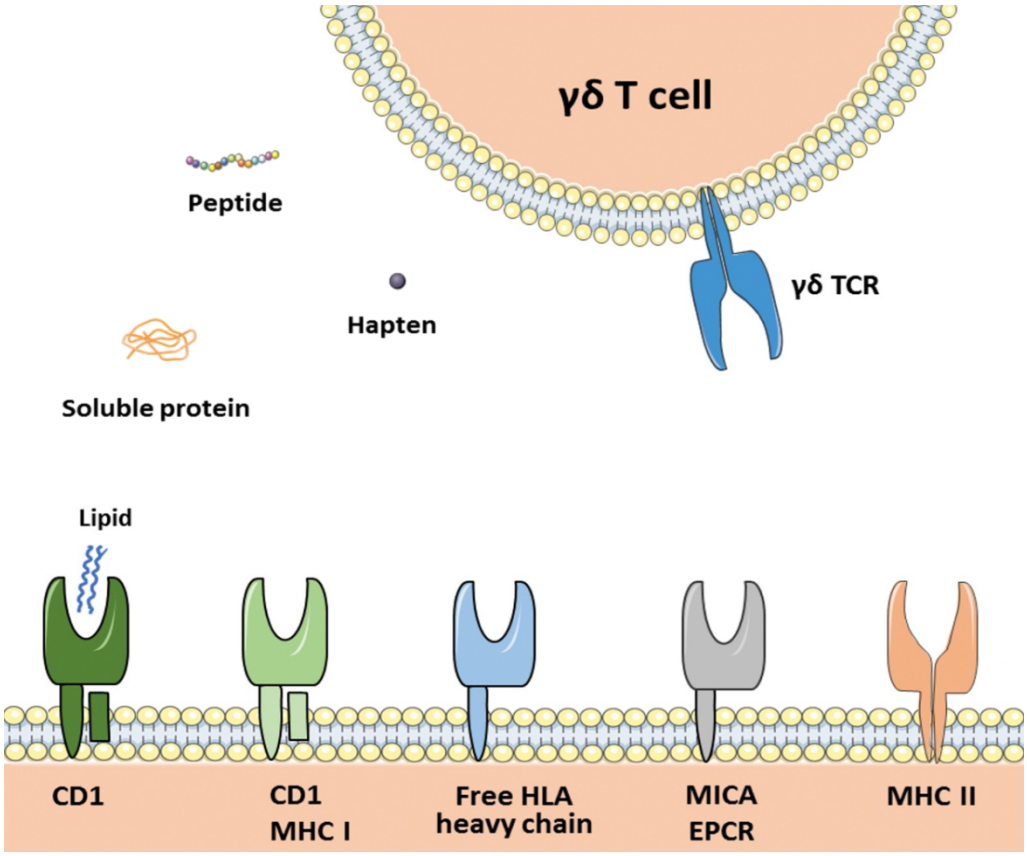


Figure 12: Ligands identifiés de TCRs gamma delta non Vγ9-Vδ2 humains (Vermijlen et al., 2018).

*Les lymphocytes T γδ ont été découverts il y a 30 ans mais très peu de ligands ont été caractérisés. Par exemple on trouve les molécules classiques de HLA-I (HLA-B * 5802, chaîne lourde HLA libre) et de classe II, des membres de la famille CD1 (CD1c, CD1d) présentant ou non des antigènes lipidiques. D'autres ligands sont des molécules apparentées au CMH et au CD1 (MICA, EPCR), et d'autres protéines liées à la surface (hMSH2, EphA2, annexine A2), des protéines solubles (HSV -gI, phycoérythrine, histidyl-ARNt synthétase), des « phosphoantigènes » (HMB-PP, IPP), des haptènes (cyanine 3,4-hydroxy-3-nitrophénylacétyle) et des peptides libres (insuline B: 9-23).*

b) Fonctions des lymphocytes T γδ

Plusieurs études montrent différents rôles des lymphocytes T γδ, tels la protection contre les pathogènes intra- et extra-cellulaires, la surveillance anti-tumorale, la modulation des réponses immunitaires innée et adaptative, la maintenance de la barrière épithéliale (Bendelac et al., 2001; Hayday et al., 2009).

1- *Rôle cytotoxique*

Les lymphocytes T γδ ont la capacité d'éliminer les cellules infectées ou transformées via plusieurs mécanismes. Le premier inclut l'engagement des récepteurs de mort alors que le second est induit via la sécrétion de molécules cytotoxiques ou antimicrobiennes. Suite à leur activation, les lymphocytes T γδ humains expriment à leur surface le Fas ligand (FasL) et/ou la molécule TRAIL dont l'engagement avec les récepteurs Fas ou TRAILR induit la mort par apoptose de la cellule cible (D'asaro et al., 2010). Les lymphocytes T γδ peuvent aussi secréter des molécules cytotoxiques telles que la perforine, le granzyme et/ou la granulysine chez l'homme (Dieli et al., 2001) (Qin et al., 2009).

2- *Production de cytokines*

Les lymphocytes T γδ sont connus pour sécréter des cytokines immunomodulatrices, chimiokines et facteurs de régulation. Les cytokines telles que l'interféron (IFN) -γ, l'IL-17, et le TNF-α produites par ces lymphocytes sont importantes car elles induisent l'activation de la réponse immunitaire innée et le recrutement de cellules immunitaires en circulation dans la zone endommagée (Gelderblom et al., 2014). Les chimiokines et les facteurs de régulation produits par les lymphocytes T γδ incluent, l'IL-13, l'IL-18, l'IL-17, l'IL-4, le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF-1) et les facteurs de croissance des kératinocytes (KGF) -1 et 7 (Chien et al., 2014). Ces molécules fournissent un mécanisme par lequel les lymphocytes T γδ peuvent interagir avec d'autres cellules immunitaires (telles que les cellules B et les lymphocytes T αβ) au cours d'une réponse inflammatoire. Cette secrétion a été étudiée dans de nombreux types de réponses immunitaires (infections, cancer, inflammation, auto-immunité). En fonction des cytokines sécrétées, les LTγδ peuvent être bénéfiques ou pas en fonction du modèle d'étude. Dans le cancer et particulièrement les carcinomes, les lymphocytes T γδ sont la source majeure d'IL-17 et peuvent jouer un rôle pro-tumoral via la production de cette cytokine. Dans la plupart des cas, l'IL-17 secrétée par les lymphocytes T γδ semble avoir un effet pro-tumoral indirect (Bao et al., 2016).

3- *Fonction CPA*

Si le rôle des LTγδ dans le développement de la réponse adaptative est bien étudié via le rôle cytotoxique et le profil cytokinique, la fonction CPA est encore en cours d'étude (Tyler et al., 2017; Zhu et al., 2016). En effet, au moins un sous-type de lymphocytes T γδ humaines s'est avéré capable d'exprimer des molécules de costimulation du HLA de classe II et des récepteurs de homing vers les ganglions lymphatiques (par exemple, CCL7) (Brandes et al., 2005, 2009). Des études antérieures ont par ailleurs montré l'aptitude des lymphocytes T γδ à présenter de manière croisée des antigènes à partir de protéines solubles (Meuter et al., 2010). Le processus d'activation de la fonction CPA est étroitement réglementé. Toutefois la relevance biologique in vivo de ces fonctions de présentation antigénique reste encore à déterminer.

c) Lymphocytes T γδ et CMV.

De par leur localisation intra-épithéliale, aux portes d'entrée de l'organisme, les lymphocytes T γδ ont été impliqués dans certaines réponses antivirales. Une prolifération et une activation des LT non-Vγ9Vδ2 a été mise en évidence dans le cas d'infection par le HCMV chez des receveurs de greffe de rein (Déchanet et al., 1999). Depuis cette observation, l'expansion de ces lymphocytes au cours d'une infection par le HCMV a été montrée dans de nombreux situations physio-pathologiques, par exemple chez les patients transplantés (foie, cœur, poumons) (Puig-Pey et al., 2010)(Couzi et al., 2010), les femmes enceintes et leurs fœtus (Fornara et al., 2011). Cette expansion est aussi observée chez les individus sains lorsqu'ils sont séropositifs pour le CMV (Pitard et al., 2008). Chez les transplantés rénaux, l'importance des lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 dans le contrôle du virus est indiquée par l'association de leur expansion à long terme in vivo après infection par le CMV et la protection contre l'infection (Déchanet et al., 1999) (Lafarge, J Inf Dis, 2001) (Kaminski et al., 2016).
Une étude *in vitro* réalisée sur des clones de lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 isolés chez plusieurs patients transplantés montre que ces clones s'activent au contact de fibroblastes infectés par le HCMV (Halary et al., 2005a). Cette activation est accompagnée d'une lyse de la cellule infectée et d'une inhibition de la multiplication du CMV. Elle n'est pas restreinte aux clones isolés; en effet une étude de la réactivité de lignées polyclonales de lymphocyte T

γδ générés à partir de lymphocytes T γδ présents dans le sang des patients transplantés ayant développé une infection à CMV, montre que plus de 10% de lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 s'activent en présence de cellules infectées alors qu'aucune activation des lymphocytes T γδ Vγ9Vδ2 n'a été observée (Halary et al., 2005a).

Les lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 activés lors d'une infection à CMV expriment majoritairement un phénotype de différenciation terminale TEMRA caractérisée par le phénotype CD45RO- CD45RA+ CD27- CD28- CD62L- CCR7-, aussi un profil d'activation HLA-DR+ CD69+ CD38+ qui *ex vivo* a été corrélé avec une capacité élevée à s'amplifier rapidement et amplement après une réinfection ou une réactivation du HCMV (Roux et al., 2013). Les lymphocytes T γδ anti-HCMV sur-expriment également ILT2/LIR1/CD85j et divers autres récepteurs inhibiteurs de type KIR, au contraire de celles issues des individus sains non infectés ou comparativement aux lymphocytes T αβ spécifiques du HCMV (Halary et al., 2005b; Pitard et al., 2008). Cette expression pourrait contribuer à réguler les lymphocytes T γδ susceptibles à l'auto-réactivité d'une manière similaire aux cellules NK.

d) Régulation des lymphocytes T γδ.

En plus de leur TCR, les lymphocytes T γδ expriment différents types de corécepteurs dont des récepteurs activateurs et d'autres inhibiteurs (figure 13). L'engagement du TCR γδ orchestre le niveau d'expression des capteurs immunitaires innés déployés pour affiner une réponse appropriée au niveau du stress. Par conséquent, les lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 peuvent agir comme des sentinelles autonomes des structures épithéliales en répondant rapidement aux menaces tissulaires sans avoir besoin d'autres cellules immunitaires, y compris des CPA.

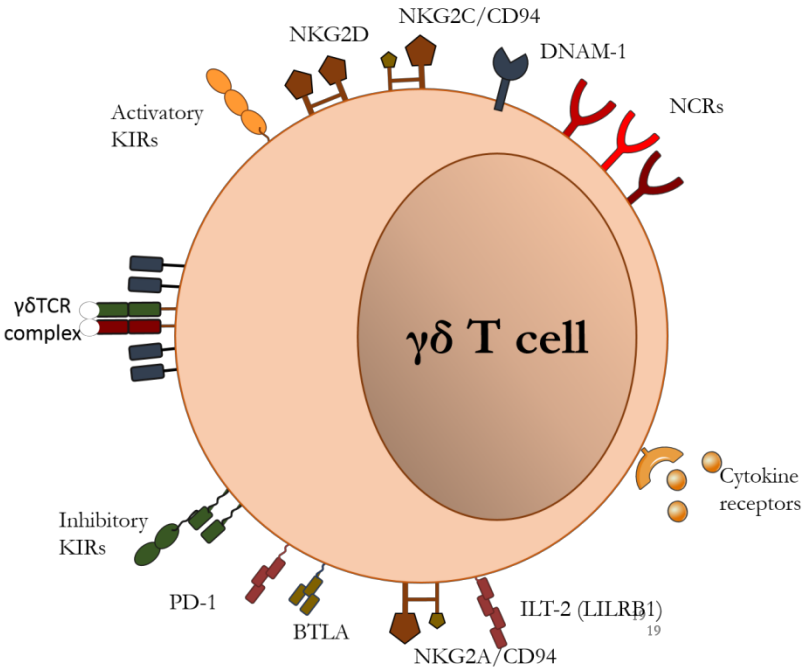


Figure 13: les récepteurs exprimés à la surface d'un lymphocyte T γδ.

Les Lymphocytes T γδ partagent certains de ses récepteurs avec les NK, par exemple les KIR et NKG2D ou avec des cellules innées par exemple les TLR2/4. Ces récepteurs participent à la régulation des LT γδ.

1. Les récepteurs de cytokines.

Les cytokines jouent un rôle déterminant dans la survie, de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes T. Par exemple l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-2 sont essentiels pour le développement des lymphocytes et l'homéostasie ; lors de l'inflammation, d'autres cytokines peuvent jouer un rôle : IL-1β, IL-12, IL-18, IL-21 et IL-23. Suite à un stress cellulaire tel que l'infection par le CMV, les cellules infectées, notamment les fibroblastes, secrètent des molécules solubles inflammatoires comme l'IL-18 (Guerville et al., 2015).

2. *Les corécepteurs activateurs.*

Les lymphocytes T γδ expriment des récepteurs activateurs, qui peuvent compléter ou même remplacer la signalisation TCR dans différents contextes, notamment NKG2D, CD16 et NKp30 (Correia et al., 2011).

Le NKG2D est le NKR le plus étudié pour les lymphocytes T γδ. Chez l'homme, NKG2D se lie à plusieurs ligands exprimés à la surface des cellules épithéliales stressées et qui appartiennent à la famille des MIC (A-B) et ULBP (UL-16 binding) apparentée à la famille des HLA-I (Hayday, 2009). Les ligands de NKG2D sont induits lors du stress cellulaire (Champsaur and Lanier, 2010). Sur les lymphocytes T γδ, le NKG2D agit la plupart du temps comme un corécepteur qui fonctionne en synergie avec le TCR (Hao et al., 2010)(Kabelitz et al., 2013).

3. *Les corécepteurs inhibiteurs KIR.*

Les récepteurs KIRs ont été mis en évidence il y a une vingtaine d'année à la surface des cellules NK (Lanier and Phillips, 1996), mais ils sont également exprimés par certains lymphocytes T. Ces molécules sont considérées comme des récepteurs inhibiteurs car lorsqu'elles sont engagées par des ligands spécifiques, elles inhibent l'activation des cellules NK. Les KIRs sont constitués de régions extracellulaires de différentes longueurs, de régions transmembranaires et de queues intracytoplasmiques contenant des motifs protéiques (appelés motifs ITIM pour Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif par opposition à ITAM) importants pour la fonction inhibitrice (Renard et al., 1997). Ces découvertes ont généré le consensus général que les KIRs accomplissent la fonction importante de régulation de la fonction effectrice des cellules NK en reconnaissant les cibles qui ne doivent pas être tuées, c'est-à-dire toutes les cellules qui expriment des niveaux normaux de molécules de HLA-I. Ce processus, aussi appelé la reconnaissance du « missing-self », est très important dans les situations pathologiques où les cellules perdent l'expression des molécules des molécules HLA-I, par exemple, après une infection virale (Ljunggren and Kärre, 1990).

Cependant, ce système est beaucoup plus complexe avec l'existence de molécules KIR qui ne sont pas inhibitrices, mais qui facilitent plutôt l'activation des cellules. Ces formes de KIR activateurs possèdent la même région extracellulaire que les KIRs inhibiteurs mais une région intracytoplasmique plus courte qui leurs permet d'interagir avec des adaptateurs contenant un motif ITAM (pour Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif). Il existe également

des récepteurs différents appelés LIRs (leukocyte Ig-like receptor family) qui présentent une homologie avec les KIR mais avec une distribution cellulaire plus étendue et sont exprimés sur une variété de types de cellules hématopoïétiques comprenant les lymphocytes NK, T et B ainsi que les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques (Biassoni and Malnati, 2018; Young et al., 2001) (figure 14).

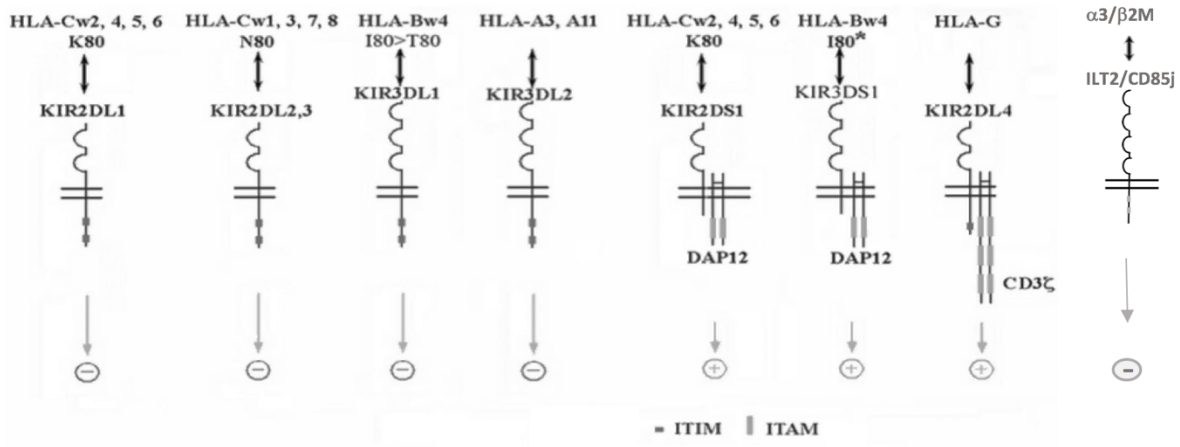


Figure 14: les récepteurs Kirs et LIRs et leurs ligands.

Les récepteurs inhibiteurs HLA de classe I appartiennent à la fois à la super-famille des immunoglobulines (par exemple, les récepteurs de type immunoglobuline à cellules tueuses [KIR] et les récepteurs de type leucocytaire [LIR]).Tous ces récepteurs transduisent le signal en utilisant des motifs inhibiteurs à base de tyrosine (ITIM), caractérisés par la séquence V / I / L / SxYxxL / V, située dans leurs parties intracytoplasmiques. Les récepteurs activateurs s'associent au polypeptide DAP12 contenant le motif d'activation à base de tyrosine (ITAM) immunorécepteur. Le signe moins (-) indique que le récepteur transduit une signalisation inhibitrice tandis que le signe plus (+) indique que le récepteur transduit une signalisation activatrice (Biassoni and Malnati, 2018).

Parmi les lymphocytes T, une petite fraction de lymphocytes T CD8+ possèdent des KIRs et des hétérodimères CD94 / NKG2. Ces cellules expriment également le phénotype CD45RO et CD29, alors qu'elles n'expriment pas les marqueurs CD28 et CD45RA (Mingari et al., 1996). Ce phénotype est caractéristique des cellules activées ayant subi une maturation fonctionnelle et différenciées en lymphocytes mémoires. Il est extrêmement rare de trouver des lymphocytes auxiliaires T CD4+ qui expriment des récepteurs KIRs.

La majorité des cellules T γδ humaines expriment au moins un KIR. En effet, les LT γδ ont différents marqueurs en commun avec les cellules NK (figure 13), et dans certains cas, elles lysent le même type de cibles comme par exemple des cellules infectées par le CMV (Aramburu et al., 1990).

Objectifs

Un des acteurs clés de la réponse adaptative anti-CMV est le lymphocyte T αβ (LT αβ). L'activation de ces lymphocytes, comme expliqué en introduction, est médiée par le TCR αβ qui ne reconnait pas les éléments étrangers sous leur forme native. Les antigènes doivent être dégradés à l'intérieur d'une cellule, apprêtés puis exposés à sa surface par les molécules HLA. Mais le CMV a réussi à échapper à la réponse des LT αβ notamment par l'inhibition de la présentation antigénique. En effet, suite à une infection par le CMV, on observe une induction des immunoévasines (produits des gènes viraux qui permettent l'échappement à la réponse immunitaire) dont une partie inhibe l'expression des molécules HLA. Cependant, d'autres sous-populations lymphocytaires - dites non conventionnelles - pourraient pallier au déficit de réponse des LT αβ dans le contexte de l'infection à CMV. Parmi ces cellules on retiendra les lymphocytes T γδ (LT γδ), dont la reconnaissance antigénique est indépendante des HLA.

Les résultats antérieurs du laboratoire ont montré une induction de LT γδ non Vγ9Vδ2 chez les patients transplantés, suite à une infection par le CMV (Dechanet et al., 1999). L'augmentation de ces lymphocytes est concomitante à la résolution de l'infection suggérant leur rôle anti-viral qui a par la suite été évoqué dans d'autres études chez l'homme, et confirmé dans un modèle murin (Couzi et al., 2010a; Kaminski et al., 2016; Khairallah et al., 2015; Scheper et al., 2013). In vitro, les LT γδ non Vγ9Vδ2 contrôlent la réplication virale via la sécrétion d'IFN γ, et sont également cytotoxiques vis-à-vis de cellules infectées par le CMV (Couzi et al., 2011; Halary et al., 2005). La réactivité anti-CMV des LT γδ non Vγ9Vδ2 nécessite une activation via leurs TCR. En revanche, très peu de ligands ont été caractérisés dans le cadre du CMV. Il s'agit principalement de l'EPCR (Willcox et al., 2012) et de l'Annexine A2 (Marlin et al., 2017). Dans ce contexte de recherche de ligands, le laboratoire s'est intéressé au TCR Vγ9Vδ3, exprimé par des LT γδ ayant subi une amplification monoclonale chez un donneur CMV+.

La réactivité anti-CMV des LT Vγ9Vδ3 a par la suite été corrélée à une augmentation de l'expression de molécules de HLA modifiées à la surface de fibroblastes infectés par le CMV et de deux lignées lymphoblastiques. Cette réactivité était bloquée par diffèrent anticorps anti-HLA générés par le laboratoire. Sachant que les molécules de HLA modifiées sont très instables et leur expression est transitoire, il a été suggéré que la formation de ces molécules pourrait être due à un problème d'affinité de peptide entrainant une perte de peptide après expression à la surface (Giles et al., 2012; Jones et al., 2011; Theodossis, 2013). Comme

certaines immunoévasines perturbent le chargement des peptides sur les molécules HLA-I dans le réticulum endoplasmique, nous avons émis l'hypothèse que ce processus pouvait être impliqué dans l'induction de l'expression des HLA modifiés à la surface des cellules infectées par le CMV.

Ainsi les objectifs de mon projet ont été de :

1- Etudier l'influence des immunoévasines US1 à US11 sur l'expression des molécules de HLA modifiées.
2- Evaluer l'influence de la modulation des différentes molécules HLA-I (modifiées ou natives) sur la réactivité des lymphocytes T Vγ9Vδ3.
3- Comparer l'effet de la modulation des molécules HLA-I par le CMV sur les LT αβ et T γδ chez un même patient

Durant ma thèse j'ai aussi travaillé sur un deuxième projet portant sur l'impact de CMV sur le développement tumoral.

L'expansion des LT γδ non Vγ9Vδ2 observée chez les patients transplantés suite à une infection au CMV (Dechanet et al., 1999) a été associée à un risque diminué de développement de cancer cutané (Couzi et al., 2010b). De plus, ces LT γδ non Vγ9Vδ2 présentaient une double réactivité vis-à-vis des cellules infectées par le CMV et des cellules tumorales coliques HT29 alors que des fibroblastes non infectés ou des cellules intestinales normales n'étaient pas reconnus (Halary et al., 2005). Notre hypothèse était donc que le CMV en induisant des LT γδ a double réactivité anti-virale et anti-tumorale chez les patients les protégerait contre le développement de tumeurs. Notre but a été alors d'utiliser le modèle murin de l'infection à CMV afin d'apporter des preuves directes concernant cette potentielle protection anti-tumorale des lymphocytes T γδ CMV-induits. De façon étonnante, les expériences préliminaires antérieures à mon arrivée au laboratoire suggéraient plutôt un rôle inhibiteur du MCMV sur la croissance des cellules tumorales, indépendant du système immunitaire.

La littérature analysant la relation entre CMV et cancer est très controversée. D'une part, l'infection à CMV a été impliquée dans des maladies malignes de différentes entités cancéreuses. Dans les cancers du cerveau et les tumeurs solides, des protéines et/ou acides nucléiques du virus ont souvent été détectés et le CMV est considéré comme un facteur de pronostic négatif. Cependant, d'autres chercheurs ont décrit plutôt un rôle protecteur anti-

tumoral du CMV par exemple chez des individus atteints de cancers d'origine hématopoïétique (Wong et al., 2017). L'effet bénéfique du CMV chez ces patients pourrait être médié par la reconnaissance des cellules leucémiques par les cellules immunitaires induites au cours de l'infection, dont les LT $\gamma\delta$ (Scheper et al., 2013b). D'autres résultats plus récents suggèrent que le CMV pourrait également avoir une action directe sur les cellules leucémiques en induisant leur apoptose (Koldehoff et al., 2015).

Au vu de ces éléments, les résultats préliminaires du laboratoire offrent un nouveau point de vue sur ce débat en montrant que le CMV peut également exercer son activité anti-tumorale sur des tumeurs solides chez la souris.

De ce fait, nous avons voulu pousser cette étude pour

1- Tester l'impact du CMV sur la croissance de différentes lignées tumorales implantées en sous-cutané dans des souris immunodéficientes.
2- Comprendre comment le CMV inhibe la croissance tumorale dans nos conditions expérimentales.
3- Etudier les conséquences de l'infection sur la survie cellulaire in vitro.

Résultats

Projet I

Projet n°1 : Etude de l'impact du HCMV sur l'expression des molécules HLA-I et conséquences sur l'activation des lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2.

I. Contexte de travail et problématique.

Comme nous l'avons discuté précédemment, l'inhibition de l'expression des molécules HLA-I est utilisée par le HCMV pour échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T αβ, grâce à quatre gènes US. Les molécules HLA natives sont normalement exprimées en tant qu'hétérodimère à la surface cellulaire : une chaîne lourde α associée à la β2-microglobuline et à un peptide antigénique. Il existe également des "HLA modifiés", avec une chaîne α seule, ou associée uniquement à la β2-microglobuline ou à un peptide (Theodossis, 2013). Ces formes de HLA modifié sont instables mais surexprimées sur les lymphocytes T activés ou sur les lignées B lymphoblastoïdes. Elles ne sont pas reconnues par le TCR αβ.

Avant mon arrivée dans l'équipe, il avait été montré que les formes modifiées de HLA-I étaient surexprimées à la surface des fibroblastes infectés par le HCMV (à l'inverse des formes natives HLA-I qui sont inhibées par les immunoévasines US2, US3, US6, US10, US11 codées par le virus). L'objectif de ce projet était de comprendre comment le HCMV induit l'expression de ces HLA-I modifiés et d'évaluer l'influence de la modulation des différentes molécules HLA-I sur la réactivité des lymphocytes T. Nous avons émis l'hypothèse que les immunoévasines virales pourraient être impliqués dans la surexpression de HLA-I modifié sur des cellules infectées par le HCMV.

Pour aborder cette étude nous avons procédé de deux manières :

- Soit en utilisant des adénovirus recombinants (Rad) contenant les ADNc codant pour chacune des immunoévasines impliquées dans l'inhibition de l'expression des HLA-I ; dans ce cas on obtient un gain de fonction pour l'inhibition des HLA-I
- Soit en utilisant une souche mutée de HCMV déficiente pour toute la section génique contenant les gènes US1 à US11 et dans ce cas on observe l'impact du virus HCMV en absence des gènes US contrôlant les molécules HLA.

II- Matériel et méthodes.

1. *Cellules et virus utilisés.*

- Les cellules utilisées : fibroblastes humains primaires de prépuce, fibroblastes de prépuce humain immortalisés par la télomérase humaine (HF-TERT), HF-TERT transfectés avec le récepteur des Coxsackievirus et Adénovirus (HF-CAR).
- Les virus utilisés : adénovirus recombinant (Rad) qui contient un tag-V5 couplés ou pas aux genes US du HCMV (US2, US3, US6, US11). 2 souches de HCMV sont utilisées le HCMV TB42/E et le CMV Merlin. CMV TB42/E est une souche clinique qui a subi très peu de mutations. Le CMV Merlin a été fournie par notre collaboration à Cardiff avec Dr. Ceri Fienlding. Dans ce cadre, on a utilisé deux virus : le virus parent ou control CMV-WT = 'Block' deletion mutant parental virus (ΔUL16, ΔUL18, UL32-GFP). Ce dernier a servi pour la fabrication du virus CMV-DUS qui est deplete pour les genes US1-US11

2. *Infection virale.*

Les fibroblastes ont été ensemencées dans du milieu à des densités cellulaires appropriées (environ $0{,}5.10^5$ pour la flasque de 25 cm2). Le jour suivant, les cellules ont été infectées avec les Rad ou le HCMV à la multiplicité d'infection indiquées dans un volume approprié de milieu de croissance (2 ml pour la flasque de 25 cm2, 1 ml par puits pour une plaque à 6 puits, 250 ul par puits pour la plaque 24 puits) pendant 2 h sur une bascule à 37 ° C sous 5% de CO2. L'inoculum a ensuite été remplacé par du milieu de croissance frais sans sérum de veau fœtal et les cellules ont été incubées pendant les temps indiqués dans les résultats.

3. *Evaluation de l'expression des HLA-I.*

Les fibroblastes CAR ou primaires sont ensemencés à raison de 2.10^5 cellules par puits dans 1ml de milieu complet. Après 24h d'adhésion, les cellules sont infectées avec différents MOI (multiplicités d'infection) de particules virales infectieuses par cellule et incubées 4 jours à 37°C, 5% CO2. Les cellules ont été récoltées par lavage une fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et traitées avec de la trypsine / EDTA pendant 1 minute à 37

° C. Après neutralisation de la trypsine avec le milieu de croissance, les cellules ont été lavées une fois dans un tampon de cytométrie en flux (FC) (1% d'albumine bovine dans du PBS). Les cellules ont été remises en suspension avec différents anticorps primaires dirigés contre les molécules HLA : le LSM (anticorps monoclonal fait maison reconnaissant tous les anti-HLA-I), W6 / 32 (reconnaissant toutes les molécules HLA de classe I natives et donc contenant à la fois β2m et la chaîne lourde, Thermo Fisher Scientific), HC-10 (reconnaissant la chaîne lourde des HLA-I lorsqu'elle est dissociée de la β2M (HLA-I modifié)) tous utilisés à une concentration de 10 µg / ml. Après 2 lavages avec du PBS les cellules sont incubées 15 min a 4°C avec un anticorps secondaire couplé à la phycoérythrine (GAM-PE). L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSR Fortessa (BD Biosciences) et l'analyse avec le logiciel FlowJo (Tree Star).

4. Marquage intracellulaire : tag V5.

Les fibroblastes CAR ou primaires sont ensemencés à raison de 5.10^5 cellules par puits dans 1ml de milieu complet. Après 24h d'adhésion, les cellules sont infectées avec différent MOI (multiplicités d'infection) de particules virales infectieuses par cellule et incubées 4 jours à 37°C, 5% CO2. Les cellules ont été récoltées par lavage une fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et traitées avec de la trypsine / EDTA pendant 1 minute à 37 ° C. Après neutralisation de la trypsine avec le milieu de croissance, les cellules ont été lavées une fois dans un tampon de cryométrie en flux (FC) (1% d'albumine bovine dans du PBS). Les cellules ont été remises en suspension, laver avec 200 µl de solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Ensuite les cellules sont incubées pour 10 dans 200 µl de PBS 4% PFA. Suivi de deux lavages avec Tampon IC buffer. Les cellules sont remises en incubation pour 1h avec Ab-Tag v5 (1µl dans 499µl de tampon IC) conjugué avec DyLight405 clone SV5-PK1 a 4 ° C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec le même tampon. L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSR Fortessa (BD Biosciences).

5. Sang et isolement des PBMC.

Les cellules mononucléées sanguines ou peripheral blood mononuclear cells (PBMC) sont isolées à partir de sang provenant de patients transplantés rénaux CMV+ du service de transplantation du CHU de Pellegrin. Les patients choisis étaient CMV+ et avaient au moins un allèle HLA compatible avec les fibroblastes utilisés pour l'infection par le CMV. Pour

l'extraction des PBMC, le sang est dilué au demi dans du PBS (phosphate buffer saline : 80mM NA2HPO4,150mM NaCl, pH=7,4) puis déposé doucement sur le ficoll milieu de séparation des lymphocytes de Eurobio ou PAA) dans un tube de 50 ml, puis centrifugés à 500g pendant 20 min sans frein ni accélérateur. L'anneau de PBMC est ensuite récupéré et lavé deux fois avec du PBS. Après lavage les cellules sont comptés en utilisant une cellule de Neubauer et repris en RPMI 1640, 8% SVF sérum du vœux fœtal, 2mM L-glutamine.

6. *Amplification des lymphocytes T gamma-delta avec l'IL2 et l'IL15.*

Après vérification du phénotype TEMRA des lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 par un marquage sur sang total avec les anticorps : anti-CD3-APC-Alexa750 (Beckman), Pan γδ-PC5 (Beckman), Delta2-PC7 (Beckman), CD27-Fitc (BD) et CD45RA-APC (BD) et éventuellement CD16-PE (Beckman). Les PBMC sont ajustées à $1x10^6$ cellules /ml dans de RPMI (8%SVF+ Glutamine) + IL2 (1000 U/ml) + IL15 (10ng/ml). Ensuite ils sont dispensés à $1,5x10^6$ cellules/puits dans une plaque 24 puits. Les cellules ont été phénotype au fur et à mesure de la culture (1 fois/semaine) pour déterminer l'expansion et le phénotype de ces lignées. Au bout de trois semaines les cellules ont été trié négativement comme décrit ci-dessous.

7. *Depletion des lymphocytes T γδ.*

Pour les tests ne faisant pas appel à la cytomètrie en flux (comme le test de cytoxicité par dosage d'IFN-γ) il est nécessaire de trier les LT γδ non-Vg9Vδ2 pour avoir une population pure. Pour cela, les cellules sont triées soit par cytomètrie (FACS ARIA) soit par tri immunomagnétique miltenyi.

a. Tri par cytométrie en flux (FACS ARIA).

Deux types de marquages sont appliqués sur les PBMC : (i) CD3, CD8 et pan γδ ou (ii) CD3, CD8, anti-vdelta2 et pan-αβ, afin de trier négativement et respectivement les CD3+ et panγδ-CD8+ (les L T αβ CD8+) et les CD3+ pan-αβ- pour les LT γδ. Les PBMC sont incubés à une concentration de 30 millions cellules/ml dans du PBS- BSA 0,5%-2 mM EDTA avec les cocktails d'anticorps cités ci-dessus. Après 15 minutes d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées avec du PBS puis centrifugées 5 min à 1500 rpm. Après centrifugation le culot est repris dans du

PBS puis passés sur un filtre de 70 um. Les PBMC sont ensuite passés dans le trieur FACS ARIA. Après le tri, les cellules sont reprises en rpmi 1640, 10% de sérum humain, IL2 (1000 UI/ml). Après 24h a 37°C, les cellules sont mises en co-culture selon le protocole décrit ci-dessous.

b. Tri immunomagnétique.

Le tri négatif de lymphocytes T γδ et des lymphocytes T αβ a été également réalisé par la méthode du tri magnétique. Les cellules à dépleter ont été marquées avec l'anticorps TCR γδ selon le protocole décrit pour le tri cellulaire par cytometrie. Les cellules marquées sont ensuite reprises dans 80 ul de PBS-BSA 0,5%- 2 mM EDTA auxquels ont été rajoutés 20 ul de billes immuno- magnétiques MACs couplées à un anti-IgG de souris (Miltenyi biotec). Après une incubation de 15 min a 4° C, les cellules sont lavées avec du PBS-BSA 0,5% -2 mM EDTA puis centrifugées a 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot est ensuite repris dans 500 ul de PBS-BSA 0,5% -2 mM EDTA et les cellules sont passées à travers une colonne LD placée sur un support Midi MACS separator (Miltenyi biotech). Après collecte des cellules, la colonne a été lavée deux fois avec 1 ml de PBS-BSA 0,5 % - 2 mM EDTA. L'efficacité de la depletion des Lymphocytes T gamma delta et les lymphocytes alpha beta est ensuite verifiée par cytometrie en flux en marquant la fraction non retenue avec des anticorps anti-TCR gd, anti-vd2 et anti-CD3 pour la pureté des gamma delta et pour les lymphocytes T alpha beta avec des anticorps anti- TCR ab, anti-CD8 et anti-CD3.

8. Test fonctionnel des JRT3 et des lymphocytes.

Afin de tester la réactivité de TCR, le laboratoire avait génerer des cellules Jurkat mutée pour le recepteur beta et transduite avec un TCR γδ. L'activation du TCR est lié a l'induction de l'expression de CD69.

Le JRT3-26 ou les JRT3 transduites avec d'autres TCR ou non transduites (1x105 cellules par puits) ont été incubées avec des fibroblastes préinfectés à MOI 10 pour le CMV. Les JRT3 ont été marqués avec du Carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE, 1 uM), à un rapport 1: 1. Après 4 heures à 37 ° C, l'activation des cellules JRT3 a été évaluée par l'expression de CD69 en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD69 conjugué à du PE (Beckman Coulter). Les données ont été recueillies sur un LSRFortessa.

L'activation des clones de lymphocytes T γδ a été évaluée par dosage d'IFNg dans le surnageant. Dans ce but, les clones de cellules T γδ sont co-cultivés avec des fibroblastes non infectés ou infectés pendant 3 ou 4 jours par la souche clinique de CMV TB40 / E, ou les souches modifies Merlin CMV-WT et CMV-ΔUS à un rapport 1: 1 (E:T). Après 24h de co-culture en présence d'IL18 ou d'IL12, le surnageant est récolté et l'IFNγ est dosé avec un kit ELISA tout en suivant la procédure proposée par le fournisseur (MABTECH). Dans certaines expériences, les anticorps bloquants suivants ont été ajoutés à la culture : anti-CD158b / j (GL183, Beckman-Coulter), anti-CD85j (GHI/75, Biolegend), LSM (anticorps monoclonal maison anti-HLA-I), W6 / 32 (anti- anti-HLA-I natives, Thermo Fisher Scientific), HC-10 (chaîne lourde libre) tous utilisés à une concentration de 10 µg / ml.

9. Analyses statistiques.

Les études statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Graphpad prism 7. Les tests statistiques in vitro utilisées est Anova one way. La significativité est notée comme suit : * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

III- Résultats.

1) Tests de l'infection des fibroblastes par les Adénovirus recombinants exprimant les immunoévasines.

Afin de tester l'effet de la modulation de l'expression des HLA-I sur la réactivité des lymphocytes T γδ, nous avons utilisé des adénovirus codant pour les gènes des immunoévasines US2 à US11 du CMV (collaboration avec le groupe de Gavin Wilkinson à Cardiff). Dans un premier temps, il était nécessaire de déterminer la fonctionnalité des adénovirus. Pour cela nous avons étudié le niveau d'expression du tag-V5 (fusionné aux protéines recombinantes exprimées par ces adénovirus) dans les cellules infectées. Après 4 jours d'infection avec les Rad-US2, Rad-US3, Rad-US6, et Rad-US11, on observe une expression du tagV5 reflétant l'expression des protéines US2, US3, US6 et US11 respectivement (Figure 15A). Cette expression est dépendante de la dose de virus utilisée (figure 15B). Après corrélation entre mortalité (observée sous microscope par coloration à

l'éosine, non montré) et niveau d'expression, nous avons choisi la MOI 25 comme dose optimale.

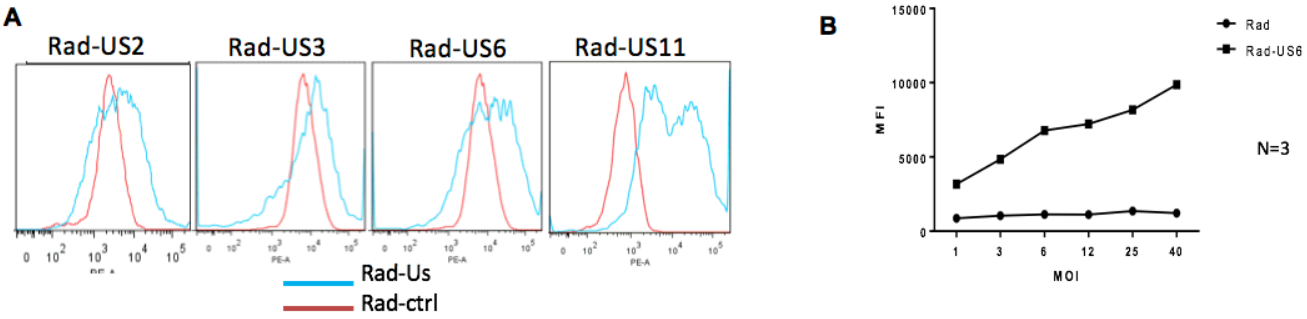


Figure 15: Vérification de l'infection par les adénovirus.

(A) Taux d'expression du Tag-V5 dans les cellules infectées Rad - US par rapport aux cellules infectées par Rad-Ctrl. (B) Effet de la dose de Rad - US6 sur le taux d'expression de Tag - V5. Un marquage intracellulaire de tag V5 a été réalisé sur des cellules infectées avec des différents adénovirus pendant 4 jours. L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSRFortessa (BD Biosciences). Données d'une expérience représentative parmi 3 expériences.

2) Les gènes US inhibent l'expression des molécules HLA-I et HLA modifié à l'exception de US6.

Le CMV est bien connu pour diminuer l'expression de HLA-I notamment par les gènes US2, US3, US6, US11. Afin de vérifier ce phénomène dans notre modèle, les HFF-CAR ont été infectés pour 4 jours par les Rad-US et le niveau d'expression du HLA-I a été déterminé par cytométrie en flux. Pour déterminer le niveau d'expression des molécules HLA-I, nous avons utilisé l'anticorps W6/32 qui reconnait les différents allèles HLA-A, HLA-B et HLA-C. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'expression des HLA-I par l'adénovirus contrôle (Rad-Ctrl) qui est inhibée lorsque l'adénovirus exprime n'importe lequel des ADNc US (figure 16 A). Pour déterminer si les gènes US ont un impact sur les molécules HLA-I dénaturées ou modifiées, nous avons utilisé l'anticorps HC-10 qui se lie spécifiquement au HLA-I dénaturé dérivé des molécules HLA-B et HLA-C, et de certaines molécules HLA-A (figure 16 B). Après 4 jours d'infection, on observe une inhibition de l'expression du HLA modifié après infection par Rad-US2, Rad-US3 et Rad-US11 par rapport au Rad-Ctrl. En revanche aucune inhibition n'est observée lorsque les HFF-CAR sont infectées par l'adénovirus Rad-US6. Etant donné que l'anticorps LSM qui a été généré dans notre laboratoire reconnait les molécules HLA-I et les molécules HLA-I dénaturées, on a testé l'impact de ces gènes US sur les ligands de

LSM05. Après traitement avec les adénovirus on observe que l'expression des ligands de LSM05 est inhibée par les 4 gènes US de la même manière que le HLA-I natif (figure 16C).

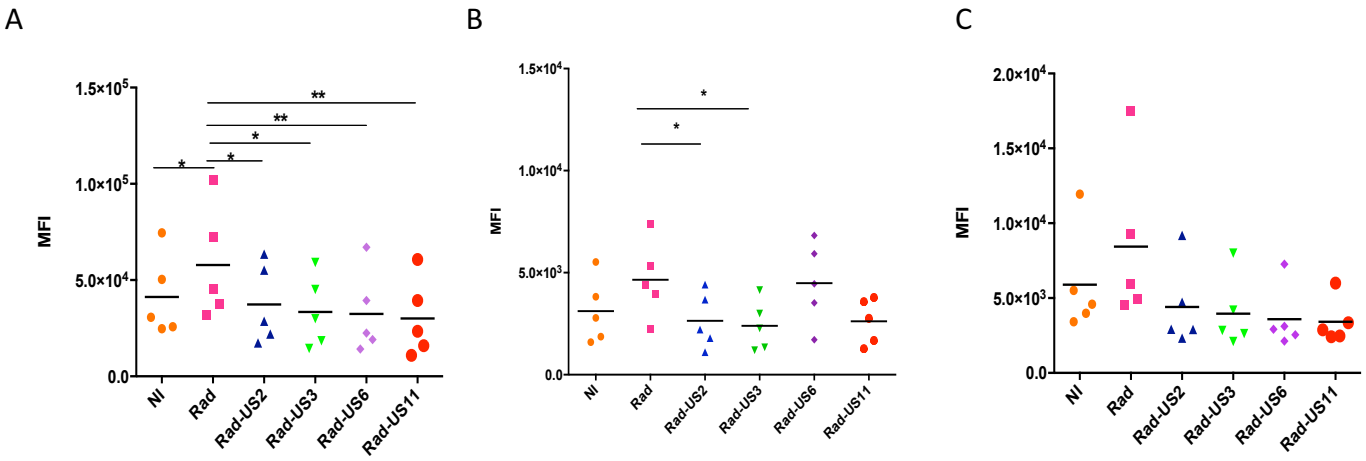


Figure 16: Expression membranaire de différentes formes de HLA sur des HFF-CAR après expression des protéines US.

*Suite à une infection pour 4 jours avec les différents virus à MOI 25, (A) Détection de l'expression du HLA natif par l'anticorps W6 / 32, (B) expression du HLA modifié par l'anticorps HC-10 et (C) Détection à la fois de l'expression du HLA natif et de l'expression du HLA modifié par l'anticorps LSM05, à la surface des HFF-CAR infectés par les différents adénovirus. L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSRFortessa. n = 5 , test Anova * P <0, 05, ** P = 0,007.*

Nous avons ensuite testé l'impact de la dose d'adénovirus, et ainsi l'impact du taux d'expression des gènes US, sur l'expression des molécules HLA-I natives ou modifiées. Les cellules ont été infectées à différentes MOI et après 4 jours l'expression des différentes molécules HLA à la surface des cellules est testée. Pour les molécules HLA-I et les ligands de LSM05 (figure 17), le niveau d'expression diminue avec l'augmentation de la dose d'adénovirus. Ainsi plus les gènes US sont induits dans les HFF-CAR plus on observe une inhibition de molécules HLA à la surface. Cependant, l'expression des molécules de HLA dénaturé, est bien inhibée d'une manière dose dépendante après infection des HFF-CAR avec les adénovirus Rad-US2, Rad-US3 et Rad-US11, mais lorsque ces HFF-CAR sont traités par le Rad-US6 le niveau d'expression des molécules HLA dénaturées reste stable même à forte MOI.

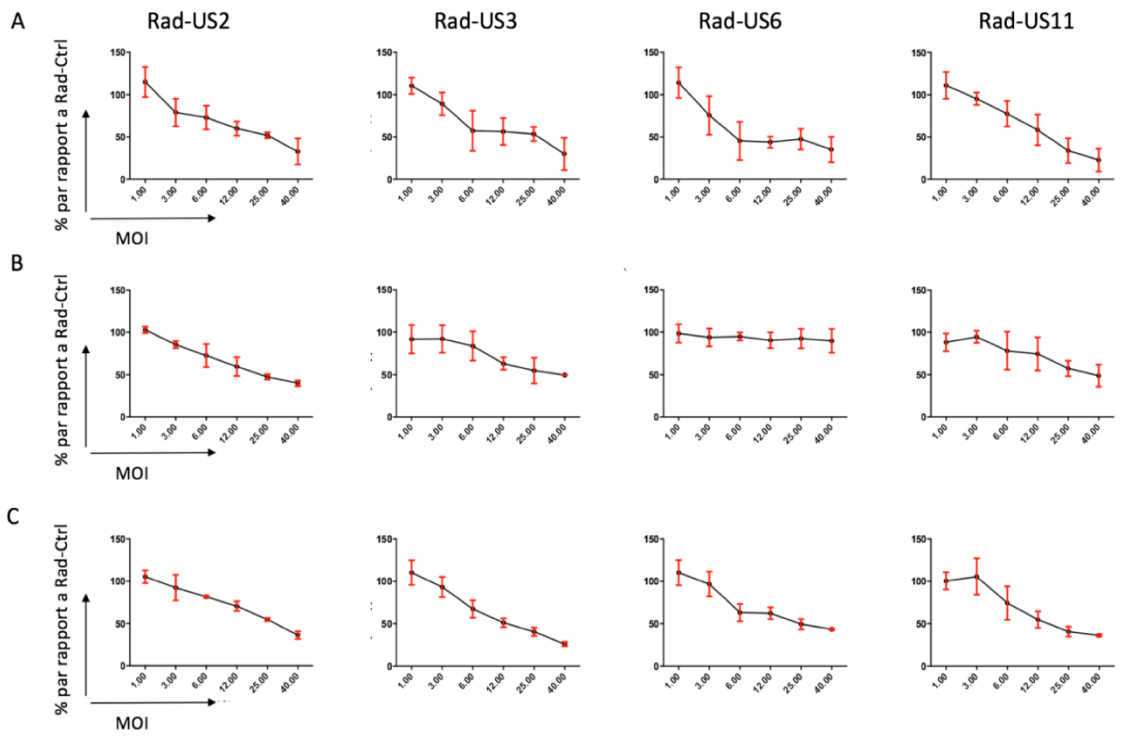


Figure 17: Expression membranaire de différentes formes de HLA sur des HFF-CAR après infection à différents MOI.

Apres infection pour 4 jours, Le taux d'expression des ligands de w6/32 (A), HC-10 (B) et LSMO5 (C) sur les cellules infectées par les Rad-US par rapport à Rad-Ctrl est calculé pour tous les adénovirus et pour chaque multiplicité d'infection. Chaque point représente la moyenne de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs indiquent l'écart type.

Le rapport d'expression HLA dénaturé/HLA-I natif après expression des protéines US2 et US3 est maintenue, un peu moins après US11, alors que l'expression d'US6 montre une augmentation nette du ratio (figure 18). Dans la mesure où le HLA-I modifié peut constituer un ligand de certains TCR $\gamma\delta$, l'augmentation de ce ratio en présence d'US6 pourrait conduire à l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$.

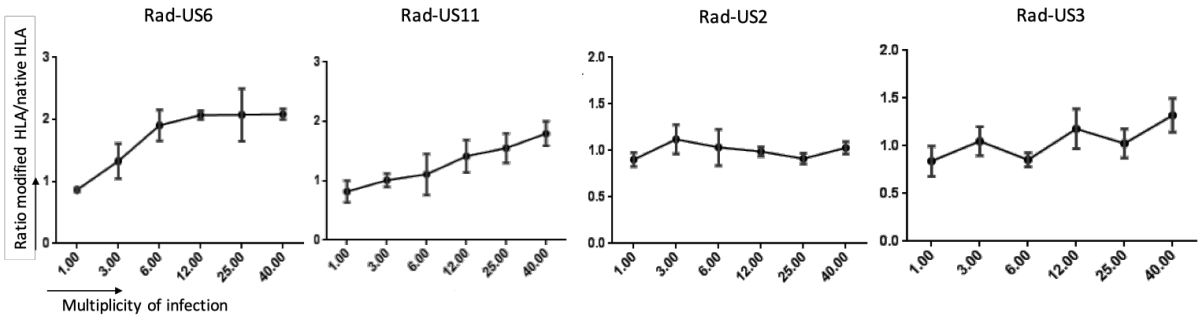


Figure 18: Le ratio de l'expression des molécules HLA dénaturées/HLA natives à la surface des cellules infectées par les Rad-US.

Ce ratio a été calculé pour tous les adénovirus et à chaque multiplicité d'infection. Les barres représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les erreurs indiquent l'écart-type.

3) L'inhibition du HLA n'a pas d'impact sur la reconnaissance des cellules cibles par le TCR γδ.

Nous avons ensuite testé l'impact de cette modulation de molécules HLA sur la reconnaissance des fibroblastes infectés par différents TCR γδ. Il a effectivement été montré que les lymphocytes T γδ peuvent être régulé par les HLA-I :

1- Soit à travers l'expression des récepteurs de HLA-I inhibiteurs type KIRs ou LIRs (Halary et al., 1997; Lawand et al., 2017).

2- Soit par un effet régulateur des HLA-I directement sur la reconnaissance du ligand antigénique par le TCR γδ comme cela a été montré par le groupe d'Eric Champagne pour les lymphocytes T Vγ9Vδ2 (Vantourout et al., 2008).

Pour tester cette deuxième possibilité, nous avons donc d'abord testé la réactivité de plusieurs lignées transduites avec différents TCRs de clones T γδ isolés chez des patients CMV+. La lignée utilisée pour ces transductions est la lignée JRT3 qui est un clone de la lignée lymphomateuse T Jurkat mutée sur le gène codant pour la chaine β du TCR et qui n'expriment pas les récepteurs aux HLA (CD158 a/b/e/h/i/j, CD85, NKG2D, NKG2A, NKG2C). La JRT3 n'exprime donc pas spontanément de TCR mais peut exprimer un TCR recombinant en association avec le CD3 endogène. L'expression du CD69 à la surface de ces lignées est le reflet de l'engagement du TCR. Cette lignée a été transduite avec trois TCR γδ :

- Le TCR Mau Vγ9Vδ1 qui reconnait le récepteur tyrosine kinase EphA2 (non publié)
- Le TCR 73R9 Vγ8Vδ3 qui reconnait l'Annexine A2 membranaire (Marlin et al, PNAS, 2017)

- Le TCR 26 Vγ9Vδ3 qui a pour cible les HLA modifiés (non publié).

Nous observons une réactivité de tous ces TCRs sur les HFF-CAR immortalisés par la télomérase (figure 19). Effectivement ces cellules expriment les ligands EphA2, FHC (données non montrées) et les fibroblastes expriment EPCR d'une manière constitutive. En comparaison avec la réactivité des JRT3 vis-à-vis des HFF-CAR non infectés, l'expression des gènes US et l'inhibition des molécules HLA ne semble avoir aucun impact sur la réactivité des JRT3. La modulation du HLA-I n'a donc pas d'effet sur la reconnaissance directe du ligand antigénique par ces TCR γδ.

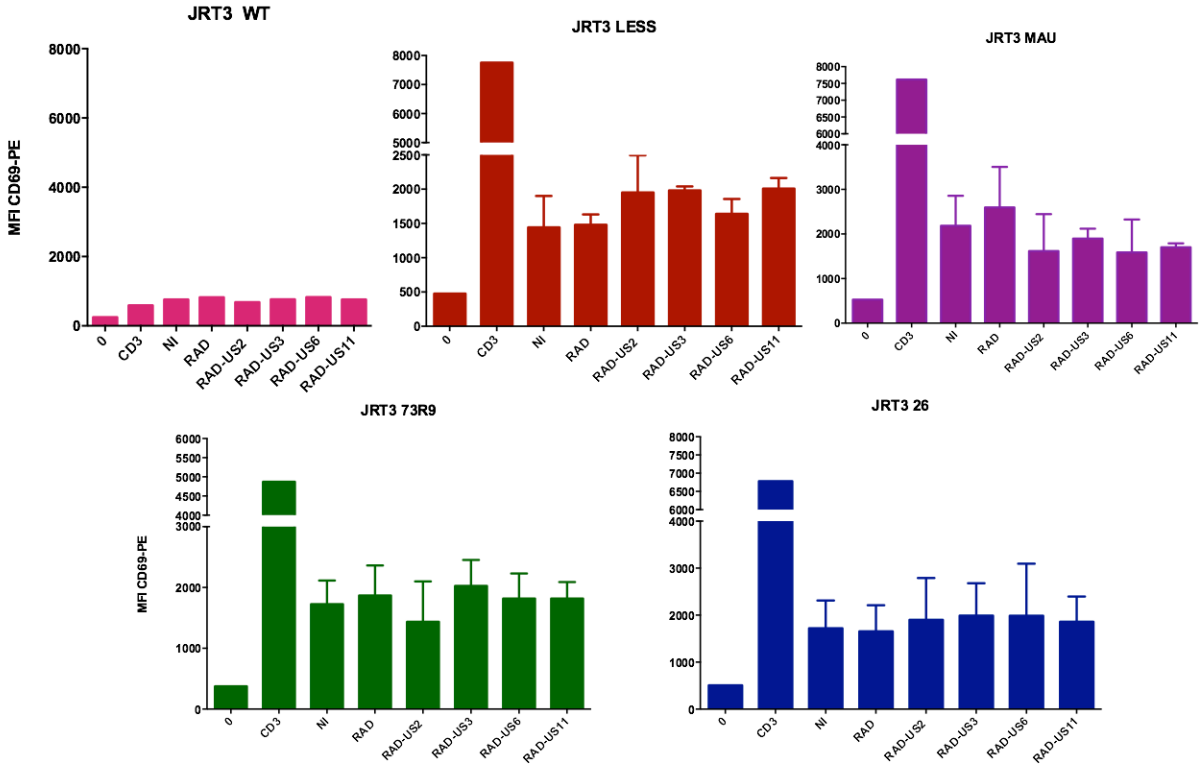


Figure 19: Réactivité des différentes JRT3 transduites avec des TCR γδ vis-à-vis des HFF-CAR traités par les adénovirus exprimant les gènes US.

Après Co-culture pour 4h avec les HFF-Tert pré-infectés pour 4 jours, la réactivité des JRT3 a été évalué par un marquage anti-CD69. L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSRFortessa. Les barres représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les erreurs indiquent l'écart-type.

4) Le CMV-ΔUS induit l'expression des différentes molécules de HLA.

Nous avons ensuite testé l'effet de cette modulation des HLA-I dans un contexte d'infection par le HCMV. Dans ce but nous avons utilisé une souche de HCMV générée par le groupe de Gavin Wilkinson (Cardiff, UK) et qui est déficiente pour la section génique contenant les gènes US1 à US11. Nous avons infecté des fibroblastes humains primaires (HFF) ou les fibroblastes immortalisés par la télomérase (HFF-Tert) avec soit la souche sauvage de HCMV (souche Merlin, HCMV-WT) ou la souche dépourvue des gènes US impliqués dans la régulation négative du HLA-I (CMV-ΔUS). Les souches CMV utilisées expriment la GFP, ce qui permet d'identifier les cellules infectées comme décrit dans la figure 20 pour les HFF-Tert.

A B

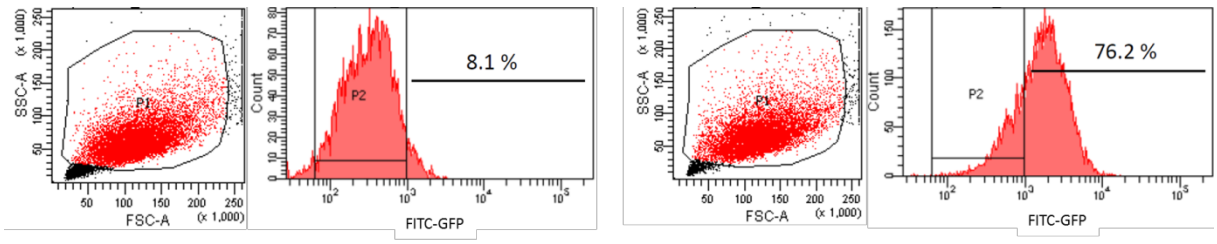


Figure 20: Test de l'infection des HFF-Tert avec les souches recombinantes de HCMV suite à une infection de 4 jours à la MOI 25.

L'Expression de la GFP a été testée sur les fibroblastes non-infectés (A) ou infectés par la souches HCMV-ΔUS (B). L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSRFortessa.

Parmi les cellules infectées, les HFF ou les HFF-Tert traités par le HCMV-WT présentent comme attendu une diminution des molécules HLA-I et des ligands du LSM05, non significatif avec le test statistique mais reproductible sur toute les expériences pour le HFF-TERT, mais significative pour les HFF primaires. En revanche et de façon intéressante, les molécules HLA dénaturées sont induites sur les HFF primaires suite à une infection avec le même virus (figure 21). Lorsque ces cellules sont traitées par le CMV-ΔUS, l'expression des molécules HLA-I et les HLA-I dénaturés est augmentée d'une manière très significative probablement grâce à la réponse des cellules à l'infection qui induit la réponse IFN-I et l'expression des gènes des HLA-

I

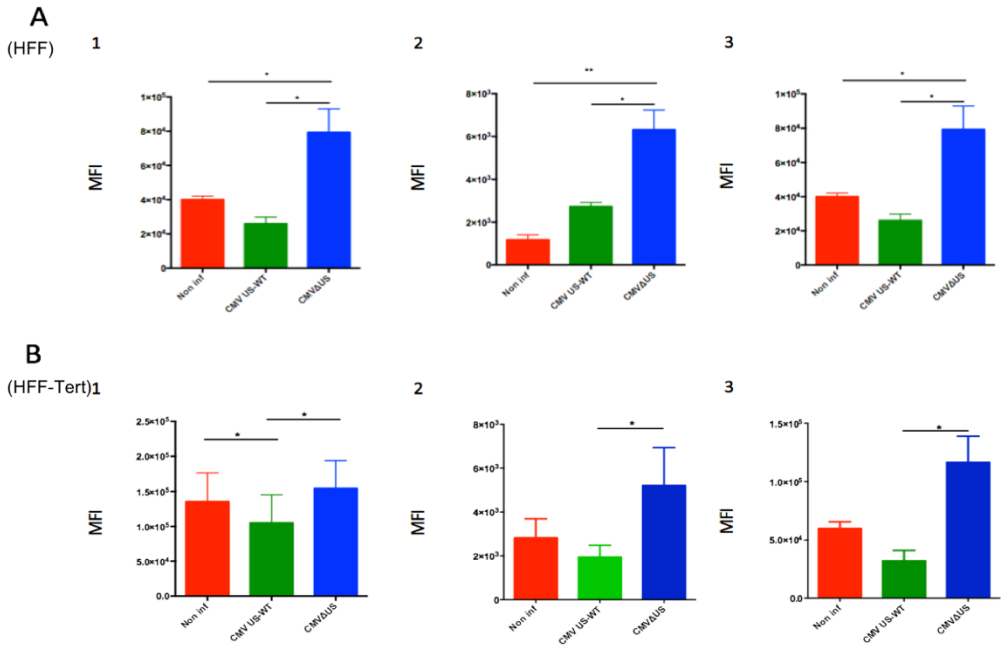


Figure 21: Expression membranaire de différentes formes de HLA sur des HFF après infection avec CMV-WT ou CMV-ΔUS.

*Suite à une infection pour 4 jours à MOI 10, (A1) Détection de l'expression du HLA natif par l'anticorps W6 / 32, (A2) expression du HLA modifié par l'anticorps HC-10 et (A3) Détection à la fois de l'expression du HLA natif et de l'expression du HLA modifié par l'anticorps LSM05, à la surface des HFF primaires infectés. (B1) Détection de l'expression du HLA natif par l'anticorps W6 / 32, (B2) expression du HLA modifié par l'anticorps HC-10 et (B3) Détection à la fois de l'expression du HLA natif et de l'expression du HLA modifié par l'anticorps LSM05, à la surface des HFF-Tert infectée par CMV-ΔUS ou WT. L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSRFortessa. Les barres représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes et les erreurs indiquent l'écart-type. Test d'Anova * P <0,05.*

5) L'augmentation de l'expression des HLA-I modifiés est associée à une réactivité accrue du TCR 26 Vγ9Vδ3.

Cette augmentation de l'expression des HLA modifiés à la surface des fibroblastes infectés nous a poussé à tester le rôle du HCMV-ΔUS sur la réactivité du TCR 26 Vγ9Vδ3 dont il avait été montré qu'il reconnait les HLA modifiés (Marlin et al.,en préparation). Nous avons infecté

les fibroblastes pendant 4 jours puis mis en co-culture avec la lignée reportrice JRT3-26 exprimant le TCR 26 Vγ9Vδ3. Le taux d'activation a été évalué par l'expression de CD69.

La lignée JRT3-26 s'active plus efficacement au contact des fibroblastes primaires infectées par CMV-ΔUS que les cellules infectées par CMV-WT (figure 22), confirmant l'association entre surexpression des HLA modifiés et réactivité du TCR 26 Vγ9Vδ3. L'inhibition de l'expression des HLA-I par les immunoévasines US pourrait donc constituer un mécanisme d'échappement non seulement pour lymphocytes T αβ mais également pour les quelques lymphocytes T γδ qui reconnaissent les HLA modifiés.

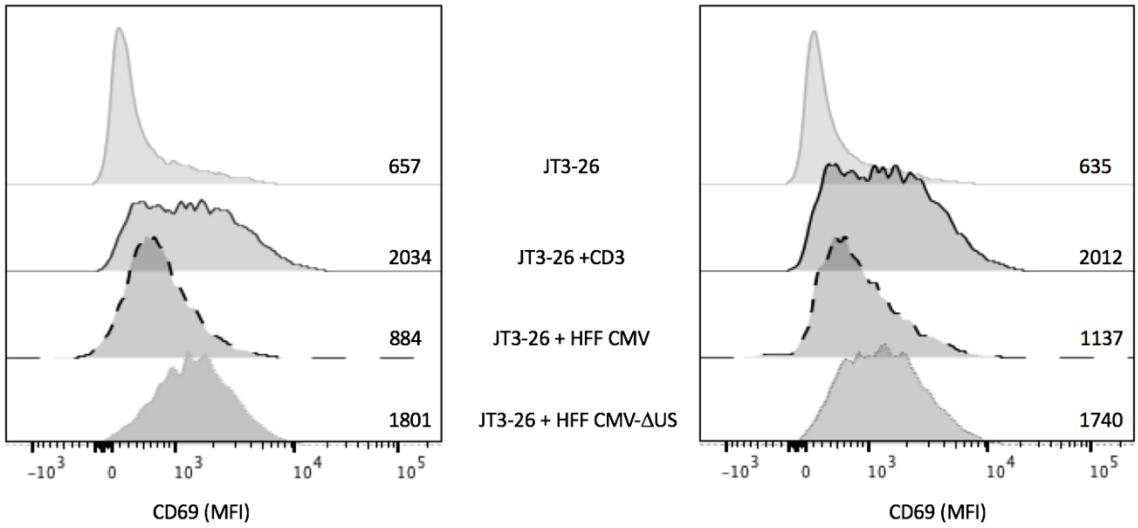


Figure 22: Réactivité des JRT3-26 vis-à-vis des HFF primaires traités par les CMV-WT et CMV-ΔUS.

Après Co-culture de 4h avec les HFF pré-infectés pendant 4 jours, la réactivité des JRT3 a été évaluée par un marquage anti-CD69. L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSRFortessa. Résultats de 2 expériences indépendantes.

6) Régulation de la réactivité du clone 3 Vγ9Vδ3 par la modulation de l'expression des molécules HLA-I par le HCMV.

Nous avons ensuite testé la réactivité de clone T 3 Vγ9Vδ3 vis-à-vis des cellules infectées. En effet le clone 3, exprime des récepteurs des molécules HLA-I telles que le CD158b/j, et sa réactivité peut donc être régulée différemment de la JRT3-26 par la modulation de

l'expression des molécules HLA-I. L'activation du clone 3 est évaluée grâce à sa production d'IFNγ.

D'une façon intéressante, le clone 3, à l'inverse du JRT3-26, s'active lorsqu'il est cultivé avec des HFF primaires infectés par la souche de HCMV-WT, mais pas lorsque les fibroblastes ont été infectés avec la souche de HCMV-ΔUS. Il semble donc que sur les cellules infectées par le HCMV-ΔUS, la surexpression des HLA-I contrecarre l'activation du clone induite par la surexpression du HLA-modifié. Ces résultats suggèrent donc que la régulation par les HLA-I prend le dessus sur la réponse à l'antigène même quand l'expression de celui-ci est augmentée (comme c'est le cas après infection par le HCMV-ΔUS, voir Figure 21).

Nous supposons que le clone 3 est régulé négativement pas l'expression des molécules HLA-I parce qu'il exprime des récepteurs inhibiteurs tel que le KIR CD158b/j.

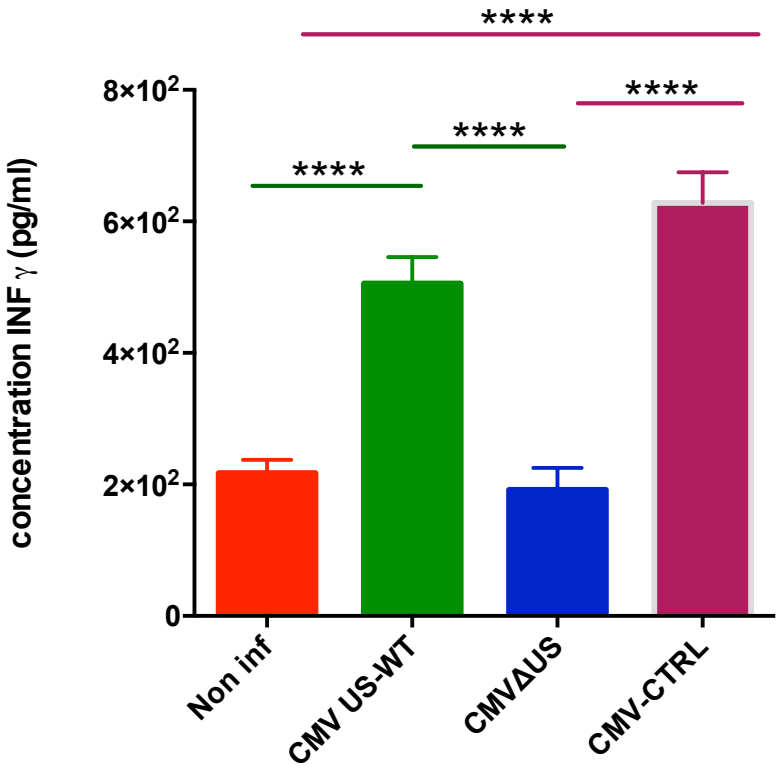


Figure 23: Quantification de la sécrétion d'IFNγ par le clone T 3 Vγ9Vδ3 après co-culture avec des fibroblastes primaires infectées par les différentes souches de HCMV.

*Après co-culture du clone 3 pour 24h avec les HFF primaires pré-infectées par soit le CMV Merlin (CMV-USWT et CMV-DUS) soit le CMV TB40/E (comme contrôle). Ensuite la réactivité du clone est reflétée par le taux de sécrétion d'IFN γ dans le surnageant. Ce taux a été testé par ELISA. Les barres représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes et les erreurs indiquent l'écart-type. Anova test **** <0,0001*

Pour généraliser ces résultats obtenus avec un clone et se rapprocher de conditions plus physiologiques, nous avons testé la réactivité de lymphocytes T $\gamma\delta$ non Vγ9Vδ2 polyclonaux isolés à partir du sang de patients CMV+. Selon cette procédure, les PBMC totaux de patients sont cultivés pendant trois semaines uniquement avec de l'IL2 et de l'IL15, ce qui permet l'amplification et l'enrichissement des lymphocytes T $\gamma\delta$ non Vγ9Vδ2. Ceux-ci sont alors purifiés par tri en cytométrie en flux. Comme présenté dans la figure 24, ces lignées primaires polyclonales de lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent une bonne réactivité contre le HCMV-WT. En revanche, nous n'observons pas ou peu de réactivité lorsque les fibroblastes sont infectés par la souche HCMV-ΔUS. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ non Vγ9Vδ2 polyclonaux sont donc réactifs aux modifications cellulaires induites par le HCMV, probablement à travers la reconnaissance d'antigènes de stress, mais sont régulés négativement si les molécules HLA-I sont surexprimées.

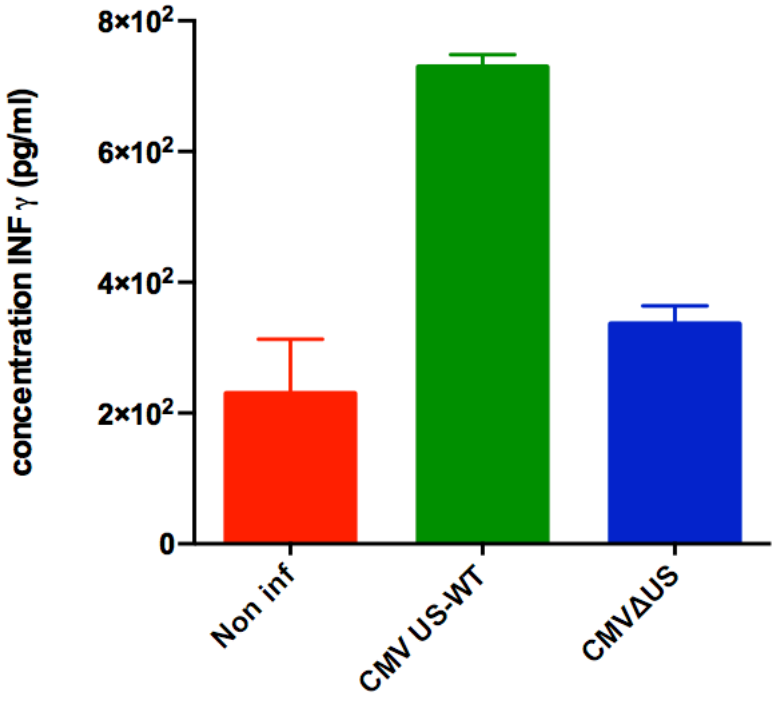


Figure 24: Quantification de la sécrétion d'IFN-γ par les lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 après co-culture avec des fibroblastes primaires infectés par le CMV.

Après tri négative magnétique des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2, ils ont été mis en co-culture pour 24h avec les HFF primaires pré-infectées par soit le CMV-USWT et CMV-ΔUS. Ensuite la réactivité des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 est reflétée par le taux de sécrétion d'IFN-γ dans le surnageant. Ce taux a été testé par ELISA. Les barres représentent la moyenne d'un duplicate de culture représentative de 3 expériences sur 3 patients différents.

Comme l'inhibition de l'expression des HLA-I par le HCMV a été montré comme un mécanisme d'échappement à la réponse des lymphocytes T αβ, nous avons ensuite comparé la réponse à ces différentes souches de HCMV, des lymphocytes T γδ et des lymphocytes T αβ isolés à partir des mêmes patients. Il nous a fallu tout d'abord analyser les allèles HLA-I exprimés par les fibroblastes primaires que nous utilisons. Ceci a été réalisé par biologie moléculaire dans le laboratoire HLA du CHU de Bordeaux (collaboration avec Jonathan Visentin). Les fibroblastes qu'on utilise ont ainsi le profil HLA-A1, A24, B8, B13. Nous avons ensuite sélectionné des patients receveurs de greffes de rein et suivis dans le service de Transplantation Rénale du CHU de Bordeaux. Hannah Kaminski, médecin Néphrologue et étudiante en thèse dans l'équipe, a choisi ceux qui présentaient au moins un allèle HLA-I en commun avec les

fibroblastes. Nous avons ensuite généré les lignées de court terme (culture des PBMC avec de l'IL2 et de l'IL15) et nous avons trié les lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 et les lymphocytes T αβ CD8+ au bout de trois semaines.

La Figure 25 montre que les lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 et les lymphocytes T αβ CD8+ présentent une réponse en miroir aux deux souches de HCMV utilisées : les lymphocytes T γδ s'activent en présence de fibroblastes infectés par la souche US-WT mais ne s'activent pas lorsque les fibroblastes sont infectés par la souches HCMV-ΔUS, à l'inverse des lymphocytes T αβ CD8+.

Ces résultats suggèrent donc un effet opposé de la modulation de l'expression des molécules HLA-I par le CMV sur les deux types de lymphocytes. De plus, cela suggère que les lymphocytes T γδ auraient un avantage sélectif sur les lymphocytes T αβ CD8 lors d'une infection, ce qui pourrait expliquer les expansions très importantes de lymphocytes T γδ parmi les lymphocytes T : elles peuvent atteindre jusqu'à 50% des lymphocytes T dans le sang de certains patients.

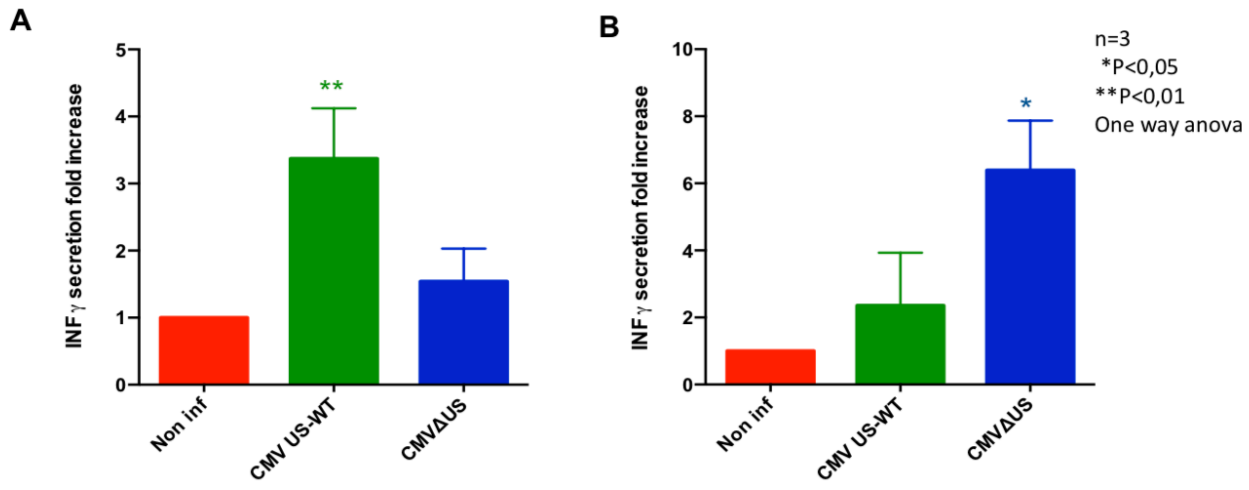


Figure 25: Comparaison de la réactivité des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 (A) et des lymphocytes Tαβ CD8+(B) contre les cellules infectées par le CMV-WT et CMV-ΔUS.

*Après tri négative par FacsAria des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 et des lymphocytes Tαβ CD8+ (du même patient), les cellules ont été mis en co-culture pour 24h avec les HFF primaires pré-infectées par soit le CMV-USWT et CMV-DUS. Ensuite la réactivité des cellules est reflétée par le taux de sécrétion d'IFN γ dans le surnageant. Ce taux a été testé par ELISA. Les barres représentent la moyenne d'au moins 2 expériences indépendantes et les erreurs indiquent l'écart-type. Test d'Anova * P <0,05 ** P <0,005*

7) Spécificité de la réponse et blocage KIR

Les résultats obtenus précédemment suggèrent une implication des récepteurs de HLA-I inhibiteurs comme récapitulé dans le tableau 4.

				Interprétation	
	KIR/LIR	Rad-US	CMV-ΔUS	Modulation de l'activité de TCR par le FHC	Modulation par les récepteurs inhibiteurs
JRT3	-	Pas d'impact	↗	oui	non
Clone	+	nd.	↘	Oui	Oui probablement prend le dessus du signal TCR
Lignées polyclonales	+	nd.	↘	Très peu	Oui probablement

Table 4: Récapitulatif des résultats obtenus et l'interprétation.

Notre hypothèse était donc à ce stade que l'induction des molécules HLA-I par le CMV-ΔUS agirait sur les récepteurs de HLA-I inhibiteurs et masquerait ainsi la réponse induite par le TCR comme montre la figure 26.

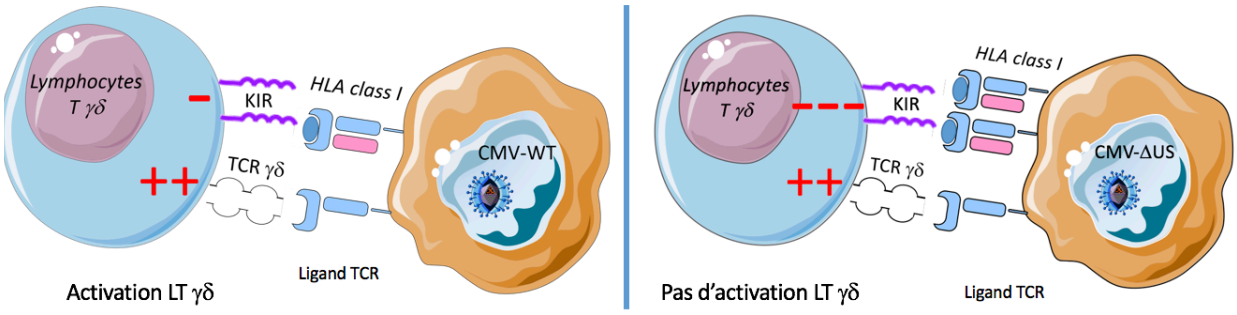


Figure 26: Processus d'activation des lymphocytes T γδ

Ainsi pour tester notre hypothèse nous avons procédé de deux manières soit a) en utilisant un anticorps bloquant la reconnaissance des HLA-I par les KIR (anticorps LSM05) pour être sûr que l'inhibition par le CMV ΔUS passe bien par le HLA-I, soit par un blocage des KIRs pour voir si ça passe par l'expression des KIRs (mais difficile car on ne connait pas l'étendue de tous les KIRs exprimés par ces lignées polyclonales).

Ainsi suite à la culture en IL2/IL15, les cellules ont été phénotypées pour les 2 récepteurs Kir CD158b/j, CD158a et un récepteur Lir CD85j dont nous avions montré qu'ils sont souvent exprimés par les lymphocytes T γδ répondant au CMV (figure 27).

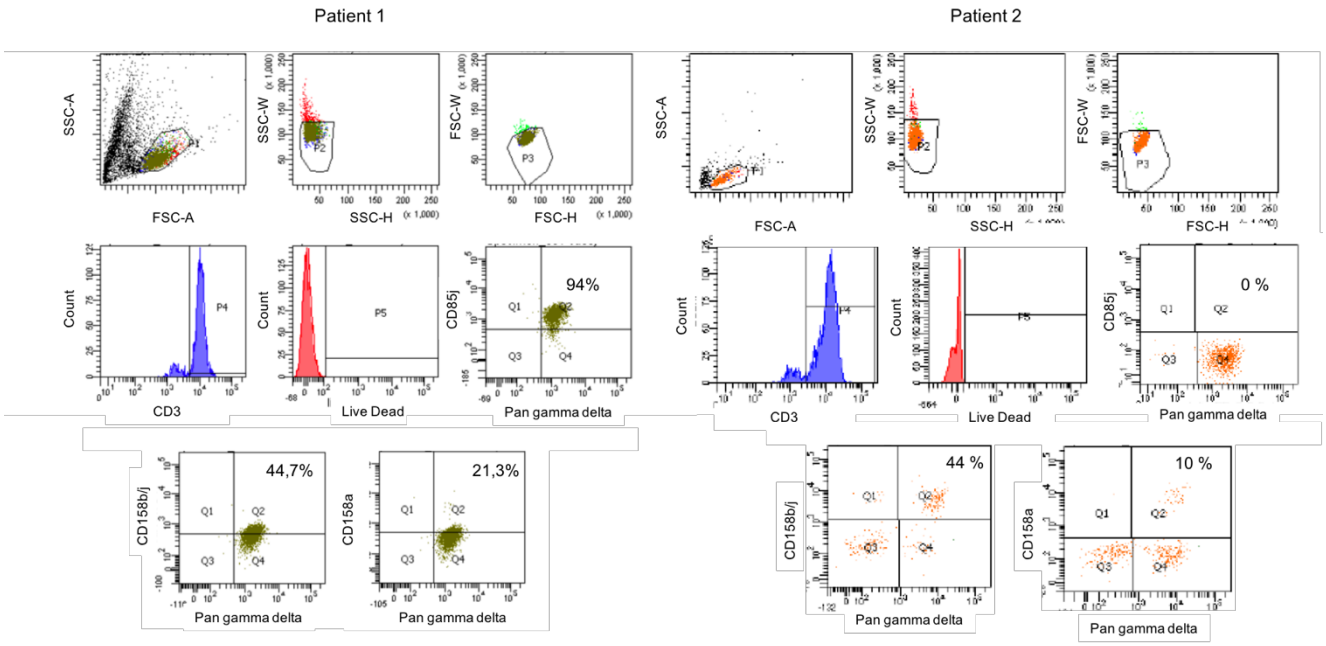


Figure 27: Phénotype d'expression des récepteurs KIR a la surface des lymphocytes T γδ.

Suite à une culture de 3 semaine en présence d'IL2/IL15un milieu favorisant l'expansion des phénotypes TEMRA γδ les cellules ont été phénotypées. Parmi les cellules CD3+ vivantes, l'expression de 2 molécules KIR, et un LIR ont été testées. Notamment CD158b/j, CD158a et CD85j.

Nos résultats indiquent une différence interindividuelle au niveau du taux de l'expression des molécules CD158 et CD85jpar les lymphocytes T γδ polyclonaux, même s'ils ont été cultivés dans les mêmes conditions et ont subi le même traitement (figure 27).

L'implication de ces molécules a ensuite été testée en bloquant soit les récepteurs soit les HLA-I. Nous nous attendions à avoir une réinduction de la réponse des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 lorsque les KIR ou le ligand de KIR sont bloquées notamment dans le cadre de CMV-ΔUS. Mais à l'inverse de notre hypothèse on observe dans nos résultats préliminaires, une inhibition lorsque on utilise le blocage avec les anticorps anti-récepteurs inhibiteurs de HLA-I et a moindre mesure avec le blocage LSM05 (figure 28).

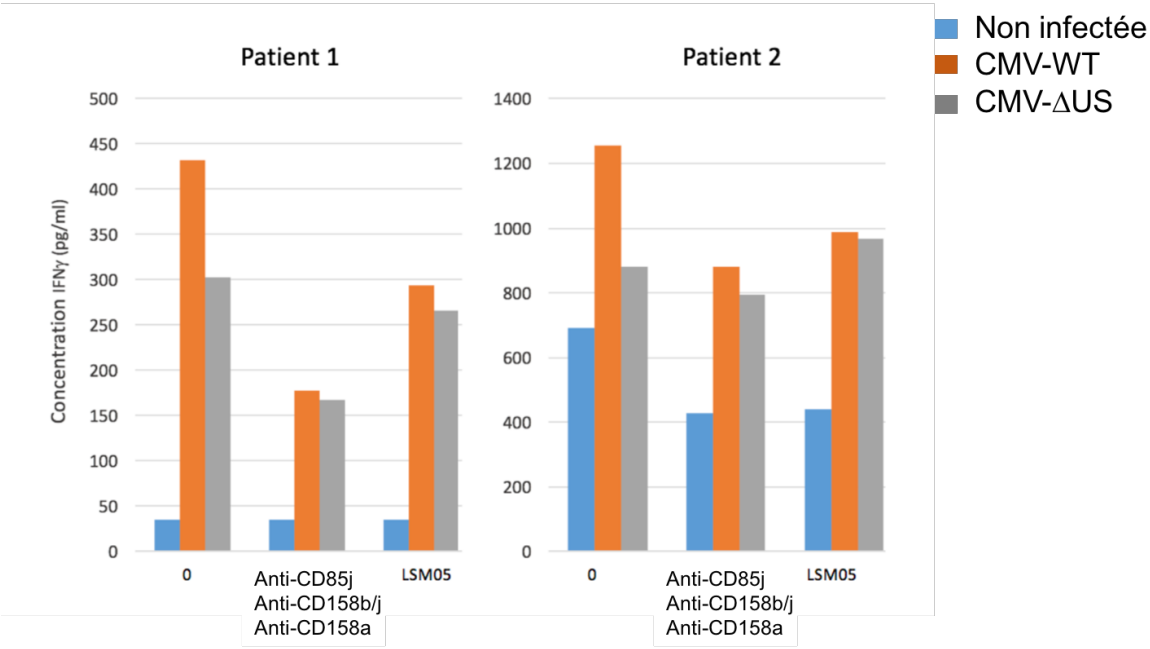


Figure 28: Quantification de la sécrétion d'IFN-γ par les lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 après co-culture avec des fibroblastes primaires infectées par le CMV.

Après tri négatif magnétique des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2, les cellules ont été traitées 15 min a 37°C avec le mélange de 2 anti-KIR et anti-LIR. Ensuite ils ont été mis en co-culture pour 24h avec les HFF primaires pré-infectées par soit le CMV-USWT et CMV-ΔUS et prémarquées ou non avec LSM05 ou W6/32.Ensuite la réactivité des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 est reflétée par le taux de sécrétion d'IFN γ dans le surnageant. Ce taux a été testé par ELISA.

Mais en concordance avec notre hypothèse et d'une manière assez prometteuse nos résultats préliminaires montrent moins d'inhibition de la production d'IFNγ par le CMV-ΔUS (par rapport au CMV-WT) en présence d'anti-KIR ou du LSM05 (figure 29). Ce résultat reste à confirmer mais suggère que l'inhibition de l'activation des lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 par le CMVDUS passe par l'engagement des récepteurs inhibiteurs de HLA-I, et donc que l'inhibition des molécules HLA-I par le CMV qui lui permet d'atténuer la réponse des lymphocytes T αβ engendre une meilleure réponse des lymphocytes T γδ.

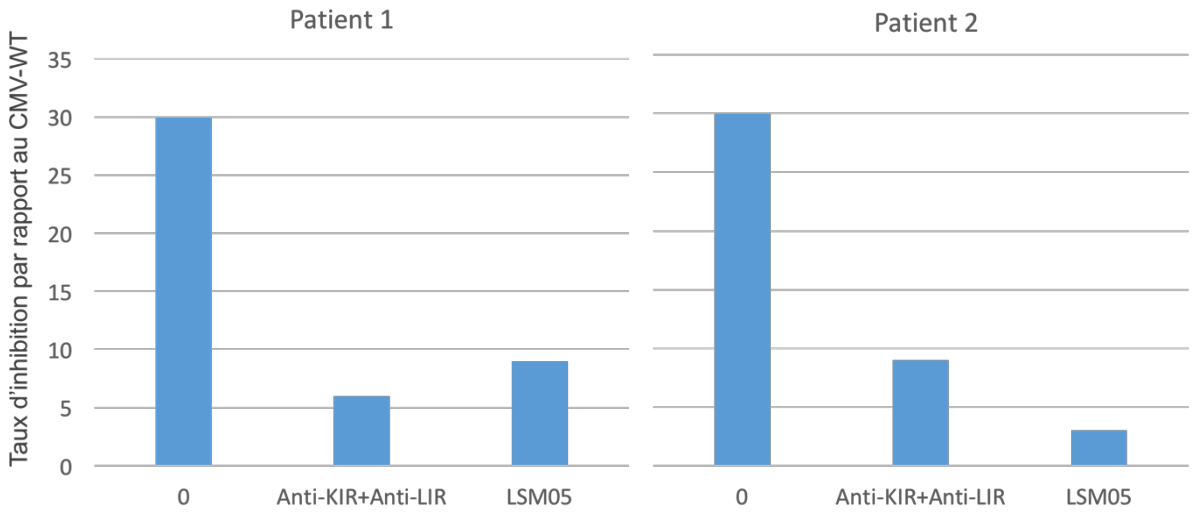


Figure 29: Taux d'inhibition de la production d'IFN-γ par les lymphocytes T $\gamma\delta$ non Vγ2Vγ9 en présence des HFF infectées par le CMV-ΔUS par rapport aux HFF infectées par le CMV-WT

Les lymphocytes T$\gamma\delta$ nonVγ9Vδ2ont été prétraités pour 15 min a 37°C avec le mélange de 2 anti-KIR et un anti-LIR. Ensuite ils ont été mis en co-culture pour 24h avec les HFF primaires pré-infectées par soit le CMV-USWT soit le CMV-ΔUS qui ont été prétraitées ou non avec l'anticorps anti-HLA-I LSM05. Ensuite la réactivité des lymphocytes T$\gamma\delta$ nonVγ9Vδ2 est analysée par leur taux de sécrétion d'IFN γ dans le surnageant. Ce taux a été testé par ELISA. Le taux d'inhibition par rapport au CMV-WT est calculé par l'équation suivante : (concentration d'IFN γ avec les fibroblastes infectés par le CMV-WT - concentration d'IFN γ avec les fibroblastes infectés par CMV-ΔUS) / concentration d'IFN γ avec les fibroblastes infectés par le CMV-WT.

IV- Discussion et perspectives.

Chez les individus immunocompétents, l'infection par le CMV est asymptomatique, par contre chez les individus immunodéprimés tel que les patients transplantés ou atteints de SIDA, l'infection peut causer des maladies graves. De nos jours, les mécanismes mis en jeu par le système immunitaire pour lutter contre le CMV restent un enjeu de recherche important pour la recherche biomédicale.

Des études réalisées dans notre équipe ont montré que l'infection par le CMV induit une expansion des lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 dans le compartiment sanguin chez des individus immunocompétents et, d'une manière plus importante, chez les patients transplantés rénaux immunodéprimés (Déchanet et al., 1999; Pitard et al., 2008a). L'expansion et l'activation des lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 lors de l'infection par le CMV suggèrent que ces cellules jouent un rôle protecteur dans la réponse anti-virale contre cette infection. Dans ce cadre il a été montré que les clones de lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 isolés à partir des patients transplantés rénaux sont réactifs vis-à-vis des fibroblastes infectées par le CMV et ainsi capable de les lyser in vitro (Halary et al., 2005b). Pour aller plus loin et mieux comprendre ces mécanismes notre équipe essaye d'identifier les ligands reconnus par ces lymphocytes.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuation de la caractérisation de ces ligands. Et ainsi, j'ai étudié l'impact des immunoévasines sur l'expression des molécules FHC et l'impact sur l'activation des LT $\gamma\delta$ non-Vγ9Vδ2 .

La structure et les propriétés des molécules FHC restent mal définies en raison de leur expression transitoire et instable. Elles sont soupçonnées de remplir des fonctions immunologiques, suscitant un intérêt considérable pour la recherche, mais leur fonction biologique est loin d'être claire. Certaines études indiquent leur interaction en trans avec quelques récepteurs NKR (CD85d, CD85e et CD85i) et en cis avec divers récepteurs de facteurs de croissance (Giles et al., 2012; Jones et al., 2011) suggérant ainsi un rôle en tant que régulateurs des cellules immunitaires. Cependant, la reconnaissance de FHC comme antigènes par le TCR $\gamma\delta$ dans le cadre d'infection au CMV n'avait jamais été rapportée avant nos observations. De même, l'augmentation de leur expression par le CMV n'avait jamais été décrite. Vu que le CMV code pour au moins quatre protéines (US2, US3, US6 et US11) qui se localisent dans le RE et affectent la stabilité des molécules HLA-I nous avons a testé dans une

première approche l'impact de ces gènes sur les molécules FHC. Malgré le fait que US3 inhibe la fonction du complexe de chargement de peptide (peptide loading complex PLC)en se liant à tapasine (Park et al., 2004), et nous avons montré que seule US6 maintenait une expression élevée des molécules FHC, alors que ces molécules sont diminuées avec US2, US3 et US11. Comme décrit dans l'introduction, US6 inhibe la fonction du récepteur TAP. Ainsi suite à l'expression du gène US6 le chargement de peptides viraux vers le réticulum endoplasmique est inhibé ce qui déstabilise la structuration et l'expression en membrane de molécules HLA-I présentant les peptides viraux. Le fait qu'US6 diminue l'expression des HLA-I natifs mais pas celle des FHC suggère que les FHC n'ont pas besoin de TAP pour être exprimés à la membrane plasmique. Ils pourraient par exemple être générés à partir de molécules HLA-I chargées avec des peptides endogènes générés directement dans le RE. Ce mécanisme pourrait expliquer le maintien de l'expression des molécules FHC que nous avons observée dans les cellules infectées par le Rad-US6. En perspective, il serait intéressant de tester l'expression des FHC sur les fibroblastes déficients pour les molécules TAP.

Dans une seconde approche nous avons testé l'impact de l'infection par le CMV en absence de ces gènes US. L'absence du groupe des gènes US1 à US11 induit l'expression des différentes molécules HLA-I. Cette induction était accompagnée par une activation du TCR 26 Vγ9Vδ3. Des résultats antérieurs de l'équipe montrent que ce TCR reconnait les HLA modifiés (Marlin et al., en préparation). En effet, le TCR 26 provient du clone 3 qui a été isolé chez un patient atteint d'hémochromatose, une pathologie associée à des altérations de la charge peptidique et de la maturation des molécules du HLA-I, entraînant une augmentation du taux de FHC à la surface cellulaire(Feder et al., 1997). Au total, ces observations suggèrent que le clone 3 aurait pu être activé dans un environnement de surexpression de FHC particulièrement élevée due à l'hémochromatose et au CMV, ce qui pourrait expliquer un enrichissement important de ce clone chez le donneur en question.

D'une façon intéressante, la réactivité du clone 3 était inversée par rapport à celle de la JRT3 26. En effet le clone était activé lorsque les molécules HLA sont inhibées donc dans le cas où les cellules sont infectées par le CMV. A l'opposé du JRT3 26 qui n'exprime pas de récepteurs inhibiteurs de HLA-I (en tout cas ceux que nous avons testés), le clone 3 exprime des récepteurs inhibiteurs régulés par les molécules HLA-I tel que CD85j. Ce qui pourrait expliquer la différence de réactivité entre ces deux lignées. En effet de nombreuses publications se sont

intéressées à la présence de ces récepteurs régulateurs sur les lymphocytes T (Vivier and Anfossi, 2004), montrant que les signaux de NKR peuvent être soit inhibiteurs, soit activateurs. L'expression de ces récepteurs est très hétérogène tant sur le plan structural que fonctionnel même au sein d'une population monoclonale. L'équipe avait montré que les lymphocytes T γδ non Vγ9Vδ2 surexprimant des récepteurs de HLA après infection par le CMV (Couzi et al., 2009). L'hétérogénéité de ces récepteurs pourrait être mise en place par l'organisme pour maintenir un répertoire diversifié de ces lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 et pour réguler l'activité de ces cellules au potentiel auto-réactif, de façon similaire aux cellules NK. Dans le cadre de l'infection au CMV qui inhibe l'expression des molécules HLA, ce mécanisme d'inhibition serait levé et donnerait un avantage aux lymphocytes T gd par rapport aux lymphocytes T ab.

Pour généraliser les résultats obtenus avec un clone, et se rapprocher des conditions physiologiques nous avons comparé la réactivité des lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 et des lymphocytes T αβ isolés à partir des patients transplantés rénaux avec au moins un HLA compatible avec nos HFF. En effet et d'une manière générale la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T αβ est restreinte par les molécules HLA, d'où l'utilisation d'un patient compatible au moins avec un HLA des fibroblastes. Cependant, les mécanismes d'activation antigénique des lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 restent mal compris et probablement hétérogènes d'un TCR à l'autre. Bien que notre étude ait mis en évidence un rôle pour les molécules HLA dénaturées dans le cas du TCR 26, comme un signal associé au stress potentiellement capable d'alerter les cellules T non-Vγ9Vδ2 sur l'infection par le CMV, il est généralement admis que la reconnaissance des antigènes n'est pas restreinte au HLA-I.

Ainsi dans notre étude j'ai pu montrer pour la première fois dans le cadre de l'infection de CMV une activation en miroir des lymphocytes T αβ et des lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 provenant du même patient . En Effet, les lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 sont activés lorsque les cellules sont infectées par le CMV-WT mais pas les lymphocytes T αβ. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T non-Vγ9Vδ2 sont bien régulés par les molécules HLA-I mais de manière opposée par rapport aux lymphocytes T αβ. De plus, cela suggère que les lymphocytes T γδ auraient un avantage sélectif sur les lymphocytes T αβ CD8 lors d'une infection, ce qui pourrait expliquer les expansions très importantes de lymphocytes T γδ qui atteindre jusqu'à 50% des lymphocytes T dans le sang de certains patients.

Nous avons essayé dans des expériences encore préliminaires de bloquer a) la reconnaissance des HLA-I par les KIR pour être sûr que l'inhibition par ΔUS passe bien par le HLA-I, b) le blocage des KIRs pour voir si ça passe par l'expression des KIRs. Il semble qu'une inhibition des KIRs ou des HLA-I permettent un retour à une réponse similaire à celle obtenue avec le CMV-WT mais cela mérite d'être confirmé. Le premier essai de blocage avait été réalisé en utilisant l'anticorps w6/32 (données non montrées), qui reconnaît un épitope monomorphe sur les produits polypeptidiques de 45 kD de HLA-A, B, C18 (données non montrées). Aucun blocage n'avait été observé, probablement parce que le site reconnu par le w6/32 très proche de la liaison β2-microglobuline qui n'est pas le site reconnu par les récepteurs KIR (Shields and Ribaudo, 1998).

Pour se rapprocher de la zone des aa 80-82 qui est reconnue par les récepteurs KIR, on a utilisé l'anticorps LSM05 qui lui reconnait la zone 140 à 150 (figure 30). Un élément qui complexifie ces expériences est que sur les lignées polyclonales il y a une expression très polymorphe des récepteurs de HLA-I inhibiteurs. En effet, on observe une différence interindividuelle d'expression des KIR et des LIR au sein de la même population. En plus, l'étendue de tous les récepteurs de HLA-I inhibiteurs exprimés par ces lignées polyclonales est inconnus (nous ne pouvons pas tous les tester avec les anticorps disponibles). Nous avons fait le choix de nous focaliser sur CD85j et CD158 qui sont ceux qui ont été les plus décrits à la surface des lymphocytes T γδ. De plus, certains KIR peuvent être activateurs et inhibiteurs comme décrit dans l'introduction, ce qui compliquerai le blocage anti-KIR. Un même anticorps pourrait activer la forme activatrice et la forme inhibitrice du même KIR puisque la partie extra-cellulaire est identique (Biassoni and Malnati, 2018). Pour régler ce problème il serait intéressant de créer des siRNA qui ciblent l'expression de ces récepteurs inhibiteurs et ainsi bloquer leur expression. La faisabilité de cette manipe est restreinte par le nombre de cellules et la grande diversité de récepteurs inhibieturs de HLA-I à cibler. En plus les lymphocytes T γδ expriment plusieurs corécepteurs, ainsi Il serait intéressant d'essayer peut-être de transduire des JRT3 exprimant des TCR γδ avec des KIR inhibiteurs ou des KIR activateurs.

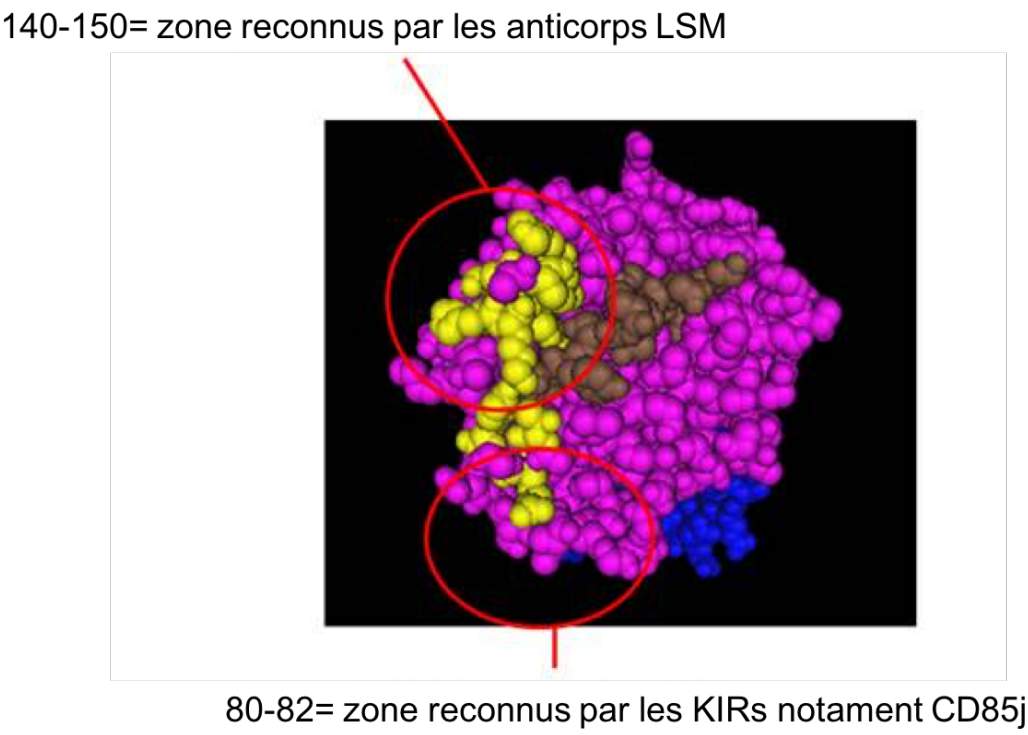


Figure 30: Présentation 3D des peptides reconnus par LSM et les récepteurs KIR.

Donc en conclusion les lymphocytes T γδ peuvent surmonter les processus d'évasion immunitaire développés par le CMV pour échapper aux cellules T αβ. Ces résultats mettent en évidence une fonction non redondante spécifique des cellules T γδ présentant un intérêt particulier dans des contextes de réponses cellulaires en cellules αβ défectueuses telles que des infections de tumeurs.

Une partie des résultats obtenus décrits ci-dessus ont été rajoutés au papier sur l'identification des HLA modifiés qui est présentée ci-dessous.

Comme mentionné dans l'introduction les ligands de lymphocytes Tγδ nonVγ9Vδ2 restent énigmatique. Dans ce cadre Romain Marlin avait montré une corrélation entre l'augmentation des molécules FHC et l'activation du TCR Vγ9δ3. Pour compléter ces données, j'ai testé l'activation du clone exprimant le TCR Vγ9δ3 par les fibroblastes infectés par deux souches distinctes de CMV et analysé sa capacité à produire de l'IFNγ dans ce contexte. Mes résultats

montrent une induction de la production d'IFNγ par le clone TCR Vγ9δ3 que ce soit avec le CMV TB42E ou le CMV MERLIN (**fig. 1 b de l'article**). J'ai également montré une bonne induction de l'expression des FHC sur les fibroblastes Tert infectés par la souche Merlin (**fig. 4 a de l'article**).

Etant donné que l'infection par le CMV induit un stress du réticulum endoplasmique notamment médiée par les gènes US qui régulent la synthèse des molécules HLA-I, j'ai testé l'impact de ces gènes sur l'induction des molécules FHC en utilisant des CMV déficients pour les gènes US1 a US10 (CMV-ΔUS). J'ai ainsi montré une augmentation de l'expression de FHC sur les cellules infectées par ce mutant par rapport au CMV-WT. Cette augmentation de FHC était associée à une augmentation de l'activation de la JRT-26 (**fig. 4f de l'article**).

En conclusion, l'ensemble de nos données montrent un nouveau mécanisme de surveillance du stress cellulaire par les lymphocytes T $\gamma\delta$ médiées par la reconnaissance de molécules FHC.

Article I

Title:

TCR-dependant recognition of modified HLA-I by gamma-delta T cells

Romain Marlin[1], Layal Massara[1], Carrie Willcox[2], Vincent Pitard[1], Sonia Netzer[1], Mahboob Salim[2], Christelle Harly[1], Thomas Bachelet [1], Jean-François Moreau[1,4], David Vermijlen[3], Ceri Fielding[5], Gavin Wilkinson[5], Jean-Luc Taupin[1,4], Benjamin Willcox[2], Jonathan Visentin[1,4] and Julie Déchanet-Merville[1]

1 Univ. Bordeaux, CNRS UMR 5164, Bordeaux, France
2 Birmingham cancer research UK Cancer centre, Birmingham, UK
3 Institute of Pharmacy, Université libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgium
4 Immunology and Immunogenetic laboratory, Bordeaux Hospital, France
5Institute of Infection and Immunity, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom.

Abstract:

γδ T cells are an important component of lymphoid stress surveillance and their implication in the response to cytomegalovirus (CMV) is increasingly established. However, knowledge on the antigens recognized by the heterogenous γδ TCR repertoire induced in this context is still limited. Here, we describe the recognition of modified forms of HLA-I molecules that lack peptide and β–2-microglobulin, (called HLA-I free heavy chains (FHC)) by a Vγ9Vδ3 TCR enriched in a CMV-positive donor. Fibroblast infection by CMV or cell endoplasmic reticulum stress stimulated the expression of FHC, resulting in the TCR-dependent response of Vγ9Vδ3 clone also observed against FHC over-expressing lymphoma B cells. FHC-reactive γδ T cell clones expressing Vγ3Vδ1 TCRs were found in two other patients, indicating that FHC recognition is not restricted to particular Vδ or Vγ usage. Expression of HLA-I inhibitory receptors by FHC-specific clones regulated their activation suggesting a fine tuned control of γδ T cell activation by FHC/classical HLA-I ratio. Altogether our results identify a novel mechanism of cell stress surveillance by γδ T cells through recognition of modified MHC-I molecules that could be particularly relevant to thwart Ag-presentation evasion mechanisms associated to CMV and tumours.

Introduction:

Although we celebrated the 30th anniversary of their discovery, many questions still surround γδ T cells. They are conserved in higher vertebrates and lymphocytes equivalent to γδ T cells have recently been found in lower vertebrates (Hirano et al., 2013). Such conservation suggests that γδ T cells carry essential functions that complement those of the other lymphocytes (αβ T cells, NKT cells, B cells and

NK cells)(Vantourout and Hayday, 2013). In this regard, the molecular mechanisms of γδ T cell activation differ in many points from that of αβ T cells and may allow γδ T cell intervention in defined contexts. As a case in point, γδ T cells are not restricted by MHC molecules and do not express CD28. These particular features do not only endow γδ T cells with the ability to recognize different antigens in different contexts, but also with a mean to counteract immune escape mechanisms developed by many pathogens and tumors.

One prototypic situation illustrating this concept is the infection by Cytomegalovirus (CMV), a widespread *Herpesviridae* considered as a paradigm for viral evasion. CMV encodes molecules to prevent antigen presentation to αβ T cells through inhibition of MHC Class I expression and to suppress NK cell functions by mimicking or down-regulating ligands of NK receptors (NKR). These evasion mechanisms are not expected to affect γδ T cells and, as a matter of fact, their response to CMV has been widely reported in many different physiopathological contexts as well as in CMV-seropositive healthy donors (Dechanet et al., 1999a; Fornara et al., 2011; Knight et al., 2010a; Pitard et al., 2008a; Roux et al., 2013; Scheper et al., 2013a; Vermijlen et al., 2010a). This response never involves the major blood subset of γδ T cells (using Vγ9Vδ2 TCRs), but seemingly involves any other γδ T cell subsets (mainly but not only constituted of Vδ1 and Vδ3 T cells and collectively called $V\delta2^{neg}$ γδ T cells) that populate the epithelia (Dechanet et al., 1999a; Pitard et al., 2008a). In renal transplant recipients, γδ T cell protective anti-viral function is suggested by the association of their expansion with CMV infection resolution (Lafarge et al., 2001). *In vitro*, γδ T cells are activated in a TCR-dependent manner by CMV-infected cells (Halary et al., 2005b; Vermijlen et al., 2010b) and in a CD16-dependent manner by IgG-opsonized CMV virions(Couzi et al., 2011). Activated γδ T cells are able to kill CMV-infected cells and to control viral replication through IFN-γ secretion (Couzi et al., 2011; Halary et al., 2005b).

Quite remarkably, γδ T cell response to CMV holds features of both specific and non-specific response. Two observations illustrate the specificity of this response: (i) our 15 yearlong experience of γδ T cell monitoring in renal transplant recipients revealed that CMV is unique among all pathogens frequently infecting these patients in its capacity to induce $V\delta2^{neg}$ γδ T cell expansions (Dechanet et al., 1999b); (ii) γδ T cell clones that recognize CMV-infected cells do not recognize cells infected with other herpesviridae *in vitro* (Halary et al., 2005b), suggesting the existence of a specific CMV signature recognized by γδ T cells. However, contrasting with this seemingly narrow specificity, γδ T cell clones reactive against CMV-infected cells are also reactive against a wide panel of tumor cells (Halary et al., 2005b; Knight et al., 2010b; Scheper et al., 2013a). As another illustration of this specific/non-specific duality, CMV-induced γδ T cells share characteristics with both non-specific innate cells (i.e. massive expansion of cells expressing diverse Vδ and Vγ regions (Dechanet et al., 1999b)expression of NKR (Couzi et al., 2009; Pitard et al., 2008a) and specific adaptive cells (i.e. highly restricted clonality in some patients(Dechanet et al., 1999a; Vermijlen et al., 2010c) , concomitant expansion with CMV-specific αβ T cells(Couzi et al., 2009), memory cell phenotype and accelerated expansion during secondary response to CMV (Pitard et al., 2008a). Such duality might lies in γδ T cells peculiar mode of activation and functions that might be important to complement αβ T cells and NK cells in the control of CMV.

Which antigens can elicit this peculiar innate/adaptative dual response of γδ T cells to CMV? Stress-induced self-antigens (by opposition to microbe-specific peptides, lipids or metabolites) expressed in different but anyway potentially specific contexts could be good candidates. Accordingly, although ligands of γδ T cells remain poorly characterized, most of those that have been identified are self-antigens consistent with γδ T cells role as important effectors of tissue stress surveillance (Vantourout and Hayday, 2013). Among such biochemically established γδ TCR ligands, there is an important representation of unconventional MHC molecules among which murine T22 (Adams et al., 2005) or human CD1d(Luoma et al., 2013; Uldrich et al., 2013), CD1c (Spada et al., 2000) and MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) (Wu et al., 2002). With respect to CMV, we have recently shown that the Vγ4Vδ5 TCR of a clone enriched in a CMV-infected patient and harboring the dual reactivity against CMV and tumors, recognized the Endothelial Protein C Receptor (EPCR)(Willcox et al., 2012). EPCR is also MHC-like and very closely related to CD1d.

Surprisingly however, EPCR is constitutively expressed on endothelial cells and CMV infection does not modulate its expression, thus cannot be considered as a *bona fide* stress antigen. Activation of EPCR-specific Vγ4Vδ5 T cell clone was induced by a multi-molecular stress signature induced by CMV through over-expression of co-stimulatory ligands (eg Intracellular adhesion marker 1 / ICAM-1) (Couzi et al., 2009; Pitard et al., 2008b). EPCR is only one of the reactivities of γδ T cells associated with CMV and tumors, many other stress antigens remain to be discovered. MICA and CD1d are absent from the surface of CMV-infected cells (Halary et al., 2005a) and are the targets of CMV and tumor immune evasion strategies (Cerboni et al., 2014; Chalupny et al., 2006; Groh et al., 2002; Raftery et al., 2008). Putative γδ TCR stress antigens induced by infection or transformation and resistant to viral and tumor immune escape would provide γδ T cells with an activation competitive advantage over αβ T cells and NK cells. Identification of these antigens is crucial to understand the basic function of γδ T cells and the meaning of their dual specific/non-specific response to CMV.

Vδ3^{+} T cells are expanded in CMV^{+} transplant recipients(Dechanet et al., 1999b) or CMV^{+} healthy individuals (Pitard et al., 2008b) as well as in B cell chronic lymphocytic leukemia (Bartkowiak et al., 2002). Vδ3^{+} clones or lines are activated by lymphoma B cells (Harly et al., 2011) and by CD1d (Mangan et al., 2013) but direct ligand of Vδ3 TCR has never been reported so far. Vδ3^{+} T cells are enriched in intestinal epithelium(Peyrat et al., 1995) and liver (Kenna et al., 2004), and are representative of the γδ T cells at the first line in stress surveillance. Then, the present study aimed at characterizing the ligand recognized by a Vδ3^{+} γδ T cell clone with dual reactivity against CMV-infected and B lymphoma cells.

Materials and Methods:

Generation of γδ T cell clones

PBMCs were generated from blood samples collected for medical care after approval by the local medical ethics committee. Vδ2^{neg} γδ T cells from PBMCs of CMV-seropositive haemochromatosis patient (#047) were sorted using magnetic beads coated with anti-Vδ1 and Vδ3 mAbs. Sorted Vδ2^{neg} γδ T cells were expanded in RPMI medium supplemented with 10% human serum, 1000 U/ml rIL-2 (Chiron), 1 µg/ml leuco-agglutinin (Sigma-Aldrich), and 35 Gy irradiated allogeneic PBMCs. After 1-month amplification, Vδ2^{neg} T-cell lines were cloned by flow cytometry (FACSAria), expanded as described above and then used in the experiments.

In some experiments, PBMCs from kidney transplant recipients (for Clones BP#12 and LY#22) were cultivated with irradiated allogenic B-EBV cells and 300 U/ml IL2. After 3 weeks, amplified Vδ2^{neg} γδ T cells were sorted using FACSAria (BD Biosciences) after staining with anti-CD3, anti-Vδ2 and anti-TCRγδ mAbs. Sorted Vδ2^{neg} γδ T cells were expanded and cloned as described above.

Generation of JRT3-26

cDNA encoding γ9 and δ3 TCR chains of T cell Clone 26 was amplified by RT-PCR and subcloned into pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen). cDNAs were then ligated into the lentiviral vector TEEW in which they were under the control of EF1a promoter. Lentivirial particles were produced by transient transfection of packaging 293T HEK cells as described (Geronimi et al., 2003). Viral titers were determined by enzyme-linked immunosorbent assay of viral protein p24. All this was done in the lentiviral vector production facility of SFR TransBioMed (Structure Fédérative de Recherche, Biologie Fondamentale et Appliquée à la Médecine, Bordeaux University). J.RT3-T3.5 cells (from American Type Culture Collection) were co-transduced with lentiviral particles expressing Vγ9 TCR chain and particles expressing Vδ3 TCR chain. This was done at a multiplicity of infection of 2, 4 or 8 in RPMI medium supplemented with 8% FCS. At 24h post-infection, cells were washed and stained with an anti-γδ mAb. Positive cells were sorted by flow cytometry (FACSAria).

β-2-microglobulin silencing

Short hairpin RNA (shRNA) sequence (B2M#859) was designed for targeting fully conserved RNA sequence encoding for beta-2-microglobulin. Oligonucleotides 5'GATCCCCAGTAAGGCATGGTTGTGGTTTCAAGAGAACCACAACCATGCCTTACTTTTTTTGGAAA-3', 3'TTTCCAAAAAAAGTAAGGCATGGTTGTGGTTCTCTTGAAACCACAACCATGCCTTACTGGGGATC-5' and irrelevant sequence (shControl) were annealed and cloned downstream from the H1 shRNA gene promoter before introduction of the sequence-verified H1-shRNA cassette into the lentiviral vector FG12.34. Lentiviral particles were produced as described previously. The inhibition of HLA-I expression in transduced cells was checked by flow cytometry and cells were sorted using a FACSAria sorter.

Expression of HLA alleles

Full-length cDNAs for HLA-A01*01, HLA-B18*01 and HLA-B35*01 were from One Lambda and subcloned in pcDNA3.1 plasmid. HLA-I deficient K562 cells were transfected by electroporation and then selected by culture with neomycin (G418 1.2mg/ml). HLA-I expression was checked by flow cytometry with W6/32 mAb staining. Then cells were cloned by limiting dilutions and HLA typing was realized on clones to confirm expression of HLA-A01*01, HLA-B18*01 or HLA-B35*01 alleles.

T cell Functional assays

JRT3-26 or JRT3 transduced with other indicated TCRs ($1x10^5$ cells per well) were incubated with tumor cell lines pre-stained with Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, 1µM) at 1:1 (E:T) ratio. In some experiments, target cells were pre-treated for 48h with tunicamycin (Sigma, 25, 5, 1, 0.2 or 0.04 µg/ml) or 16h with thapsigargin (Sigma, 0.5, 0.1, 0.02, 0.004 µM), kind gift from Dr E Chevet (Bordeaux, France). After 4h at 37°C, activation of JRT3 cells was assessed by expression of CD69 using PE-conjugated anti-CD69 mAb (Beckman Coulter). Data were collected on a LSRFortessa 2-Blue 3-Violet 3-Red 5-Yelgr laser configuration (BD Biosciences) and analysed using Diva (BD Biosciences) and FlowJo 9.3.2 (Tree star) softwares (flow cytometry facility of SFR TransBioMed). Cytotoxic activity of γδ T cell clones was assessed using CD107a mobilization assay. γδ T cell clones were co-cultured with $CFSE^+$ tumor cell lines, fibroblast (foreskin or lung fibroblast) uninfected or infected with CMV clinical strain TB40/E (3 or 4 days post infection) at 1:2 (E:T) ratio, in the presence of PE-conjugated anti-CD107a mAb (BD Biosciences) and monensin (5nM; Sigma). Expression of CD107a marker was analyzed by flow cytometry after 6h of co-culture. In some experiments, following blocking antibodies were added to the culture: anti-Vγ9 (IMMU 360), anti-Vδ3 (P11.5B), anti-Vδ1 (R9.12), anti-CD158b/j (GL183, Beckman coulter), anti-CD85j (GHI/75, Biolegend), LSM (anti-HLA-I home-made mAbs), W6/32 (anti-HLA class I molecule containing both β2m and the heavy chain, Thermo Fisher Scientific), HC-10 (anti-HLA class I free heavy chain, kind gift from Pr Paul Fish) all used at a 10 µg/ml concentration. Another way to test γδ T cell clones reactivity, was the quantification of IFN g in the supernatant. After 24h of culture with fibroblasts infected or not with different strain of CMV (CMV TB42E, CMV Merlin), Supernatants were harvested and IFNγ amounts were quantified by ELISA (Human IFNγ ELISA development kit, Mabtech).

Generation of LSM mAbs

Experimental protocol was approved by Animal Care and Use committee board of Bordeaux (N°50120124-A). SKW6.4 cells (12×10^6 cells in 50 µl PBS) were injected without adjuvant into each footpad of the back legs of BALB/c mice (n = 2). Ten days later, mice were boosted in the same conditions, and at day 14, popliteal lymph nodes were collected and B cells were extracted and fused with the mouse myeloma partner P3U1 at a 1:1 ratio. Hybridomas were grown to confluence and assessed for neutralization of JRT3-26 reactivity as follows. Hybridoma supernatants (50 µl) were added to 96-well U-bottomed plates containing $CFSE^+$ SKW6.4 cells (5×10^4 cells per well). After 30 min at room temperature, JRT3-26 cells were added (5×10^4 cells per well) and plates were incubated for 4 h at 37 °C. Cells were stained with PE-conjugated anti-CD69 mAb and analysed by flow cytometry. Six hybridomas secreting antibodies that strongly neutralized JRT3-26 reactivity, were selected and cloned

by limiting dilution, and the resulting mAbs were called LSM mAbs. All LSM mAbs were purified using a column of Protein A agarose resin.

Immunoprecipitation with LSM mAbs

SKW6.4 or Daudi cells were washed twice with PBS before surface biotinylation for 30 min at 4 °C with sulfo-*N*-hydroxysuccinimide–LC–biotin (0.5 mg/ml in PBS; Thermo Fisher). Reactions were quenched by the addition of Tris, pH 7.4, to a final concentration of 20 mM. Cells were then washed and lysed for 30 min on ice in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 and Complete protease inhibitor 'cocktail' (Roche)). Insoluble materials were removed by centrifugation at 17,000*g* for 15 min. Soluble lysates were precleared for 1 h at 4 °C with agarose beads coated with protein A (Biorad), then supernatants were immunoprecipitated overnight with LSM or W6/32 mAbs coupled to Protein A agarose beads. Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, separated by SDS-PAGE in reducing condition and detected with streptavidin–horseradish peroxidase (Thermo Fisher). To confirm the anti-HLA-I specificity of LSM mAbs, same immunoprecipitation procedure was used except that cells were not biotinylated and that revelation was done using the EMR8-5 anti-HLA-I mAb (0.2µg/ml ; Abcam).

Florescent microscopy

Human foreskin fibroblasts were cultured 96h in Lab-Teck chamber slide systems (Thermo-Scientific) in presence or absence of TB40/E human cytomegalovirus strain. Cells were then washed and fixed 20 min with a 2% paraformaldehyde solution. Primary staining was performed during 1h at room temperature and Alexa Fluor 488 conjugated goat-anti-mouse IgG (Invitrogen) was added as secondary antibody during 30 min. DAPI staining (0.5µg/ml, Invitrogen) was used to detect cell nuclei. Slides were mounted in Vectashield mounting media (Vector) and analysed with an Olympus AX70 microscope.

Characterization of HLA allele specificity of LSM mAbs

LSM mAbs were used in a single antigen flow bead (SAFB) assay (LabScreen single antigen LS1A04, One Lambda, Canoga Park, CA) on a Luminex platform. The tests were performed according to manufacturer's instruction except that phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse Ab was used as revelation antibody. Measured Mean Fluorescence Intensity (MFI) values were normalized using the baseline formula proposed by the Fusion software (One Lambda).

Determination of LSM binding region on HLA-I

HLA protein sequences were obtained on IMGT/HLA database (EMBL-EBI, UK) and alignments were performed with ClustalW2. Comparing the sequences between all the alleles recognized by each LSM mAb to the sequence of unrecognized alleles showed that the difference concentrated in the 140 to 160 aa region of alpha-2 helix. This was made possible in focusing on very close but differently recognized alleles. For instance, LSM-03 binds B40:02 but not B40:01 which are different by aa at position 143 and 147, and binds B15:13 but not B15:11 which are different by aa at position 156. Moreover, differences also concentrated in the 140-160 region when comparing the few HLA-A alleles recognized by LSM-02, LSM-03, LSM-04 or LSM-05 to the HLA-A alleles not recognized. Finally, a combination of four amino-amino acids (Q144, R145, A149 and R151) was present in all the alleles (contained in the luminex assay) that are recognized by all four LSM mAbs and absent in all the alleles that are not recognized. This combination was also absent from the H2d allele of Balb/c mice in which LSM mAbs were generated. As LSM-01 and LSM-06 were recognizing all HLA alleles but had the same blocking activity as the four other mAbs, they probably recognize a more represented epitope in the same 140-160 region.

HLA typing of tumor cell lines and clones

Tumor cell line and clone HLA-A, -B and -C genotypes were determined with High Resolution Sequence Specific Oligonucleotide assay (One Lambda) according to the manufacturer's instructions.

Results:

Vγ9Vδ3 TCR dependent recognition of target cells

Vδ3 T cells are expanded in the course of CMV infection as shown before in CMV-seropositive individuals (Pitard et al., 2008b) and shown here for 20 renal transplant recipients and one CMV^{+} hemochromatosis patient (Supplemental Fig. S1a). In order to know whether Vδ3 T cells could recognize antigenic stress ligands induced by CMV infection or tumor transformation, we focused on the γδ T cell Clone 26 (Vγ9Vδ3) that was isolated from a CMV seropositive hemochromatosis patient (#047) who displayed 4.6% of Vδ2^{neg} γδ T cells among circulating T cells (Supplemental Fig. S1b). The polyclonal Vδ2^{neg} γδ T cell line generated from this patient's PBMC comprised 66% of Vγ9Vδ3 T cells whose spectratyping and sequencing of CDR3γ and CDR3δ revealed a massively preponderant sequence corresponding to that of Clone 26 (Supplemental Fig. S1b,c). This clone was thus considerably enriched in this individual, and it typically displayed TCR-dependent dual reactivity against CMV-infected cells (Fig. 1a,b) and tumor cells (SKW6.4 lymphoma cells in the present case, Fig. 1c). To confirm that the TCR played a critical role in clone reactivity, cDNA encoding for Vγ9 and Vδ3 TCR chains were obtained from Clone 26 and retroviraly transduced into the TCR-deficient human J.RT3-T3.5 T cells to produce the JRT3-26 cells (Supplemental Fig. S2a). The antigenic specificity of JRT3-26 was assessed against a panel of 42 tumor cell lines, among which only three B lymphoma cell lines (SKW6.4, LP-1 and B-EBV BOI) induced JRT3-26 cell activation, with a magnitude of at least three times over the baseline, as checked by the expression of CD69 on JRT3-26 (Fig. 1d and all 42 tumor cell lines are represented in Supplemental Fig. S2b). These three JRT3-26 target cells did not activate the same J.RT3-T3.5 T cell line transduced to express any of seven other dual reactive Vδ2^{neg} γδ TCRs available in our team (shown in Fig. 1e for those containing Vγ9 or Vδ3 chains). Blocking either Vγ9 or Vδ3 chains using neutralizing mAbs abrogated JRT3-26 reactivity against target cells (Fig. 1f). Altogether, these results support the conclusion that the enriched Vγ9Vδ3 TCR 26 recognizes a common antigen expressed on both CMV-infected cells and some lymphoma cells.

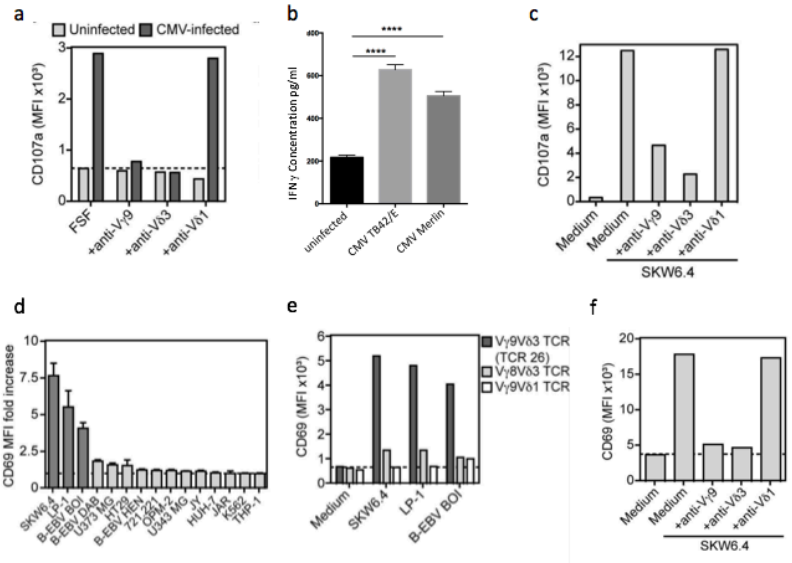


Figure 1 : Vγ9Vδ3 TCR-mediated recognition of CMV-infected cells and B cell lymphoma.

*Activation of Clone 26 was measured by cell surface expression of CD107a after a 6 hours co-culture with (**a**) uninfected (light grey bars), CMV-infected (dark grey bars) foreskin fibroblasts (FSF) or (**c**) SKW6.4 lymphomas in absence of any mAb or in the presence of anti-Vγ9, anti-Vδ3 or anti-Vδ1 mAbs. Also after 24h of co-culture with uninfected and CMV infected fibroblasts (**b**). (**d**) Activation of JRT3-26 reporter cell was measured by CD69 expression on JRT3-26 cell surface after a 4 hours co-culture with target cells. CD69 staining mean of fluorescence intensity (MFI) for each condition was normalized by MFI measured on JRT3-26 cultured in medium alone (dotted line). Bars represent the mean of at least 3 independent experiments and the errors indicate the SEM. Target cells that induced highest JRT3-26 activation were represented in dark grey. (**e**) Activation of JRT3-26 (Vγ9Vδ3 TCR), JRT3 73R9 (Vγ8Vδ3 TCR) and JRT3 MAU (Vγ9Vδ1 TCR) detected by flow cytometry after a 4 hours co-culture with SKW6.4, LP-1 or B-EBV BOI cells. (**f**) Activation of JRT3-26 against SKW6.4 target cells in absence of any mAb or in the presence of anti-Vγ9, anti-Vδ3 or anti-Vδ1 mAbs. In all panels, the dotted lines represent the CD107a or CD69 baseline expression measured on the Clone 26 or the JRT3-26 incubated in medium alone (negative control). Data are representative of at least 3 independent experiments.*

Generation of LSM mAbs that inhibit Vγ9Vδ3 TCR activation

We then sought to identify the antigenic ligand of this Vγ9Vδ3 TCR. First, the three reported direct ligands of Vδ2^{neg} γδ T cells, i.e. EPCR, CD1d and MICA, could be excluded since they were not expressed on the surface of SKW6.4, LP-1 nor B-EBV BOI cells (Supplemental Fig S3a). Then, we applied the monoclonal antibody based strategy we have previously developed to identify EPCR as the antigenic ligand of a CMV-induced Vγ4Vδ5 T cell clone (Willcox et al., 2012). This method relies on generating blocking mAbs having the same antigenic specificity as the TCR of interest (see Methods). BalB/C mice were immunized with SKW6.4 cells and, after hybridoma selection and cloning, six mAbs abrogating JRT3-26 activation by SKW6.4 cells were retained and called LSM01 to LSM06 (Fig. 2a). LSM mAbs also inhibited recognition by JRT3-26 of the two other targets, LP-1 and B-EBV BOI (Supplemental Fig. S3b). Inhibition of JRT3-26 reactivity was TCR-specific since LSM mAbs did not alter activation of the same JRT3 cells expressing other Vδ2^{neg} γδ TCR recognizing different tumor cells (Fig 2b) or recognizing their cognate antigenic ligand transduced in the same SKW6.4, B-EBV BOI and LP-1 cells (Fig. 2c and Supplemental Fig. S3c,d). Altogether, these results showed that LSM mAbs specifically abrogated recognition of target cells by TCR 26 and seemingly recognized the same antigen as this TCR.

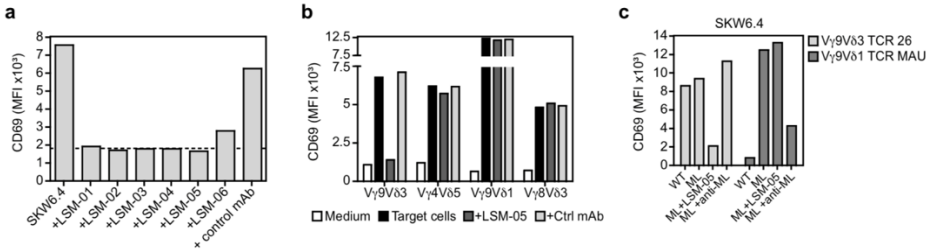


Figure 2: LSM mAbs specifically inhibit Vγ9Vδ3 TCR reactivity.

*(**a**) Activation of JRT3-26 cells against SKW6.4 target cells in absence of any mAb (SKW6.4) or in the presence of each LSM mAb (LSM-01 to LSM-06) or control mAb (control mAb). Dotted line represent the CD69 baseline expression measured on negative control (medium). (**b**) Activation of JRT3 reporter cells expressing Vδ2^{Neg} γδ TCR (JRT3-26 / Vγ9Vδ3 TCR, JRT3 LES / Vγ4Vδ5 TCR, JRT3 MAU / Vγ9Vδ1 TCR and JRT3 73R9 / Vγ8Vδ3 TCR) against their own target cell (SKW6.4, HT-29, U373MG respectively), in the absence of mAb (Target cells) or in the presence of LSM-05 or control mAbs (Ctrl mAb). (**c**) Specific target cells of JRT3-26 were transduced to express the TCR MAU ligand (ML). Reactivity of JRT3-26 (Vγ9Vδ3 TCR) and JRT3 MAU (Vγ9Vδ1 TCR) were measured in co-culture with wild-type (WT) or MAU-ligand-transducted (ML) SKW6.4, in the presence of LSM-05 and anti-MAU-ligand mAbs. Data are representative of at least 3 independent experiments.*

LSM mAbs recognize the alpha-2 helix of HLA class I molecules

To characterize the molecular target of LSM mAbs, we first determined its molecular mass by immunoprecipitation from biotinylated SKW6.4 cell surface proteins. All LSM mAb specifically immunoprecipitated the same main band of approximately 45-50 kDa (Fig. 3a). Then, we analysed the distribution of LSM antigen expression on a large panel of cells. Flow cytometry analyses showed that LSM mAbs strongly stained the three B lymphoma targets (SKW6.4, LP-1 and B-EBV BOI), but also unexpectedly stained many tumor cell lines that did not induce JRT3-26 activation, including the effector JRT3-26 cells themselves (Fig. 3b). Fresh T, NK and B cells as well as monocytes from peripheral blood samples were also positive for LSM mAb staining (Fig 3c). The protein targeted by LSM mAbs was therefore widely expressed but conferred reactivity to JRT3-26 only when present on certain B lymphomas. Remarkably, among the large panel of cell lines tested, only four (K562, 721.221, Daudi and JAR cells) were negative for LSM mAb staining (Fig. 3b) and are known to be defective for cell surface expression of HLA-I molecules (Supplemental Fig. S4a). This suggested that LSM mAbs might be recognizing HLA-I molecules, consistent with LSM mAb target apparent molecular mass (Fig. 3a) of 45-50 kDa equivalent to that of HLA-I heavy chains. We then confirmed that HLA-I was the target of LSM mAbs by showing: (i) LSM mAb surface staining on HLA-deficient K562 cells when transfected with HLA-A*01, HLA-B*18 or HLA-B*35 cDNAs (Fig. 3d and Supplemental Fig. S4b), (ii) decrease LSM mAbs staining of SKW6.4 cells after shRNA silencing of HLA-I molecules expression (Fig. 3e and Supplemental Fig. S4c), and (iii) immunoblot detection by the anti-HLA mAb EMR8-5 of the band immunoprecipitated by LSM mAbs, at the same size as HLA-I molecules immunoprecipitated by the anti-HLA-I W6/32 mAb used as positive control (Fig. 3f). Negative staining of $MICA^+$ K562 cells and $HLA\text{-}E^+$ or $HLA\text{-}G^+$ 721.221 cells showed that LSM mAbs did not cross-react with these non-classical HLA-I molecules (Supplemental Fig. S4d). Inability of LSM mAbs to immunoprecipitate membrane proteins from biotinylated HLA-I negative Daudi cells also showed low or absent LSM mAbs cross-reactivity to other membrane proteins (Supplemental Fig. S4e).

Using a linear regression test, we observed that MFI of LSM mAb staining correlated to W6/32 mAb staining (Fig. 3g and Supplemental Fig. S4f). Linear regression coefficient varied from one LSM mAb to the other, suggesting different HLA-I allelic specificities that were confirmed using Luminex flow beads coated with single HLA-I alleles. LSM-01 and LSM-06 recognized nearly all HLA-I alleles tested, LSM-02 and LSM-05 recognized most HLA-B and HLA-C alleles and few HLA-A alleles, and LSM-03 and LSM-04 showed specificity for selected HLA-I alleles (Supplemental Fig. S5). Comparison of protein sequence between all alleles recognized versus all alleles non-recognized by each LSM-02, 03, 04 or 05 (see Methods) allowed us to determine that all these 4 LSM recognized the same region between amino acids 140 and 160 within the alpha-2 helix of heavy chain (Fig. 3h). In conclusion, LSM mAbs selected to recognize Vγ9Vδ3 TCR 26 antigen, targeted an epitope within the alpha-2 helix of HLA-I heavy chains.

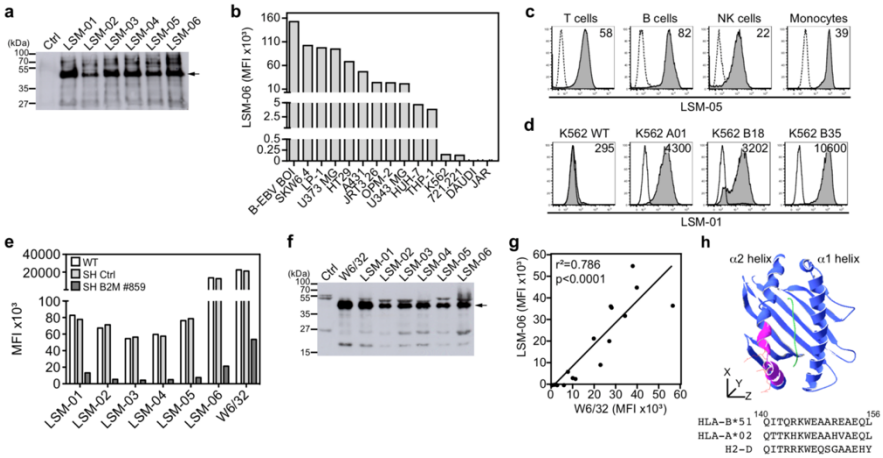


Figure 3: LSM mAbs target the alpha-2 domain of HLA class I proteins.

*(**a**) Immunoblot analysis of biotinylated proteins immunoprecipitated by control mAb or LSM mAbs from Triton X100-lysed SKW6.4 cells detected with streptavidin–horseradish peroxydase. Molecular sizes are indicated in kDa. (**b**) Surface expression of LSM-06-targeted molecule on tumoral cell lines was measured by flow cytometry. (**c**) Cell surface expression of LSM-05-targeted protein on T cells ($CD3^+$), B cells ($CD19^+$), NK cells ($CD3^{neg}CD56^+$) and monocytes ($CD14^+$) within ex vivo PBMCs was analyzed by flow cytometry (Grey histograms). PE-conjugated goat anti-mouse IgG stained cells were used as controls (dotted lines). The numbers indicate the x-fold increase in mean fluorescence intensity over the control. This experiment is representative of n=5 PBMC donors. (**d**) Cell surface expression of LSM-01-targeted protein on wild-type (WT) or HLA-I transfected (A*01, B*18 and B*35) K562 cells was analyzed by flow cytometry (Pink histograms). PE-conjugated goat anti-mouse IgG stained cells were used as controls (White histograms). Values for the MFI of LSM-01 staining are indicated. (**e**) Cell surface expression of the 6 LSM mAbs and anti-HLA-I W6/32 mAb on SKW6.4 cells after transduction with shRNA targeting β2M (B2M#859) (Dark grey bars) or control (Ctrl) (Grey bars) compared to untransfected cells (WT) (White bars). (**f**) Immunoblot analysis of proteins immunoprecipitated by control mAb, W6/32 mAb (positive control) or LSM mAbs from Triton X100-lysed SKW6.4 cells detected with EMR8-5 anti-HLA class I mAb. (**g**) Correlation of LSM-06 and Pan HLA-I W6/32 mAb surface staining of cell lines in **c** individually represented by dots. The line represents the linear regression. (**h**) Location of the common region (aa 140 to 156) on HLA-I alpha-2 domain involved in LSM mAb staining. Structure of alpha-1 and alpha-2 domains of HLA-B*51:01 antigen is represented. Purple, area where differences between recognized and unrecognized HLA alleles are found; green, loaded peptide. Sequence of aa 140 to 156 in LSM-targeted HLA-B*51:01 allele, LSM-untargeted HLA-A*02:01 allele and BALB/c MHC class I H2-D protein.*

Target cells of vγ9vδ3 TCR express β2-microglobuline free HLA-I heavy chain (FHC)

Specific blocking of TCR 26 reactivity by LSM mAbs that recognize HLA-I molecules suggested that HLA-I was the antigenic ligand for TCR 26. However, the discrepancy between the very restricted reactivity of JRT3-26 against only three B lymphoma cell lines (Fig. 1d) and the wide binding of LSM mAbs to any HLA-I positive cell line (Fig. 3b) does not support this hypothesis. In addition, this was inconsistent with recognition of CMV-infected cells by TCR 26 (Fig. 1a) since CMV is well known to decrease HLA-I expression (reviewed in (Lin et al., 2007) and Fig. 4a). We assumed that the reactivity of TCR 26 did not rely on specific HLA-I allele recognition since (i) there is not a common allele among HLA-A, B and C antigens shared by all TCR 26 target cells (SKW6.4, LP-1 and B-EBV BOI) (Supplemental Table SI) and (ii) fibroblasts from unrelated donors (FSF, HFF and MRC-5), all with different HLA genotypes), were all recognized by TCR 26 once infected with CMV (Fig. S6a). These observations prompted us to consider whether Vγ9Vδ3 TCR could recognize an altered form of HLA-I molecules that would be specifically expressed on the surface of stressed cells such as CMV-infected or lymphoma cells. Interestingly, free HLA-I heavy chains (FHC), resulting from peptide and β-2-microglobulin (β2m) dissociation, have been reported on the surface of activated cells. Consistent with our findings, FHC are over-expressed by B cell lines (Matko et al., 1994) and are up-regulated in hemochromatosis individuals (de Almeida et al., 2005). To determine whether FHC were expressed during CMV infection, we used the HC-10 mAb that specifically binds to FHC derived from HLA-B and HLA-C molecules, and some HLA-A (Perosa et al., 2003). After 4 days of infection, an expected down-regulation of HLA-I was observed on CMV-infected cells, while most remarkably, HC-10 staining turned positive (Fig. 4a and S6b). As FHC are sensitive to trypsin (Matko et al., 1994), HC10 staining was the most convincing when fibroblasts were detached using EDTA and by microscopy examination that also revealed a strongest FHC staining on the typical round shaped CMV-infected cells (Fig. S6b). FHC was also heavily expressed on the B lymphoma cell lines recognized by TCR 26 (SKW6.4, B-EBV BOI and LP-1) and weakly expressed on the unrecognized OPM-2 lymphoma cell line (Fig. 4b).

We next determined whether FHC expression was needed for TCR 26 recognition of target cells. This could not be achieved by using HC-10, which is known to recognize an epitope located in the alpha-1 helix of HLA-I heavy chain (Perosa et al., 2003) and thus did not block the reactivity of TCR 26 which most probably recognized an epitope close to that of blocking LSM mAbs, i.e. within the alpha-2 helix (Supplemental Fig. S6c). Silencing β2M expression decreased native HLA-I molecule expression and abrogated FHC expression on SKW6.4, which nearly completely abrogated TCR 26 activation (Fig. 4c). It was previously shown that tunicamycin, a N-linked glycosylation inhibitor, alters assembly of certain HLA alleles and thus inhibits FHC surface expression (Neefjes and Ploegh, 1988). Accordingly, tunicamycin treatment of SKW6.4 cells decreased in a dose-dependent manner both FHC surface expression and activation of the JRT3-26 but not that of a JRT3 transduced with another TCR (Vγ9Vδ1 TCR MAU) (Fig. 4d).

Increase of FHC expression is associated with enhanced Vγ9Vδ3 TCR reactivity

As HLA-I folding and peptide loading take place within the endoplasmic reticulum (ER), we finally wondered whether ER stress could modulate FHC expression by using thapsigargin an inducer of Ca^{2+}-dependent ER stress. Treatment of SKW6.4 cells with increasing doses of thapsigargin induced a slight but reproducible increase of both FHC surface expression and JRT3-26 activation (Supplemental Fig. S7), but did not affect the reactivity of Vγ9Vδ1 TCR MAU transductants (Supplemental Fig. S7). Moreover, thapsigargin also induced both FHC expression on fibroblast and Clone 26 activation against treated cells (fig. 4e). CMV encodes four US proteins (US2, US3, US6, US11) located in the ER where they affect the MHC-I stability. Using a mutant strain of CMV deficient for the gene region encoding this proteins, we showed an increase of FHC expression on cells infected with this mutant when compared to CMV-WT (fig. 4f). This increase of FHC was associated with an increase of JRT-26 activation (fig.4f).
Altogether these results suggested that TCR 26 recognition of target cells relies on FHC expression.

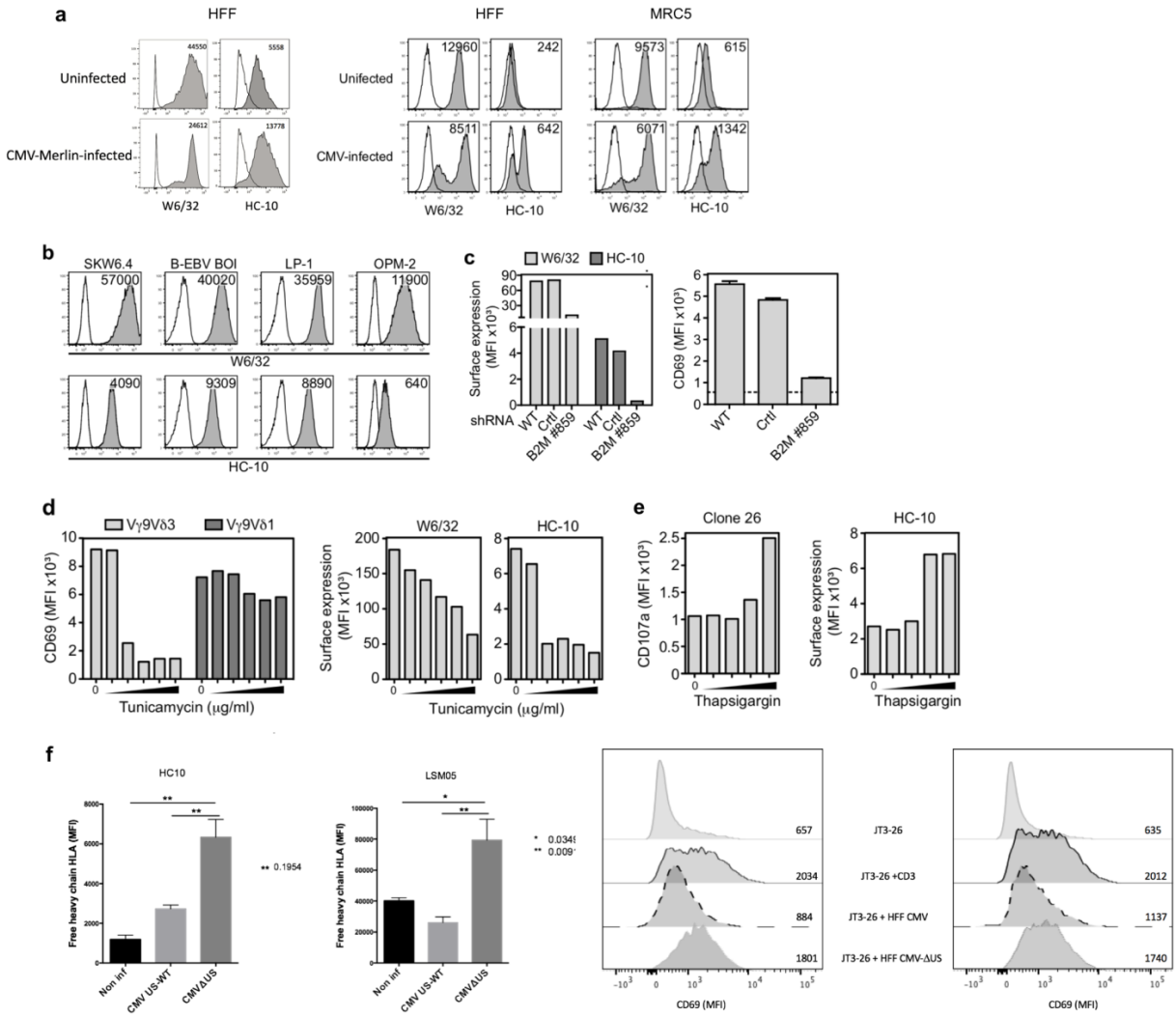


Figure 4: Vγ9Vδ3 TCR activation is dependent of β-2-microglobulin-free HLA-I heavy chain surface expression.

*(**a** & **b**) Cell surface expression of β-2-microglobulin (β2M) associated (W6/32) and β2M free (HC-10) HLA-I heavy chains on CMV-infected fibroblasts (foreskin HFF and lung MRC-5) (**a** bottom) 3 days post-infection compared to uninfected cell control (**a** top), and B cell lymphoma (**b**). PE-conjugated goat anti-mouse IgG stained cells were used as controls (White histograms). MFI values are indicated. Data are representative of 3 independent experiments. (**c**) Cell surface expression of HLA-I and FHC on SKW6.4 cells after transduction with shRNA targeting β2M (B2M#859) or control (Ctrl) compared to untransfected cells (WT). Activation of JRT3-26 against these target cells was measured by CD69 expression after 4 hours of co-culture. (**d**) SKW6.4 ML+ were cultured in the presence of tunicamycin during respectively 48h or 16h. Reactivity of JRT3-26 and JRT3-MAU against drug treated cells was measured after 4 hours of co-culture. Cell surface expression of HLA-I and FHC on SKW6.4 ML+ cells was evaluated by flow cytometry. (**e**) Reactivity of Clone 26 against thapsigargin treated HFF was measured after 4 hours of co-culture (left), and FHC surface expression on HFF was determined by flow cytometry (right). (**f**) Cell surface expression of β2M free (HC-10) HLA-I heavy chains on the surface and LSM05 ligand on infected primary HFFs infected with CMV-ΔUS or WT (left) After co-culture for 4h with pre-infected HFF for 4 days, the reactivity of JRT3 was evaluated by anti-CD69 staining (right).*

FHC is a direct ligand for TCR 26

To demonstrate that FHC was a ligand of TCR 26, we examined the putative direct interaction between soluble TCR 26 and soluble FHC. For that purpose, we generated soluble forms of HLA-B7 (which is recognized by all LSM mAbs and expressed by one of the B lymphoma cell line targeted by Clone 26, see Fig. 7 below). We observed a background signal after injection of soluble TCR 26 over immobilized HLA-B7 or over control EPCR used as negative control (Fig. 5a). To generate FHC, immobilized HLA-B7 was treated with citric acid buffer (pH 3.5) to strip off β2m and peptide. We observed that soluble TCR 26 bound HLA-B7 FHC to a much greater extent than native HLA-B7. Equilibrium affinity analyses yielded an apparent dissociation constant (Kd) of 55 µM.
Results with FHC molecules generated without acid treatment. Fig. 5b
These data confirmed that FHC was a direct and specific ligand for the TCR 26.

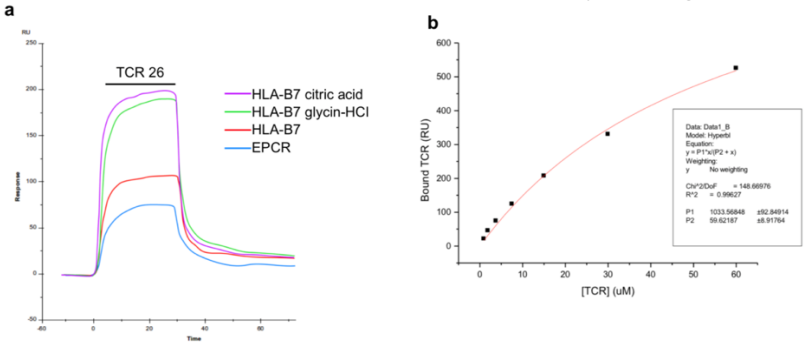


Figure 5: Vγ9Vδ3 TCR binds the β-2-microglobulin-free HLA-I heavy chain.

Clone 26 reactivity is modulated by HLA-inhibitory NK receptors

We then returned to the original T cell Clone 26 to assess whether LSM antibodies inhibited its reactivity similarly as that of JRT3-26. Surprisingly, LSM-05 mAb blocked Clone 26 reactivity against SKW6.4 but increased the reactivity against LP-1, B-EBV BOI (Fig. 6a) and CMV-infected cells (Fig. 6b). Since LSM antibodies recognize native HLA-I molecules, we supposed that they could prevent binding of HLA-I molecules to inhibitory receptors potentially expressed on Clone 26 explaining this potentiating effect. Indeed, expression of CD158b/j (KIR2DL2/L3/S2) and CD85j (ILT-2) HLA-I receptors were detected on Clone 26 (Fig. 6c) but not on JRT3 (data not shown). Blocking these receptors using neutralizing mAbs strongly increased Clone 26 reactivity against all the targets and revealed the inhibitory effect of LSM-05 mAb on Clone 26 reactivity (Fig. 6d,e,f). Interestingly, CD158b/j and CD85j neutralization also revealed Clone 26 reactivity against other lymphoma cells (JY and B-EBV HEN, Fig. 6f) that express FHC (Supplemental Fig. S8a), yet did not uncover any reactivity against uninfected fibroblasts or OPM-2 (Fig. 6e,f) that do not express FHC molecules (Fig. 4a,b). Interestingly, we had available another clone (Clone 3) from the same patient which expressed the same TCR as Clone 26, and expressed CD158b/j but not CD85j (Supplemental Fig. S8b). Clone 3 had a better constitutive reactivity against FHC-expressing B lymphoma targets (Supplemental Fig. S8c,e) which was blocked by LSM-05 mAb when CD158b/j was neutralized.
Altogether, these results showed that reactivity of clones expressing a TCR specific for FHC is under the control of HLA-I inhibitory receptors resulting in a fine tuning of T cell activation. This could represent an interesting advantage for γδ T cells to control CMV which increases FHC expression while decreasing native HLA-I expression.

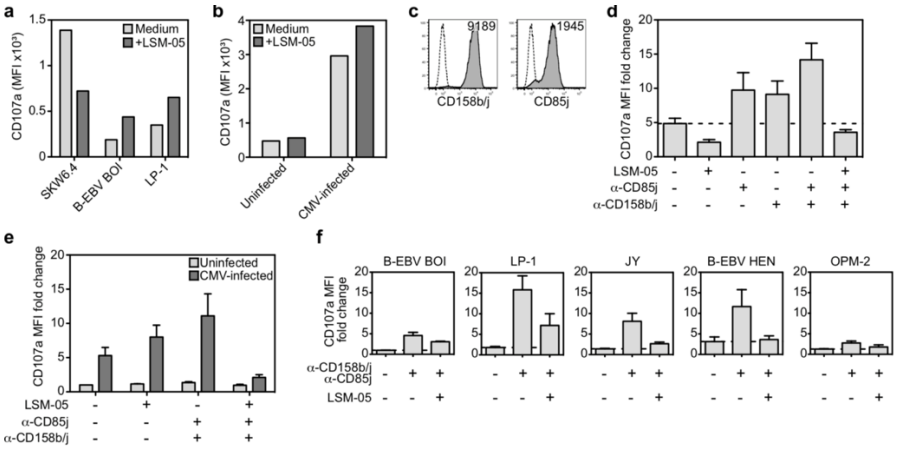


Figure 6: Regulation of Vγ9Vδ3 γδ clone reactivity by inhibitory receptors specific for HLA-I.

*(**a** & **b**) Clone 26 was co-cultured with different target cells (SKW6.4, B-EBV BOI and LP-1 in **a** or uninfected and CMV-infected FSF in **b**) during 6 hours in absence of any mAbs (medium) or in presence of LSM-05 mAb. Clone activation was measured by CD107a mobilization and mean of fluorescence (MFI) of CD107a staining was analyzed by flow cytometry. Data are representative of at least 3 independent experiments. (**c**) Cell surface expression of CD158b/j and CD85j inhibitory receptors on Clone 26 was analyzed by flow cytometry. Unstained cells were used as controls (Dotted line). MFI values are indicated. (**d** & **e**) CD107a cell surface expression was measured on Clone 26 after 6 hours of co-culture with SKW6.4 cells (**d**) or uninfected and CMV-infected FSF (**e**) in the presence of LSM-05, anti-CD85j and/or anti-CD158b/j mAbs. Results are the fold increase in CD107a MFI values compared to the absence of any mAb control (Dotted line). Bars represent the mean of at least 3 independent experiments and the errors indicate the SEM. (**f**) Clone 26 activation was measured by CD107a mobilization after a 6 hours co-culture with different target cells in the presence of LSM-05, anti-CD85j and/or anti-CD158b/j mAbs. Bars represent the fold induction of MFI values of CD107a staining compared to the absence of any mAb control (Dotted line) and error bars indicate the SEM. At least, 3 independent experiments were performed for each co-culture condition.*

Shared recognition of FHC by other Vδ2^{neg} γδ T cells.

To know whether FHC specificity was shared by other Vδ2^{neg} γδ T cells, we incubated PBMC from kidney transplant recipients having developed CMV-infection on FHC-expressing B-EBV BOI cells. Vδ2^{neg} γδ T cells were sorted from expanded cells and clones generated. Among six different patients tested, we identified 2 clones (BP#12 and LY#22) from different patients whose activation against SKW6.4 or LP-1 target cells was abrogated in the presence of LSM-05 blocking mAb or after silencing of β2m in SKW6.4 or LP-1 cells (Fig. 7). Phenotyping using mAbs directed against Vδ1,2,3,5 and Vγ2,3,4,8,9 regions of the TCR showed that BP#12 expressed a non-Vδ1,2,3,5 Vγ2,3 or 4 γδ TCR and LY#22 clone expressed a Vδ1 non-Vγ8,9 TCR (Supplemental Fig. S9a,b). These results indicated that FHC recognition can be mediated by TCRs with diverse Vδ or Vγ usage.

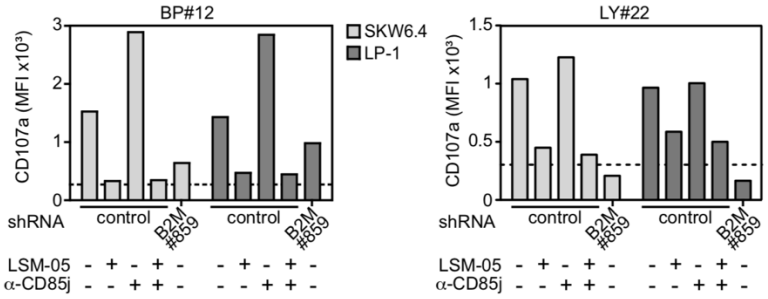


Figure 7: β-2-microglobulin-free HLA-I heavy chain is recognized by other γδ T cells

γδ T clone BP#12 and LY#22 were generated after amplification against irradiated B-EBV BOI cells. Clone activations were measured by CD107a mobilization after a 6 hours co-culture with SKW6.4 and LP-1 cells transduced with shRNA targeting β2M (B2M#859) or control (Ctrl). Co-cultures were performed in the presence of LSM-05 and/or anti-CD85j mAbs. Mean of fluorescence (MFI) of CD107a staining was analysed by flow cytometry. Data are representative of 3 independent experiments.

Discussion:

In the present study, we firstly provide evidence for a new biological function of FHC by revealing (i) their role as direct stress antigens for γδ T lymphocytes and (ii) the modulation of their expression by CMV. Secondly, these results describe for the first time a direct antigenic ligand for Vδ3$^+$ T cells providing molecular insight into the reactivity of Vδ2^{neg} γδ T cells against CMV-infected cells reported in different pathophysiological contexts(Dechanet et al., 1999b; Knight et al., 2010a; Pitard et al., 2008b; Vermijlen et al., 2010c). Thirdly, high FHC expression on B lymphoma elucidates the dual reactivity of CMV-induced γδ T lymphocytes against tumor cells (Halary et al., 2005b) particularly lymphoma cells that have been described as targets of Vδ2^{neg} γδ T cells, including Vδ3$^+$ T cells (Harly et al., 2011; Scheper et al., 2013a; Siegers et al., 2011).

Although MHC-I molecule expression is controlled by a well-organized peptide-loading complex (PLC) within the ER, altered form of HLA class I molecules lacking peptide and/or β2m can be displayed on cell surface under certain conditions (Theodossis, 2013)(Arosa et al., 2007). They are called empty MHC class-I, free heavy chains (FHC) or open conformers. The structure and properties of FHC remain poorly defined due to their intrinsically transient and unstable nature. They are suspected to fulfil unique immunological functions triggering considerable research interest but their biological function is far from clear. They have been shown to interact *in trans* with few NKR (CD85d, CD85e and CD85i) (Giles et al., 2012; Jones et al., 2011) and *in cis* with diverse growth factor receptors (Edidin, 1988) suggesting a role as regulators of immune and non-immune cells. However, recognition of FHC as antigens by αβ or γδ TCR had never been reported before our observation. FHC can also be present on cell surface as homodimers of HLA-I heavy chains (only reported for HLA-B27 (Allen et al., 1999), or to distribute in clusters containing native β2m associated MHC-I molecules (Matko et al., 1994). They have also been found in the peptide binding groove of MHC Class II molecules (Jiang et al., 2013). Defining which of all these forms are recognized by γδ TCR and whether γδ TCR recognition is dependent or is modulated by FHC association with growth factor receptors or NKR, deserves further investigations.

Our study provides a novel role for FHC molecules, as a stress-associated signal potentially able to alert γδ T cells about CMV-infection or lymphocyte transformation. In line with Clone 26 recognition of B lymphoid cells, FHC have been initially described on the surface of proliferating lymphoid cells such as EBV transformed B cell lines and activated T cells (Madrigal et al., 1991; Matko et al., 1994). More generally, exquisite expression of FHC on metabolically active cells fits well with the recognized role of γδ T cells in stress surveillance. Importantly, FHC derive from fully mature MHC-I molecules present at the plasma membrane that dissociate from peptide and/or β2m (Demaria et al., 1992) probably explaining why β2m mRNA interference in lymphoma cells decreased FHC expression. The reasons behind this dissociation are still elusive but one alleged cause is perturbation of quality control of PLC

in the ER leading to MHC-I heavy chains loaded with low-affinity peptide prone to dissociation at cell surface. Accordingly, association between peptide affinity, increase of HLA-I stability and decrease of FHC expression have been shown using mutants of tapasin which is probably the most important chaperone involved in quality control by PLC (Petersen et al., 2005). Moreover, ER stress using thapsigargin has been shown to inhibit tapasin transcription particularly in lymphoma cells (Mahadevan and Zanetti, 2011). Then our observation that thapsigargin increased FHC expression in SKW6.4 cells could be due to tapasin inhibition (de Almeida et al., 2005). Interestingly also, CMV encodes at least four proteins (US2, US3, US6 and US11) that locate into the ER where they affect MHC class I stability (for review (Noriega et al., 2012)). Relevant to the discussion, US3 inhibits PLC function through binding to tapasin (Park et al., 2004). This mechanism could account for the induction of FHC expression that we observed in CMV-infected cells. In addition, Clone 26 was isolated from a patient with hemochromatosis, a pathology that was associated with alterations in peptide loading and ER maturation of MHC-I molecules resulting in an increased level of cell-surface FHC. Altogether these observations suggest that Clone 26 might have been activated in an environment of particularly high FHC overexpression due to both hemochromatosis and CMV, which could explain important enrichment of this clone in the donor.

FHC molecules can theoretically be expressed on cell surface from any HLA-I antigens (A, B, or C). Several of our observations are in line with the recognition by Vγ9Vδ3 T cells of FHC from different alleles of HLA-B and HLA-C locus: (i) diverse target cells with different HLA-I alleles were recognized by Clone 26 and Clone 3; (ii) fibroblasts from unrelated donors activated Clone 26 and Clone 3 when infected by CMV; (iii) HLA-I alleles of Clone 26 donor (which FHC forms have most likely activated TCR-26 expressing T cells *in vivo*) are different from that of target cells (Table SI); (iv) all blocking LSM mAbs targeted a wide panel of HLA-B and HLA-C alleles; (vi) Clone 26 and Clone 3 activation was abrogated by treatment of target cells with tunicamycin that blocks N-linked glycosylation and that is known to reduce native and FHC forms of HLA-B alleles because their interaction with PLC chaperones in the ER is dependent on glycosylation (Neefjes and Ploegh, 1988). Thus, recognition of FHC seems to be HLA-I allele independent consistently with our ability to derive FHC-specific clones from unrelated patients. Determination of the HLA-I region targeted by LSM mAbs was made possible by identifying shared residues in the sequence in all alleles recognized by LSM mAbs and that are different in all non-recognized alleles. The only HLA-I region that fulfilled these stringent criteria was located between amino acids 140 and 160 within the alpha-2 helix of HLA-I heavy chain. This indicates that LSM mAbs targeted different epitopes (since they recognize different panels of HLA-I alleles) but all located in the same region. Moreover, the corresponding region of mouse H2d was different from that of recognized HLA-I alleles (Figure 3), in agreement with the immunization of H2d Balb/c mice in which LSM mAbs were generated. Since all LSM mAbs blocked TCR-26 recognition of FHC (while recognizing different epitopes), it is likely that this alpha-2 helix region is important for TCR-26 binding. However, conformation of the epitope recognized by TCR 26 should be different between regular peptide-β2m-associated HLA-I molecules and FHC molecules since TCR 26 recognized only FHC forms.

FHC extend the list of MHC-related molecules identified as γδ TCR antigenic ligands. Strikingly, four of these ligands, i.e. FHC, T22, EPCR and MICA, do not associate with β2m. Moreover, even CD1d which associates with β2m when fully glycosylated, can be expressed on the apical membrane of intestinal epithelial cells as a non-glycosylated β2m-free form which has been proposed to activate γδ intraepithelial T lymphocytes (Balk et al., 1994; Somnay-Wadgaonkar et al., 1999). It would be interesting to know whether the recently described Vδ1 TCRs recognizing both lipid-free or lipid-loaded CD1d (Luoma et al., 2013; Uldrich et al., 2013), would also bind non-glycosylated β2m-free CD1d. Could β2m-free conformation of both MHC-like molecule and conventional MHC-I molecules be a common peculiarity recognized by γδ T cells?

Being peptide-free, FHC recognition by γδ T cells also emphasize their bias toward recognition of native self-antigens such as T22 and MICA that do not present any antigen, but also as CD1d which can be reportedly recognized by several Vδ1 clones in a lipid-free form (Luoma et al., 2013; Uldrich et al., 2013). Even if activated in a pathogen-associated context, CMV-reactive γδ T cells appear to recognize self-antigens as previously inferred from their dual-reactivity toward CMV-free tumor cells (Halary et

al., 2005a). This was then demonstrated by the lipid independent binding of EPCR by the Vγ4Vδ5 LES (Willcox et al., 2012) and here for the four FHC-specific clones. Cross reactivity with CMV-encoded molecules cannot be ruled out inasmuch as compounds of microbial origin have recently been described as bona-fide γδ T cell antigens (Zeng et al., 2012). However, cross-reactivity is unlikely because the blocking antibodies generated against tumours to block TCR LES recognition of EPCR or TCR 26 recognition of FHC, also block reactivity of both TCRs against CMV-infected cells and against the whole tumour cell panel they recognize. If direct specificity against pathogen products does not explain γδ T cell activation, indirect detection of CMV through the sensing of the CMV-induced self-molecules as FHC can also be a powerful mean to trigger CMV-specific γδ T cell response and to counteract inhibition of CMV antigen presentation. This is reminiscent of the influenza-related increase of T22 expression on myeloid cells associated with activated T22-specific γδ T detection in the regional lymph nodes {Chang, 2007 #185}. Moreover, upregulation of FHC in other situations such as tumours indicate that this mechanism has a wider relevance for stress surveillance by γδ T cells, and could participate to the dual innate/adaptive response of γδ T cells.

Recognition of self-antigens by γδ T cells requires to be tightly regulated to avoid autoimmunity. In this regard, the four FHC specific γδ T clones we identified express at least one HLA-I inhibitory receptor, namely CD85j (ILT-2) and/or CD158b. These receptors do not interact with FHC (Gonen-Gross et al., 2005; Stewart et al., 2005) by contrast to other members of ILT receptors (CD85d, CD85e and CD85i) (Giles et al., 2012; Jones et al., 2011) only expressed by monocytes, dendritic cell or other myeloid cells. We observed an efficient inhibitory effect of CD85j and CD158b on FHC-specific clones suggesting a key role of regular β2m-peptide associated MHC-I molecules in the control of γδ T cell response to FHC. Then the FHC/regular MHC-I ratio is important to fine tune the activation of γδ T cells. This is particularly relevant in the context of CMV which can not only increase FHC expression as shown here but also diminish regular MHC-I expression. In lymphoma B cells, the FHC/regular MHC-I ratio seemed to be modulated in favour of a strong overexpression of FHC rather than a reduction of MHC-I expression. However, it is possible also that alleles binding inhibitory HLA-I receptors are specifically inhibited in lymphoma cells as previously described for HLA-Bw6 in leukemia (Demanet et al., 2004). Lymphoma cell expression of FHC was sufficient to induce constitutive activation of Clone 26 against SKW6.4 and of Clone 3 against several lymphoma cells, but neutralization of CD85j and CD158b was necessary to reveal activation of Clone BP#12 and LY#22 by SKW6.4 and LP1. As MHC-I expression down-regulation is frequently observed in carcinoma cells (Garrido et al., 2010) which are also targets of CMV-induced γδ T cells (Halary et al., 2005b), it would be interesting to know whether such cells could express FHC molecules and constitutively activate FHC-*specific* clones. The recognition by γδ T cells of the fine balance between FHC versus regular MHC-I expression endow them with a potentially important function to thwart viral and tumour immune evasion mechanisms aiming at preventing antigen presentation. This would confer to γδ T cells a competitive advantage over αβ T cells explaining their specific relationship with CMV.

FHC and EPCR are not unique ligands for CMV-induced γδ T cells. JRT3 cells transduced with other γδ TCRs isolated from other CMV-induced γδ T cell clones do not recognize FHC nor EPCR and are activated by different panels of tumor cells (Willcox et al., 2012). Thus, the response of γδ T cells to CMV involves a diverse antigenic repertoire which further characterization should shed light on the mechanisms underlying the dual innate/adaptive response of γδ T cells to CMV. Nevertheless, TCR 26 was highly represented among donor's γδ T cells and other FHC-specific clones were isolated from two other CMV-infected patients, suggesting a certain representativeness of this reactivity among γδ T cells responding to CMV. Given the necessity for HLA-I inhibitory receptor neutralisation to reveal FHC-reactivity, the functional assay we used may have underestimated γδ T cell reactivity to FHC. Three FHC-specific TCRs expressed different Vγ and Vδ regions, raising the question of the molecular mechanism of FHC/TCR interaction. FHC polymorphism might authorize recognition by different CDR1γ/δ and CDR2γ/δ regions; alternatively, CDR3 might preponderantly account for the interaction.

γδ T cells are important to monitor early signs of tissue infection or stress. While knowledge on the mechanisms underpinning this important function of γδ T cells remains fragmented, recent progress disclosed increasingly different possible scenarios: (i) expression of self-encoded native molecules, eg

T22 or MICA, induced or strongly increased by stress on cell surface; (ii) modification by stress-induced metabolites (eg phosphoantigens) of a self-encoded molecule (eg Butyrophilin-3A1 / CD277) (Sandstrom et al., 2014; Vavassori et al., 2013); (iii) stress induction of co-stimulatory ligands reducing the activation threshold of γδ T cells recognizing a stable self-molecule (eg EPCR); (iv) presentation of stress-associated lipids if such lipids were to be identified and loaded to CD1d. By identifying FHC, our study reveals a novel scenario based on stress-induced folding modifications of a self-molecule. Activation of γδ T cells during such different scenarios is a powerful way to diversify the possibilities to warn the immune system about multiple potentially harmful situations, and for γδ T cells to valuably complement αβ T cells in the immune arsenal deployed against pathogens and tumours.

Supplementary information:

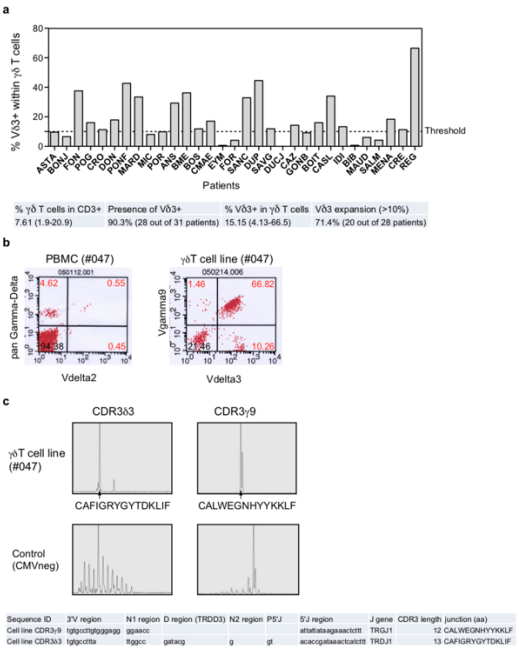


Figure S1: Vδ3 TCR expression in CMV seropositive patients.
(a) Vδ3^{+} T cell percentages into γδ T cells from 31 CMV^{+} kidney transplant recipients. The mean (range) of γδ T cell and Vδ3^{+} T cell percentages are indicated in the table. Vδ3 expansion was defined as a percentage of Vδ3+ T cells among γδ T cells above 10%. (**b**) Percentage of Vδ2^{Neg} γδ T cells into CMV+ hemochromatosis patient PBMC (#047) and Vγ9Vδ3+ cells into polyclonal Vδ2^{Neg} γδ T cell line (#047) was analysed by flow cytometry. Percentage of each subpopulation was indicated. (**c**) Spectratyping and sequencing analysis of polyclonal Vδ2^{Neg} γδ T cell line (#047) revealed a high prevalence of the indicated sequences: all sequences corresponding to the CDR3δ3 size of 13 aa were CAFIGRYGYTDKLIF (15 out of 15 sequences) and all sequences corresponding to the CDR3γ9 size of 12 aa were CALWEGNHYYKKLF. Note that the Vγ9 chain of Clone 26 used the Jγ1 as joining gene segment and not the longer JγP that is usually used by the phosphoantigen-reactive CDR3γ9 chain; this resulted in a shorter CDR3γ9 (Fig. 1Sb).

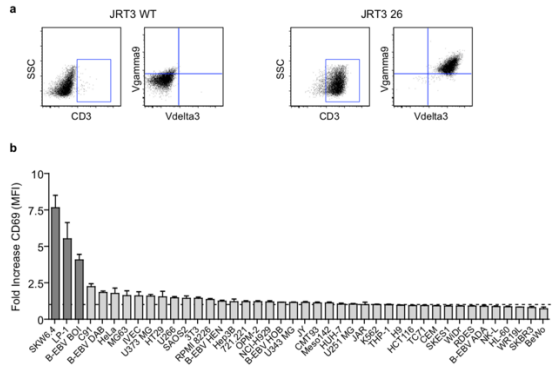


Figure S2. Preponderant Vγ9Vδ3 TCR was transferred into JRT3 reporter cell line.
(**a**) Expression of Vγ9 and Vδ3 chains on untransfected (WT) and Vγ9Vδ3+ (26) JRT3 cells. (**b**) Activation of JRT3-26 reporter cell was measured by CD69 expression on JRT3-26 cell surface after 4 hours of co-culture with target cells. Mean of fluorescence (MFI) of CD69 in each condition was normalized by MFI measured in negative control (medium). Bars represent the mean of at least 3 independent experiments and the errors indicate the SEM.

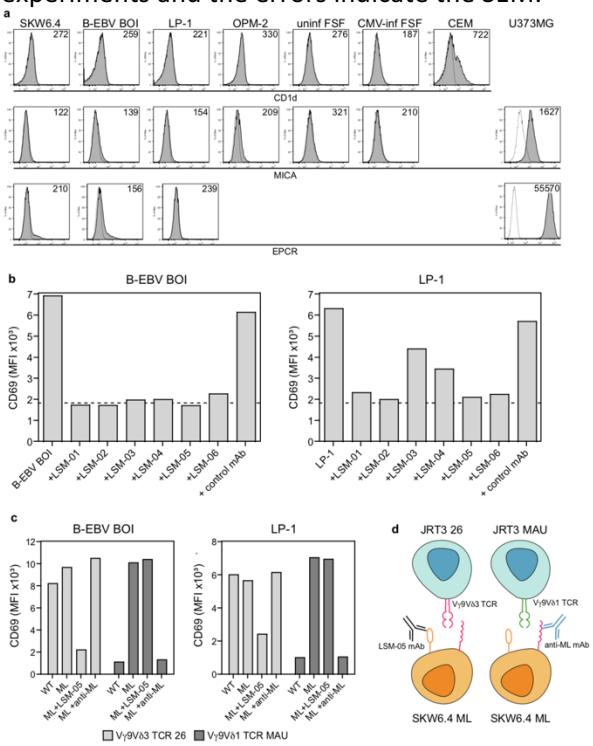


Figure S3. LSM mAbs inhibit recognition by Vγ9Vδ3 TCR with two other target cells
(**a**) Cell surface expression of CD1d (upper panel), MICA (middle panel) and EPCR (lower panel) on B lymphoma, uninfected and CMV-infected FSF, CEM T cells and U373MG glioblastoma. MFI are indicated. (**b**) Activation of JRT3-26 cells against B-EBV BOI (left) and LP-1 (right) target cells in absence of any mAb or in the presence of each LSM mAb (LSM-01 to LSM-06) or control mAb (control mAb). Dotted line represents the CD69 baseline expression measured on negative control (medium). (**c**) B-EBV BOI and LP-1 cells were transduced to express the TCR MAU ligand (ML). Reactivity of JRT3-26 (Vγ9Vδ3 TCR) and JRT3 MAU (Vγ9Vδ1 TCR) were measured in co-culture with wild-type (WT) or MAU-ligand transduced (ML) SKW6.4, in the presence of LSM-05 and anti-MAU ligand mAbs. Data are representative of at least 3 independent experiments. (**d**) Schematic description of the experimental model used in Fig. 2c and S3c. SKW64 ML, LP-1 ML and B-EBV BOI ML cells expressed both Vγ9Vδ3 TCR and Vγ9Vδ1 TCR ligand. JRT3-26 and JRT3-MAU differing only by their TCR, this model ensures that the blocking mAb tested truly recognizes the ligand of the tested TCR.

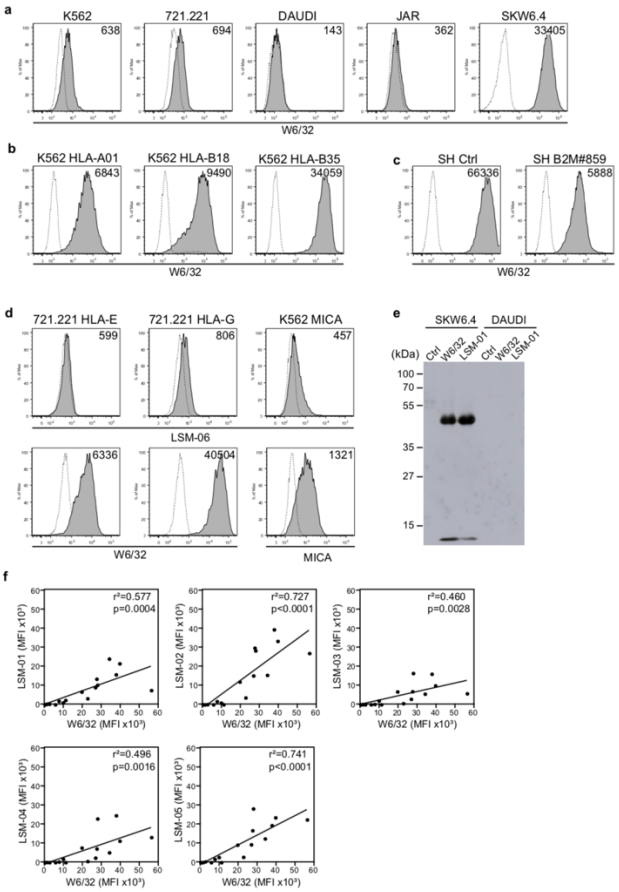


Figure S4. Comparison of LSM and W6/32 staining.

(**a**, **b**, **c, e**) Pan HLA-I W6/32, LSM-06 or anti-MICA mAb surface staining of K562, 721.221, Daudi, JAR, SKW6.4, HLA-I (A*01, B*18 or B*35) transduced K562, shRNA targeting β2M (B2M#859) or control (Ctrl) transduced SKW6.4, HLA-G1 or HLA-E transduced 721.221 or MICA transduced K562 cell lines. MFI are indicated (**d**) Immunoblot analysis of biotinylated surface proteins immunoprecipitated by control mAb, W6/32 or LSM-01 mAbs from Triton X100-lysed SKW6.4 and Daudi cells detected with streptavidin–horseradish peroxydase. Molecular sizes are indicated in kDa. (**f**) Correlation of LSM mAbs (LSM-01 to LSM-05) and Pan HLA-I W6/32 mAb surface staining of cell lines in Fig 3C individually represented by dots. Each line represents the linear regression.

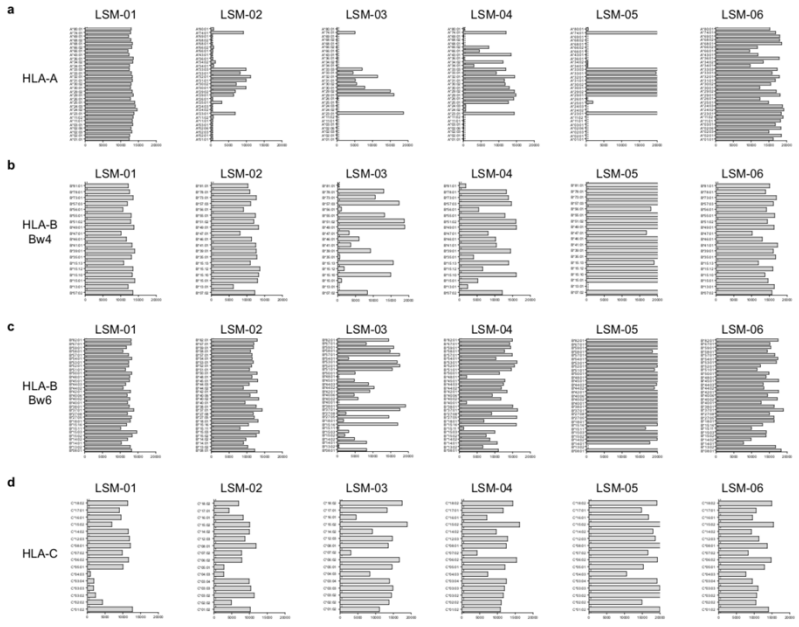


Figure S5. HLA allele specificity of LSM mAbs.
HLA allelic specificity was analysed by luminex technology using a single antigen flow bead assay. Results are presented separately for HLA-A (**a**), HLA-B Bw4 (**b**), HLA-B Bw6 (**c**) and HLA-C (**d**) for each LSM mAbs.

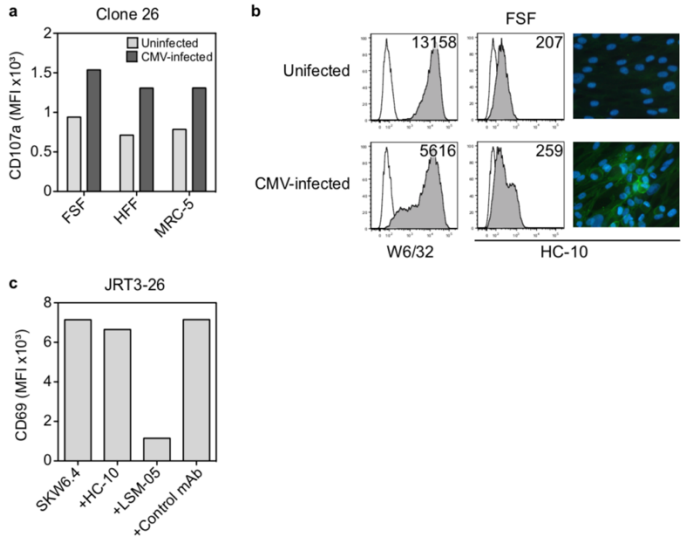


Figure S6. CMV infection of fibroblasts induced both Clone 26 reactivity and FHC surface expression.
(**a**) Clone 26 reactivity was measured after 6 hours of co-culture with CMV infected fibroblasts or uninfected cells. (**b**) Cell surface expression of β-2-microglobulin (β2M) associated (W6/32) and β2M free (HC-10) HLA-I heavy chains on CMV-infected FSF 3 days post-infection compared to uninfected control cells. HC-10 staining was analysed also by microscopy on uninfected and CMV-infected FSF. (**c**) Reactivity of JRT3-26 was measured in co-culture with SKW6.4 cells in the absence of any mAb (SKW6.4) or in the presence of HC-10, LSM-05 or control mAb. Data are representative of at least 3 independent experiments.

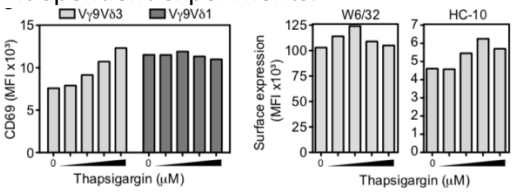


Figure S7. Vγ9Vδ3 TCR activation is dependent of β-2-microglobulin-free HLA-I heavy chain surface expression. *SKW6.4 ML+ were cultured in the presence of tunicamycin or thapsigargin during respectively 48h or 16h. Reactivity of JRT3-26 and JRT3-MAU against drug treated cells was measured after 4 hours of co-culture. Cell surface expression of HLA-I and FHC on SKW6.4 ML+ cells was evaluated by flow cytometry.*

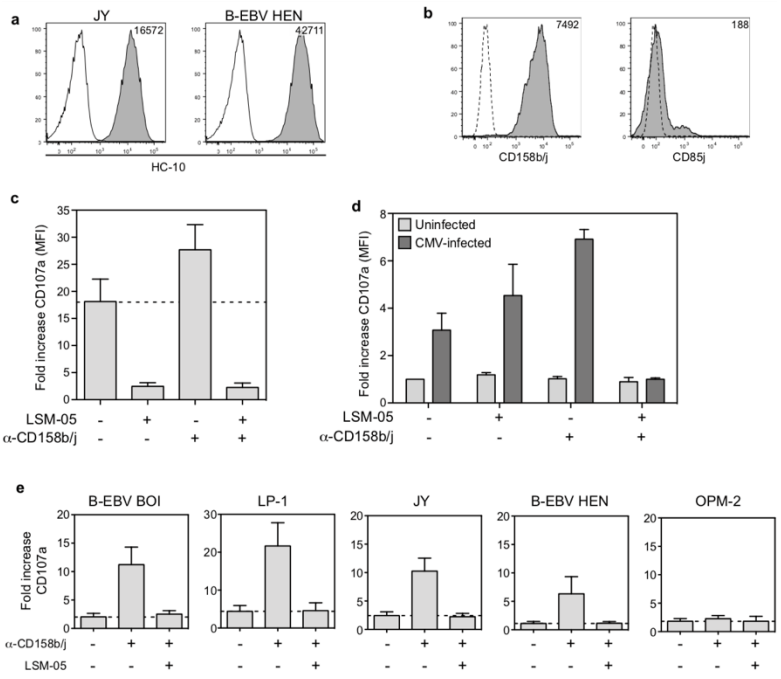
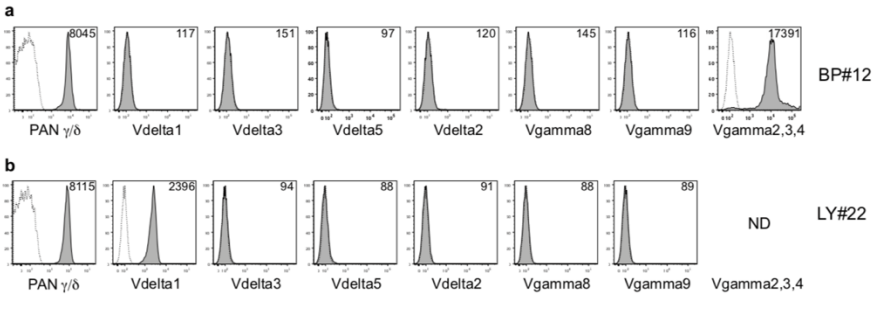


Figure S8. Regulation of Vγ9Vδ3 γδ Clone 3 by HLA-I inhibitory NK receptors.
(a) Cell surface expression of HC-10 on JY and B-EBV HEN cells. (**b**) Cell surface expression of CD158b/j and CD85j inhibitory receptors on Clone 26 was analysed by flow cytometry. Unstained cells were used as controls (Dotted line). MFI values are indicated. (**c** & **d**) CD107a mobilization was measured on Clone 3 after 6 hours of co-culture with SKW6.4 cells (**c**) or uninfected and CMV-infected FSF (**d**) in the presence of LSM-05 or anti-CD158b/j mAbs. Results are the fold increase in CD107a MFI values compared to the absence of any mAb control (Dotted line). Bars represent the mean of at least 3 independent experiments and the errors indicate the SEM. (**e**) Clone 3 activation was measured by CD107a mobilization after a 6 hours co-culture with different target cells in the presence of LSM-05 or anti-CD158b/j mAbs. Bars represent the fold induction of MFI values of CD107a staining compared to the absence of any mAb control (Dotted line) and error bars indicate the SEM. At least, 3 independent experiments were performed for each co-culture condition.



c

Sequence ID	CDR3 length	junction (aa)
LY#22 CDR3δ1	19	CALGDTSYESGGYTDKLIF
LY#22 CDR3γ3	13	CATWSFTGWFKIF

Figure S9. BP#12 and LY#22 γδ T clones do not express Vγ9 or Vδ3 chain.
Cell surface expression of TCR PAN gamma/delta, Vδ1, Vδ3, Vδ5, Vδ2, Vγ8, Vγ9 and Vγ2,3,4 chains on BP#12 (**a**) and LY#22 (**b**) γδ T clones. Unstained cells were used as controls (Dotted line). MFI values are indicated. (**c**) CDR3 sequences of Vdelta and Vgamma chains are indicated for Clones BP#12 and LY#22.

Table SI. HLA typing of B lymphoma cells

	HLA-A	HLA-B	HLA-C
SKW6.4	A*01, *02	B*51, *57	C*06, *14
B-EBV BOI	A*23, *29	B*44, *49	C*07, *16
LP-1	A*26, *30	B*18, *35	C*04, *07
OPM-2	A*24	B*07:02, *15:27	C*04, *07
JY	A*02	B*07:02	C*07
B-EBV HEN	A*01:01, *02:01	B*08:01, *15:01	C*03:04, *07:01
Clone 26	A*03, *29	B*40:02, *44	C*02, *16
BP#12	A*02, *30	B*18, *44	ND
LY#22	A*02, *03	B*07:02, *57	ND
FSF	A*24, *29	B*35, *51	ND
HFF	A*29:02, *32:01	B*35:02, *44:03	
MRC-5	A*02, *29	B*07, *44	ND

References :

Aaronson, D.S., and Horvath, C.M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. Science *296*, 1653–1655.

Abele, R., and Tampé, R. (1999). Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. Biochim. Biophys. Acta *1461*, 405–419.

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

Ahn, J.H., and Hayward, G.S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. J Virol *71*, 4599–4613.

Allen, R.L., O'Callaghan, C.A., McMichael, A.J., and Bowness, P. (1999). Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. J Immunol *162*, 5045–5048.

de Almeida, S.F., Carvalho, I.F., Cardoso, C.S., Cordeiro, J.V., Azevedo, J.E., Neefjes, J., and de Sousa, M. (2005). HFE cross-talks with the MHC class I antigen presentation pathway. Blood *106*, 971–977.

Antoine, P., Olislagers, V., Huygens, A., Lecomte, S., Liesnard, C., Donner, C., and Marchant, A. (2012). Functional Exhaustion of CD4+ T Lymphocytes during Primary Cytomegalovirus Infection. J. Immunol. *189*, 2665–2672.

Antoniou, A.N., Powis, S.J., and Elliott, T. (2003). Assembly and export of MHC class I peptide ligands. Curr. Opin. Immunol. *15*, 75–81.

Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M.A., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., et al. (2002). Memory $CD8^+$ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat. Med. *8*, 379–385.

Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. Nat. Immunol. *6*, 515–523.

Arosa, F.A., Santos, S.G., and Powis, S.J. (2007). Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules. Trends Immunol *28*, 115–123.

Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and

XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. J. Exp. Med. *207*, 1273–1281.
Bai, B., Wang, X., Chen, E., and Zhu, H. (2016). Human cytomegalovirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. Oncotarget *7*, 76735–76742.
Balk, S.P., Burke, S., Polischuk, J.E., Frantz, M.E., Yang, L., Porcelli, S., Colgan, S.P., and Blumberg, R.S. (1994). Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. Science *265*, 259–262.
Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Pariente, N., Verdaguer, N., and Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. Adv. Virus Res. *62*, 19–111.
Bartkowiak, J., Kulczyck-Wojdala, D., Blonski, J.Z., and Robak, T. (2002). Molecular diversity of gammadelta T cells in peripheral blood from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Neoplasma *49*, 86–90.
Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science *285*, 727–729.
Bayard, C., Lepetitcorps, H., Roux, A., Larsen, M., Fastenackels, S., Salle, V., Vieillard, V., Marchant, A., Stern, M., Boddaert, J., et al. Coordinated expansion of both memory T cells and NK cells in response to CMV infection in humans. Eur. J. Immunol. *46*, 1168–1179.
Biassoni, R., and Malnati, M.S. (2018). Human Natural Killer Receptors, Co-Receptors, and Their Ligands: Human Natural Killer Receptors, Co-Receptors, and Their Ligands. Curr. Protoc. Immunol. *121*, e47.
Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. N. Engl. J. Med. *320*, 1731–1735.
Bisbal, C., and Silverman, R.H. (2007). Diverse functions of RNase L and implications in pathology. Biochimie *89*, 789–798.
Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. Annu. Rev. Immunol. *31*, 443–473.
Boldogh, I., Huang, E.-S., Rady, P., Arany, I., Tyring, S., and Albrecht, T. (1994). Alteration in the Coding Potential and Expression of H-ras in Human Cytomegalovirus-Transformed Cells. Intervirology *37*, 321–329.
Brocchieri, L., Kledal, T.N., Karlin, S., and Mocarski, E.S. (2005). Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. J. Virol. *79*, 7570–7596.
Browne, E.P., Wing, B., Coleman, D., and Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. J. Virol. *75*, 12319–12330.
Castillo, J.P., Yurochko, A.D., and Kowalik, T.F. (2000). Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. J. Virol. *74*, 8028–8037.
Castillo, J.P., Frame, F.M., Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Yurochko, A.D., and Kowalik, T.F. (2005). Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. J. Virol. *79*, 11467–11475.
Cerboni, C., Fionda, C., Soriani, A., Zingoni, A., Doria, M., Cippitelli, M., and Santoni, A. (2014). The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. Front Immunol *4*, 508.
Chalupny, N.J., Rein-Weston, A., Dosch, S., and Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. Biochem Biophys Res Commun *346*, 175–181.

Champsaur, M., and Lanier, L.L. (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. Immunol. Rev. *235*, 267–285.
Chen, H.-P., Jiang, J.-K., Lai, P.-Y., Chen, C.-Y., Chou, T.-Y., Chen, Y.-C., Chan, C.-H., Lin, S.-F., Yang, C.-Y., Chen, C.-Y., et al. (2014). Tumoral presence of human cytomegalovirus is associated with shorter disease-free survival in elderly patients with colorectal cancer and higher levels of intratumoral interleukin-17. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *20*, 664–671.
Chen, H.-P., Jiang, J.-K., Chen, C.-Y., Yang, C.-Y., Chen, Y.-C., Lin, C.-H., Chou, T.-Y., Cho, W.-L., and Chan, Y.-J. (2016). Identification of human cytomegalovirus in tumour tissues of colorectal cancer and its association with the outcome of non-elderly patients. J. Gen. Virol. *97*, 2411–2420.
Cinatl, J., Cinatl, J., Vogel, J.U., Rabenau, H., Kornhuber, B., and Doerr, H.W. (1996). Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. Intervirology *39*, 259–269.
Correia, D.V., Fogli, M., Hudspeth, K., da Silva, M.G., Mavilio, D., and Silva-Santos, B. (2011). Differentiation of human peripheral blood Vδ1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. Blood *118*, 992–1001.
Costa-Garcia, M., Vera, A., Moraru, M., Vilches, C., López-Botet, M., and Muntasell, A. (2015). Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 2715–2724.
Cotton, R.N., Shahine, A., Rossjohn, J., and Moody, D.B. (2018). Lipids hide or step aside for CD1-autoreactive T cell receptors. Curr. Opin. Immunol. *52*, 93–99.
Couzi, L., Pitard, V., Netzer, S., Garrigue, I., Lafon, M.E., Moreau, J.F., Taupin, J.L., Merville, P., and Dechanet-Merville, J. (2009). Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. J Infect Dis *200*, 1415–1424.
Couzi, L., Levaillant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., et al. (2010a). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *21*, 181–188.
Couzi, L., Levaillant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., et al. (2010b). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. J Am Soc Nephrol *21*, 181–188.
Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2011). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). Blood *119*, 1418–1427.
Cui, X., Freed, D.C., Wang, D., Qiu, P., Li, F., Fu, T.-M., Kauvar, L.M., and McVoy, M.A. (2017). Impact of Antibodies and Strain Polymorphisms on Cytomegalovirus Entry and Spread in Fibroblasts and Epithelial Cells. J. Virol. *91*.
Dausset, J. (1958). [Iso-leuko-antibodies]. Acta Haematol. *20*, 156–166.
Davignon, J.L., Castanié, P., Yorke, J.A., Gautier, N., Clément, D., and Davrinche, C. (1996). Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. J. Virol. *70*, 2162–2169.
Davison, A.J. (2002). Evolution of the herpesviruses. Vet. Microbiol. *86*, 69–88.

Déchanet, J., Merville, P., Lim, A., Retière, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Méric, C., Hallet, M.-M., Kourilsky, P., et al. (1999). Implication of γδ T cells in the human immune response to cytomegalovirus. J. Clin. Invest. *103*, 1437–1449.
Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., et al. (1999a). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. J Clin Invest *103*, 1437–1449.
Dechanet, J., Merville, P., Berge, F., Bone-Mane, G., Taupin, J.L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., and Moreau, J.F. (1999b). Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. J Infect Dis *179*, 1–8.
Demanet, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M.J., Maes, P., Claas, F.H., and Ferrone, S. (2004). Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? Blood *103*, 3122–3130.
Demaria, S., Schwab, R., and Bushkin, Y. (1992). The origin and fate of beta 2m-free MHC class I molecules induced on activated T cells. Cell Immunol *142*, 103–113.
Edidin, M. (1988). Function by association? MHC antigens and membrane receptor complexes. Immunol Today *9*, 218–219.
Elmaagacli, A.H., Steckel, N.K., Koldehoff, M., Hegerfeldt, Y., Trenschel, R., Ditschkowski, M., Christoph, S., Gromke, T., Kordelas, L., Ottinger, H.D., et al. (2011). Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. Blood *118*, 1402–1412.
ENGSTRAND, M., LIDEHÄLL, A.K., TÖTTERMAN, T.H., HERRMAN, B., ERIKSSON, B.-M., and KORSGREN, O. (2003). Cellular responses to cytomegalovirus in immunosuppressed patients: circulating CD8+ T cells recognizing CMVpp65 are present but display functional impairment. Clin. Exp. Immunol. *132*, 96–104.
Everett, R.D., Rechter, S., Papior, P., Tavalai, N., Stamminger, T., and Orr, A. (2006). PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. J Virol *80*, 7995–8005.
Feder, J.N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V.K., Mapa, F.A., Morikang, E., Prass, C.E., Starnes, S.M., Wolff, R.K., Parkkila, S., et al. (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. J Biol Chem *272*, 14025–14028.
Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., and Griffin, D.E. (2001). Fields virology (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
Fioretti, A., Furukawa, T., Santoli, D., and Plotkin, S.A. (1973). Nonproductive infection of guinea pig cells with human cytomegalovirus. J. Virol. *11*, 998–1003.
Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. Blood *119*, 2665–2674.
Fornara, C., Lilleri, D., Revello, M.G., Furione, M., Zavattoni, M., Lenta, E., and Gerna, G. (2011). Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and γδ T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. J. Clin. Immunol. *31*, 1054–1064.
Fouts, A.E., Chan, P., Stephan, J.-P., Vandlen, R., and Feierbach, B. (2012). Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 Complex Comprise the Majority of the Anti-Cytomegalovirus (Anti-CMV) Neutralizing Antibody Response in CMV Hyperimmune Globulin. J. Virol. *86*, 7444–7447.

Furman, M.H., Dey, N., Tortorella, D., and Ploegh, H.L. (2002). The Human Cytomegalovirus US10 Gene Product Delays Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. J. Virol. *76*, 11753–11756.
Gamadia, L.E., Remmerswaal, E.B.M., Weel, J.F., Bemelman, F., van Lier, R.A.W., and Ten Berge, I.J.M. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. Blood *101*, 2686–2692.
García, M.A., Meurs, E.F., and Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. Biochimie *89*, 799–811.
Garrido, F., Cabrera, T., and Aptsiauri, N. (2010). "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. Int J Cancer *127*, 249–256.
Gaspar, M., and Shenk, T. (2006). Human cytomegalovirus inhibits a DNA damage response by mislocalizing checkpoint proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 2821–2826.
Geder, K.M., Lausch, R., O'Neill, F., and Rapp, F. (1976). Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus. Science *192*, 1134–1137.
Geronimi, F., Richard, E., Redonnet-Vernhet, I., Lamrissi-Garcia, I., Lalanne, M., Ged, C., Moreau-Gaudry, F., and De Verneuil, H. (2003). Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34+ and CD34+/38-/lin- cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation. Stem Cells *21*, 472–480.
Giles, J., Shaw, J., Piper, C., Wong-Baeza, I., McHugh, K., Ridley, A., Li, D., Lenart, I., Antoniou, A.N., DiGleria, K., et al. (2012). HLA-B27 homodimers and free H chains are stronger ligands for leukocyte Ig-like receptor B2 than classical HLA class I. J Immunol *188*, 6184–6193.
Goldmacher, V.S., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Dionne, C.A., Kedersha, N.L., Vater, C.A., Han, J.W., Lutz, R.J., Watanabe, S., Cahir McFarland, E.D., et al. (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 12536–12541.
Gonen-Gross, T., Achdout, H., Arnon, T.I., Gazit, R., Stern, N., Horejsi, V., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., and Mandelboim, O. (2005). The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules. J Immunol *175*, 4866–4874.
Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. Nature *419*, 734–738.
Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. *20*, 621–667.
Guerville, F., Daburon, S., Marlin, R., Lartigue, L., Loizon, S., Pitard, V., Couzi, L., Moreau, J.-F., Déchanet-Merville, J., and Faustin, B. (2015). TCR-dependent sensitization of human γδ T cells to non-myeloid IL-18 in cytomegalovirus and tumor stress surveillance. Oncoimmunology *4*.
Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., and López-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. Blood *104*, 3664–3671.
Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K., Pincus, S., Toldy, J., Cox, W.I., Meric, C., Plotkin, S., Gönczöl, E., and Berencsi, K. (2000). Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. J. Infect. Dis. *181*, 1537–1546.
Hai, R., Chu, A., Li, H., Umamoto, S., Rider, P., and Liu, F. (2006). Infection of human cytomegalovirus in cultured human gingival tissue. Virol. J. *3*, 84.
Halary, F., Peyrat, M.A., Champagne, E., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Vié, H., Fournié, J.J., and Bonneville, M. (1997). Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes

expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. Eur. J. Immunol. *27*, 2812–2821.
Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.-F., and Dechanet-Merville, J. (2005a). Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. J. Exp. Med. *201*, 1567–1578.
Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2005b). Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. J. Exp. Med. *201*, 1567–1578.
Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. J. Exp. Med. *186*, 1407–1418.
Hao, J., Wu, X., Xia, S., Li, Z., Wen, T., Zhao, N., Wu, Z., Wang, P., Zhao, L., and Yin, Z. (2010). Current progress in γδ T-cell biology. Cell. Mol. Immunol. *7*, 409–413.
Harkins, L., Volk, A.L., Samanta, M., Mikolaenko, I., Britt, W.J., Bland, K.I., and Cobbs, C.S. (2002). Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. Lancet Lond. Engl. *360*, 1557–1563.
Harly, C., Peyrat, M.A., Netzer, S., Dechanet-Merville, J., Bonneville, M., and Scotet, E. (2011). Up-regulation of cytolytic functions of human Vdelta2-gamma T lymphocytes through engagement of ILT2 expressed by tumor target cells. Blood *117*, 2864–2873.
Hayday, A.C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. Annu. Rev. Immunol. *18*, 975–1026.
Hayday, A.C. (2009). Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity *31*, 184–196.
Hendricks, D.W., Balfour, H.H., Dunmire, S.K., Schmeling, D.O., Hogquist, K.A., and Lanier, L.L. (2014). Cutting edge: NKG2C(hi)CD57+ NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *192*, 4492–4496.
Hengel, H., Koszinowski, U.H., and Conzelmann, K.-K. (2005). Viruses know it all: new insights into IFN networks. Trends Immunol. *26*, 396–401.
Hirano, M., Guo, P., McCurley, N., Schorpp, M., Das, S., Boehm, T., and Cooper, M.D. (2013). Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. Nature *501*, 435–438.
Hofmann, H., Sindre, H., and Stamminger, T. (2002). Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. J Virol *76*, 5769–5783.
Hovanessian, A.G., and Justesen, J. (2007). The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. Biochimie *89*, 779–788.
Huang, E.S., and Roche, J.K. (1978). Cytomegalovirus D.N.A. and adenocarcinoma of the colon: Evidence for latent viral infection. Lancet Lond. Engl. *1*, 957–960.
Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci *147*, 258–267.
Isaacson, M.K., Juckem, L.K., and Compton, T. (2008). Virus entry and innate immune activation. Curr Top Microbiol Immunol *325*, 85–100.
Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-

interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. J Cell Biol *147*, 221–234.
Ito, S., Pophali, P., Co, W., Koklanaris, E.K., Superata, J., Fahle, G.A., Childs, R., Battiwalla, M., and Barrett, A.J. (2013). CMV reactivation is associated with a lower incidence of relapse after allo-SCT for CML. Bone Marrow Transplant. *48*, 1313–1316.
Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. Oncogene *20*, 7223–7233.
Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., Lanier, L.L., Saito, T., et al. (2013). Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. Int Immunol *25*, 235–246.
Jones, E.Y. (1997). MHC class I and class II structures. Curr. Opin. Immunol. *9*, 75–79.
Jones, D.C., Kosmoliaptsis, V., Apps, R., Lapaque, N., Smith, I., Kono, A., Chang, C., Boyle, L.H., Taylor, C.J., Trowsdale, J., et al. (2011). HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 2990–2997.
Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. J. Exp. Med. *207*, 1247–1260.
Kabelitz, D., Kalyan, S., Oberg, H.-H., and Wesch, D. (2013). Human Vδ2 versus non-Vδ2 γδ T cells in antitumor immunity. Oncoimmunology *2*.
Kadri, N., Wagner, A.K., Ganesan, S., Kärre, K., Wickström, S., Johansson, M.H., and Höglund, P. (2016). Dynamic Regulation of NK Cell Responsiveness. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *395*, 95–114.
Kakizuka, A., Miller, W.H., Umesono, K., Warrell, R.P., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., and Evans, R.M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell *66*, 663–674.
Kaminski, H., Garrigue, I., Couzi, L., Taton, B., Bachelet, T., Moreau, J.-F., Déchanet-Merville, J., Thiébaut, R., and Merville, P. (2016). Surveillance of γδ T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *27*, 637–645.
Kenna, T., Golden-Mason, L., Norris, S., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., and Doherty, D.G. (2004). Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. Clin Immunol *113*, 56–63.
Kim, K.S., and Carp, R.I. (1972). Abortive Infection of Human Diploid Cells by Murine Cytomegalovirus. Infect. Immun. *6*, 793–797.
Kim, Y.-E., and Ahn, J.-H. (2015). Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. PLOS Pathog. *11*, e1004785.
Knight, A., Madrigal, A.J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P.J., and Lowdell, M.W. (2010a). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. Blood *116*, 2164–2172.
Knight, A., Madrigal, A.J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P.J., and Lowdell, M.W. (2010b). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. Blood *116*, 2164–2172.

Koldehoff, M., Lindemann, M., Opalka, B., Bauer, S., Ross, R.S., and Elmaagacli, A.H. (2015). Cytomegalovirus induces apoptosis in acute leukemia cells as a virus-versus-leukemia function. Leuk. Lymphoma *56*, 3189–3197.
Kotenko, S.V. (2011). IFN-lambdas. Curr Opin Immunol *23*, 583–590.
Krause, C.D., and Pestka, S. (2005). Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. Pharmacol Ther *106*, 299–346.
Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. Microbes Infect. *5*, 1263–1277.
Kuchipudi, S.V. (2015). The Complex Role of STAT3 in Viral Infections.
Kumar, A., Tripathy, M.K., Pasquereau, S., Al Moussawi, F., Abbas, W., Coquard, L., Khan, K.A., Russo, L., Algros, M.-P., Valmary-Degano, S., et al. (2018). The Human Cytomegalovirus Strain DB Activates Oncogenic Pathways in Mammary Epithelial Cells. EBioMedicine *30*, 167–183.
Kumari, P., Narayanan, S., and Kumar, H. (2015). Herpesviruses: interfering innate immunity by targeting viral sensing and interferon pathways. Rev. Med. Virol. *25*, 187–201.
Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M.C., Bergé, F., Potaux, L., Moreau, J.F., and Déchanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. J. Infect. Dis. *184*, 533–541.
Lafemina, R.L., and Hayward, G.S. (1988). Differences in cell-type-specific blocks to immediate early gene expression and DNA replication of human, simian and murine cytomegalovirus. J. Gen. Virol. *69 (Pt 2)*, 355–374.
Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1996). Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. Immunol. Today *17*, 86–91.
Lawand, M., Déchanet-Merville, J., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2017). Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. Front. Immunol. *8*.
Le, V.T., Trilling, M., Wilborn, M., Hengel, H., and Zimmermann, A. (2008). Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. J Gen Virol *89*, 2416–2426.
Lin, A., Xu, H., and Yan, W. (2007). Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. Cell Mol Immunol *4*, 91–98.
Lio, C.-W.J., McDonald, B., Takahashi, M., Dhanwani, R., Sharma, N., Huang, J., Pham, E., Benedict, C.A., and Sharma, S. (2016). cGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection. J. Virol. *90*, 7789–7797.
Ljunggren, H.G., and Kärre, K. (1990). In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. Immunol. Today *11*, 237–244.
Luoma, A.M., Castro, C.D., Mayassi, T., Bembinster, L.A., Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Scharf, L., Kung, J.E., Sibener, L.V., et al. (2013). Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells. Immunity *39*, 1032–1042.
Luster, A.D. (2002). The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. Curr. Opin. Immunol. *14*, 129–135.
Madrigal, J.A., Belich, M.P., Benjamin, R.J., Little, A.M., Hildebrand, W.H., Mann, D.L., and Parham, P. (1991). Molecular definition of a polymorphic antigen (LA45) of free HLA-A and -B heavy chains found on the surfaces of activated B and T cells. J Exp Med *174*, 1085–1095.

Mahadevan, N.R., and Zanetti, M. (2011). Tumor stress inside out: cell-extrinsic effects of the unfolded protein response in tumor cells modulate the immunological landscape of the tumor microenvironment. J Immunol *187*, 4403–4409.
Malathi, K., Dong, B., Gale, M., and Silverman, R.H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. Nature *448*, 816–819.
Mangan, B.A., Dunne, M.R., O'Reilly, V.P., Dunne, P.J., Exley, M.A., O'Shea, D., Scotet, E., Hogan, A.E., and Doherty, D.G. (2013). Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells. J Immunol *191*, 30–34.
Marlin, R., Pappalardo, A., Kaminski, H., Willcox, C.R., Pitard, V., Netzer, S., Khairallah, C., Lomenech, A.-M., Harly, C., Bonneville, M., et al. (2017). Sensing of cell stress by human γδ TCR-dependent recognition of annexin A2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, 3163–3168.
Marrack, P., and Kappler, J. (1994). Subversion of the immune system by pathogens. Cell *76*, 323–332.
Mason, G.M., Jackson, S., Okecha, G., Poole, E., Sissons, J.G.P., Sinclair, J., and Wills, M.R. (2013). Human cytomegalovirus latency-associated proteins elicit immune-suppressive IL-10 producing $CD4^+$ T cells. PLoS Pathog. *9*, e1003635.
Matko, J., Bushkin, Y., Wei, T., and Edidin, M. (1994). Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. J Immunol *152*, 3353–3360.
Mingari, M.C., Schiavetti, F., Ponte, M., Vitale, C., Maggi, E., Romagnani, S., Demarest, J., Pantaleo, G., Fauci, A.S., and Moretta, L. (1996). Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 12433–12438.
Neefjes, J.J., and Ploegh, H.L. (1988). Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with beta 2-microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. Eur J Immunol *18*, 801–810.
Noriega, V., Redmann, V., Gardner, T., and Tortorella, D. (2012). Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. Immunol Res *54*, 140–151.
Ohta, A., Fujita, A., Murayama, T., Iba, Y., Kurosawa, Y., Yoshikawa, T., and Asano, Y. (2009). Recombinant human monoclonal antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein B neutralize virus in a complement-dependent manner. Microbes Infect. *11*, 1029–1036.
Orr, M.T., and Lanier, L.L. (2010). Natural Killer Cell Education and Tolerance. Cell *142*, 847–856.
Park, B., Kim, Y., Shin, J., Lee, S., Cho, K., Fruh, K., Lee, S., and Ahn, K. (2004). Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. Immunity *20*, 71–85.
Paulus, C., Krauss, S., and Nevels, M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. Proc Natl Acad Sci U A *103*, 3840–3845.
Perosa, F., Luccarelli, G., Prete, M., Favoino, E., Ferrone, S., and Dammacco, F. (2003). Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide. J Immunol *171*, 1918–1926.
Petersen, J.L., Hickman-Miller, H.D., McIlhaney, M.M., Vargas, S.E., Purcell, A.W., Hildebrand, W.H., and Solheim, J.C. (2005). A charged amino acid residue in the transmembrane/cytoplasmic region of tapasin influences MHC class I assembly and maturation. J Immunol *174*, 962–969.

Peyrat, M.A., Davodeau, F., Houde, I., Romagne, F., Necker, A., Leget, C., Cervoni, J.P., Cerf-Bensussan, N., Vie, H., Bonneville, M., et al. (1995). Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V delta 3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor (TCR) delta-chain expressors and alpha beta T cells expressing V delta 3J alpha C alpha-encoded TCR chains. J Immunol *155*, 3060–3067.
Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.-E., Merville, P., Moreau, J.-F., and Dechanet-Merville, J. (2008a). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. Blood *112*, 1317–1324.
Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.-E., Merville, P., Moreau, J.-F., and Dechanet-Merville, J. (2008b). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. Blood *112*, 1317–1324.
Plummer, G. (1973). Cytomegaloviruses of man and animals. Prog. Med. Virol. Fortschritte Med. Virusforsch. Progres En Virol. Medicale *15*, 92–125.
Preston, C.M., and Nicholl, M.J. (2006). Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression. J Gen Virol *87*, 1113–1121.
Puig-Pey, I., Bohne, F., Benítez, C., López, M., Martínez-Llordella, M., Oppenheimer, F., Lozano, J.J., González-Abraldes, J., Tisone, G., Rimola, A., et al. (2010). Characterization of γδ T cell subsets in organ transplantation. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *23*, 1045–1055.
Quinnan, G.V., Burns, W.H., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J., Jackson, L., Santos, G.W., and Saral, R. (1984). HLA-restricted cytotoxic T lymphocytes are an early immune response and important defense mechanism in cytomegalovirus infections. Rev. Infect. Dis. *6*, 156–163.
Raftery, M.J., Hitzler, M., Winau, F., Giese, T., Plachter, B., Kaufmann, S.H., and Schonrich, G. (2008). Inhibition of CD1 antigen presentation by human cytomegalovirus. J Virol *82*, 4308–4319.
Rahbar, A., Orrego, A., Peredo, I., Dzabic, M., Wolmer-Solberg, N., Stråât, K., Stragliotto, G., and Söderberg-Nauclér, C. (2013). Human cytomegalovirus infection levels in glioblastoma multiforme are of prognostic value for survival. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. *57*, 36–42.
Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. J. Virol. *70*, 8833–8849.
Redondo-Pachón, D., Crespo, M., Yélamos, J., Muntasell, A., Pérez-Sáez, M.J., Pérez-Fernández, S., Vila, J., Vilches, C., Pascual, J., and López-Botet, M. (2017). Adaptive NKG2C+ NK Cell Response and the Risk of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *198*, 94–101.
Renard, V., Cambiaggi, A., Vély, F., Bléry, M., Olcese, L., Olivero, S., Bouchet, M., and Vivier, E. (1997). Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. Immunol. Rev. *155*, 205–221.
Rentenaar, R.J., Gamadia, L.E., van derHoek, N., van Diepen, F.N.J., Boom, R., Weel, J.F.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2000). Development of virus-specific CD4+ T cells during primary cytomegalovirus infection. J. Clin. Invest. *105*, 541–548.
Rich, K.C., Chang, B.H., Mofenson, L., Fowler, M.G., Cooper, E., Pitt, J., Hillyer, G.V., and Mendez, H. (1997). Elevated CD8+DR+ lymphocytes in HIV-exposed infants with early positive HIV cultures: a possible early marker of intrauterine transmission. Women and Infants Transmission Study Group. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc. *15*, 204–210.

Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., and Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. Science *257*, 238–241.
Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. Cell *78*, 761–771.
Rölle, A., Mousavi-Jazi, M., Eriksson, M., Odeberg, J., Söderberg-Nauclér, C., Cosman, D., Kärre, K., and Cerboni, C. (2003). Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 902–908.
Roux, A., Mourin, G., Larsen, M., Fastenackels, S., Urrutia, A., Gorochov, G., Autran, B., Donner, C., Sidi, D., Sibony-Prat, J., et al. (2013). Differential impact of age and cytomegalovirus infection on the gammadelta T cell compartment. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *191*, 1300–1306.
Roy, S., Ly, D., Castro, C.D., Li, N.-S., Hawk, A.J., Altman, J.D., Meredith, S.C., Piccirilli, J.A., Moody, D.B., and Adams, E.J. (2016). Molecular Analysis of Lipid-Reactive Vδ1 γδ T Cells Identified by CD1c Tetramers. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *196*, 1933–1942.
Ryckman, B.J., Chase, M.C., and Johnson, D.C. (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 14118–14123.
Sanchez, V., McElroy, A.K., and Spector, D.H. (2003). Mechanisms Governing Maintenance of Cdk1/Cyclin B1 Kinase Activity in Cells Infected with Human Cytomegalovirus. J. Virol. *77*, 13214–13224.
Sandstrom, A., Peigne, C.M., Leger, A., Crooks, J.E., Konczak, F., Gesnel, M.C., Breathnach, R., Bonneville, M., Scotet, E., and Adams, E.J. (2014). The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. Immunity *40*, 490–500.
Scheper, W., van Dorp, S., Kersting, S., Pietersma, F., Lindemans, C., Hol, S., Heijhuurs, S., Sebestyen, Z., Grunder, C., Marcu-Malina, V., et al. (2013a). gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. Leukemia *27*, 1328–1338.
Scheper, W., van Dorp, S., Kersting, S., Pietersma, F., Lindemans, C., Hol, S., Heijhuurs, S., Sebestyen, Z., Grunder, C., Marcu-Malina, V., et al. (2013b). gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. Leukemia *27*, 1328–1338.
Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol *55*, 255–281.
Shen, Y., Zhu, H., and Shenk, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate “hit-and-run” oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 3341–3345.
Shields, M.J., and Ribaudo, R.K. (1998). Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of beta2-microglobulin. Tissue Antigens *51*, 567–570.
Sia, I.G., and Patel, R. (2000). New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. Clin. Microbiol. Rev. *13*, 83–121, table of contents.
Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. Science *284*, 1835–1837.
Siegers, G.M., Dhamko, H., Wang, X.H., Mathieson, A.M., Kosaka, Y., Felizardo, T.C., Medin, J.A., Tohda, S., Schueler, J., Fisch, P., et al. (2011). Human Vdelta1 gammadelta T cells

expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. Cytotherapy *13*, 753–764.
Sijmons, S., Van Ranst, M., and Maes, P. (2014). Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing. Viruses *6*, 1049–1072.
Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus Cell Tropism. In Human Cytomegalovirus, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 63–83.
Somnay-Wadgaonkar, K., Nusrat, A., Kim, H.S., Canchis, W.P., Balk, S.P., Colgan, S.P., and Blumberg, R.S. (1999). Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form. Int Immunol *11*, 383–392.
Soroceanu, L., Matlaf, L., Khan, S., Akhavan, A., Singer, E., Bezrookove, V., Decker, S., Ghanny, S., Hadaczek, P., Bengtsson, H., et al. (2015). Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins Promote Stemness Properties in Glioblastoma. Cancer Res. *75*, 3065–3076.
Spada, F.M., Grant, E.P., Peters, P.J., Sugita, M., Melián, A., Leslie, D.S., Lee, H.K., van Donselaar, E., Hanson, D.A., Krensky, A.M., et al. (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. J. Exp. Med. *191*, 937–948.
Spector, D.H. (2015). Human cytomegalovirus riding the cell cycle. Med Microbiol Immunol *204*, 409–419.
Stewart, C.A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F.A., et al. (2005). Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. Proc Natl Acad Sci U A *102*, 13224–13229.
Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science *339*, 786–791.
Sylwester, A., Nambiar, K.Z., Caserta, S., Klenerman, P., Picker, L.J., and Kern, F. (2016). A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. Mech. Ageing Dev. *158*, 14–22.
Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., et al. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. J. Exp. Med. *202*, 673–685.
Szostecki, C., Guldner, H.H., Netter, H.J., and Will, H. (1990). Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. J Immunol *145*, 4338–4347.
Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., et al. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 3516–3521.
Taher, C., Frisk, G., Fuentes, S., Religa, P., Costa, H., Assinger, A., Vetvik, K.K., Bukholm, I.R.K., Yaiw, K.-C., Smedby, K.E., et al. (2014). High prevalence of human cytomegalovirus in brain metastases of patients with primary breast and colorectal cancers. Transl. Oncol. *7*, 732–740.
Takaoka, A., and Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. Cell Microbiol *8*, 907–922.
Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. Cell *140*, 805–820.
Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Leis, M., and Stamminger, T. (2006). Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. J Virol *80*, 8006–8018.

Teijaro, J.R. (2016). Type I interferons in viral control and immune regulation. Curr. Opin. Virol. *16*, 31–40.
Teo, W.H., Chen, H.-P., Huang, J.C., and Chan, Y.-J. (2017). Human cytomegalovirus infection enhances cell proliferation, migration and upregulation of EMT markers in colorectal cancer-derived stem cell-like cells. Int. J. Oncol. *51*, 1415–1426.
Theodossis, A. (2013). On the trail of empty MHC class-I. Mol. Immunol. *55*, 131–134.
Townsend, A., and Bodmer, H. (1989). Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. *7*, 601–624.
Uldrich, A.P., Le Nours, J., Pellicci, D.G., Gherardin, N.A., McPherson, K.G., Lim, R.T., Patel, O., Beddoe, T., Gras, S., Rossjohn, J., et al. (2013). CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. Nat Immunol *14*, 1137–1145.
Uze, G., and Monneron, D. (2007). IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. Biochimie *89*, 729–734.
Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. Nat Rev Immunol *13*, 88–100.
Vantourout, P., Martinez, L.O., Fabre, A., Collet, X., and Champagne, E. (2008). Ecto-F1-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes. Mol. Immunol. *45*, 485–492.
Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D.G., Rodland, K., Wiley, S., et al. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. J. Virol. *78*, 10960–10966.
Vavassori, S., Kumar, A., Wan, G.S., Ramanjaneyulu, G.S., Cavallari, M., El Daker, S., Beddoe, T., Theodossis, A., Williams, N.K., Gostick, E., et al. (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. Nat Immunol *14*, 908–916.
Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010a). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. J Exp Med *207*, 807–821.
Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010b). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. J Exp Med *207*, 807–821.
Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010c). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. J. Exp. Med. *207*, 807–821.
Vermijlen, D., Gatti, D., Kouzeli, A., Rus, T., and Eberl, M. (2018). γδ T cell responses: How many ligands will it take till we know? Semin. Cell Dev. Biol.
Vivier, E., and Anfossi, N. (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. Nat. Rev. Immunol. *4*, 190–198.
Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. Nat. Immunol. *9*, 503–510.
Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P.P. (1998). PML is essential for multiple apoptotic pathways. Nat Genet *20*, 266–272.
Welte, S.A., Sinzger, C., Lutz, S.Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K.L., Eknigk, U., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2003). Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. Eur. J. Immunol. *33*, 194–203.
Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. J. Virol. *78*, 5535–5545.

Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Cell *84*, 769–779.
Willcox, C.R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., Salim, M., Silberzahn, T., Moreau, J.-F., Hayday, A.C., Willcox, B.E., and Déchanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human γδ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. Nat. Immunol. *13*, 872–879.
Williams, A.P., Peh, C.A., Purcell, A.W., McCluskey, J., and Elliott, T. (2002). Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. Immunity *16*, 509–520.
Wolmer-Solberg, N., Baryawno, N., Rahbar, A., Fuchs, D., Odeberg, J., Taher, C., Wilhelmi, V., Milosevic, J., Mohammad, A.-A., Martinsson, T., et al. (2013). Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? Int. J. Cancer *133*, 2351–2361.
Wong, G., Chakera, A., Chapman, J.R., Chadban, S.C., Pilmore, H., Craig, J.C., and Lim, W.H. (2017). Cytomegalovirus and cancer after kidney transplantation: Role of the human leukocyte antigen system? Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc. *19*.
Wu, J., and Chen, Z.J. (2014). Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. Annu. Rev. Immunol. *32*, 461–488.
Wu, J., Groh, V., and 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*, 1236–1240.
Xia, T., Konno, H., Ahn, J., and Barber, G.N. (2016). Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA-Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. Cell Rep. *14*, 282–297.
Xu, B., Pizarro, J.C., Holmes, M.A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R.K. (2011). Crystal structure of a γδ T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 2414–2419.
Young, N.T., Canavez, F., Uhrberg, M., Shum, B.P., and Parham, P. (2001). Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex. Immunogenetics *53*, 270–278.
Zeng, X., Wei, Y.L., Huang, J., Newell, E.W., Yu, H., Kidd, B.A., Kuhns, M.S., Waters, R.W., Davis, M.M., Weaver, C.T., et al. (2012). gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. Immunity *37*, 524–534.
Zhang, X., Wu, J., Du, F., Xu, H., Sun, L., Chen, Z., Brautigam, C.A., Zhang, X., and Chen, Z.J. (2014). The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. Cell Rep *6*, 421–430.
Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. Blood *95*, 2748–2752.
Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood *112*, 1557–1569.

Projet 2

I. Projet n°2 : Etude de l'impact de MCMV sur le développement des tumeurs coliques humaines HT29

A- Contexte de travail et problématique

Les études réalisées au laboratoire concourent à un rôle antiviral des lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 dans la réponse immunitaire dirigée contre le HCMV (voir introduction p 45). Par ailleurs, les lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 isolés des patients HCMV+ sont capables de reconnaître et de lyser *in vitro*, soit des fibroblastes infectés par le HCMV, soit différentes lignées cellulaires tumorales dont les cellules tumorales d'adénocarcinome colique HT29, contrairement à des cellules intestinales normales (Halary et al., 2005a). Ces résultats suggèrent un rôle anti-tumoral des lymphocytes T γδ amplifiés au cours de l'infection à CMV. En accord avec cette hypothèse, la séropositivité à l'égard du HCMV et l'expansion des lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2 dans le sang ont été liées à un risque réduit de cancers chez les transplantés rénaux, comparativement aux patients séronégatifs (Couzi et al., 2010b).

Afin d'apporter des preuves directes concernant cette potentielle protection anti-tumorale des lymphocytes T γδ induits par le CMV, une ancienne étudiante en thèse de l'équipe (Camille Khairallah) a utilisé un modèle murin.

Ainsi, Camille Khairallah a évalué la croissance de tumeurs coliques MC38, implantées en sous-cutané dans des souris TCRα -/- et CD3ε -/-, préalablement infectées (7 jours avant) ou non par le MCMV (figure 31). Aucune différence de croissance tumorale n'a été observée dans les deux lignées de souris en absence d'infection. L'infection préalable des souris TCRα -/- n'a pas non plus modifié le développement des tumeurs. Par contre, de manière assez inattendue, l'infection des souris CD3ε -/- a montré une inhibition importante de la croissance tumorale comparativement aux souris contrôles non infectées. Ces résultats montrent que dans ces conditions expérimentales, les lymphocytes T γδ n'ont pas d'effet anti-tumoral, et ce en absence ou en présence de CMV. Ils suggèrent un impact du MCMV sur les tumeurs coliques implantées en sous cutanée, indépendant des lymphocytes T αβ et γδ. La même observation a été réalisée dans des souris NSG, fortement immunodéficientes (absence de lymphocytes T et B, de cellules NK), montrant ainsi que l'effet anti-tumoral du CMV est indépendant de la plupart des cellules immunitaires.

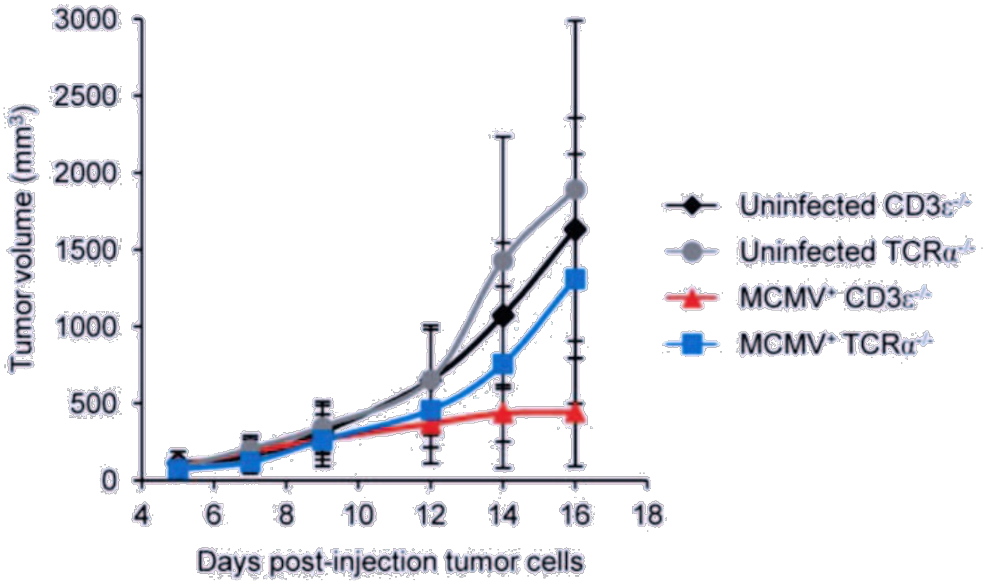


Figure 31: –L'injection du MCMV inhibe la croissance tumorale chez les souris CD3ε-/-.

8-10 souris CD3ε -/- et TCRα -/- ont été infectées en i.p. avec 2.10^3 PFU de MCMV. Après 7 jours, les souris infectées et les souris contrôles ont reçu en sous cutanée 5.10^5 cellules MC38 et la croissance tumorale a été suivie tous les 2 à 3 jours. Les courbes représentent la moyenne et l'écartype des volumes tumoraux de chaque groupe de souris obtenus dans une expérience.

La relation entre l'infection par le CMV et le cancer a été étudiée pendant des décennies et a suscité de nombreuses contradictions dans la littérature. Bien que le HCMV ne soit généralement pas considéré comme un virus oncogène, l'infection à HCMV a été impliquée dans des maladies malignes de différentes entités cancéreuses. Dans les cancers du cerveau et les tumeurs solides, des protéines et/ou acides nucléiques du virus ont souvent été détectés et le HCMV est considéré comme un facteur de pronostic négatif. Il a ainsi été associé à une survie à long terme moins importante chez les individus atteints de cancer (Rahbar et al., 2013) (Wolmer-Solberg et al., 2013) (Taher et al., 2014). Cependant, d'autres chercheurs ont décrit plutôt un rôle protecteur anti-tumoral du CMV par exemple chez des individus atteints de cancers d'origine hématopoïétique (Elmaagacli et al., 2011)(Ito et al., 2013) (Wong et al., 2017). L'effet bénéfique du HCMV chez ces patients pourrait être médié par la reconnaissance des cellules leucémiques par les cellules immunitaires induites au cours de l'infection, dont les LT γδ (Scheper et al., 2013b). Ces résultats sont en accord avec nos données chez les receveurs d'allogreffes rénales, qui montrent une diminution des cancers chez les patients présentant une augmentation de lymphocytes T γδ non-Vγ9Vδ2, dépendante du HCMV (Couzi et al., 2010b). Ainsi, le rôle oncomodulateur du CMV est encore controversé faute de preuve directe le reliant au développement tumoral.

Des résultats récents suggèrent que le HCMV pourrait également avoir une action directe sur les cellules leucémiques en induisant leur apoptose (Koldehoff et al., 2015). De même, les résultats de Camille Khairallah suggèrent un rôle anti-tumoral direct du MCMV que nous avons cherché à confirmer.

Pour aborder cette étude nous avons procédé de deux manières :

- Soit en utilisant comme précédemment des souris NSG afin de tester l'impact du CMV sur la croissance de différentes lignées tumorales implantées en sous-cutané.
- Soit en utilisant des modèles cellulaires, plus précisément des lignées d'adénocarcinomes coliques, afin d'étudier les conséquences de l'infection sur la survie cellulaire.

L'association du CMV avec l'adénocarcinome colorectal a été signalée pour la première fois en 1978 par Huang et Roche (Huang and Roche, 1978), et a été confirmée par la suite dans diverses études. Cependant, les détails de cette association restent encore flous. Ainsi l'objectif de cette étude est de mieux comprendre l'impact du CMV en dehors du contexte immunitaire sur le développement tumoral.

Article 2 :

Title:

Uncovering the anticancer potential of murine cytomegalovirus against human colon cancer cells

Layal Massara[1,2]*, Camille Khairallah[1,2]*, Benoit Rousseau[1,3], Julien Izotte[1,3], Alban Giese[1,4], Xavier Gauthereau[1,5], Julie Déchanet-Merville[1,2]* and Myriam Capone[1,2]*

* L.M., C.K., J.D-M. and M.C. contributed equally to this work.

Université Bordeaux Segalen, F-33076 Bordeaux, France[1]
CNRS, UMR 5164, F-33076 Bordeaux, France[2]
Service commun des animaleries, animalerie A2, F-33076 Bordeaux, France[3]
EA2406 Histologie et pathologie moléculaire des tumeurs, F-33076 Bordeaux, France[4];
Plateforme de PCR quantitative UMS 3427, F-33076 Bordeaux, France[5]

Correspondance : CAPONE Myriam
UMR-CNRS5164-ImmunoConCept, Bat 1B, 1er étage, Université de Bordeaux, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux
Tel: 0033-5-57-57-95-74
Fax: 0033-5-57-57-14-72
Email: mcapone@immuconcept.org

Short title: **Murine cytomegalovirus targets human colon cancer cells**

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) nucleic acids and proteins are often found in tumors, but the precise relationship between HCMV and cancer remains a matter of debate. Most of time, HCMV is described as an oncomodulatory virus with a pro-tumor role. In contrast, a beneficial anti-tumor role of HCMV was evidenced in transplant recipients, which could rely on recognition and killing of cancer cells by HCMV-induced lymphocytes. Our goal was to test whether CMV could influence cancer development in an immune-independent manner. Using highly immunodeficient mice, we showed that murine CMV (MCMV) could inhibit the growth of murine melanomas and colon carcinomas. Surprisingly, MCMV also reduced human colon carcinomas development *in vivo*, in contrast to HCMV. *In vitro*, both viruses were able to infect human cancer cells. However, decreased cell viability was observed upon MCMV infection only. Expression of human interferon-β (IFN-β) and nuclear domain 10 (ND10) was induced in MCMV-infected, but not in HCMV-infected human colon cancer cells. These results suggest a decreased capacity of the murine counterpart of HCMV, to counteract intrinsic defenses in the human cellular host. Finally, immunodeficient mice receiving local MCMV virotherapy showed a reduction of human colon cancer cells growth, albeit no clinical signs of virus dissemination was evidenced. Our study, which describe a selective advantage of MCMV over HCMV, to control human colon cancer, could pave the way for the development of novel therapeutic protocols for treating cancer.

INTRODUCTION

Cytomegaloviruses (CMVs) are large, enveloped, double-stranded DNA herpesviruses that establish a life-long latent infection. Seroprevalence of human cytomegalovirus (HCMV) ranges from 50% to 100% in the general adult population. CMVs have co-evolved with their host following co-speciation resulting in highly species-specific viruses that are unable to replicate efficiently in heterologous hosts. Species-specificity of CMVs is not due to the absence of appropriate entry receptors in cells, but relies on a post-penetration block of viral replication, due to the inability of the virus to prevent apoptosis (1) or to subvert host defense mechanisms (2). Murine CMV (MCMV), a natural mouse pathogen, shares a high degree of sequence homology and biology with HCMV, making it an excellent model to study viral pathogenesis and hosts responses *in vivo*.

HCMV primary infection is most of time subclinical thanks to robust intracellular and host defense mechanisms, which ultimately lead to the control of viral replication and establishment of latency. Type-I interferons (IFN) are produced as a first line of defense by stromal, endothelial and innate lymphocytes, upon sensing of viral DNA by pattern recognition receptors (PRR), such as Toll-like receptors (TLR) and more recently identified intracellular DNA sensors (3) (4) (5). Type I-IFNs induce an antiviral state in their cellular host, but possess indirect anti-pathogen activity *via* the induction of IFN-stimulated genes (ISGs). Among the IFN-stimulated factors are the constitutively expressed cellular proteins that form the nuclear domain (ND10), a macromolecular complex which create a condensed chromatin environment around the major immediate early (IE) promoter of HCMV, resulting in the inhibition of IE gene transcription and subsequent productive viral infection (6) (7, 8). Type-I-IFNs operate as autocrine and paracrine factors and orchestrate innate and adaptive immune responses.

The immune response against HCMV relies on multiple and redundant immune effector functions from the innate and adaptive immune system. Whilst the acute phase of infection is dominated by the triptych DC-NK-αβ T cell responses, long term control of CMV is primarily attributed to αβ T cells, although memory of CMV-reactive NK cells has been described more recently (reviewed in (9)). Unconventional T lymphocytes also participate to the immune response against HCMV. In 1999, we described a long-term expansion of non-(Vδ2Vγ9) γδ T cells (that we refer to as $V\delta2^{neg}$ T cells) in the blood of renal transplant recipients infected with HCMV (10). The anti-viral role of $V\delta2^{neg}$ T cells was evidenced by our subsequent studies, as well as by other teams in different contexts (reviewed in (11). The mouse model was particularly useful to prove the antiviral protective function of γδ T lymphocytes (12, 13).

Due to their specificity for stress-induced self-antigens, HCMV-induced $V\delta2^{neg}$ T cells recognized carcinomas cell lines *in vitro* (14) (15) (16) (17), inhibited human colon cancer cells growth and metastases in mice (18) (19), and associated with reduced cancer risk in renal transplant recipients (20). Along the same line, Scheper *et al.* showed cross-recognition and reactivity of $V\delta2^{neg}$ T cells against HCMV-infected cells and leukaemic blasts (21). Besides, HCMV reactivation after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) was linked to a decreased rate of relapse for acute myeloid leukemia (AML) (22) (23) (24, 25). The mechanism underpinning this beneficial effect of HCMV was suggested to rely on the recognition of leukemic cells by donor derived, HCMV-stimulated $V\delta2^{neg}$ T cells and $NKG2C^{pos}$ NK cytotoxic effectors (for reviews see (26) (27)). These data add another layer of complexity to the story of HCMV and cancer, which remains a highly dynamic research topic with still unresolved questions and controversies.

In the 1970s, the group of Rapp reported the transformation of embryo lung fibroblasts upon *in vitro* infection with a clinical isolate of HCMV (28). However, the notion that HCMV could be oncogenic was superseded by the concept of oncomodulation (29), due to the reported

controversies about the presence of HCMV in tumours (30-32). Supporting the oncomodulatory role of HCMV, several research groups have described an increased malignancy of human tumour cell lines infected by HCMV (33-35). Yet, the group of Herbein reconsidered the oncogenic potential of HCMV in a recent report, showing that long term-culture of mammary epithelial cells (HMEC) in presence of HCMV-DB induced their transformation (36), reviewed in (37). Concerning colorectal cancer, a pro-tumour role of HCMV has been put forward (38) (39). However, HCMV may influence the outcome of colorectal cancer in an age-depend manner. Indeed, the presence of HCMV in colorectal tumours was associated with shorter disease free survival in ≥65 years old patients (40), and a favorable outcome in non-elderly patients (41).

While the pro-tumour role of HCMV has been predominantly evoked, a recent report described an inhibitory role of HCMV on the development of human hepatocellular carcinoma xenografted in NSG mice (42). An anti-tumour role of CMV was also reported in the mouse model, after systemic infection of MCMV in the case of a liver lymphoma (43), and after intra-tumoral injection of MCMV in the case of melanomas (44) (45).

The reported discrepancies about the role of CMV in cancer might be due to variable factors including the state of cytomegalovirus infection (acute versus latent), as well as the origin of tumour and the composition of associated microenvironment. The present study aimed at testing whether and how CMV would influence colon cancer cells growth without the influence of main immune effectors, by means of MCMV infection in highly immunodeficient mice.

RESULTS

Dose-dependent inhibition of mouse cancer cells growth in immunodeficient mice

In order to test the effect of MCMV without the impact of main anti-tumor immune effectors, we used the most highly immunodeficient mice available. MC38 colon cancer cells were injected subcutaneously (s.c.) in NSG mice that concomitantly received MCMV intraperitoneally (i.p.), or were left uninfected. Because of the high sensitivity of NSG mice, two different doses of virus were used (10^4 and 10^2 PFU). As shown in figure 1A, the growth of MC38 cells was inhibited in both batches of infected mice, in comparison to the control group of uninfected mice. MCMV also inhibited B16 melanoma tumour growth in a dose-dependent manner. At the end of the experiment, a significant difference was observed between the two groups of infected mice (10^2 vs 10^4 PFU) for both tumour volumes (figure 1A) and tumour weight (figure 1B). The intensity of tumour growth inhibition was dependent on the injected viral load and, most probably, reliant to the number of infected tumour cells in the host. The hypothesis that MC38 cells were infected by MCMV was sustained by detection of immediate early (I-E1) proteins within MC38 tumours (figure 1C). As depicted, the number of I-E1+ cells appeared higher in mice that had received 10^4 vs 10^2 PFU of viral inoculum.

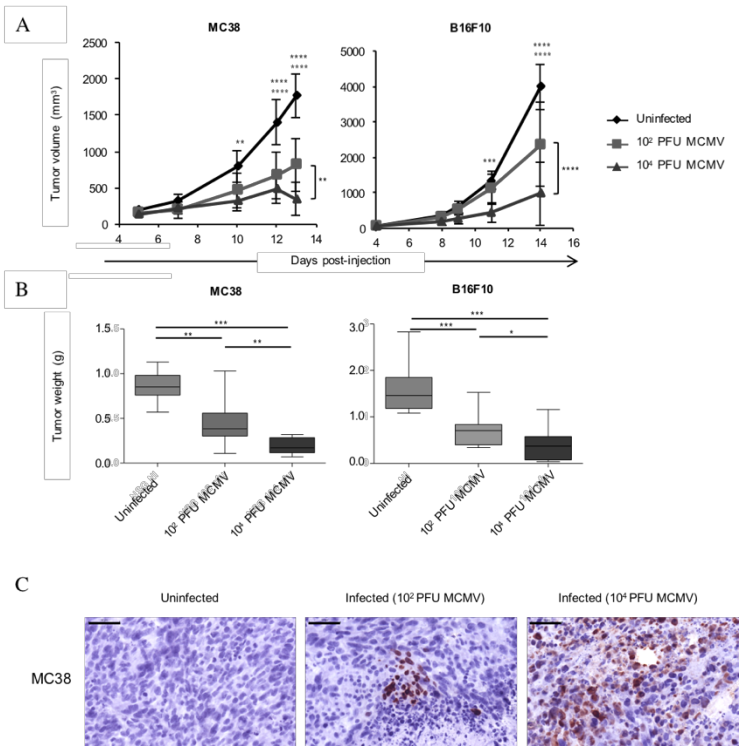


Figure 1. Dose-dependent inhibition of mouse cancer cells growth in immunodeficient mice.

NSG mice received s.c. injections of 5.10^5 MC38 or B16F10 tumour cells and were left untreated, or infected with 10^2 or 10^4 PFU of MCMV. (A) Tumour growth was monitored 3 times a week. (B) Tumours were weighted 2 weeks post-infection, after sacrifice. Bars represent the mean +/- SEM of tumour volumes (A) and weight (B) from 8-10 mice for one representative experiment out of 2. Significant differences between control and infected mice are shown at different time points, while significant differences between the 2 groups of infected mice (10^2 or 10^4 PFU) are shown at the end of experiment. Statistical tests were two-way ANOVA (A) and Mann-Whitney (B) (*P<0,05; **P<0,005; ***P<0,001; ****P <0,0001). (C) The expression of IE1 proteins was evaluated by immunohistochemistry on biopsies of tumours retrieved at the end of experiment, from uninfected, 10^2 and 10^4 PFU infected mice. Images are from one representative mouse out of 3. Scale bar: 50 µm.

Cancer cells show different permissiveness to MCMV

Permissiveness of mouse cancer cells to MCMV was further analyzed *in vitro*, comparatively to highly permissive murine fibroblasts (3T3). Because MCMV replicate very poorly in human cells due to high species specificity, we also tested permissiveness of human cancer cells. Results from these analyses are shown in figure 2. Akin to 3T3 fibroblasts, B16F10 melanomas were highly permissive to MCMV. Staining of cells with anti-IE-1 monoclonal antibody (mAb) showed that a low viral dose (MOI=0,01) was sufficient to infect B16F10 and 3T3, in contrast to MC38 colon cancer cells that required higher doses of virus (MOI≥1) to be infected (figure 2A). Then, after inactivation of residual virus, supernatants from cancer cells previously subjected to variable doses of MCMV were transferred onto 3T3 fibroblasts, and their infectivity assessed by I-E1 staining. As evidenced by the presence of I-E1+ fibroblasts, infectious viral particles were released from cancer cells, as long as the initial MOI was ≥0,01

for B16F10 and 3T3, and ≥1 for MC38 (figure 2B). In contrast, although MCMV IE-1 antigens could be detected in human HT29 colon cancer cells infected with MCMV (MOI>1, figure 1A), no viral particles could be evidenced by transfer supernatant experiments (figure 2B). These results suggest that MCMV can induce a productive infection in mouse cancer cells contrarily to human cancer cells. However, mouse cancer cell lines show different permissiveness to MCMV, B16F10 melanomas being highly permissive to MCMV, in contrast to MC38 colon cancer cells.

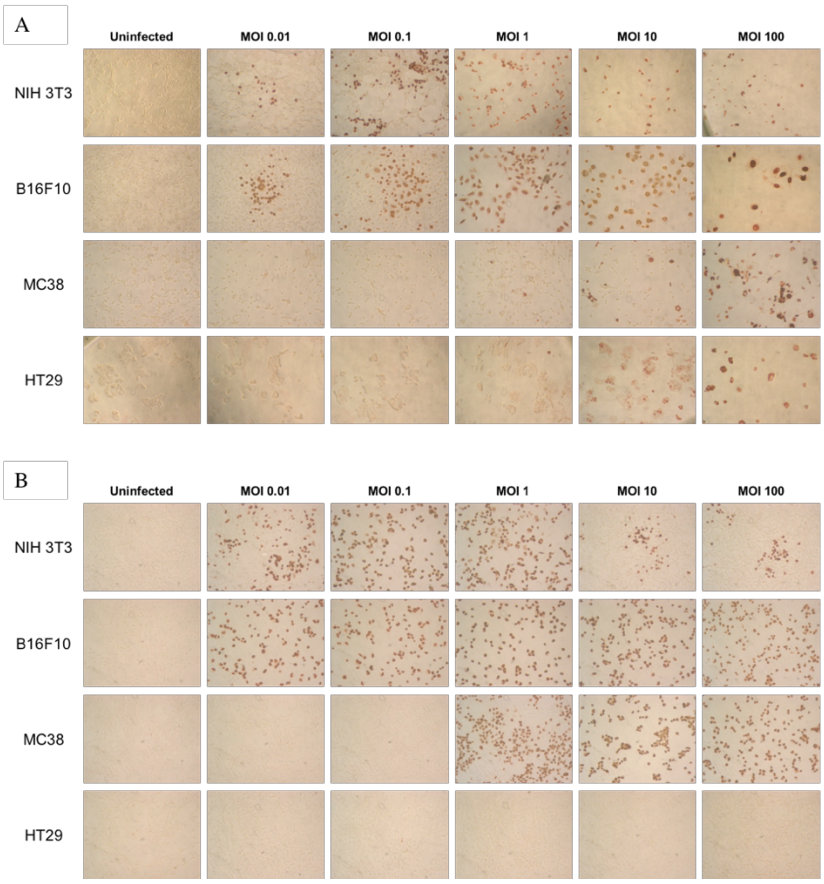


Figure 2. Cancer cells show different permissiveness to MCMV.
(A) The different cell lines were left uninfected, or were infected with variable doses of MCMV; the expression of IE1 proteins was evaluated after 48 hours. (B) Supernatant from pre-infected cell lines was collected after 5 days, submitted to acidic treatment and transferred onto 3T3 fibroblasts. IE1 expression on 3T3 was analyzed 24 h post-supernatant transfers. Images are from one experiment representative of 2.

MCMV affects survival of both mouse and human cancer cells

We next assessed cell survival of MCMV-infected cancer cells. As measured by MTT assay, the viral dose inhibiting 50% of growth (IC_{50}) 3 days post-infection related to an 1<MOI<10 for B16F10 and 3T3, 10<MOI<100 for HT29 and was higher than MOI=100 for MC38 (figure 3A). In parallel, apoptosis of cancer cells was evaluated by flow cytometry. At day 3 post-infection using an MOI=1, 30% of 3T3, 20% of B16F10, 5% of MC38 and 8% of HT29 cells were annexin V+. An MOI=100 was 100% lethal for B16 and 3T3 cells, while 20% of MC38 and 30% of HT29 were annexin V+ (figure 3B). These data confirm that B16F10 are highly sensitive to MCMV infection in contrast to MC38. They also show that relatively high doses of MCMV (MOI>10) may inhibit proliferation or induce apoptosis of human HT29 colon cancer cells, despite the absence of a productive viral cycle.

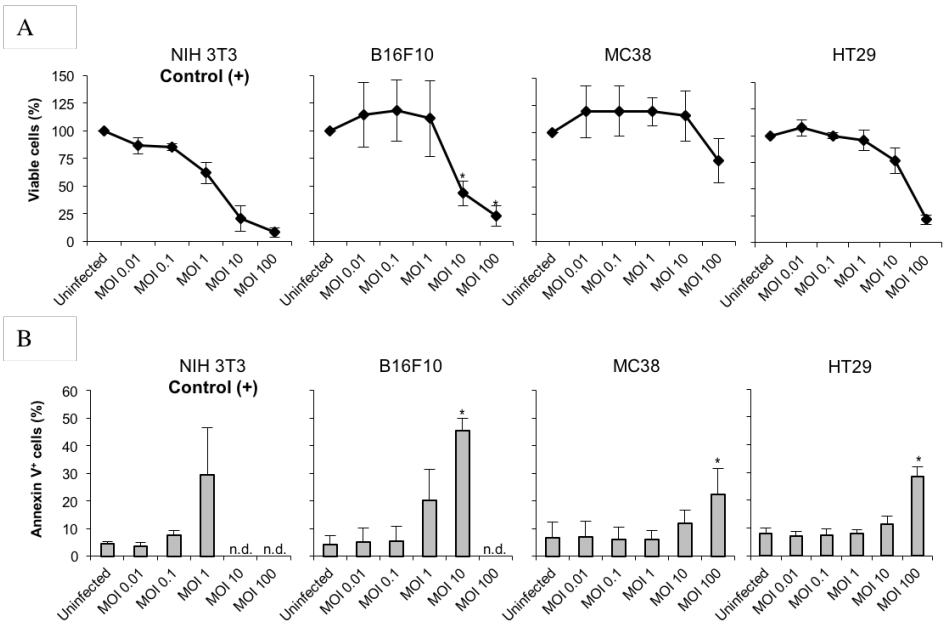


Figure 3. MCMV affects survival of both mouse and human cancer cells.
Cell lines were left infected with MCMV at different MOI for 72h. (A) The viability of cells was assessed using an MTT assay. (B) The proportion of annexin V5+ cells was measured by flow cytometry. Bars represent the mean +/- SEM of 3-4 independent experiments. The proportions of viable cells (A) and annexin V+ cells (B) between control and infected cells were compared and statistics analyzed using two-way ANOVA (*P<0, 05).

Increased host defense mechanisms in MCMV vs HCMV-infected HT29 cells

CMV-replication in cells from a different species might be prohibited due to the inability of the virus to overcome host defense mechanisms. MCMV-IE1 proteins were evidenced in HT29 cells infected with either murine or humane CMV (figure 4A). However, 24h post-infection, IFNβ expression in human colon cancer cells was highly increased by MCMV but not HCMV, comparatively to uninfected cells (figure 4B); similar results were obtained at day 7 (not shown). Since IFNβ possess indirect anti-pathogen activity *via* the induction of various ISGs and ND10, we examined in infected vs control HT29 cells: *i)* the expression of the promyelocytic leukemia protein (PML) and the speckled protein of 100 kDa (sp100), two major components of ND10 and *ii)* the transcription of a panel of ISG that were previously shown to be regulated during cancer. As observed in figure 4C, the expression of PML and sp100 was up-regulated 24h post-MCMV infection, while HCMV had not effect. Similarly, the transcription of ISG genes was differently affected by both viruses, with a reproducible (although non-significant) increase in 24h-MCMV infected cells only, comparatively to uninfected cells (figure 4D).

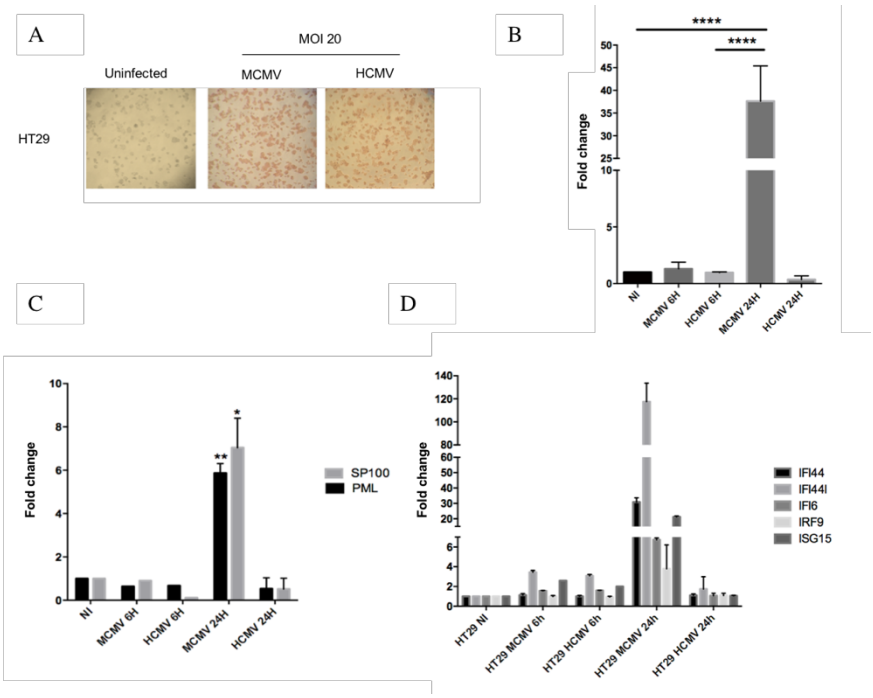


Figure 4. Increased host defense mechanisms in MCMV vs HCMV-infected HT29 cells. (A) HT29 cells were left uninfected, or subjected to MCMV or HCMV infection (MOI=20); staining of murine (MCMV) and human (HCMV) IE1 proteins was performed after 48h. Images are representative of 2/3 independent experiments. (B-D) HT29 cells were uninfected or infected with MCMV or HCMV (MOI=20). IFNβ (B), ND10 (C), and ISG (D) mRNA levels were evaluated 24h and 6h post-infection by real-time qRT-PCR and normalized to house-keeping genes using the ΔΔCt method. Bars represent the mean +/- SEM of at least 3 independent experiments. Two-way ANOVA statistical tests were used (*P<0,05; **P<0,005 ****P <0,0001).

MCMV affects human colon cancer cells in vitro, in contrast to HCMV

Our next in vitro experiments aimed at comparing MCMV vs HCMV impact on human colon cancer cells. At day 3 post-infection, very few cells stained positive for annexin V with HCMV (12%), while 22% of MCMV-infected HT29 cells were annexin V+ (figure 5A). In parallel, MCMV-infection caused a 50% and 75% decrease of HT29 cell counts at day 3 and 5, respectively, while HCMV infection had no effect (figure 5B). MCMV was also able to target SW480 colon cancer cells as evidenced by IE-1 staining, expression of annexin V and inhibition of tumour growth (supplementary figure 1). We next tested the effect of MCMV vs HCMV infection on HT29 cell cycle, and observed a slight decrease in the proportion of cells in G1 phase concomitant to an increase in S phase in MCMV-infected cells only (figure 5C). Finally, inhibition of wound healing by MCMV but not HCMV was shown using a scratch assay (figure 5D).

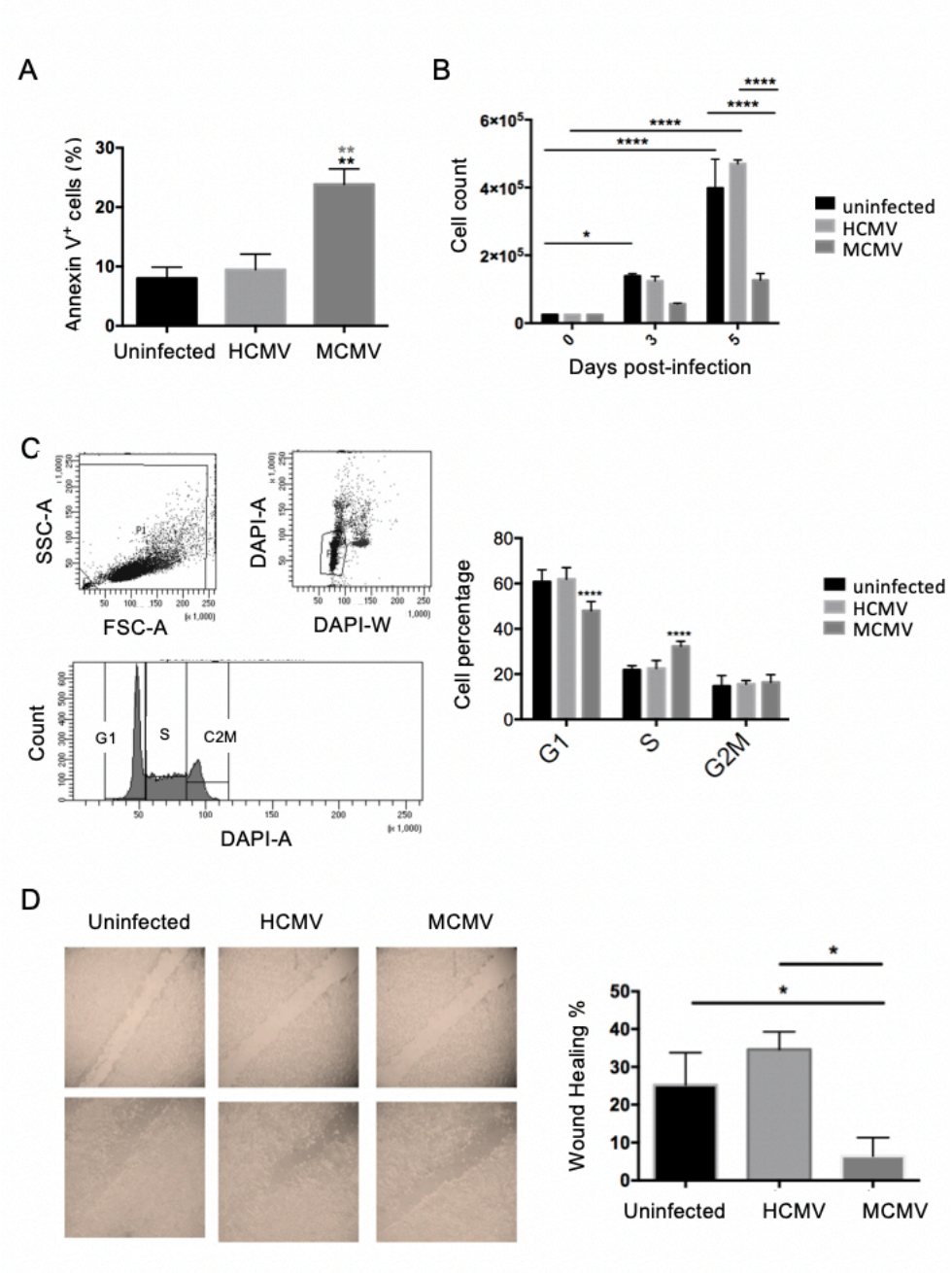


Figure 5. MCMV affects human colon cancer cells in vitro, in contrast to HCMV.
HT29 cells were left uninfected, or infected with MCMV or HCMV (MOI=20). The impact of MCMV and HCMV on apoptosis (A), culture cell counts (B), cell cycle (C) and wound healing (D) was determined (for each technique see the material and methods section). Bars represent the mean +/- SEM of 2-4 independent experiments. Two-way ANOVA statistical tests were used (*P<0,05; ****P <0,0001).

MCMV-restricted inhibition of human colon cancer cells growth in mice

As a first approach to test the effect of MCMV on human colon cancer cells growth, HT29 cells were implanted s.c. in immune deficient mice that received i.p. injections of MCMV (10^4 PFU). HT29 tumors barely developed in MCMV-treated mice and tumour weight was very low in

comparison to tumours from untreated mice (figure 6A). The presence of MCMV I-E1 antigens was evidenced in HT29 tumours, although few cells stained positive comparatively to what we observed previously with murine colon cancer cells (figure 6B and figure 1C). However, HCMV is unable to produce a systemic infection in mice, impeding the possibility to compare the effect of both viruses in those settings. For that reason, in a second set of experiments, HT29 cells were pre-infected with MCMV or HCMV before s.c. implantation in NSG mice. As shown, tumour growth was significantly inhibited by MCMV pre-infection in contrast to HCMV and, at the end of the experiment, tumour masses were much lower in the MCMV-infected group than in HCMV-infected or control mice (figure 6C).

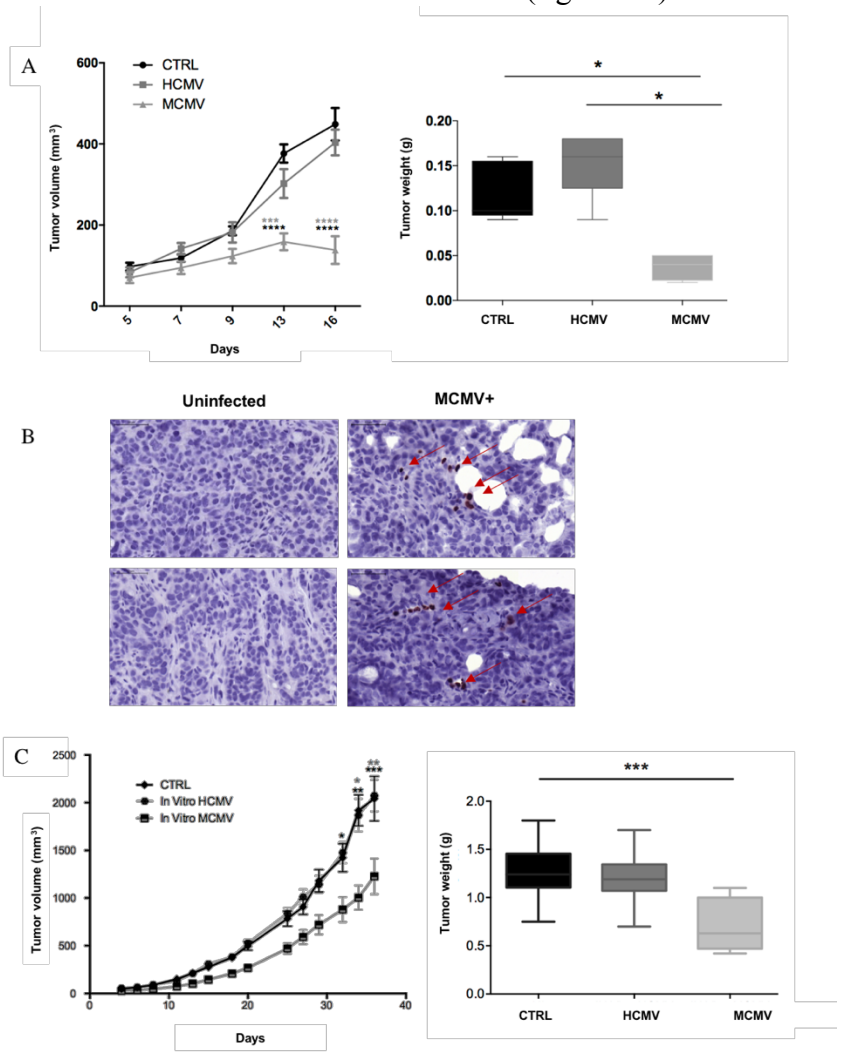


Figure 6. MCMV-restricted inhibition of human colon cancer cells growth in mice.
(A) NSG mice received s.c. injections of 5.10^5 HT29 tumour cells and were left untreated, or i.p. infected with 10^4 PFU of MCMV or HCMV. Tumour growth was monitored three times a week and tumours were weighted at the end of experiment. Bars represent the mean +/- SEM of tumour volumes and weight from 5-8 mice for one representative experiment out of 2. Significant differences between control and infected mice are shown at different time points. (B) IE1 staining was performed on biopsies of tumours retrieved at the end of experiment. Images are from one representative mouse out of 3. Scale bar: 50 µm. (C) NSG mice received s.c. injections of 5.10^5 HT29 control cells, or 5.10^5 HT29 cells pre-infected *in vitro* with HCMV or MCMV (MOI=10). Tumour growth was monitored three times a week and tumours were weighted 38 days post-infection, after sacrifice. Bars represent the mean +/- SEM of tumour

volumes and weight from 10 mice for one representative experiment out of 2. (A) and (C) Statistical tests were two-way ANOVA for tumour growth and Mann-Whitney for tumour weights (*P<0,05; ***P < 0,001; ****P <0,0001).

Inhibition of human cancer cells growth by local MCMV-therapy

A third set of experiments was carried out with the goal to evaluate the effect of a therapy based on local MCMV injections in human cancer cells. Two s.c. viral injections (10^3 Plaque-Forming Units (PFU)) were performed in the course of the experiment (figure 7A). The development of tumors in mice receiving local MCMV-therapy was followed in parallel to the one of mice bearing MCMV-pre-infected HT29 cells, and comparatively to tumor growth in control uninfected mice. Inhibition of human cancer cells growth occurred with comparable efficiency in the two batches of mice challenged with MCMV, and a reduction of tumor weights was evidenced after sacrifice (figure 7A). Furthermore, tumours that had grown in mice treated with local MCMV therapy, or in mice receiving pre-infected HT29 cells, showed a decreased proportion of Ki67+ (figure 7B). Finally, for both groups of mice, IE-1+ cells were visualized in human tumours at the end of the experiment, although in low proportion. In contrast, livers retrieved from MCMV challenged mice appeared negative for I-E1, suggesting neglected viral dissemination (figure 7C).

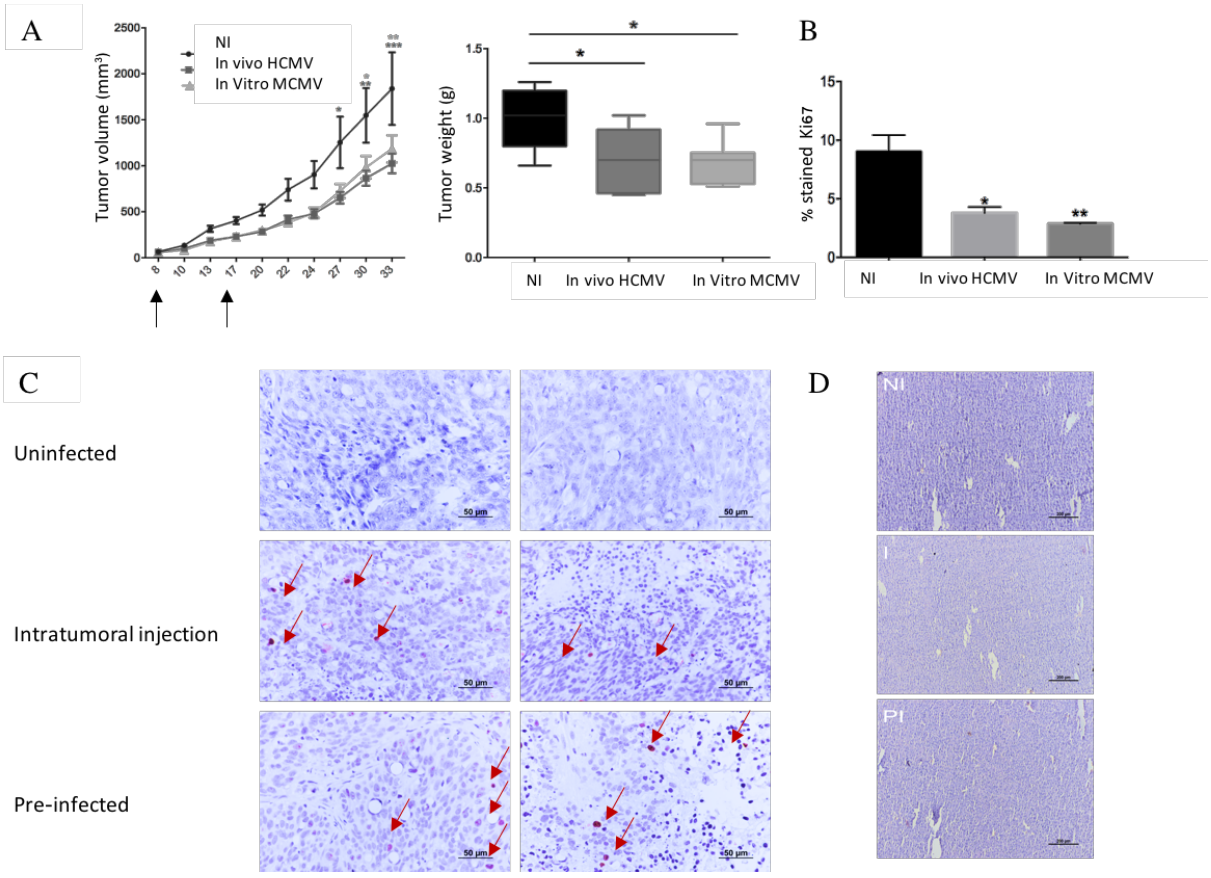


Figure 7. Inhibition of human cancer cells growth by local MCMV therapy.
NSG mice received s.c. injections of 5.10^5 HT29 uninfected cells (2x10 mice), or HT29 cells pre-infected with MCMV at MOI=10 (1x10 mice) (*in vitro* MCMV). Half of mice bearing HT29 untreated tumours (10) received local MCMV therapy (*in vivo* MCMV) at days 8 and 17

(10^3 PFU). (A) Tumour growth was monitored three times a week and tumours were weighted 33 days post-infection, after sacrifice. Bars represent the mean +/- SEM of tumours volumes and weights from 10 mice of one representative experiment out of 2. (B) KI67 staining was done on tumor biopsies, at the end of experiment. Statistical tests were two-way ANOVA for tumour growth and Mann-Whitney for tumour weights and Ki67 staining (*P<0,05; **P<0,005; ***P<0,001). (C) IE1 staining was performed on tumor biopsies and liver. Scale bar 50 μm for tumors and 200 μm for liver. Arrow indicate IE1 positive cells.

DISCUSSION

Previous results including ours suggest that HCMV infection in transplant recipients may establish a favorable context for tumour control, through the mobilization of immune effectors that display dual reactivity against HCMV-infected and cancer cells (20) (21) (26). Yet, Koldehof at al. showed a direct pro-apoptotic effect of HCMV on acute leukemia cell lines that could explain, at least in part, the decreased leukemic relapse rate in AML patients with HCMV reactivation (46). The aim of the present study was to test the immune-independent effect of CMV infection on the development of non-hematologic malignancies.

First, we showed a viral dose-dependent inhibition of B16F10 and MC38 murine cancer cells growth in highly immunodeficient mice. The presence of IE-1+ cells in MC38 tumours retrieved from mice, and the results of our *in vitro* analyses, were suggestive of a direct viral anti-tumour effect. These results differed from a recent study in immunocompetent mice bearing B16F10 tumours, where MCMV was primarily found to target tumour associated macrophages (TAM), and to inhibit tumour development through an indirect immune-related mechanism (44). The absence of immune control in immunodeficient mice probably allows the virus to disseminate, reach distant sites and cancer cells, and eventually kill the mice. In their whole, our analyses are in accord with the idea that CMV could exert a direct anti-tumor activity through cancer cells killing. This scenario, that probably only rarely occurs in physiological situations, might take place with specific tumours and/or in particular contexts of immunosuppression.

Decreased murine cancer cells viability, and production of infectious viral particles were shown upon MCMV infection of B16F10 and MC38 cancer cells *in vitro*. In both cancer cell lines, cell death appeared as soon as IE-1+ cells were detected, but 10^2-lower viral doses were required to induce a lytic cycle in B16F10 melanomas, comparatively to MC38 colon carcinomas. This was unexpected since CMV was shown to poorly replicate in cancer cells, due to the expression of oncogenic alleles that induce multiple blocks including inhibition of viral entry, expression of IE genes and viral DNA replication (47). Whether the excessive sensitivity of B16F10 is due to increased viral entry (in comparison to MC38) or to the absence of intrinsic antiviral mechanisms requires further investigations.

Increased apoptosis of murine cancer cells upon MCMV infection *in vitro* did not preclude the possibility that MCMV could also operate through an indirect mechanism to inhibit cancer cells growth *in vivo*, such as the release of soluble inhibitory factors by non-tumoral cells. However, inhibition of human HT29 tumours was also evidenced after intraperitoneal infection with MCMV (figure 6A), despite the fact that mouse cytokines don't cross-react with human cells. *In vivo* infection of human colon cancer cells by MCMV was suggested by the presence of IE-1+ (figure 6B) and HLA-I+ (not shown) cells in serial sections of HT29 tumours. *In vitro*, apoptosis of HT29 cells by MCMV correlated with IE-1+ staining. However, no viral particles were detected in supernatants from MCMV-infected HT29 cells, indicating that the viral lytic cycle was not completed in human tumour cells, contrarily to murine cancer cells (figure 2B). This suggests that different MCMV-induced cell death mechanisms may take place in murine vs human cancer cells. Finally, few I-E1+ cells were evidenced within HT29 tumours retrieved from mice, even when human cancer cells were pre-infected with high MOI of MCMV (figure

7C). This could be due to the preferential proliferation of remaining non-infected cells *in vivo*, or to an inhibition of murine viral transcription/replication in the human cancer cell line. The increased expression of IFN-β and ND10 components transcripts in HT29 MCMV-infected cells, comparatively to control cells, favor the second hypothesis (48).
In addition to inducing apoptosis of HT29 cells, MCMV was able to act on various cellular functions, sustaining its anti-tumour potential on human colon cancer cells. MCMV infection of HT29 cells affected wound healing, and triggered a cell cycle arrest in S-phase and an inhibition of cell proliferation. Furthermore, HT29 cells infected by MCMV expressed IFN-β mRNA and, most probably, IFN-β protein, as suggested by the induction of ISGs. This cytokine is probably involved in HT29 growth inhibition since it was shown to activate caspase-dependent apoptosis of HT29 cells (49), as well as to trigger the prolongation of S-phase and to block subsequent transition into G2/M-phase (50). IFN-β independent inhibitory mechanisms likely also operate in MCMV-induced tumour cell control. Indeed, apoptosis and inhibition of cell counts were shown in the infected SW480 colon cancer cell line as well, despite its reported defectiveness in cGAS expression and STING signaling (51).
In contrast to MCMV, HCMV did not have a significant impact on HT29 colon cancer cells *in vitro* (figure 5) and *in vivo* (figure 6). Our results are different from the one of Teo et al. who showed a significant increase in cell proliferation and viability in HT29 cells, 48h post infection with HCMV (52). These discrepancies might be due to the different viral strains used in their study and in ours (AD169 and TB40, respectively). While the relationship between HCMV and cancer remains puzzling, our results describe a selective advantage of MCMV over HCMV, in fighting human cancer. Intra-tumoral injection of MCMV induced an inhibition of HT29 tumour growth. MCMV did not seem to disseminate to the liver of mice. Although highly sensitive to MCMV, NSG mice did not show clinical signs of infection along the course of the experiment, and neither IE-1 proteins (figure 7D) could be detected in the livers.
During cross-species infection, a post-penetration block of viral replication occurs and limits viral spread (53) (54). This block might be due to the inability of the virus to prevent apoptosis (1) or to subvert host defense mechanisms. Indeed, I-E1 from murine CMV was unable to counteract human ND10 components, in contrast to I-E1 from human CMV (2). In light with these findings in non tumoral cells, we propose that MCMV is unable to counteract cell intrinsic responses in human cancer cells. In support with this hypothesis, we found an increased expression of IFN-β, sp100 and PML in HT29 cells infected by MCMV, but not HCMV.
The peculiar features of CMV (large DNA genome for gene cloning, possible re-infection, induction of life-long immune surveillance), have led to propose the use of CMV as a viral vaccine vector (55) (56) (57). CMV-based vaccine vectors for cancer are also under consideration, and have shown some protection in murine models of prostate cancer (58) and melanoma, although different efficacies were evidenced, reliant to nature of the cloned antigenic epitope and to the route of infection (59) (44), reviewed in (60) (61). However, therapeutic vaccination for late stage cancer patients could be dangerous in immunocompromised patients, and must require the use of spread defective viral variants (62). Alternatively, recombinant MCMV has been suggested as a potential antigen delivery vector in humans, due to its ability to target dendritic cells without compromising their antigen-presenting ability (63) (64). Yet, CMV is not considered as an oncolytic virus and has never been evoked as a potential virotherapeutic agent to target tumours. Our study paves the way for the development of novel therapeutic protocols based on the local tumour delivery of MCMV, a strategy that could be of relevance for treating cancer in immunocompromised recipients. Using MCMV (or HCMV-based vectors containing MCMV proteins) could allow maintaining cancer cell intrinsic responses that will ultimately lead to cell death, and could avoid uncontrolled and harmful viral multiplication in human surrounding tissues.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and viral stocks

We used 8 to 12 weeks-old NOD-scid gamma (NSG) mice from the Jackson Laboratories. The mice were housed in an appropriate facility (Animalerie A2, University of Bordeaux, France) and kept under pathogen-free conditions.

The MC38 colonic adenocarcinoma and B16F10 murine melanoma cell lines, both generated from C57BL/6 mice, were generously donated by Dr. B. Robert (Montpellier Cancer Research Institute) and Dr. P. Voisin (Centre de Résonance Magnétique des Sytèmes Biologiques,, Bordeaux). NIH 3T3 murine fibroblasts (Swiss mice) and the HT29 human colon adenocarcinoma cell line were from the American Type Culture Collections (ATCC). Cells were cultured at 37 ° C, 5% CO_2 in DMEM complete medium (*Gibco Invitrogen*) supplemented with 8% of heat inactivated fetal calf serum (*PAA Laboratories GmbH*). All cell lines used were regularly tested for the absence of mycoplasma.

MCMV was from the ATCC (Smith strain, ATCC VR-194). For *in vivo* experiments, the virus was amplified in BALB/c background mice (BALBcBy/J, *Charles Rivers Laboratory*, *Larbresle, France*) to generate salivary gland extracts containing MCMV. For the experiments carried out *in vitro*, the virus was amplified by successive passages on a NIH 3T3 cell layer. Virus titers were defined by the standard method of monolayer lysis lanes of murine embryonic fibroblasts (MEFs). The clinical strain of HCMV TB40-E (generously donated by C. Sinzger, University of Turbingen, Germany) was amplified *in vitro* by successive passages on fibroblast cell layer.

Implantation of tumor cells and infection of mice

For systemic CMV infections (figures 1A and 6A), the mice were anesthetized and subcutaneously given 5.10^5 tumour cells (MC38, B16F10 or HT29) in the right flank. The mice were infected the same day by intra-peritoneal injection of 10^2 or 10^4 Plaque-Forming Units (PFU) of MCMV extracted from salivary glands. In the experiments described in figures 6C and 7A (*in vitro* MCMV), the mice were anesthetized and subcutaneously given 5.10^5 HT29 control cells, or HT29 cells that had been pre-infected *in vitro* for 4 days with MCMV or HCMV, at a multiplicity of infection (MOI) of 10. For local MCMV therapy (figure 7A, *in vivo* MCMV), mice received two injections of 10^3 PFU of MCMV at day 8 and at day 17. Tumor growth was monitored by measuring the length and width of tumors with a caliper three to two times per week. The tumor volume was estimated using the following formula: tumor volume (mm^3) = [Length (mm) x Width^2 (mm)] / 2.

Infection of cells and detection of viral proteins in vitro

The NIH 3T3, MC38, B16F10 and HT29 cells were seeded at a rate of 3000 cells per well in a 96-well plate in 100 µl of complete medium. After 24h of adhesion, cells were infected with various MOI (0.01, 0.1, 1, 10 and 100). After 48 h of incubation at 37 ° C, 5% CO_2, the cells were washed with PBS and fixed. Endogenous peroxidases were inhibited with an H_2O_2 solution for 20 min at -20 ° C. Staining was performed using mAbs against MCMV IE1 (clone Croma 101 from *CapRi*) and HCMV IE1 (Argene KiT, ref 11-004) and Vectastain Universal Elite ABC R.T.U Kit (*Vector Laboratories*) following the manufacturer's recommendations. The revelation was done using the AEC Kit (*Vector Laboratories*).

Supernatant transfer experiments

The NIH 3T3, MC38, B16F10 and HT29 cells were seeded at a rate of 3000 cells per well in a 96-well plate in 100 µl of complete medium. After 24h of adhesion, cells were infected with various MOI (0.01, 0.1, 1, 10 and 100). After centrifugation and incubation for one hour at 37°C, cells were washed with DMEM. Remaining viral inoculum was eliminated using citric buffer at pH=3. After 5 days of incubation at 37°C, 5% CO_2, supernatant was transferred on a 3000 seeded NIH 3T3 per well in a 96-well plate. IE1 staining was performed using the technic described below.

Analyses of biopsies

The tumors (MC38 and HT29) and eventually thelivers were taken at the end of experiments, weighed, placed in cassettes and fixed with 4% parformaldehyde for 4 hours. The samples were transferred to a 70% ethanol solution and included in paraffin. The antigens were unmasked on sections of 4 µm thick, by 30 min incubation in Tris buffer (10 mM) EDTA (1 mM) at pH9. After inhibition of endogenous peroxidases with 3% H2O2 solution, the aspecific binding sites and avidin were blocked by the blocking solutions of Vectastain Universal Elite ABC R.T.U kit and Avidin / Biotin Blocking kit, respectively (*Vector Laboratories*). Staining was performed using mAbs against Ki67 (clone sp6 *Thermo Scientific*) and mouse IE1 (clone Croma 101) and Vectastain Universal Elite ABC R.T.U kit. The revelation was done using Novared (*Vector Laboratories*). A counterstaining was done in Mayer hemalun before the analysis. The slides were scanned with the Pannoramic Scan and analyzed with Pannoramic Viewer.

Viability of post-infected cells

The viability of tumours cells and 3T3 post-infection with MCMV was assessed by an MTT assay. The cells were seeded at a rate of 500 to 2500 cells per well according to the cell line in 96-well plate in 100 µl of complete medium. After 24h of adhesion, the cells were infected with various MOI (0.01, 0.1, 1, 10 and 100). After 3 days of infection, the cells were incubated for 2 to 4 hours at 37 ° C, 5% CO2 with 15 µl per well of a solution of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 bromide -diphenyl tetrazolium at 5 mg / ml (*Sigma Aldrich*). The formazan crystals were then solubilized by the addition of 105 µl per well of isopropanol containing 5% of formic acid. The optical density was read at 570 nm with a Varioskan Flash (*Thermo Scientific*). The absorbance of the medium alone was then subtracted from that of the conditions tested to evaluate the specific absorbance of each condition.

RT-qPCR

HT29 cells were seeded at a rate of 5.10^5 cells per well in a 96-well plate in 100 µl of complete medium. After 24h of adhesion, the cells were infected with an MOI of 20 and incubated for 6h, 24 h or 48h at 37 ° C, 5% CO 2. RNA extraction was done using NucleoSpin® RNA Plus from *Macherey-nagel*. RNA quality and quantity were tested respectively using Agilent tape station and DS-11Denovix. RNA were converted to cDNA using Promega®Go-Script Kit. RT-qPCR was realized using Syber-GoTaq master mix from *Promega*®. Samples were distributed using Agilent pipetting station epMotion 5073 *eppendorf*®. And the PCR was performed using CFX 384 Thermocycler Bio-Rad®. All procedures were performed according to the manufacturer's instructions. The following targets were analyzed: IFNβ, IFI6, IFI44, IFI44l, IRF9, ISG15, PML and Sp100. Primers sequences were provided from *Sigma Genosys*.

Gene	Sequence	GenBank Access Number
IRF9	GCCCTACAAGGTGTATCAGTTG	NM_006084
	TGCTGTCGCTTTGATGGTACT	
ISG15	GAGGCAGCGAACTCATCTTT	NM_005101
	CTTCAGCTCTGACACCGACA	
SP100	TCCATGACAAATTGCCTCTCC	NM_001206702
	GAGATGGGGAACCCGAAGG	
PML	CTTCTGCTCCAACCCCAAC	NM_033239
	AAGGCACTATCCTGCTCCTG	
IFI 44	GGTGGGCACTAATACAACTGG	NM_006417
	CACACAGAATAAACGGCAGGTA	
IFI 44L	TCTGCCATTTATGTTGTGTGACA	NM_006820
	CAGGTGTAATTGGTTTACGGGAA	
IFI6	GGTCTGCGATCCTGAATGGG	NM_022873
	TCACTATCGAGATACTTGTGGGT	
Ifnb	ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC	NM_002176
	GGAATCCAAGCAAGTTGTAGCTC	

Cell cycle analysis

HT29 cells were seeded at a rate of 5.10^5 cells per well in a 96-well plate in 100 µl of complete medium. After 24h of adhesion, the cells were infected with MOI of 20 and incubated for 48h at 37 ° C, 5% CO2. After washing the cells were fixed with 70% ice cold-ethanol for 1 hour at 4°C. After centrifugation for 5 min at 400g, cells were washed once using PBS, 1%BSA. Staining was then proceeded by incubation for 30 minutes using 0,5 µg/ml DAPI (*Sigma*). Acquisition was made on a LSRFortessa (*BD Biosciences*) and analysis with BD-DIVA software.

Annexin V detection

The NIH 3T3, MC38, B16F10 and HT29 cells were seeded at a rate of 3000 cells per well in a 96-well plate in 100 µl of complete medium. After 24h of adhesion, the cells were infected with different MOI (0.01, 0.1, 1, 10 and 100) and incubated for 72 h at 37 ° C, 5% CO 2. After PBS washing cell apoptosis was determined using FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (*BD Pharmingen*). Staining of annexin V was carried out according to the manufacturer's instructions. Acquisition was made on a LSRFortessa (*BD Biosciences*) and analysis with the FlowJo (Tree Star) software (*BD Pharmingen*).

Wound healing assay

For wound healing assays, HT29 (1×10^6) were cultured in 6-well plates for 24 h to obtain a confluent monolayer. Vertical artificial scratches were made in the wells by scraping the cell monolayer along the diameter of each well using a 10 µL pipette tip. Cells that separated from the monolayer were removed. Then, medium containing or not MCMV at MOI 20 was added. After 48h in culture, the microscopic images of the scratched area before and after treatment were obtained and observed through a microscope at a magnification of 100×, and 40×. The percentage of wound healing were analyzed using ImajeJ software .

Statistical analyses

Statistical studies were performed using Graphpad prism 5 software. Differences in tumor growth measured *in vivo* were analyzed by an ANOVA two-way test. The statistical differences between the tumor weights were determined by a Mann-Whitney test. The significance is noted as follows: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.

FUNDING

This work was supported in part by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Fondation pour la Recherche Médicale [DEQ20110421287], the Agence National de la Recherche [ANR-12-BSV3-0024-02]. Camille Khairallah was supported by the Conseil Régional d'Aquitaine and the Fondation pour la Recherche Médicale [FDT20140931227].

AKNOWLEDGMENTS

We thank Anaëlle Stum and Vincent Pitard for technical assistance at the Flow cytometry facility, CNRS UMS 3427, INSERM US 005, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.
We also thank Pr Pierre Dubus and Jean-Philippe Merlio for immunhistoochemistry analyses.

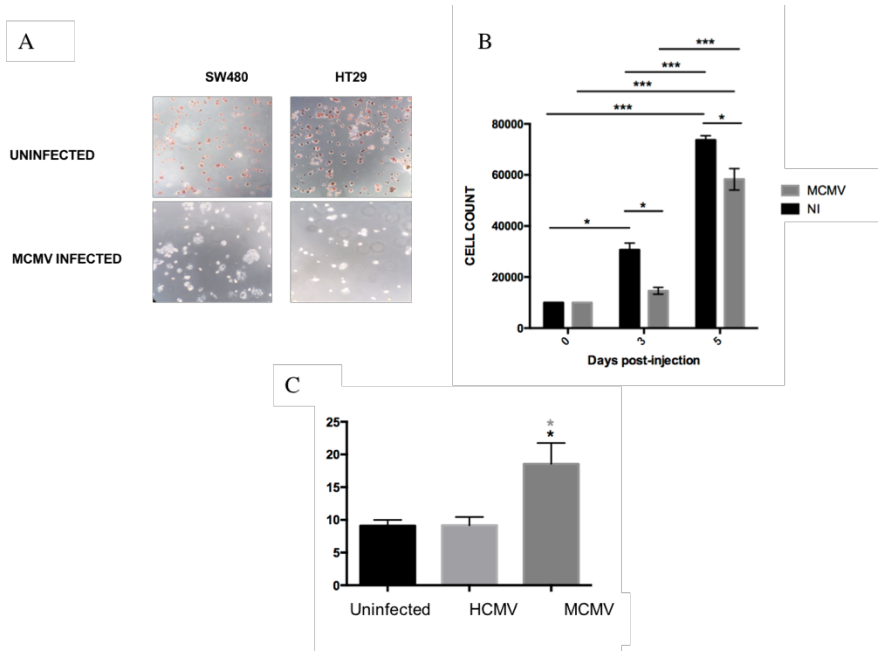
REFERENCES

1. Jurak I, Brune W. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. EMBO J. 2006;25(11):2634-42. doi: 10.1038/sj.emboj.7601133. PubMed PMID: 16688216; PubMed Central PMCID: PMCPMC1478185.
2. Tang Q, Maul GG. Mouse cytomegalovirus crosses the species barrier with help from a few human cytomegalovirus proteins. J Virol. 2006;80(15):7510-21. doi: 10.1128/JVI.00684-06. PubMed PMID: 16840331; PubMed Central PMCID: PMCPMC1563706.
3. Lio CW, McDonald B, Takahashi M, Dhanwani R, Sharma N, Huang J, et al. cGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection. J Virol. 2016;90(17):7789-97. doi: 10.1128/JVI.01040-16. PubMed PMID: 27334590; PubMed Central PMCID: PMCPMC4988162.
4. Paijo J, Doring M, Spanier J, Grabski E, Nooruzzaman M, Schmidt T, et al. cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells. PLoS Pathog. 2016;12(4):e1005546. doi: 10.1371/journal.ppat.1005546. PubMed PMID: 27058035; PubMed Central PMCID: PMCPMC4825940.
5. Almine JF, O'Hare CA, Dunphy G, Haga IR, Naik RJ, Atrih A, et al. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. Nat Commun. 2017;8:14392. doi: 10.1038/ncomms14392. PubMed PMID: 28194029; PubMed Central PMCID: PMCPMC5316833.
6. Woodhall DL, Groves IJ, Reeves MB, Wilkinson G, Sinclair JH. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. J Biol Chem. 2006;281(49):37652-60. doi: 10.1074/jbc.M604273200. PubMed PMID: 17035242.
7. Adler M, Tavalai N, Muller R, Stamminger T. Human cytomegalovirus immediate-early gene expression is restricted by the nuclear domain 10 component Sp100. J Gen Virol. 2011;92(Pt 7):1532-8. doi: 10.1099/vir.0.030981-0. PubMed PMID: 21471311.
8. Ashley CL, Glass MS, Abendroth A, McSharry BP, Slobedman B. Nuclear domain 10 components upregulated via interferon during human cytomegalovirus infection potently regulate viral infection. J Gen Virol. 2017;98(7):1795-805. doi: 10.1099/jgv.0.000858. PubMed PMID: 28745271.
9. O'Sullivan TE, Sun JC, Lanier LL. Natural Killer Cell Memory. Immunity. 2015;43(4):634-45. doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.013. PubMed PMID: 26488815; PubMed Central PMCID: PMCPMC4621966.
10. Dechanet J, Merville P, Lim A, Retiere C, Pitard V, Lafarge X, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. J Clin Invest. 1999;103(10):1437-49. doi: 10.1172/JCI5409. PubMed PMID: 10330426; PubMed Central PMCID: PMCPMC408467.
11. Khairallah C, Dechanet-Merville J, Capone M. gammadelta T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. Front Immunol. 2017;8:105. doi: 10.3389/fimmu.2017.00105. PubMed PMID: 28232834; PubMed Central PMCID: PMCPMC5298998.
12. Sell S, Dietz M, Schneider A, Holtappels R, Mach M, Winkler TH. Control of murine cytomegalovirus infection by gammadelta T cells. PLoS Pathog. 2015;11(2):e1004481. doi: 10.1371/journal.ppat.1004481. PubMed PMID: 25658831; PubMed Central PMCID: PMCPMC4450058.

13. Khairallah C, Netzer S, Villacreces A, Juzan M, Rousseau B, Dulanto S, et al. gammadelta T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV). PLoS Pathog. 2015;11(3):e1004702. doi: 10.1371/journal.ppat.1004702. PubMed PMID: 25747674; PubMed Central PMCID: PMCPMC4352080.
14. Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, Merville P, et al. Shared reactivity of V{delta}2(neg){gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. J Exp Med. 2005;201(10):1567-78. doi: 10.1084/jem.20041851. PubMed PMID: 15897274; PubMed Central PMCID: PMCPMC2212929.
15. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, Silberzahn T, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. Nat Immunol. 2012;13(9):872-9. doi: 10.1038/ni.2394. PubMed PMID: 22885985.
16. Guerville F, Daburon S, Marlin R, Lartigue L, Loizon S, Pitard V, et al. TCR-dependent sensitization of human gammadelta T cells to non-myeloid IL-18 in cytomegalovirus and tumor stress surveillance. Oncoimmunology. 2015;4(5):e1003011. doi: 10.1080/2162402X.2014.1003011. PubMed PMID: 26155394; PubMed Central PMCID: PMCPMC4485801.
17. Marlin R, Pappalardo A, Kaminski H, Willcox CR, Pitard V, Netzer S, et al. Sensing of cell stress by human gammadelta TCR-dependent recognition of annexin A2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(12):3163-8. doi: 10.1073/pnas.1621052114. PubMed PMID: 28270598; PubMed Central PMCID: PMCPMC5373368.
18. Devaud C, Bilhere E, Loizon S, Pitard V, Behr C, Moreau JF, et al. Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model. Cancer Res. 2009;69(9):3971-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3037. PubMed PMID: 19383918.
19. Devaud C, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Paroissin C, Khairallah C, et al. Anti-metastatic potential of human Vdelta1(+) gammadelta T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. Cancer Immunol Immunother. 2013;62(7):1199-210. doi: 10.1007/s00262-013-1402-1. PubMed PMID: 23619975.
20. Couzi L, Lafarge X, Pitard V, Neau-Cransac M, Dromer C, Billes MA, et al. Gamma-delta T cell expansion is closely associated with cytomegalovirus infection in all solid organ transplant recipients. Transpl Int. 2011;24(5):e40-2. doi: 10.1111/j.1432-2277.2010.01181.x. PubMed PMID: 21463369.
21. Scheper W, van Dorp S, Kersting S, Pietersma F, Lindemans C, Hol S, et al. gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. Leukemia. 2013;27(6):1328-38. doi: 10.1038/leu.2012.374. PubMed PMID: 23277330.
22. Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trenschel R, Ditschkowski M, et al. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. Blood. 2011;118(5):1402-12. doi: 10.1182/blood-2010-08-304121. PubMed PMID: 21540462.
23. Green ML, Leisenring WM, Xie H, Walter RB, Mielcarek M, Sandmaier BM, et al. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. Blood. 2013;122(7):1316-24. doi: 10.1182/blood-2013-02-487074. PubMed PMID: 23744585; PubMed Central PMCID: PMCPMC3744995.
24. Manjappa S, Bhamidipati PK, Stokerl-Goldstein KE, DiPersio JF, Uy GL, Westervelt P, et al. Protective effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients is influenced by conditioning regimen. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(1):46-52. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.10.003. PubMed PMID: 24120526; PubMed Central PMCID: PMCPMC4029772.
25. Inagaki J, Noguchi M, Kurauchi K, Tanioka S, Fukano R, Okamura J. Effect of Cytomegalovirus Reactivation on Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(2):300-6. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.006. PubMed PMID: 26371373.
26. Litjens NHR, van der Wagen L, Kuball J, Kwekkeboom J. Potential Beneficial Effects of Cytomegalovirus Infection after Transplantation. Front Immunol. 2018;9:389. doi: 10.3389/fimmu.2018.00389. PubMed PMID: 29545802; PubMed Central PMCID: PMCPMC5838002.
27. Bigley AB, Baker FL, Simpson RJ. Cytomegalovirus: an unlikely ally in the fight against blood cancers? Clin Exp Immunol. 2018. doi: 10.1111/cei.13152. PubMed PMID: 29737525.
28. Geder KM, Lausch R, O'Neill F, Rapp F. Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus. Science. 1976;192(4244):1134-7. PubMed PMID: 179143.
29. Cinatl J, Jr., Cinatl J, Vogel JU, Rabenau H, Kornhuber B, Doerr HW. Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. Intervirology. 1996;39(4):259-69. doi: 10.1159/000150527. PubMed PMID: 9078467.
30. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. Neoplasia. 2009;11(1):1-9. PubMed PMID: 19107226; PubMed Central PMCID: PMCPMC2606113.
31. Johnsen JI, Baryawno N, Soderberg-Naucler C. Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? Oncotarget. 2011;2(12):1329-38. doi: 10.18632/oncotarget.383. PubMed PMID: 22246171; PubMed Central PMCID: PMCPMC3282090.
32. Lawler SE. Cytomegalovirus and glioblastoma; controversies and opportunities. J Neurooncol. 2015;123(3):465-71. doi: 10.1007/s11060-015-1734-0. PubMed PMID: 25682092.
33. Lepiller Q, Abbas W, Kumar A, Tripathy MK, Herbein G. HCMV activates the IL-6-JAK-STAT3 axis in HepG2 cells and primary human hepatocytes. PLoS One. 2013;8(3):e59591. doi: 10.1371/journal.pone.0059591. PubMed PMID: 23555719; PubMed Central PMCID: PMCPMC3608661.

34. Price RL, Song J, Bingmer K, Kim TH, Yi JY, Nowicki MO, et al. Cytomegalovirus contributes to glioblastoma in the context of tumor suppressor mutations. Cancer Res. 2013;73(11):3441-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3846. PubMed PMID: 23729642; PubMed Central PMCID: PMCPMC4136413.
35. Soroceanu L, Matlaf L, Khan S, Akhavan A, Singer E, Bezrookove V, et al. Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins Promote Stemness Properties in Glioblastoma. Cancer Res. 2015;75(15):3065-76. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3307. PubMed PMID: 26239477; PubMed Central PMCID: PMCPMC4526117.
36. Kumar A, Tripathy MK, Pasquereau S, Al Moussawi F, Abbas W, Coquard L, et al. The Human Cytomegalovirus Strain DB Activates Oncogenic Pathways in Mammary Epithelial Cells. EBioMedicine. 2018;30:167-83. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.015. PubMed PMID: 29628341; PubMed Central PMCID: PMCPMC5952350.
37. Herbein G. The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis. Viruses. 2018;10(8). doi: 10.3390/v10080408. PubMed PMID: 30081496.
38. Chen HP, Chan YJ. The oncomodulatory role of human cytomegalovirus in colorectal cancer: implications for clinical trials. Front Oncol. 2014;4:314. doi: 10.3389/fonc.2014.00314. PubMed PMID: 25452935; PubMed Central PMCID: PMCPMC4233914.
39. Bai B, Wang X, Chen E, Zhu H. Human cytomegalovirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. Oncotarget. 2016;7(47):76735-42. doi: 10.18632/oncotarget.12523. PubMed PMID: 27732934; PubMed Central PMCID: PMCPMC5363545.
40. Chen HP, Jiang JK, Lai PY, Chen CY, Chou TY, Chen YC, et al. Tumoral presence of human cytomegalovirus is associated with shorter disease-free survival in elderly patients with colorectal cancer and higher levels of intratumoral interleukin-17. Clin Microbiol Infect. 2014;20(7):664-71. doi: 10.1111/1469-0691.12412. PubMed PMID: 24118412.
41. Chen HP, Jiang JK, Chen CY, Yang CY, Chen YC, Lin CH, et al. Identification of human cytomegalovirus in tumour tissues of colorectal cancer and its association with the outcome of non-elderly patients. J Gen Virol. 2016;97(9):2411-20. doi: 10.1099/jgv.0.000558. PubMed PMID: 27435237.
42. Kumar A, Coquard L, Pasquereau S, Russo L, Valmary-Degano S, Borg C, et al. Tumor control by human cytomegalovirus in a murine model of hepatocellular carcinoma. Mol Ther Oncolytics. 2016;3:16012. doi: 10.1038/mto.2016.12. PubMed PMID: 27626063; PubMed Central PMCID: PMCPMC5008266.
43. Erlach KC, Bohm V, Seckert CK, Reddehase MJ, Podlech J. Lymphoma cell apoptosis in the liver induced by distant murine cytomegalovirus infection. J Virol. 2006;80(10):4801-19. doi: 10.1128/JVI.80.10.4801-4819.2006. PubMed PMID: 16641273; PubMed Central PMCID: PMCPMC1472044.
44. Erkes DA, Xu G, Daskalakis C, Zurbach KA, Wilski NA, Moghbeli T, et al. Intratumoral Infection with Murine Cytomegalovirus Synergizes with PD-L1 Blockade to Clear Melanoma Lesions and Induce Long-term Immunity. Mol Ther. 2016;24(8):1444-55. doi: 10.1038/mt.2016.121. PubMed PMID: 27434584; PubMed Central PMCID: PMCPMC5023369.
45. Erkes DA, Wilski NA, Snyder CM. Intratumoral infection by CMV may change the tumor environment by directly interacting with tumor-associated macrophages to promote cancer immunity. Hum Vaccin Immunother. 2017;13(8):1778-85. doi: 10.1080/21645515.2017.1331795. PubMed PMID: 28604162; PubMed Central PMCID: PMCPMC5557234.
46. Koldehoff M, Lindemann M, Opalka B, Bauer S, Ross RS, Elmaagacli AH. Cytomegalovirus induces apoptosis in acute leukemia cells as a virus-versus-leukemia function. Leuk Lymphoma. 2015;56(11):3189-97. doi: 10.3109/10428194.2015.1032968. PubMed PMID: 25818505.
47. Xu S, Schafer X, Munger J. Expression of Oncogenic Alleles Induces Multiple Blocks to Human Cytomegalovirus Infection. J Virol. 2016;90(9):4346-56. doi: 10.1128/JVI.00179-16. PubMed PMID: 26889030; PubMed Central PMCID: PMCPMC4836323.
48. Dag F, Dolken L, Holzki J, Drabig A, Weingartner A, Schwerk J, et al. Reversible silencing of cytomegalovirus genomes by type I interferon governs virus latency. PLoS Pathog. 2014;10(2):e1003962. doi: 10.1371/journal.ppat.1003962. PubMed PMID: 24586165; PubMed Central PMCID: PMCPMC3930589.
49. Juang SH, Wei SJ, Hung YM, Hsu CY, Yang DM, Liu KJ, et al. IFN-beta induces caspase-mediated apoptosis by disrupting mitochondria in human advanced stage colon cancer cell lines. J Interferon Cytokine Res. 2004;24(4):231-43. doi: 10.1089/107999004323034105. PubMed PMID: 15144569.
50. Katayama T, Nakanishi K, Nishihara H, Kamiyama N, Nakagawa T, Kamiyama T, et al. Type I interferon prolongs cell cycle progression via p21WAF1/CIP1 induction in human colon cancer cells. Int J Oncol. 2007;31(3):613-20. PubMed PMID: 17671689.
51. Xia T, Konno H, Ahn J, Barber GN. Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. Cell Rep. 2016;14(2):282-97. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.029. PubMed PMID: 26748708; PubMed Central PMCID: PMCPMC4845097.
52. Teo WH, Chen HP, Huang JC, Chan YJ. Human cytomegalovirus infection enhances cell proliferation, migration and upregulation of EMT markers in colorectal cancer-derived stem cell-like cells. Int J Oncol. 2017;51(5):1415-26. doi: 10.3892/ijo.2017.4135. PubMed PMID: 29048611; PubMed Central PMCID: PMCPMC5642395.
53. Kim KS, Carp RI. Abortive infection of human diploid cells by murine cytomegalovirus. Infect Immun. 1972;6(5):793-7. PubMed PMID: 4118017; PubMed Central PMCID: PMCPMC422612.
54. Lafemina RL, Hayward GS. Differences in cell-type-specific blocks to immediate early gene expression and DNA replication of human, simian and murine cytomegalovirus. J Gen Virol. 1988;69 (Pt 2):355-74. doi: 10.1099/0022-1317-69-2-355. PubMed PMID: 2828515.

55. Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, Ventura AB, Hughes CM, Coyne-Johnson L, et al. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. Nature. 2011;473(7348):523-7. doi: 10.1038/nature10003. PubMed PMID: 21562493; PubMed Central PMCID: PMCPMC3102768.
56. Hansen SG, Sacha JB, Hughes CM, Ford JC, Burwitz BJ, Scholz I, et al. Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms. Science. 2013;340(6135):1237874. doi: 10.1126/science.1237874. PubMed PMID: 23704576; PubMed Central PMCID: PMCPMC3816976.
57. Marzi A, Murphy AA, Feldmann F, Parkins CJ, Haddock E, Hanley PW, et al. Cytomegalovirus-based vaccine expressing Ebola virus glycoprotein protects nonhuman primates from Ebola virus infection. Sci Rep. 2016;6:21674. doi: 10.1038/srep21674. PubMed PMID: 26876974; PubMed Central PMCID: PMCPMC4753684.
58. Klyushnenkova EN, Kouiavskaia DV, Parkins CJ, Caposio P, Botto S, Alexander RB, et al. A cytomegalovirus-based vaccine expressing a single tumor-specific CD8+ T-cell epitope delays tumor growth in a murine model of prostate cancer. J Immunother. 2012;35(5):390-9. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182585d50. PubMed PMID: 22576344; PubMed Central PMCID: PMCPMC3366429.
59. Qiu Z, Huang H, Grenier JM, Perez OA, Smilowitz HM, Adler B, et al. Cytomegalovirus-Based Vaccine Expressing a Modified Tumor Antigen Induces Potent Tumor-Specific CD8(+) T-cell Response and Protects Mice from Melanoma. Cancer Immunol Res. 2015;3(5):536-46. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0044. PubMed PMID: 25633711.
60. Qiu Z, Grenier JM, Khanna KM. Reviving virus based cancer vaccines by using cytomegalovirus vectors expressing modified tumor antigens. Oncoimmunology. 2016;5(1):e1056974. doi: 10.1080/2162402X.2015.1056974. PubMed PMID: 26942064; PubMed Central PMCID: PMCPMC4760325.
61. Quinn M, Erkes DA, Snyder CM. Cytomegalovirus and immunotherapy: opportunistic pathogen, novel target for cancer and a promising vaccine vector. Immunotherapy. 2016;8(2):211-21. doi: 10.2217/imt.15.110. PubMed PMID: 26786895; PubMed Central PMCID: PMCPMC5619022.
62. Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, Allan JE, Hill AB. Sustained CD8+ T cell memory inflation after infection with a single-cycle cytomegalovirus. PLoS Pathog. 2011;7(10):e1002295. doi: 10.1371/journal.ppat.1002295. PubMed PMID: 21998590; PubMed Central PMCID: PMCPMC3188546.
63. Wang X, Messerle M, Sapinoro R, Santos K, Hocknell PK, Jin X, et al. Murine cytomegalovirus abortively infects human dendritic cells, leading to expression and presentation of virally vectored genes. J Virol. 2003;77(13):7182-92. PubMed PMID: 12805417; PubMed Central PMCID: PMCPMC164805.
64. Wang X, Chen DG. Recombinant murine cytomegalovirus vector activates human monocyte-derived dendritic cells in a NF-kappaB dependent pathway. Mol Immunol. 2009;46(16):3462-5. doi: 10.1016/j.molimm.2009.08.001. PubMed PMID: 19716178; PubMed Central PMCID: PMCPMC2757491.



Supplementary figure 1. MCMV affects human metastatic colon cancer cells (SW480) *in vitro*, in contrast to HCMV.
(A) 48h after infection of SW480 with MCMV or HCMV (MOI=20), the expression of IE1 proteins was evaluated by immunohistochemistry staining comparatively to HT29. (B) Impact of MCMV and HCMV on SW480 cell counts at day 3 and 5 post-infection. (C) Histograms show the proportion of annexin V+ cells in each condition 48h post-infection. Bars represent

the mean +/- SEM of 3 independent experiments. Two-way ANOVA statistical tests were used (*P<0,05; ****P <0,0001).

B- Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus sur ce projet montrent la capacité du MCMV - indépendamment des acteurs majeurs du système immunitaire - à inhiber la croissance de tumeurs coliques murines (MC38), de mélanomes murins (B16F10) et, d'une manière plus surprenante, d'adénocarcinomes coliques humains (HT29), suggérant un rôle anti-tumoral direct du MCMV.

De manière intéressante, l'inhibition de croissance des HT29 observée *in vivo* avec le virus murin, n'est pas reproduite avec le virus humain. *In vitro*, les deux virus sont capables d'infecter les cellules tumorales coliques humaines. Cependant, seul le virus murin induit une inhibition de la viabilité cellulaire, alors que le virus humain a peu d'effet sur la prolifération des cellules HT29. Nous avons montré que le MCMV induit la transcription de l'interféron β humain (IFN β), contrairement au HCMV, ce qui suggère que ce facteur pourrait être (au moins partiellement) impliqué dans l'effet anti-tumoral du MCMV. Il serait ainsi intéressant de tester cette hypothèse en bloquant (ou pas) le récepteur à l'IFN (IFNAR) *in vitro*, et en testant la prolifération cellulaire après infection par le MCMV. La voie cGAS-STING a été largement impliquée dans la production d'IFN β. Or, la majorité des lignées utilisées dans les laboratoires sont STING-déficientes, ce qui n'est pas le cas des HT29 (Xia et al., 2016). Ainsi, nous nous sommes demandé si l'effet inhibiteur du MCMV est également induit dans des lignées STING-déficientes et avons testé l'impact du MCMV et du HCMV sur les SW480, une autre lignée de cancer colique humain. Malgré une permissivité aux deux virus MCMV et HCMV, seul le MCMV a induit une inhibition de la viabilité de ces cellules *in vitro*.

Nous ne pouvons pas exclure qu'*in vivo*, l'inhibition de croissance des HT29 observée après infection des souris en intrapéritonéal, pourrait également être médiée de façon indirecte, à savoir par un effet au niveau de l'environnement tumoral. Bien que la plupart des cytokines murines soient incapables d'interagir avec les récepteurs aux cytokines d'origine humaine, le MCMV pourrait bloquer la néo-angiogenèse, soit en infectant et en tuant les cellules endothéliales murines, soit en empêchant la sécrétion de molécules pro-angiogéniques par

les HT29. En effet, de nombreux facteurs humains (à l'inverse des facteurs murins) peuvent cross-réagir avec les récepteurs de l'autre espèce. La première hypothèse est partiellement éliminée suite à notre expérience de pré-infection des HT29 *in* vitro, et réimplantation in vivo, puisque le virus ne semble pas avoir disséminé dans les organes des souris. En effet, nous n'avons pas pu détecter la protéine virale IE1 par immunohistochimie dans des coupes de foie, alors que cet organe est une des premières cibles du MCMV. Pour éliminer complétement cette hypothèse il sera intéressant de regarder s'il y a une co-localisation du marqueur des cellules endothéliales (CD31) et de l'ADN fragmenté par un marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Le MCMV pourrait également inhiber la sécrétion de facteurs de croissance humains par les HT29 ou, à l'opposé, induire la sécrétion de facteurs inhibiteurs. Afin de tester cette hypothèse il serait intéressant de tester l'effet du surnageant de HT29 infectées par le MCMV, sur des cellules tumorales humaines non infectées.

Nos résultats montrent aussi que, malgré une infection importante (avoisinant les 100%) des HT29 implantées en sous-cutané dans les souris, très peu de cellules tumorales étaient encore IE1+ dans les tumeurs prélevées après 30j. On peut émettre ainsi deux hypothèses : (i) soit l'expression de IE1 est inhibée dans ces cellules, (ii) soit les cellules ne survivent pas mais sécrètent des cytokines après leur mort, qui impacteraient sur les cellules tumorales non infectées. Pour tester ces deux hypothèses nous pourrions infecter des cellules marquées avec la GFP, les mélanger ou pas avec des cellules non infectées GFP-, et regarder ainsi si les cellules GFP+ se maintiennent *in vivo*.

Finalement, étant donné que le modèle sous cutané n'est pas un modèle qui favorise la génération de métastases, nous avons testé dans une expérience préliminaire l'impact du MCMV sur l'apparition de métastases en injectant des HT29 préinfectées exprimant la luciférase dans le caecum. Dans cette expérience la prise de greffe des cellules HT29 était remarquablement faible dans le cas des souris traitées par MCMV, comparativement aux HT29 non traitées au traitées par le HCMV. Cela pourrait être dû soit à une erreur d'injection, soit à un effet du MCMV sur les molécules d'adhésion des HT29. Sur les souris ou la prise de greffe était réussie on observe une diminution de métastases dans les souris traitées par le MCMV par rapport au groupe contrôle ou au groupe de souris traitées par le HCMV (figure

32). Bien sûr il faudra reproduire cette expérience pour vérifier s'il s'agit vraiment un impact sur les métastases ou sur l'adhérence.

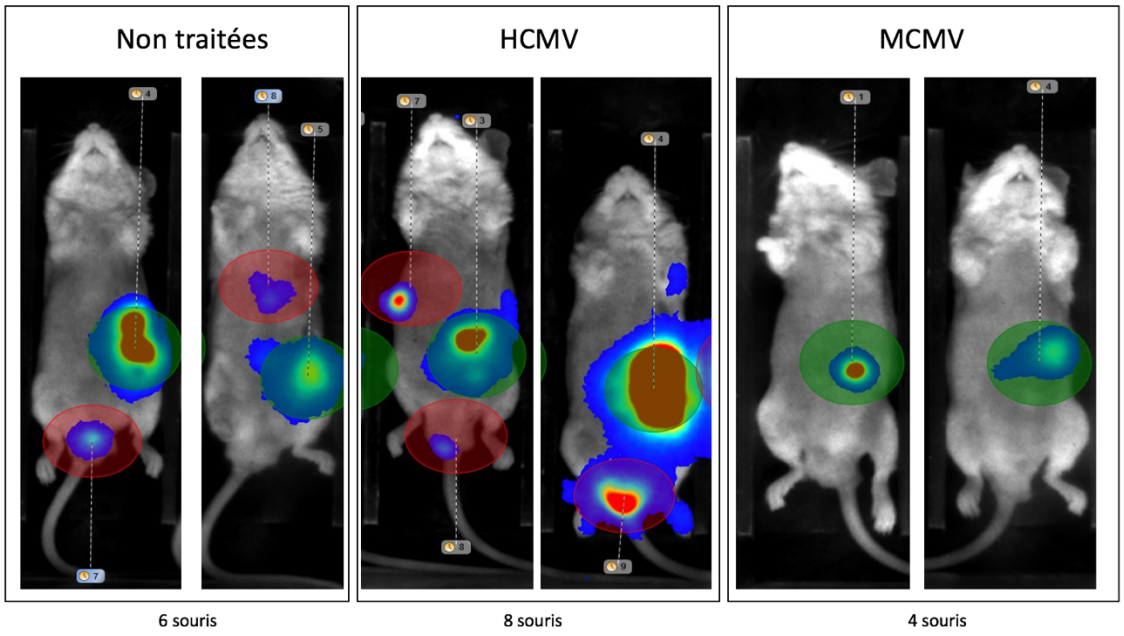


Figure 32: impact de MCMV sur les métastases coliques humaines.

Suite à une infection de 4 jours à MOI 10 in vitro des HT29-luciferase+ les cellules ont été implantées dans le caecum des souris NSG. La croissance tumorale ainsi que le suivi des métastases ont été réalisées tous les 3 jours en injectant de la luciférine. La photo a été prise 2 semaines après implantation des tumeurs.

Malgré le fait que MCMV ait un effet anti-tumorale sur les cellules humaines il est encore très tôt de le proposer en thérapie. En effet pour pouvoir le proposer en thérapie il faudrait tester l'impact de ce Virus sur les cellules adjacentes, sur le système immunitaire mais aussi la possibilité d'éventuelles recombinaisons avec la souche humaine.

Conclusion

La structure, les propriétés et la fonction des molécules de HLA modifiées sont encore mal caractérisées. Dans notre étude, nous montrons une expression des molécules de HLA modifiées pour la première fois dans un contexte de stress physiologique, à savoir l'infection au CMV. Ces molécules s'avèrent être impliquées dans l'activation d'une sous population de lymphocytes T γδ exprimant le TCR Vγ9Vδ3.

J'ai également montré que l'inhibition des molécules de HLA – une stratégie mise en place par le CMV pour échapper aux lymphocytes T αβ – favorise plutôt l'activation des lymphocytes T γδ non Vγ9Vδ2. Cette activation pourrait être due à une diminution du signal inhibiteur médié par les KIR qui sont exprimés à un niveau élevé sur ces cellules (Couzi et al., 2009).

Cette régulation par les signaux inhibiteurs rapprocherait ces lymphocytes des cellules NK, alors que la nécessité d'un signal TCR leur confère une spécificité de réponse.

Dans une deuxième approche, d'une manière intéressante, inattendue, j'ai pu montrer un impact anti-tumoral du CMV murin sur les cellules tumorales humaines, à l'inverse du CMV humain qui avait plutôt un effet oncomodulateur. Nous avons fait l'hypothèse d'une incapacité du CMV murin à contrecarrer la réponse de la cellule hôte délimitant ainsi les effets de la barrière d'espèce.

Ainsi notre étude apporte une perspective nouvelle et inattendue dans le domaine du traitement du cancer par l'utilisation thérapeutique du CMV murin. Cette perspective nécessite en amont de tester :

1- L'expression des auto-antigènes de stress et des molécules de HLA à la surface des cellules humaines infectées par le CMV murin, et l'impact sur la réponse T

Il serait en effet intéressant de savoir si en plus d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, le CMV n'induirait pas leur reconnissance et élimination par les cellules du système immunitaire. Il faudrait par exemple tester la cytotoxicité des lymphocytes T γδ humains vis-à-vis de cellules tumorales humaines infectées par le MCMV mais aussi le profil d'expression de molécules de stress (telles que les molécules de HLA modifiées) à la surface des cellules tumorales infectées. L'impact de l'infection au MCMV sur l'expression des molécules de HLA et la réactivité des lymphocytes T αβ humains pourraient également être analysés. Sachant que le CMV humain utilise 10% de son génome afin d'échapper au système immunitaire et plus précisément aux lymphocytes T αβ notamment via l'inhibition des molécules HLA, il se pourrait que cet effet ne soit pas observé avec le CMV murin du fait de son incapacité à contrecarrer la réponse de la cellule hôte humaine. Dans une expérience préliminaire (données non illustrées), l'infection de fibroblastes humains par le CMV murin avait plutôt tendance

plutôt à induire l'expression des molécules HLA suggérant une activation possible des lymphocytes T αβ et, au contraire, une inhibition des lymphocytes T γδ et des cellules NK via l'activation des récepteurs inhibiteurs.

2- L'impact sur les cellules primaires.

Avant l'utilisation de CMV murin en thérapie, il faudrait tester l'impact de l'infection sur les cellules primaires. Plusieurs études montrent que les cellules primaires humaines peuvent être infectées par le CMV murin mais ne montrent aucune réplication du virus du fait de l'induction d'un processus apoptotique (Jurak and Brune, 2006; Tang and Maul, 2006). Il faudrait tester l'effet du CMV murin sur des cellules primaires isolées à partir de tumeurs fraiches mais également sur des cellules primaires normales telles que des fibroblastes ou des cellules endothéliales afin de déterminer si cet effet anti-prolifératif est spécifique des cellules tumorales.

3- Possibilité de recombinaison avec le CMV humain.

Il faudra notamment tester l'impact de la possible recombinaison entre le CMV Humain et le CMV Murin. En effet la possibilité de recombinaison pourrait rendre ce virus plus virulent et ainsi avoir un impact plus grave. Pour vérifier les possibles recombinaisons, il serait possible de les comparer en utilisant le SimPlot software.

Bibliographie

.

Aaronson, D.S., and Horvath, C.M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. Science *296*, 1653–1655.

Abele, R., and Tampé, R. (1999). Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. Biochim. Biophys. Acta *1461*, 405–419.

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

Ahn, J.H., and Hayward, G.S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. J Virol *71*, 4599–4613.

Allen, R.L., O'Callaghan, C.A., McMichael, A.J., and Bowness, P. (1999). Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. J Immunol *162*, 5045–5048.

de Almeida, S.F., Carvalho, I.F., Cardoso, C.S., Cordeiro, J.V., Azevedo, J.E., Neefjes, J., and de Sousa, M. (2005). HFE cross-talks with the MHC class I antigen presentation pathway. Blood *106*, 971–977.

Antoine, P., Olislagers, V., Huygens, A., Lecomte, S., Liesnard, C., Donner, C., and Marchant, A. (2012). Functional Exhaustion of CD4+ T Lymphocytes during Primary Cytomegalovirus Infection. J. Immunol. *189*, 2665–2672.

Antoniou, A.N., Powis, S.J., and Elliott, T. (2003). Assembly and export of MHC class I peptide ligands. Curr. Opin. Immunol. *15*, 75–81.

Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M.A., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., et al. (2002). Memory $CD8^+$ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat. Med. *8*, 379–385.

Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., et al. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. Nat. Immunol. *6*, 515–523.

Arosa, F.A., Santos, S.G., and Powis, S.J. (2007). Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules. Trends Immunol *28*, 115–123.

Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. J. Exp. Med. *207*, 1273–1281.

Bai, B., Wang, X., Chen, E., and Zhu, H. (2016). Human cytomegalovirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. Oncotarget *7*, 76735–76742.

Balk, S.P., Burke, S., Polischuk, J.E., Frantz, M.E., Yang, L., Porcelli, S., Colgan, S.P., and Blumberg, R.S. (1994). Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. Science *265*, 259–262.

Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Pariente, N., Verdaguer, N., and Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. Adv. Virus Res. *62*, 19–111.

Bartkowiak, J., Kulczyck-Wojdala, D., Blonski, J.Z., and Robak, T. (2002). Molecular diversity of gammadelta T cells in peripheral blood from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Neoplasma *49*, 86–90.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science *285*, 727–729.

Bayard, C., Lepetitcorps, H., Roux, A., Larsen, M., Fastenackels, S., Salle, V., Vieillard, V., Marchant, A., Stern, M., Boddaert, J., et al. Coordinated expansion of both memory T cells and NK cells in response to CMV infection in humans. Eur. J. Immunol. *46*, 1168–1179.

Biassoni, R., and Malnati, M.S. (2018). Human Natural Killer Receptors, Co-Receptors, and Their Ligands: Human Natural Killer Receptors, Co-Receptors, and Their Ligands. Curr. Protoc. Immunol. *121*, e47.

Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. N. Engl. J. Med. *320*, 1731–1735.

Bisbal, C., and Silverman, R.H. (2007). Diverse functions of RNase L and implications in pathology. Biochimie *89*, 789–798.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. Annu. Rev. Immunol. *31*, 443–473.

Boldogh, I., Huang, E.-S., Rady, P., Arany, I., Tyring, S., and Albrecht, T. (1994). Alteration in the Coding Potential and Expression of H-ras in Human Cytomegalovirus-Transformed Cells. Intervirology *37*, 321–329.

Brocchieri, L., Kledal, T.N., Karlin, S., and Mocarski, E.S. (2005). Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. J. Virol. *79*, 7570–7596.

Browne, E.P., Wing, B., Coleman, D., and Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. J. Virol. *75*, 12319–12330.

Castillo, J.P., Yurochko, A.D., and Kowalik, T.F. (2000). Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. J. Virol. *74*, 8028–8037.

Castillo, J.P., Frame, F.M., Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Yurochko, A.D., and Kowalik, T.F. (2005). Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. J. Virol. *79*, 11467–11475.

Cerboni, C., Fionda, C., Soriani, A., Zingoni, A., Doria, M., Cippitelli, M., and Santoni, A. (2014). The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. Front Immunol *4*, 508.

Chalupny, N.J., Rein-Weston, A., Dosch, S., and Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. Biochem Biophys Res Commun *346*, 175–181.

Champsaur, M., and Lanier, L.L. (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. Immunol. Rev. *235*, 267–285.

Chen, H.-P., Jiang, J.-K., Lai, P.-Y., Chen, C.-Y., Chou, T.-Y., Chen, Y.-C., Chan, C.-H., Lin, S.-F., Yang, C.-Y., Chen, C.-Y., et al. (2014). Tumoral presence of human cytomegalovirus is associated with shorter disease-free survival in elderly patients with colorectal cancer and higher levels of intratumoral interleukin-17. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *20*, 664–671.

Chen, H.-P., Jiang, J.-K., Chen, C.-Y., Yang, C.-Y., Chen, Y.-C., Lin, C.-H., Chou, T.-Y., Cho, W.-L., and Chan, Y.-J. (2016). Identification of human cytomegalovirus in tumour tissues of colorectal cancer and its association with the outcome of non-elderly patients. J. Gen. Virol. *97*, 2411–2420.

Cinatl, J., Cinatl, J., Vogel, J.U., Rabenau, H., Kornhuber, B., and Doerr, H.W. (1996). Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. Intervirology *39*, 259–269.

Correia, D.V., Fogli, M., Hudspeth, K., da Silva, M.G., Mavilio, D., and Silva-Santos, B. (2011). Differentiation of human peripheral blood Vδ1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. Blood *118*, 992–1001.

Costa-Garcia, M., Vera, A., Moraru, M., Vilches, C., López-Botet, M., and Muntasell, A. (2015). Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 2715–2724.

Cotton, R.N., Shahine, A., Rossjohn, J., and Moody, D.B. (2018). Lipids hide or step aside for CD1-autoreactive T cell receptors. Curr. Opin. Immunol. *52*, 93–99.

Couzi, L., Pitard, V., Netzer, S., Garrigue, I., Lafon, M.E., Moreau, J.F., Taupin, J.L., Merville, P., and Dechanet-Merville, J. (2009). Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. J Infect Dis *200*, 1415–1424.

Couzi, L., Levaillant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., et al. (2010a). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *21*, 181–188.

Couzi, L., Levaillant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., et al. (2010b). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. J Am Soc Nephrol *21*, 181–188.

Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2011). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). Blood *119*, 1418–1427.

Cui, X., Freed, D.C., Wang, D., Qiu, P., Li, F., Fu, T.-M., Kauvar, L.M., and McVoy, M.A. (2017). Impact of Antibodies and Strain Polymorphisms on Cytomegalovirus Entry and Spread in Fibroblasts and Epithelial Cells. J. Virol. *91*.

Dausset, J. (1958). [Iso-leuko-antibodies]. Acta Haematol. *20*, 156–166.

Davignon, J.L., Castanié, P., Yorke, J.A., Gautier, N., Clément, D., and Davrinche, C. (1996). Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. J. Virol. *70*, 2162–2169.

Davison, A.J. (2002). Evolution of the herpesviruses. Vet. Microbiol. *86*, 69–88.

Déchanet, J., Merville, P., Lim, A., Retière, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Méric, C., Hallet, M.-M., Kourilsky, P., et al. (1999). Implication of γδ T cells in the human immune response to cytomegalovirus. J. Clin. Invest. *103*, 1437–1449.

Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., et al. (1999a). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. J Clin Invest *103*, 1437–1449.

Dechanet, J., Merville, P., Berge, F., Bone-Mane, G., Taupin, J.L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., and Moreau, J.F. (1999b). Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. J Infect Dis *179*, 1–8.

Demanet, C., Mulder, A., Deneys, V., Worsham, M.J., Maes, P., Claas, F.H., and Ferrone, S. (2004). Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? Blood *103*, 3122–3130.

Demaria, S., Schwab, R., and Bushkin, Y. (1992). The origin and fate of beta 2m-free MHC class I molecules induced on activated T cells. Cell Immunol *142*, 103–113.

Edidin, M. (1988). Function by association? MHC antigens and membrane receptor complexes. Immunol Today *9*, 218–219.

Elmaagacli, A.H., Steckel, N.K., Koldehoff, M., Hegerfeldt, Y., Trenschel, R., Ditschkowski, M., Christoph, S., Gromke, T., Kordelas, L., Ottinger, H.D., et al. (2011). Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. Blood *118*, 1402–1412.

ENGSTRAND, M., LIDEHÄLL, A.K., TÖTTERMAN, T.H., HERRMAN, B., ERIKSSON, B.-M., and KORSGREN, O. (2003). Cellular responses to cytomegalovirus in immunosuppressed patients: circulating CD8+ T cells recognizing CMVpp65 are present but display functional impairment. Clin. Exp. Immunol. *132*, 96–104.

Everett, R.D., Rechter, S., Papior, P., Tavalai, N., Stamminger, T., and Orr, A. (2006). PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. J Virol *80*, 7995–8005.

Feder, J.N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V.K., Mapa, F.A., Morikang, E., Prass, C.E., Starnes, S.M., Wolff, R.K., Parkkila, S., et al. (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. J Biol Chem *272*, 14025–14028.

Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., and Griffin, D.E. (2001). Fields virology (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).

Fioretti, A., Furukawa, T., Santoli, D., and Plotkin, S.A. (1973). Nonproductive infection of guinea pig cells with human cytomegalovirus. J. Virol. *11*, 998–1003.

Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., and Miller, J.S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. Blood *119*, 2665–2674.

Fornara, C., Lilleri, D., Revello, M.G., Furione, M., Zavattoni, M., Lenta, E., and Gerna, G. (2011). Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and γδ T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. J. Clin. Immunol. *31*, 1054–1064.

Fouts, A.E., Chan, P., Stephan, J.-P., Vandlen, R., and Feierbach, B. (2012). Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 Complex Comprise the Majority of the Anti-Cytomegalovirus (Anti-CMV) Neutralizing Antibody Response in CMV Hyperimmune Globulin. J. Virol. *86*, 7444–7447.

Furman, M.H., Dey, N., Tortorella, D., and Ploegh, H.L. (2002). The Human Cytomegalovirus US10 Gene Product Delays Trafficking of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. J. Virol. *76*, 11753–11756.

Gamadia, L.E., Remmerswaal, E.B.M., Weel, J.F., Bemelman, F., van Lier, R.A.W., and Ten Berge, I.J.M. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. Blood *101*, 2686–2692.

García, M.A., Meurs, E.F., and Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. Biochimie *89*, 799–811.

Garrido, F., Cabrera, T., and Aptsiauri, N. (2010). “Hard” and “soft” lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. Int J Cancer *127*, 249–256.

Gaspar, M., and Shenk, T. (2006). Human cytomegalovirus inhibits a DNA damage response by mislocalizing checkpoint proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 2821–2826.

Geder, K.M., Lausch, R., O’Neill, F., and Rapp, F. (1976). Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus. Science *192*, 1134–1137.

Geronimi, F., Richard, E., Redonnet-Vernhet, I., Lamrissi-Garcia, I., Lalanne, M., Ged, C., Moreau-Gaudry, F., and De Verneuil, H. (2003). Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34+ and CD34+/38-/lin- cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation. Stem Cells *21*, 472–480.

Giles, J., Shaw, J., Piper, C., Wong-Baeza, I., McHugh, K., Ridley, A., Li, D., Lenart, I., Antoniou, A.N., DiGleria, K., et al. (2012). HLA-B27 homodimers and free H chains are stronger ligands for leukocyte Ig-like receptor B2 than classical HLA class I. J Immunol *188*, 6184–6193.

Goldmacher, V.S., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Dionne, C.A., Kedersha, N.L., Vater, C.A., Han, J.W., Lutz, R.J., Watanabe, S., Cahir McFarland, E.D., et al. (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 12536–12541.

Gonen-Gross, T., Achdout, H., Arnon, T.I., Gazit, R., Stern, N., Horejsi, V., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., and Mandelboim, O. (2005). The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules. J Immunol *175*, 4866–4874.

Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. Nature *419*, 734–738.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. *20*, 621–667.

Guerville, F., Daburon, S., Marlin, R., Lartigue, L., Loizon, S., Pitard, V., Couzi, L., Moreau, J.-F., Déchanet-Merville, J., and Faustin, B. (2015). TCR-dependent sensitization of human γδ T cells to non-myeloid IL-18 in cytomegalovirus and tumor stress surveillance. Oncoimmunology *4*.

Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., and López-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. Blood *104*, 3664–3671.

Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K., Pincus, S., Toldy, J., Cox, W.I., Meric, C., Plotkin, S., Gönczöl, E., and Berencsi, K. (2000). Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. J. Infect. Dis. *181*, 1537–1546.

Hai, R., Chu, A., Li, H., Umamoto, S., Rider, P., and Liu, F. (2006). Infection of human cytomegalovirus in cultured human gingival tissue. Virol. J. *3*, 84.

Halary, F., Peyrat, M.A., Champagne, E., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Vié, H., Fournié, J.J., and Bonneville, M. (1997). Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. Eur. J. Immunol. *27*, 2812–2821.

Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.-F., and Dechanet-Merville, J. (2005a). Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. J. Exp. Med. *201*, 1567–1578.

Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2005b). Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. J. Exp. Med. *201*, 1567–1578.

Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. J. Exp. Med. *186*, 1407–1418.

Hao, J., Wu, X., Xia, S., Li, Z., Wen, T., Zhao, N., Wu, Z., Wang, P., Zhao, L., and Yin, Z. (2010). Current progress in γδ T-cell biology. Cell. Mol. Immunol. *7*, 409–413.

Harkins, L., Volk, A.L., Samanta, M., Mikolaenko, I., Britt, W.J., Bland, K.I., and Cobbs, C.S. (2002). Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. Lancet Lond. Engl. *360*, 1557–1563.

Harly, C., Peyrat, M.A., Netzer, S., Dechanet-Merville, J., Bonneville, M., and Scotet, E. (2011). Up-regulation of cytolytic functions of human Vdelta2-gamma T lymphocytes through engagement of ILT2 expressed by tumor target cells. Blood *117*, 2864–2873.

Hayday, A.C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. Annu. Rev. Immunol. *18*, 975–1026.

Hayday, A.C. (2009). Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity *31*, 184–196.

Hendricks, D.W., Balfour, H.H., Dunmire, S.K., Schmeling, D.O., Hogquist, K.A., and Lanier, L.L. (2014). Cutting edge: NKG2C(hi)CD57+ NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *192*, 4492–4496.

Hengel, H., Koszinowski, U.H., and Conzelmann, K.-K. (2005). Viruses know it all: new insights into IFN networks. Trends Immunol. *26*, 396–401.

Hirano, M., Guo, P., McCurley, N., Schorpp, M., Das, S., Boehm, T., and Cooper, M.D. (2013). Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. Nature *501*, 435–438.

Hofmann, H., Sindre, H., and Stamminger, T. (2002). Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. J Virol *76*, 5769–5783.

Hovanessian, A.G., and Justesen, J. (2007). The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. Biochimie *89*, 779–788.

Huang, E.S., and Roche, J.K. (1978). Cytomegalovirus D.N.A. and adenocarcinoma of the colon: Evidence for latent viral infection. Lancet Lond. Engl. *1*, 957–960.

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci *147*, 258–267.

Isaacson, M.K., Juckem, L.K., and Compton, T. (2008). Virus entry and innate immune activation. Curr Top Microbiol Immunol *325*, 85–100.

Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. J Cell Biol *147*, 221–234.

Ito, S., Pophali, P., Co, W., Koklanaris, E.K., Superata, J., Fahle, G.A., Childs, R., Battiwalla, M., and Barrett, A.J. (2013). CMV reactivation is associated with a lower incidence of relapse after allo-SCT for CML. Bone Marrow Transplant. *48*, 1313–1316.

Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. Oncogene *20*, 7223–7233.

Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., Lanier, L.L., Saito, T., et al. (2013). Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. Int Immunol *25*, 235–246.

Jones, E.Y. (1997). MHC class I and class II structures. Curr. Opin. Immunol. *9*, 75–79.

Jones, D.C., Kosmoliaptsis, V., Apps, R., Lapaque, N., Smith, I., Kono, A., Chang, C., Boyle, L.H., Taylor, C.J., Trowsdale, J., et al. (2011). HLA class I allelic sequence and conformation regulate leukocyte Ig-like receptor binding. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 2990–2997.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. J. Exp. Med. *207*, 1247–1260.

Kabelitz, D., Kalyan, S., Oberg, H.-H., and Wesch, D. (2013). Human Vδ2 versus non-Vδ2 γδ T cells in antitumor immunity. Oncoimmunology *2*.

Kadri, N., Wagner, A.K., Ganesan, S., Kärre, K., Wickström, S., Johansson, M.H., and Höglund, P. (2016). Dynamic Regulation of NK Cell Responsiveness. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *395*, 95–114.

Kakizuka, A., Miller, W.H., Umesono, K., Warrell, R.P., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., and Evans, R.M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell *66*, 663–674.

Kaminski, H., Garrigue, I., Couzi, L., Taton, B., Bachelet, T., Moreau, J.-F., Déchanet-Merville, J., Thiébaut, R., and Merville, P. (2016). Surveillance of γδ T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *27*, 637–645.

Kenna, T., Golden-Mason, L., Norris, S., Hegarty, J.E., O'Farrelly, C., and Doherty, D.G. (2004). Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. Clin Immunol *113*, 56–63.

Kim, K.S., and Carp, R.I. (1972). Abortive Infection of Human Diploid Cells by Murine Cytomegalovirus. Infect. Immun. *6*, 793–797.

Kim, Y.-E., and Ahn, J.-H. (2015). Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. PLOS Pathog. *11*, e1004785.

Knight, A., Madrigal, A.J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P.J., and Lowdell, M.W. (2010a). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. Blood *116*, 2164–2172.

Knight, A., Madrigal, A.J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P.J., and Lowdell, M.W. (2010b). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. Blood *116*, 2164–2172.

Koldehoff, M., Lindemann, M., Opalka, B., Bauer, S., Ross, R.S., and Elmaagacli, A.H. (2015). Cytomegalovirus induces apoptosis in acute leukemia cells as a virus-versus-leukemia function. Leuk. Lymphoma *56*, 3189–3197.

Kotenko, S.V. (2011). IFN-lambdas. Curr Opin Immunol *23*, 583–590.

Krause, C.D., and Pestka, S. (2005). Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. Pharmacol Ther *106*, 299–346.

Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. Microbes Infect. *5*, 1263–1277.

Kuchipudi, S.V. (2015). The Complex Role of STAT3 in Viral Infections.

Kumar, A., Tripathy, M.K., Pasquereau, S., Al Moussawi, F., Abbas, W., Coquard, L., Khan, K.A., Russo, L., Algros, M.-P., Valmary-Degano, S., et al. (2018). The Human Cytomegalovirus Strain DB Activates Oncogenic Pathways in Mammary Epithelial Cells. EBioMedicine *30*, 167–183.

Kumari, P., Narayanan, S., and Kumar, H. (2015). Herpesviruses: interfering innate immunity by targeting viral sensing and interferon pathways. Rev. Med. Virol. *25*, 187–201.

Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M.C., Bergé, F., Potaux, L., Moreau, J.F., and Déchanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. J. Infect. Dis. *184*, 533–541.

Lafemina, R.L., and Hayward, G.S. (1988). Differences in cell-type-specific blocks to immediate early gene expression and DNA replication of human, simian and murine cytomegalovirus. J. Gen. Virol. *69 (Pt 2)*, 355–374.

Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1996). Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. Immunol. Today *17*, 86–91.

Lawand, M., Déchanet-Merville, J., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2017). Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. Front. Immunol. *8*.

Le, V.T., Trilling, M., Wilborn, M., Hengel, H., and Zimmermann, A. (2008). Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. J Gen Virol *89*, 2416–2426.

Lin, A., Xu, H., and Yan, W. (2007). Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. Cell Mol Immunol *4*, 91–98.

Lio, C.-W.J., McDonald, B., Takahashi, M., Dhanwani, R., Sharma, N., Huang, J., Pham, E., Benedict, C.A., and Sharma, S. (2016). cGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection. J. Virol. *90*, 7789–7797.

Ljunggren, H.G., and Kärre, K. (1990). In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. Immunol. Today *11*, 237–244.

Luoma, A.M., Castro, C.D., Mayassi, T., Bembinster, L.A., Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Scharf, L., Kung, J.E., Sibener, L.V., et al. (2013). Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells. Immunity *39*, 1032–1042.

Luster, A.D. (2002). The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. Curr. Opin. Immunol. *14*, 129–135.

Madrigal, J.A., Belich, M.P., Benjamin, R.J., Little, A.M., Hildebrand, W.H., Mann, D.L., and Parham, P. (1991). Molecular definition of a polymorphic antigen (LA45) of free HLA-A and -B heavy chains found on the surfaces of activated B and T cells. J Exp Med *174*, 1085–1095.

Mahadevan, N.R., and Zanetti, M. (2011). Tumor stress inside out: cell-extrinsic effects of the unfolded protein response in tumor cells modulate the immunological landscape of the tumor microenvironment. J Immunol *187*, 4403–4409.

Malathi, K., Dong, B., Gale, M., and Silverman, R.H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. Nature *448*, 816–819.

Mangan, B.A., Dunne, M.R., O'Reilly, V.P., Dunne, P.J., Exley, M.A., O'Shea, D., Scotet, E., Hogan, A.E., and Doherty, D.G. (2013). Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells. J Immunol *191*, 30–34.

Marlin, R., Pappalardo, A., Kaminski, H., Willcox, C.R., Pitard, V., Netzer, S., Khairallah, C., Lomenech, A.-M., Harly, C., Bonneville, M., et al. (2017). Sensing of cell stress by human γδ TCR-dependent recognition of annexin A2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, 3163–3168.

Marrack, P., and Kappler, J. (1994). Subversion of the immune system by pathogens. Cell *76*, 323–332.

Mason, G.M., Jackson, S., Okecha, G., Poole, E., Sissons, J.G.P., Sinclair, J., and Wills, M.R. (2013). Human cytomegalovirus latency-associated proteins elicit immune-suppressive IL-10 producing $CD4^+$ T cells. PLoS Pathog. *9*, e1003635.

Matko, J., Bushkin, Y., Wei, T., and Edidin, M. (1994). Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. J Immunol *152*, 3353–3360.

Mingari, M.C., Schiavetti, F., Ponte, M., Vitale, C., Maggi, E., Romagnani, S., Demarest, J., Pantaleo, G., Fauci, A.S., and Moretta, L. (1996). Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 12433–12438.

Neefjes, J.J., and Ploegh, H.L. (1988). Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with beta 2-microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. Eur J Immunol *18*, 801–810.

Noriega, V., Redmann, V., Gardner, T., and Tortorella, D. (2012). Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. Immunol Res *54*, 140–151.

Ohta, A., Fujita, A., Murayama, T., Iba, Y., Kurosawa, Y., Yoshikawa, T., and Asano, Y. (2009). Recombinant human monoclonal antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein B neutralize virus in a complement-dependent manner. Microbes Infect. *11*, 1029–1036.

Orr, M.T., and Lanier, L.L. (2010). Natural Killer Cell Education and Tolerance. Cell *142*, 847–856.

Park, B., Kim, Y., Shin, J., Lee, S., Cho, K., Fruh, K., Lee, S., and Ahn, K. (2004). Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. Immunity *20*, 71–85.

Paulus, C., Krauss, S., and Nevels, M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. Proc Natl Acad Sci U A *103*, 3840–3845.

Perosa, F., Luccarelli, G., Prete, M., Favoino, E., Ferrone, S., and Dammacco, F. (2003). Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide. J Immunol *171*, 1918–1926.

Petersen, J.L., Hickman-Miller, H.D., McIlhaney, M.M., Vargas, S.E., Purcell, A.W., Hildebrand, W.H., and Solheim, J.C. (2005). A charged amino acid residue in the transmembrane/cytoplasmic region of tapasin influences MHC class I assembly and maturation. J Immunol *174*, 962–969.

Peyrat, M.A., Davodeau, F., Houde, I., Romagne, F., Necker, A., Leget, C., Cervoni, J.P., Cerf-Bensussan, N., Vie, H., Bonneville, M., et al. (1995). Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V delta 3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor (TCR) delta-chain expressors and alpha beta T cells expressing V delta 3J alpha C alpha-encoded TCR chains. J Immunol *155*, 3060–3067.

Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.-E., Merville, P., Moreau, J.-F., and Dechanet-Merville, J. (2008a). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. Blood *112*, 1317–1324.

Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.-E., Merville, P., Moreau, J.-F., and Dechanet-Merville, J. (2008b). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. Blood *112*, 1317–1324.

Plummer, G. (1973). Cytomegaloviruses of man and animals. Prog. Med. Virol. Fortschritte Med. Virusforsch. Progres En Virol. Medicale *15*, 92–125.

Preston, C.M., and Nicholl, M.J. (2006). Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression. J Gen Virol *87*, 1113–1121.

Puig-Pey, I., Bohne, F., Benítez, C., López, M., Martínez-Llordella, M., Oppenheimer, F., Lozano, J.J., González-Abraldes, J., Tisone, G., Rimola, A., et al. (2010). Characterization of γδ T cell

subsets in organ transplantation. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *23*, 1045–1055.

Quinnan, G.V., Burns, W.H., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J., Jackson, L., Santos, G.W., and Saral, R. (1984). HLA-restricted cytotoxic T lymphocytes are an early immune response and important defense mechanism in cytomegalovirus infections. Rev. Infect. Dis. *6*, 156–163.

Raftery, M.J., Hitzler, M., Winau, F., Giese, T., Plachter, B., Kaufmann, S.H., and Schonrich, G. (2008). Inhibition of CD1 antigen presentation by human cytomegalovirus. J Virol *82*, 4308–4319.

Rahbar, A., Orrego, A., Peredo, I., Dzabic, M., Wolmer-Solberg, N., Strååt, K., Stragliotto, G., and Söderberg-Nauclér, C. (2013). Human cytomegalovirus infection levels in glioblastoma multiforme are of prognostic value for survival. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. *57*, 36–42.

Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. J. Virol. *70*, 8833–8849.

Redondo-Pachón, D., Crespo, M., Yélamos, J., Muntasell, A., Pérez-Sáez, M.J., Pérez-Fernández, S., Vila, J., Vilches, C., Pascual, J., and López-Botet, M. (2017). Adaptive NKG2C+ NK Cell Response and the Risk of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *198*, 94–101.

Renard, V., Cambiaggi, A., Vély, F., Bléry, M., Olcese, L., Olivero, S., Bouchet, M., and Vivier, E. (1997). Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. Immunol. Rev. *155*, 205–221.

Rentenaar, R.J., Gamadia, L.E., van derHoek, N., van Diepen, F.N.J., Boom, R., Weel, J.F.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2000). Development of virus-specific CD4+ T cells during primary cytomegalovirus infection. J. Clin. Invest. *105*, 541–548.

Rich, K.C., Chang, B.H., Mofenson, L., Fowler, M.G., Cooper, E., Pitt, J., Hillyer, G.V., and Mendez, H. (1997). Elevated CD8+DR+ lymphocytes in HIV-exposed infants with early positive HIV cultures: a possible early marker of intrauterine transmission. Women and Infants Transmission Study Group. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc. *15*, 204–210.

Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., and Greenberg, P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. Science *257*, 238–241.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. Cell *78*, 761–771.

Rölle, A., Mousavi-Jazi, M., Eriksson, M., Odeberg, J., Söderberg-Nauclér, C., Cosman, D., Kärre, K., and Cerboni, C. (2003). Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 902–908.

Roux, A., Mourin, G., Larsen, M., Fastenackels, S., Urrutia, A., Gorochov, G., Autran, B., Donner, C., Sidi, D., Sibony-Prat, J., et al. (2013). Differential impact of age and cytomegalovirus infection on the gammadelta T cell compartment. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *191*, 1300–1306.

Roy, S., Ly, D., Castro, C.D., Li, N.-S., Hawk, A.J., Altman, J.D., Meredith, S.C., Piccirilli, J.A., Moody, D.B., and Adams, E.J. (2016). Molecular Analysis of Lipid-Reactive Vδ1 γδ T Cells Identified by CD1c Tetramers. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *196*, 1933–1942.

Ryckman, B.J., Chase, M.C., and Johnson, D.C. (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 14118–14123.

Sanchez, V., McElroy, A.K., and Spector, D.H. (2003). Mechanisms Governing Maintenance of Cdk1/Cyclin B1 Kinase Activity in Cells Infected with Human Cytomegalovirus. J. Virol. *77*, 13214–13224.

Sandstrom, A., Peigne, C.M., Leger, A., Crooks, J.E., Konczak, F., Gesnel, M.C., Breathnach, R., Bonneville, M., Scotet, E., and Adams, E.J. (2014). The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. Immunity *40*, 490–500.

Scheper, W., van Dorp, S., Kersting, S., Pietersma, F., Lindemans, C., Hol, S., Heijhuurs, S., Sebestyen, Z., Grunder, C., Marcu-Malina, V., et al. (2013a). gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. Leukemia *27*, 1328–1338.

Scheper, W., van Dorp, S., Kersting, S., Pietersma, F., Lindemans, C., Hol, S., Heijhuurs, S., Sebestyen, Z., Grunder, C., Marcu-Malina, V., et al. (2013b). gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. Leukemia *27*, 1328–1338.

Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol *55*, 255–281.

Shen, Y., Zhu, H., and Shenk, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate “hit-and-run” oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 3341–3345.

Shields, M.J., and Ribaudo, R.K. (1998). Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of beta2-microglobulin. Tissue Antigens *51*, 567–570.

Sia, I.G., and Patel, R. (2000). New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. Clin. Microbiol. Rev. *13*, 83–121, table of contents.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. Science *284*, 1835–1837.

Siegers, G.M., Dhamko, H., Wang, X.H., Mathieson, A.M., Kosaka, Y., Felizardo, T.C., Medin, J.A., Tohda, S., Schueler, J., Fisch, P., et al. (2011). Human Vdelta1 gammadelta T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. Cytotherapy *13*, 753–764.

Sijmons, S., Van Ranst, M., and Maes, P. (2014). Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing. Viruses *6*, 1049–1072.

Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus Cell Tropism. In Human Cytomegalovirus, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 63–83.

Somnay-Wadgaonkar, K., Nusrat, A., Kim, H.S., Canchis, W.P., Balk, S.P., Colgan, S.P., and Blumberg, R.S. (1999). Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form. Int Immunol *11*, 383–392.

Soroceanu, L., Matlaf, L., Khan, S., Akhavan, A., Singer, E., Bezrookove, V., Decker, S., Ghanny, S., Hadaczek, P., Bengtsson, H., et al. (2015). Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins Promote Stemness Properties in Glioblastoma. Cancer Res. *75*, 3065–3076.

Spada, F.M., Grant, E.P., Peters, P.J., Sugita, M., Melián, A., Leslie, D.S., Lee, H.K., van Donselaar, E., Hanson, D.A., Krensky, A.M., et al. (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. J. Exp. Med. *191*, 937–948.

Spector, D.H. (2015). Human cytomegalovirus riding the cell cycle. Med Microbiol Immunol *204*, 409–419.

Stewart, C.A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F.A., et al. (2005). Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. Proc Natl Acad Sci U A *102*, 13224–13229.

Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science *339*, 786–791.

Sylwester, A., Nambiar, K.Z., Caserta, S., Klenerman, P., Picker, L.J., and Kern, F. (2016). A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. Mech. Ageing Dev. *158*, 14–22.

Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., et al. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. J. Exp. Med. *202*, 673–685.

Szostecki, C., Guldner, H.H., Netter, H.J., and Will, H. (1990). Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. J Immunol *145*, 4338–4347.

Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., et al. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 3516–3521.

Taher, C., Frisk, G., Fuentes, S., Religa, P., Costa, H., Assinger, A., Vetvik, K.K., Bukholm, I.R.K., Yaiw, K.-C., Smedby, K.E., et al. (2014). High prevalence of human cytomegalovirus in brain metastases of patients with primary breast and colorectal cancers. Transl. Oncol. *7*, 732–740.

Takaoka, A., and Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. Cell Microbiol *8*, 907–922.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. Cell *140*, 805–820.

Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Leis, M., and Stamminger, T. (2006). Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. J Virol *80*, 8006–8018.

Teijaro, J.R. (2016). Type I interferons in viral control and immune regulation. Curr. Opin. Virol. *16*, 31–40.

Teo, W.H., Chen, H.-P., Huang, J.C., and Chan, Y.-J. (2017). Human cytomegalovirus infection enhances cell proliferation, migration and upregulation of EMT markers in colorectal cancer-derived stem cell-like cells. Int. J. Oncol. *51*, 1415–1426.

Theodossis, A. (2013). On the trail of empty MHC class-I. Mol. Immunol. *55*, 131–134.

Townsend, A., and Bodmer, H. (1989). Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. *7*, 601–624.

Uldrich, A.P., Le Nours, J., Pellicci, D.G., Gherardin, N.A., McPherson, K.G., Lim, R.T., Patel, O., Beddoe, T., Gras, S., Rossjohn, J., et al. (2013). CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. Nat Immunol *14*, 1137–1145.

Uze, G., and Monneron, D. (2007). IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. Biochimie *89*, 729–734.

Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. Nat Rev Immunol *13*, 88–100.

Vantourout, P., Martinez, L.O., Fabre, A., Collet, X., and Champagne, E. (2008). Ecto-F1-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes. Mol. Immunol. *45*, 485–492.

Varnum, S.M., Streblow, D.N., Monroe, M.E., Smith, P., Auberry, K.J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D.G., Rodland, K., Wiley, S., et al. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. J. Virol. *78*, 10960–10966.

Vavassori, S., Kumar, A., Wan, G.S., Ramanjaneyulu, G.S., Cavallari, M., El Daker, S., Beddoe, T., Theodossis, A., Williams, N.K., Gostick, E., et al. (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. Nat Immunol *14*, 908–916.

Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010a). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. J Exp Med *207*, 807–821.

Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010b). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. J Exp Med *207*, 807–821.

Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010c). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. J. Exp. Med. *207*, 807–821.

Vermijlen, D., Gatti, D., Kouzeli, A., Rus, T., and Eberl, M. (2018). γδ T cell responses: How many ligands will it take till we know? Semin. Cell Dev. Biol.

Vivier, E., and Anfossi, N. (2004). Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. Nat. Rev. Immunol. *4*, 190–198.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. Nat. Immunol. *9*, 503–510.

Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P.P. (1998). PML is essential for multiple apoptotic pathways. Nat Genet *20*, 266–272.

Welte, S.A., Sinzger, C., Lutz, S.Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K.L., Eknigk, U., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2003). Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. Eur. J. Immunol. *33*, 194–203.

Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2004). Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. J. Virol. *78*, 5535–5545.

Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Cell *84*, 769–779.

Willcox, C.R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., Salim, M., Silberzahn, T., Moreau, J.-F., Hayday, A.C., Willcox, B.E., and Déchanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human γδ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. Nat. Immunol. *13*, 872–879.

Williams, A.P., Peh, C.A., Purcell, A.W., McCluskey, J., and Elliott, T. (2002). Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. Immunity *16*, 509–520.

Wolmer-Solberg, N., Baryawno, N., Rahbar, A., Fuchs, D., Odeberg, J., Taher, C., Wilhelmi, V., Milosevic, J., Mohammad, A.-A., Martinsson, T., et al. (2013). Frequent detection of human

cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? Int. J. Cancer *133*, 2351–2361.

Wong, G., Chakera, A., Chapman, J.R., Chadban, S.C., Pilmore, H., Craig, J.C., and Lim, W.H. (2017). Cytomegalovirus and cancer after kidney transplantation: Role of the human leukocyte antigen system? Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc. *19*.

Wu, J., and Chen, Z.J. (2014). Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. Annu. Rev. Immunol. *32*, 461–488.

Wu, J., Groh, V., and 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*, 1236–1240.

Xia, T., Konno, H., Ahn, J., and Barber, G.N. (2016). Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA-Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. Cell Rep. *14*, 282–297.

Xu, B., Pizarro, J.C., Holmes, M.A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R.K. (2011). Crystal structure of a γδ T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 2414–2419.

Young, N.T., Canavez, F., Uhrberg, M., Shum, B.P., and Parham, P. (2001). Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex. Immunogenetics *53*, 270–278.

Zeng, X., Wei, Y.L., Huang, J., Newell, E.W., Yu, H., Kidd, B.A., Kuhns, M.S., Waters, R.W., Davis, M.M., Weaver, C.T., et al. (2012). gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. Immunity *37*, 524–534.

Zhang, X., Wu, J., Du, F., Xu, H., Sun, L., Chen, Z., Brautigam, C.A., Zhang, X., and Chen, Z.J. (2014). The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. Cell Rep *6*, 421–430.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. Blood *95*, 2748–2752.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood *112*, 1557–1569.

Annexe I

The Journal of Heart and Lung Transplantation
http://www.jhltonline.org

FEATURED PAPERS

Lung intragraft donor-specific antibodies as a risk factor for graft loss

Jonathan Visentin, PharmD, PhD,[a,b] Albane Chartier, MD,[c] Layal Massara,[b] Gabriel Linares,[a] Gwendaline Guidicelli, PharmD, PhD,[a] Elodie Blanchard, MD,[c] Marie Parrens, MD, PhD,[d,e] Hugues Begueret, MD,[d] Claire Dromer, MD,[c] and Jean-Luc Taupin, PharmD, PhD[a,b]

From the [a]Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France; [b]Unité Mixte de Recherche 5164, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Bordeaux, Talence, France; [c]Service des Maladies Respiratoires, Hôpital Haut-Lévêque, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Pessac, France; [d]Laboratoire de Biologie et Pathologie des Tumeurs, Hôpital Haut-Lévêque, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Pessac, France; and the [e]Département de Pathologie, A2406, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

KEYWORDS:
HLA antibodies;
lung transplant;
single-antigen flow beads;
biopsy;
antibody-mediated rejection

BACKGROUND: The effect of donor-specific anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies (DSAs) on graft survival is recognized in lung transplantation, but not all serum DSAs appear to be harmful. We wondered whether in situ DSA detection from graft biopsy specimens could help in identifying lung transplant recipients (LTRs) at higher risk for graft loss.
METHODS: Class I and II HLA antibody single-antigen flow bead assays were performed in 53 LTRs to identify immunoglobulin G DSA in biopsy specimen eluates and in sera and to evaluate C1q binding ability of DSA in sera. Intragraft DSAs (gDSAs) were correlated with serum DSAs (sDSAs), clinical and histologic data, and graft survival.
RESULTS: Twenty-eight (52.8%) LTRs had sDSAs, 12 (22.6%) had C1q-positive sDSAs, and 11 (20.8%) had gDSAs. Fifty sDSAs were found, among which 15 (30%) were C1q-positive and 14 (28%) were found in biopsy specimen eluates. One DSA was detected in the biopsy specimen only. Serum mean fluorescence intensity and biopsy fragment size were higher for sDSAs detected in biopsy specimens ($p = 0.003$ and $p = 0.02$, respectively). One-year post-biopsy graft survival was lower for LTRs with gDSAs ($p = 0.008$ by log-rank test). Presence of gDSA at the time of biopsy constituted a risk factor for graft loss in univariate (odds ratio, 6.67; 95% confidence interval [CI] 1.51–29.47; $p = 0.008$; hazard risk, 3.44; 95% CI, 1.47–8.01, $p = 0.005$) and multivariate (odds ratio, 5.85; 95% CI, 1.23–27.68; $p = 0.03$; hazard risk, 4.51; 95% CI, 1.83–11.13; $p = 0001$) analyses using logistic regression and a Cox proportional hazard model, respectively.
CONCLUSIONS: In lung transplantation, gDSA appears to be a valuable biomarker to identify pathogenic DSA and LTRs with a higher risk for graft loss.
J Heart Lung Transplant 2016;35:1418–1426
© 2016 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

Lung transplantation (LT) has benefited from advances in surgical techniques and immunosuppression strategies, but median survival remains limited compared with other solid-organ transplantations.[1] The main cause of graft loss is

See Related Editorial, page 1412

Reprint requests: Jean-Luc Taupin, PharmD, PhD, Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris cedex 10, France. Telephone: +33-1-42-49-49-35. Fax: +33-1-42-49-52-47.
E-mail address: jean-luc.taupin@aphp.fr

1053-2498/$ - see front matter © 2016 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2016.06.010

bronchiolitis obliterans syndrome (BOS),[1,2] which is associated with several risk factors, including acute cellular rejection, lymphocytic bronchitis, human leukocyte antigen (HLA) mismatches, community-acquired respiratory viral infections, primary graft dysfunction, and gastroesophageal reflux.[3–6]

Previous studies showed that development of HLA antibodies was also associated with BOS and even preceded its development.[7–10] This was further demonstrated using single-antigen flow beads (SAFB) assays, which greatly improved the resolution and the sensitivity of donor-specific antibodies (DSAs) detection.[11–16] However, detection of serum DSAs with SAFB has technical limitations, false-negative and false-positive results being, respectively, caused by complement interference[17–19] and by anti-HLA antibodies of an ill-defined pathogenic role recognizing denatured class I HLA molecules.[20–25]

The presence of DSAs is not synonymous with lung allograft injury.[26] The lack of a direct association may be a result of the inability of the DSA to bind to the graft because of the absence of expression of cognate HLA molecules or because of insufficient binding strength between a low-affinity DSA and its target. That circulating DSAs may not be detectable within the blood during episodes of antibody-mediated rejection (AMR) if the DSAs are trapped within the allograft, as also been suggested in kidney[27,28] and liver[29] transplantation. Another difficulty is that the histologic features of AMR in LT have not yet been accurately defined. The diagnosis of AMR therefore relies on the presence of allograft dysfunction, circulating DSAs, and pathologic findings, without clear evidence of a pathogenic interaction between the DSAs and the transplant.[30]

The SAFB assay has been adapted to the detection of C1q-binding HLA antibodies,[31] with promising results in kidney transplantation[32,33] but, to our knowledge, the use and interest of this new assay have not been studied in LT.

We reported in a previous study of kidney transplantation that in situ detection of DSAs was a severity marker for antibody-mediated pathogenic processes.[34] The aims of this study were therefore to evaluate whether intragraft DSAs (gDSAs) can be detected in LT biopsy specimens, to identify the factors associated with their presence and whether they could represent a risk factor for graft loss.

Methods

This study was approved by the Institutional Review Board and did not interfere with standard patient clinical management.

Patients and biopsies

In this retrospective single-center study, among the 252 LT recipients (LTRs) who received transplants locally from January 1999 to July 2014, we included the 53 LTRs for whom a frozen, non-fixed biopsy specimen and a serum sample obtained close to the day of the biopsy were available. Biopsies were performed for deterioration in clinical status or for routine surveillance. Formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy specimens were stained with hematoxylin and eosin for histologic review and classification according to the International Society for Heart and Lung Transplantation 2007 and 2013 reports.[35,36] Immunohistochemical C4d analysis was performed on deparaffinized sections. Continuous, linear, endothelial, and subendothelial C4d staining in capillaries was considered positive.

We collected available data on HLA sensitization status, graft conditions, immunosuppressive regimen, and graft functional status at 12 months after the biopsy and until August 2015. Recipient's death, replacement on the waiting list, or re-LT defined a graft loss. Except for cystic fibrosis patients, LTRs received an induction therapy with anti-thymocyte globulins and maintenance therapy associated cyclosporine, mycophenolate, and steroids. Tacrolimus replaced cyclosporine in case of BOS or refractory acute rejection. Everolimus was associated to the triple therapy in two cases: kidney dysfunction, to decrease the dose of calcineurin inhibitor, and for patients with BOS, insufficient improvement of respiratory function after calcineurin inhibitor switch. Azithromycin was introduced in case of BOS with airway neutrophilia without infectious manifestation.

Biopsy elution and anti-HLA antibody testing

We used frozen biopsy fragments initially devoted to histopathologic analysis. No sampling was specifically performed for this study. Graft biopsy specimens were processed according to the previously described protocol[34,37] using the Elukit II acid elution kit (Gamma Biologicals, Inc., Houston, TX). Their length, width, and thickness were measured. Anti-HLA class I and II antibodies were identified in serum and biopsy specimen eluates with the LabScreen LS1A04 and LS2A01 SAFB assays (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) on a Luminex 100 analyzer (Luminex, Austin, TX), according to the manufacturer's recommendations.

Sera were systematically treated with ethylenediamine tetraacetic acid to circumvent the complement interference phenomenon.[17–19] The C1q Screen assay (One Lambda) was performed when a serum DSA (sDSA) was detected. The positivity threshold for sDSAs was set at a normalized mean fluorescence intensity (MFI) of 500 for immunoglobulin G detection and 300 for C1q binding, using the baseline calculation mode on HLA Fusion software (One Lambda). For biopsy specimen eluates, the positivity threshold was set at a normalized MFI higher than the mean plus 5 standard deviations of the MFI obtained in the biopsy specimen eluate for the alleles not expressed by the donor that displayed a MFI below 500 in serum (i.e., against which the patient was considered not sensitized). When necessary, additional donor HLA typing (class I HLA-A, -B, -C and class II HLA-DR,-DR51/52/53, -DQ and -DP) was performed with high-resolution reverse sequence-specific oligonucleotide primed polymerase chain reaction (LabType, One Lambda) on frozen aliquots of cells collected at the time of LT.

Statistical analysis

Categoric variables are summarized as counts and percentages and median values with the range or interquartile range (IQR). The independent-samples Mann-Whitney U test and Fisher's exact test were used for group comparisons of continuous and categoric variables, respectively. The optimal threshold for MFI value was determined with receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. Kaplan-Meier analysis was used to construct graft survival curves. The log-rank test was used for comparisons. The variables potentially associated with 1-year post-biopsy survival underwent univariate and multivariate analysis, using a logistic regression model. A Cox proportional hazards analysis was used for univariate and multivariate analyses for overall graft survival. Multivariate analyses included variables that showed trends in univariate analysis (i.e., $p \leq 0.2$). Variables not independently

Table 1 Patient Characteristics at the Time of Transplantation

Variable[a]	Total	gDSA−	gDSA+	*p*-value[b]
Patients	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Recipient gender				0.18
Female	27 (51.0)	19 (45.2)	8 (72.7)	
Male	26 (49.0)	23 (54.8)	3 (27.3)	
Recipient age, years	48 (27–56)	47 (26–56)	45 (32–55)	0.78
Diagnosis				
Emphysema	19 (35.8)	16 (38.1)	3 (27.3)	0.73
Cystic fibrosis	18 (34.0)	15 (35.7)	3 (27.3)	0.73
Fibrosis	9 (16.0)	6 (14.3)	3 (27.3)	0.37
PAH	3 (5.7)	2 (4.8)	1 (9.1)	0.51
Other	4 (7.5)	3 (7.1)	1 (9.1)	1.00
Type of transplant				
Double lung	47 (88.7)	39 (92.9)	8 (72.7)	0.10
Single lung	3 (5.7)	2 (4.8)	1 (9.1)	0.51
Heart-lung	3 (5.7)	1 (2.4)	2 (18.2)	0.11
Donor age, years	41 (32–55)	42 (32–53)	41 (33 -60)	0.78
Extended criteria donor	34 (64.2)	28 (66.7)	6 (54.5)	0.50
Ischemic time, min	377 (301–427)	366 (295–420)	380 (360–459)	0.21
Induction therapy[c]	29 (54.7)	23 (54.8)	6 (54.5)	1.00
Early ACR (≤3 months)	23 (43.4)	20 (47.6)	3 (27.3)	0.31
HLA-A/B MM	3 (3–4)	4 (3–4)	3 (2–3)	0.07
HLA-DR/DQ MM	3 (2–4)	3 (2–4)	3 (2–4)	0.67
HLA A/B/DR/DQ MM	6 (5–7)	6 (5–7)	5 (5–7)	0.11
Pre-transplant HLA sensitization				
None	31 (58.5)	27 (64.3)	4 (36.4)	0.17
Anti-HLA	11 (20.8)	8 (19.0)	3 (24.3)	0.68
DSA	11 (20.8)	7 (16.7)	4 (36.4)	0.21
Positive CDCXM	0	0	0	NA
Positive FCXM	2 (3.8)	0	2 (18.2)	0.04
Cytomegalovirus status				
D+/R−	20 (37.7)	17 (40.5)	3 (27.3)	0.50
D+ or D−/R+	19 (35.8)	15 (35.7)	4 (36.4)	1.00
D−/R−	14 (26.4)	10 (23.8)	4 (36.4)	0.45

ACR, acute cellular rejection; CDCXM, complement dependent cytotoxicity crossmatch; D, donor; DSA, donor-specific antibodies; FCXM, flow cytometry crossmatch; gDSA, intragraft donor-specific antibodies; HLA, human leukocyte antigens; MM, mismatch; NA, not applicable; PAH, pulmonary arterial hypertension; R, recipient.

[a]Categoric variables are expressed as number (%) and continuous variables as median (interquartile range).

[b]Categoric variables were analyzed with the Fisher's exact test and continuous variables with the Mann-Whitney *U* test.

[c]Anti-thymocyte globulins.

predictive of graft survival were dropped using the backward elimination procedure. Results are reported as odds ratios (ORs) or hazard risk (HR) with a 95% confidence interval (CI) and corresponding *p*-value. A p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed with MedCalc software (Mariakerke, Belgium).

Results

Patient characteristics at LT and at biopsy

The study included 53 LTRs for whom serum and biopsy specimen eluates were tested with class I and II SAFB. At the time of biopsy, serum analysis showed that 4 LTRs were not sensitized, whereas 49 LTRs (92.5%) exhibited anti-HLA antibodies, with 6 (11.3%) only exhibiting anti-class I, 9 (17.0%) only anti-class II, and 34 (64.2%) anti-class I and anti-class II. At least 1 sDSA was present in 28 LTRs (52.8%), with 6 (21.4%) displaying only class I, 18 (64.3%) only class II, and 4 (14.3%) both class I and class II DSAs. Median sDSA number was 2 (range, 1–4) per patient. Among the 28 sDSA-positive (+) LTRs, 12 (42.9%) displayed at least 1 C1q+ sDSA.

Among the 53 LTRs, 11 (20.8%) displayed 1 or more gDSAs, 3 (27.3%) of them displaying only class I gDSAs and 8 (72.7%) only class II gDSAs, with a median of 1 gDSA (range 1–3) per patient. One LTR displayed a DSA in biopsy specimen eluate not found in the serum. Seven (63.6%) among the 11 sDSA+/gDSA+ LTRs displayed at least one C1q+ sDSA.

At the time of LT, there was no difference in demographic or clinical characteristics between LTRs who would become gDSA+ or gDSA-negative (–) (for these latter, sDSA+/gDSA− and sDSA−/gDSA− LTRs being pooled) at the time of biopsy (Table 1). The only difference at the time of biopsy was that gDSA+ patients more frequently displayed acute decline of graft function

Table 2 Patient Characteristics and Histology at the Time of Biopsy

Variable[a]	Total	gDSA−	gDSA+	*p*-value[b]
Patients	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Recipient age, years	50 (31–58)	49 (29–58)	52 (34–58)	0.83
Time from transplantation, days	507 (75–1128)	281(80–1102)	554 (135–1119)	0.90
Early biopsies (≤3 months from transplantation)	16 (30.2)	13 (31.0)	3 (27.3)	1.00
Acute decline of graft function[c]	24 (64.9)	16 (55.2)	8 (100)	0.03
Type of biopsy				0.30
Surgical	20 (37.7)	14 (33.3)	6 (54.5)	
Transbronchial	33 (62.3)	28 (66.7)	5 (45.5)	
Biopsy indication				
Respiratory function decline	27 (50.9)	21 (50.0)	6 (54.5)	1.00
Acute respiratory distress syndrome	10 (18.9)	7 (16.7)	3 (27.3)	0.42
Dyspnea	7 (13.2)	7 (16.7)	0	1.00
Protocol biopsy	8 (15.1)	6 (14.3)	2 (18.2)	0.67
Radiologic	1 (1.9)	1 (2.4)	0	1.00
Serum sample to biopsy,[d] days	3 (2–13)	6 (1–13)	3 (2–19)	0.72
Treatment[e]				
Cyclosporine	36 (67.9)	28 (66.7)	8 (72.7)	1.00
Tacrolimus	17 (32.1)	14 (33.3)	3 (27.3)	1.00
Everolimus	7 (13.2)	6 (14.3)	1 (9.1)	1.00
Azithromycin	29 (54.7)	23 (54.8)	6 (54.5)	1.00
Histologic findings				
Diffuse alveolar damages	5 (9.4)	4 (9.5)	1 (9.1)	1.00
Acute cellular rejection	10 (19.9)	7 (16.7)	3 (27.3)	0.42
High grade (≥A3)	1 (1.9)	1 (2.4)	0	1.00
Recurrent (any A grade)	4 (7.5)	4 (9.5)	0	0.57
Neutrophilic capillaritis	0	0	0	NA
Obliterative bronchiolitis	10 (18.9)	6 (14.3)	4 (36.4)	0.19
C4d deposition[f]	3 (6.4)	2 (5.3)	1 (11.1)	0.48
High-grade lymphocytic bronchiolitis (B2R)	7 (13.2)	5 (11.9)	2 (18.2)	0.63
Infectious disease	12 (22.6)	9 (21.4)	3 (27.3)	0.70
Normal biopsy specimen	20 (37.7)	19 (45.2)	1 (9.1)	0.04
Thrombosis	1 (1.9)	1 (2.4)	0	1.00

gDSA, intragraft donor-specific antibodies.
[a]Categoric data are expressed as number (%) and continuous data as median (interquartile range)
[b]Categoric variables were analyzed with the Fisher's exact test and continuous variables with the Mann-Whitney *U* test.
[c]Among recipients whose biopsy occurred more than 3 months after transplantation.
[d]Absolute value.
[e]Treatment associated cyclosporine or tacrolimus plus mycophenolate acid and corticosteroids, with or without everolimus and/or azithromycin.
[f]C4d staining was performed for 47 of 53 specimens from 38 gDSA− and 9 gDSA+ recipients.

(Table 2). Median time between serum and biopsy sampling was similar between gDSA− (0 day; IQR, 0–42 days) and gDSA+ (7 days; IQR, 0–83 days) LTRs ($p = 0.54$). Histologic findings at time of biopsy evidenced a higher proportion of normal biopsy specimens for gDSA− LTRs (Table 2). Allograft function at the time of biopsy was similar between gDSA+ and gDSA− LTRs (Table 3).

Characteristics of sDSAs and gDSAs

Among the 50 sDSAs that were found, 14 (28%) were class I (6 HLA-A, 2 HLA-B, 6 HLA-C) with a median MFI of 1,095 (IQR, 652–3,366), and 36 (72%) were class II (8 HLA-DR, 18 HLA-DQB1, 6 HLA-DQA1, 4 HLA-DP) with a median MFI of 3,662 (IQR, 1,590–9,113; $p = 0.004$ for class I vs class II; Figure 1A). Among the sDSA, 15 (30%) were C1q+, all in class II (1 HLA-DR, 10 HLA-DQB1, 4 HLA-DQA1), with a median immunoglobulin G SAFB MFI of 8,819 (IQR 4,528–19,237), which was significantly higher than for the C1q− sDSA (median MFI, 1,456; IQR, 834–3,393; $p < 0.0001$ for C1q+ vs C1q−).

Fourteen (28%) of the 50 sDSA were found in biopsy specimen eluates (s+/g+ DSA) and 1 DSA was in a biopsy specimen only (s−/g+ DSA). These 15 gDSAs constituted the gDSA group, composed of 4 (26.7%) class I (2 HLA-A, 1 HLA-B, and 1 HLA-C) and 11 (73.3%) class II (1 HLA-DR, 7 HLA-DQB1, 3 HLA-DQA1). The median MFI of the sDSAs was 1,804 (IQR, 940–3,720) for those not found in biopsy specimens and was 10,383 (IQR 3,707–19,237) for those found in biopsy specimens ($p = 0.003$ for gDSA+ vs gDSA−; Figure 1B). We used a ROC curve analysis to define the optimal sDSA MFI threshold allowing the gDSA+ status to be predicted. The area under curve was 0.765 ($p = 0.007$) and the optimal threshold was 6,515 (confidence interval, 3,249–9,407), offering 66.7% sensitivity and 91.7% specificity, and 8 and 0.36 positive and negative likelihood ratios,

Table 3 Allograft Function at the Day of Biopsy

Variable	Total No. (%)	gDSA− No. (%)	gDSA+ No. (%)	*p*-value[a]
Patients	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Allograft function at biopsy				
BOS 0	8 (15.1)	7 (13.2)	1 (9.1)	1.00
BOS 0p	6 (11.3)	4 (7.5)	2 (18.2)	0.59
BOS 1	6 (11.3)	6 (11.3)	0	0.32
BOS 2	11 (20.8)	6 (11.3)	5 (45.5)	0.04
BOS 3	9 (17.0)	9 (17.0)	0	0.18
BOS	26 (49.1)	21 (50)	5 (45.5)	1.00
High-grade BOS (≥2)	20 (37.7)	15 (35.7)	5 (45.5)	0.73
ND	13 (24.5)	10 (18.9)	3 (27.3)	1.00

BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; gDSA, intragraft donor-specific antibodies; ND, not determinable because of recipient intubation.
[a]Fisher's exact test.

respectively. The size of the eluted fragment was higher for the gDSA+ (median, 8.5 mm^3; IQR 4.9–11.3 mm^3) than for the gDSA− (median, 5.8 mm^3; IQR 1.7–6.4 mm^3) biopsy specimens ($p = 0.02$). Relations between sDSA MFI, biopsy fragment size, and gDSA status are presented in Figure 1C. Of note, C1q+ sDSAs and gDSAs constituted overlapping but not identical groups because 7 of 15 C1q+ sDSAs were not found in biopsy specimen eluates and 7 of 15 gDSAs did not bind C1q in serum.

DSA status and post-biopsy outcomes

At 1 year after biopsy, 20 LTRs (37.7%) had lost their graft at a median of 92 days (IQR, 20–231 days). Graft survival was comparable between the sDSA− LTRs and the sDSA+ LTRs, whichever their gDSA status was (Figure 2A). In contrast, graft survival was lower for the gDSA+ LTRs than for the gDSA− and the sDSA− LTRs (Figure 2B and C). Identical findings were observed after censoring LTRs who survived with their graft less than 3 months after the biopsy (Figure 2D–F). At the time of the biopsy, univariate and multivariate analyses showed that the presence of gDSAs and infection were the only risk factors for graft loss (Table 4). During the first year post-biopsy, the only difference between gDSA− and gDSA+ LTRs in immunosuppression or infection was that gDSA+ LTRs were more frequently treated for humoral rejection than sDSA+/gDSA− LTRs (Table 5). The median of total post-biopsy follow-up was 391 days (IQR, 214–434 days), and 25 (47.2%) recipients lost their graft at a median of 212 days post-biopsy (IQR, 44–358 days).

We used a Cox proportional hazards model to analyze several parameters at the time of biopsy. Only the presence of gDSA and infection at the time of biopsy were associated with an increased risk for graft loss (Table 4). There was no difference in cause of graft loss (Table 6) or allograft dysfunction at the end of follow-up between gDSA+ and gDSA− LTRs (data not shown).

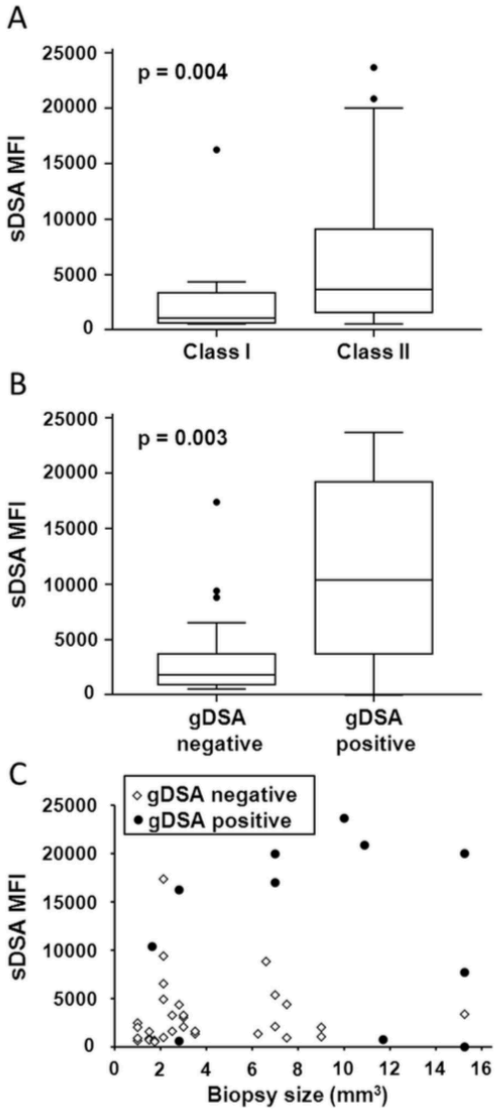


Figure 1 Characteristics of donor-specific antibodies (DSAs) detected in serum and in biopsy specimen eluates with single-antigen flow beads. (A) Serum DSA (sDSA) mean fluorescence intensity (MFI) of class I and II DSAs and (B) sDSA MFI detected or not in intragraft DSA (gDSA) biopsy specimen eluates. The horizontal line in the middle of each box indicates the median, the top and bottom borders of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively, the whiskers encompass the range, and the outliers are represented as black circles. MFI results were compared using the Mann-Whitney *U* test. (C) Link between serum MFI, biopsy fragment size, and gDSA positivity.

Discussion

We report that DSAs can be identified in eluates from LT biopsy specimens. Anti-DQ DSAs were the most frequently identified as sDSAs and also as gDSAs. Their role has been less studied than that of anti-class I and anti-DR DSAs

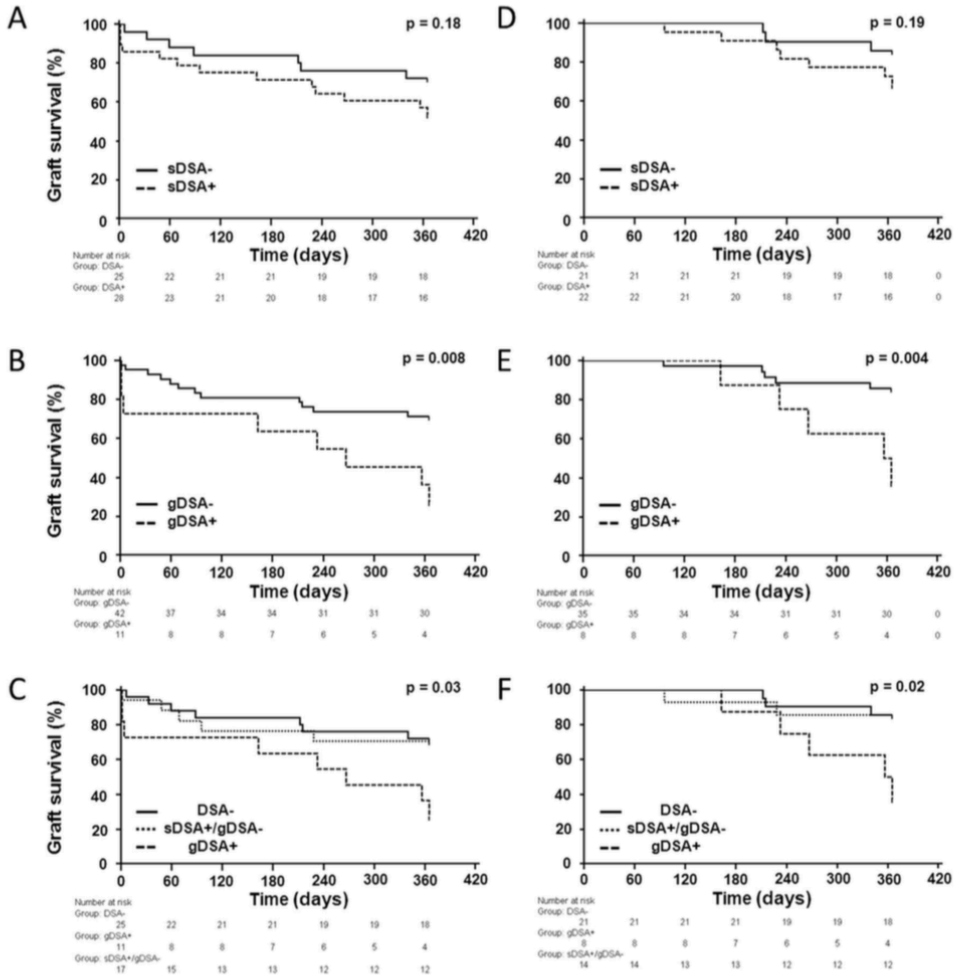


Figure 2 One-year post-biopsy graft survival according to donor-specific antibodies (DSAs) status. (A) Comparison of graft survival between recipients with or without DSAs, with those having intragraft DSA (gDSA) or serum (sDSA) not detected in biopsy specimen eluates being pooled. (B) Comparison of graft survival between recipients with or without gDSAs, with those having sDSA not detected in biopsy eluates and those with no DSA being pooled. (C) Comparison of graft survival between recipients having gDSAs, sDSAs not detected in biopsy eluates, and no DSAs. Panels D, E, and F represent the same analysis as in A, B, and C, respectively, after exclusion of recipients who survived less than 3 months after the biopsy. Graft survival was compared using the log-rank test.

because of the difficulties in identifying anti-DQ DSAs before the use of SAFB. Moreover, expression of HLA-DQ by the graft has been scarcely studied. It is noteworthy that the assignment of the DQ antigenic specificities has traditionally relied on the β-chain only, ignoring the possible contribution of the α-chain and potentially underestimating its importance. Nowadays, thanks to a more accurate evaluation, the highly pathogenic role of HLA-DQ DSA is increasingly reported for LT as well as for other solid-organ transplantations.[38–40] Our results strongly support these findings by showing that they can be found in biopsy specimen eluates (i.e., are able to interact with donor HLA-DQ molecules expressed by the lung allograft).

The prevalence of gDSAs was lower than that of s+/g– DSAs, which could reflect an insufficient sensitivity of the biopsy elution assay. Indeed, s+/g+ DSA had higher serum MFI values than s+/g– DSA, and were preferentially, but not systematically, detected in eluates from larger biopsy specimen fragments. This indicated that we might have missed sDSAs bound to the donor tissue when the amount and/or strength of the sDSAs were too low and/or when the specimen fragment was too small.[41] Nevertheless, we could detect several sDSAs of very low MFI in small biopsy specimens, whereas others with higher MFI were not retrieved in situ, despite tissue fragments of substantially bigger size. In line with this, the serum MFI threshold calculated with ROC curve analysis to predict the presence of gDSAs offered quite weak sensitivity and positive likelihood ratio. Moreover, for 1 LTR we were able to detect 1 gDSA, which was not retrieved in serum,

Table 4 Univariate and Multivariate Analysis of Risk Factors at Time of Biopsy Associated With Graft Loss at 1-Year Post-Biopsy (Logistic Regression) and Overall Graft Loss (Cox Proportional Hazards Model

	Graft loss at 1-year post-biopsy				Overall graft loss			
	Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
Variable	OR (95% CI)	*p*-value	OR (95% CI)	*p*-value	HR (95% CI)	*p*-value	HR (95% CI)	*p*-value
ARDS	1.04 (0.29–3.78)	0.95					1.39 (0.58–3.33)	0.46
Acute rejection	1.87 (0.47–7.49)	0.38			1.35 (0.58–3.29)	0.50		
Infection	3.02 (0.80–11.32)	0.10	5.65 (1.13–28.21)	0.03	2.62 (1.12–6.18)	0.03	3.67 (1.45–9.27)	0.006
BOS	1.06 (0.35–3.34)	0.91			0.88 (0.39–1.98)	0.76		
Severe BOS	2.30 (0.73–7.25)	0.15	3.39 (0.85–13.54)	0.08	1.43 (0.64–3.20)	0.39		
DSAs	2.23 (0.71–7.01)	0.16[a]			1.65 (0.73–3.74)	0.22		
C1q+ DSAs	1.93 (0.52—7.10)	0.32			1.65 (0.68—3.97)	0.29		
GDSAs	6.67 (1.51–29.47)	0.008	5.85 (1.23–27.68)	0.03	3.44 (1.47–8.01)	0.005	4.51 (1.83–11.13)	0.001

ARDS, acute respiratory distress syndrome; BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; CI, confidence interval; DSA, donor-specific antibodies; gDSAs: intragraft donor-specific antibodies; HR, hazard risk; OR, odds ratio.

[a]No odds ratio value in the multivariate analysis because of an exclusion from the model during the backward elimination procedure.

suggesting that the DSAs were completely trapped within the allograft.[27,28] Therefore the search for gDSAs would greatly benefit from disposing of larger tissue fragments to ascertain that a negative result is a proof of absence of DSAs in situ.

In our cohort, post-biopsy survival was lower in gDSA+ LTRs than in LTRs with sDSA only, without DSAs, or without anti-HLA antibodies. No difference was observed between sDSA+ and sDSA– LTRs. These findings were confirmed in a multivariate analysis showing that the presence of gDSA but not of sDSA was an independent risk factor for graft loss.

Then, besides the technical considerations discussed above, the clinical management of LTRs could also benefit from gDSA detection. Indeed, although almost all the gDSAs were also sDSAs, detection of a gDSA confirms that the sDSA is able to interact with the allograft and to exert pathogenic effects. However, sDSAs not detectable in situ could have an affinity/avidity and/or be produced at a concentration that is not adequate, or could target antigens not expressed high enough locally. Interestingly, more than half of gDSA+ recipients were diagnosed as having acute cellular rejection, infectious disease, or a normal specimen, but not acute or chronic AMR. In these cases, prospectively identifying gDSAs could help refine the diagnosis and more precisely guide recipient management.

We observed that the C1q+ sDSA and gDSA populations were overlapping but not identical, and that the presence of C1q+ sDSAs was not associated with a higher risk for graft loss. However, complement activation is only one of the possible effector mechanisms for a DSA, and we recently showed that non–complement-binding DSAs are indeed harmful.[42] The ability of the DSA to bind to the graft could therefore provide more valuable information than its ability to bind C1q on SAFB.

Another approach for evaluating AMR in LT could be the search for DSAs in bronchoalveolar lavage fluids. However, this could be less sensitive and might not bring the same information as biopsy elution through detection of DSAs unable to strongly interact with the graft.

Our study has several limitations. It is a single-center, retrospective, and non-randomized study of a rather small LTRs cohort, and the comparison of LTRs characteristics at the time of LT or biopsy could have been underpowered, not

Table 5 Treatment Modifications and Infections During the First Year Post-Biopsy

Variable	Total No. (%)	gDSA– No. (%)	gDSA+ No. (%)	*p*-value[a]
Patients	53 (100)	42 (79.2)	11 (20.8)	
Corticosteroid bolus	20 (37.7)	15 (35.7)	5 (45.5)	0.73
Thymoglobulins	7 (13.2)	5 (11.9)	2 (18.2)	0.63
Tacrolimus switch[b]	18 (34.0)	13 (31.0)	5 (45.5)	0.48
Everolimus introduction	15 (28.3)	11 (26.2)	4 (36.4)	0.71
Azithromycin introduction	11 (20.8)	9 (21.4)	2 (18.2)	1.00
IVIg + rituximab +/– PE[c]	14 (50.0)	5 (29.4)	9 (81.8)	0.018
Bacterial infection after biopsy	38 (71.7)	29 (69.0)	9 (81.8)	0.48

gDSA, intragraft donor-specific antibodies.

[a]Values were analyzed with the Fisher's exact test.

[b]Substitution of cyclosporine by tacrolimus.

[c]Intravenous immunoglobulin (IVIg) + rituximab +/– plasma exchange (PE), comparison of recipients with serum donor-specific antibodies only.

Table 6 Cause of Graft Loss for Patients With and Without Intragraft Donor-Specific Antibodies

Variable	Total No. (%)	gDSA− No. (%)	gDSA+ No. (%)	*p*-value[a]
Patients	25 (100)	16 (64.0)	9 (36.0)	
Cause of graft loss				
BOS	14 (56.0)	9 (56.3)	5 (55.6)	1.00
ACR	1 (4.0)	1 (6.3)	0	1.00
Infection	7 (28.0)	4 (25.0)	3 (33.3)	0.67
Other	3 (12.0)	2 (12.5)	1 (11.1)	1.00

ACR, acute cellular rejection, BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; gDSA, intragraft donor-specific antibodies.
[a]Fisher's exact test.

precluding that some risk factors for the presence of gDSAs might exist.[38] Lung graft function deterioration was often at an advanced stage at the time of the biopsy, because nearly 40% of recipients already had severe BOS. Therefore, our findings cannot be used for estimating the role of gDSAs in the early phase of AMR. Moreover, we did not observe a decreased post-biopsy graft survival for sDSA+ LTRs compared with LTRs without sDSAs or anti-HLA antibodies. This was in disagreement with reports from the recent literature[11–13,15,16] and could be explained by a short follow-up after the biopsy that did not allow graft loss caused by chronic AMR to be observed.

In conclusion, by showing that the presence of gDSAs was associated with graft loss, we highlight the interest of searching DSAs in biopsy specimen eluates. This work paves the way for further prospective investigations in larger cohorts to analyze whether gDSAs could represent a valuable biomarker of AMR in a field where other approaches, such as histopathology, are frequently unhelpful.

Disclosure statement

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript or other conflicts of interest to disclose.

The authors thank Dr Nuala Mooney (INSERM U1160) for critically reading the revised version of the manuscript.

This work has benefited from the financial help of the French Agence de la Biomédecine, via the 2014 and 2015 call-for-proposals. The funder had no role in work design and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Yusen RD, Christie JD, Edwards LB, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirtieth adult lung and heart-lung transplant report—2013; focus theme: age. J Heart Lung Transplant 2013;32:965-78.
2. Finlen Copeland CA, Snyder LD, et al. Survival after bronchiolitis obliterans syndrome among bilateral lung transplant recipients. Am J Respir Crit Care Med 2010;182:784-9.
3. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. J Heart Lung Transplant 2002;21:297-310.
4. Khalifah AP, Hachem RR, Chakinala MM, et al. Respiratory viral infections are a distinct risk for bronchiolitis obliterans syndrome and death. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:181-7.
5. Daud SA, Yusen RD, Meyers BF, et al. Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:507-13.
6. D'Ovidio F, Mura M, Tsang M, et al. Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 2005;129:1144-52.
7. Jaramillo A, Smith MA, Phelan D, et al. Development of ELISA-detected anti-HLA antibodies precedes the development of bronchiolitis obliterans syndrome and correlates with progressive decline in pulmonary function after lung transplantation. Transplantation 1999;67:1155-61.
8. Sundaresan S, Mohanakumar T, Smith MA, et al. HLA-A locus mismatches and development of antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. Transplantation 1998;65:648-53.
9. Girnita AL, McCurry KR, Iacono AT, et al. HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent-recurrent lung allograft acute rejection. J Heart Lung Transplant 2004;23:1135-41.
10. Palmer SM, Davis RD, Hadjiliadis D, et al. Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. Transplantation 2002;74:799-804.
11. Morrell MR, Pilewski JM, Gries CJ, et al. De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2014;33:1288-94.
12. Safavi S, Robinson DR, Soresi S, Carby M, Smith JD. De novo donor HLA-specific antibodies predict development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2014;33:1273-81.
13. Ius F, Sommer W, Tudorache I, et al. Early donor-specific antibodies in lung transplantation: risk factors and impact on survival. J Heart Lung Transplant 2014;33:1255-63.
14. Smith JD, Ibrahim MW, Newell H, et al. Pre-transplant donor HLA-specific antibodies: characteristics causing detrimental effects on survival after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2014;33:1074-82.
15. Witt CA, Gaut JP, Yusen RD, et al. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2013;32:1034-40.
16. Kim M, Townsend KR, Wood IG, et al. Impact of pretransplant anti-HLA antibodies on outcomes in lung transplant candidates. Am J Respir Crit Care Med 2014;189:1234-9.
17. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. Transplantation 2011;92:510-515.
18. Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. Transpl Immunol 2013;29:17-21.
19. Visentin J, Vigata M, Daburon S, et al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. Transplantation 2014;98:625-31.
20. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberu J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. Transplantation 2008;86:1111-1115.
21. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. Hum Immunol 2009;70:844-53.
22. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, et al. The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. Clin Exp Immunol 2013;173:536-43.

23. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, et al. Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. Transplantation 2014;98:738-44.
24. Visentin J, Marroc M, Guidicelli G, et al. Clinical impact of preformed donor-specific denatured class I HLA antibodies after kidney transplantation. Clin Transplant 2015;29:393-402.
25. Visentin J, Guidicelli G, Moreau JF, Lee JH, Taupin JL. Deciphering allogeneic antibody response against native and denatured HLA epitopes in organ transplantation. Eur J Immunol 2015;45:2111-21.
26. Glanville AR. Antibody-mediated rejection in lung transplantation: myth or reality? J Heart Lung Transplant 2010;29:395-400.
27. Del Bello A, Congy N, Sallusto F, et al. Anti-human leukocyte antigen immunization after early allograft nephrectomy. Transplantation 2012; 93:936-41.
28. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Sallusto F, et al. Donor-specific antibodies after ceasing immunosuppressive therapy, with or without an allograft nephrectomy. Clin J Am Soc Nephrol 2012;7:1310-9.
29. Neau-Cransac M, Le Bail B, Guidicelli G, et al. Evolution of serum and intra-graft donor-specific anti-HLA antibodies in a patient with two consecutive liver transplantations. Transpl Immunol 2015;33:58-62.
30. Westall GP, Snell GI. Antibody-mediated rejection in lung transplantation: fable, spin, or fact? Transplantation 2014;98:927-30.
31. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. Hum Immunol 2011;72:849-58.
32. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. N Engl J Med 2013; 369:1215-26.
33. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. Kidney Int 2016;89:209-16.
34. Bachelet T, Couzi L, Lepreux S, et al. Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome. Am J Transplant 2013;13:2855-64.
35. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, et al. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. J Heart Lung Transplant 2007;26:1229-42.
36. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, et al. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. J Heart Lung Transplant 2013;32:1147-62.
37. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rifle G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. Transplantation 2003;76:395-400.
38. Lobo LJ, Aris RM, Schmitz J, Neuringer IP. Donor-specific antibodies are associated with antibody-mediated rejection, acute cellular rejection, bronchiolitis obliterans syndrome, and cystic fibrosis after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2013;32:70-7.
39. Smith JD, Banner NR, Hamour IM, et al. De novo donor HLA-specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival. Am J Transplant 2011;11:312-9.
40. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. Transplantation 2012;94:172-7.
41. Martin L, Guignier F, Bocrie O, et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. Transplantation 2005; 79:1459-61.
42. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, et al. Non-complement-binding de novo donor-specific anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. J Am Soc Nephrol 2015;27:615-25.

Curriculum vitae

MASSARA layal
Tel : 0620033871
Mail : layalmassara@gmail.com

Diplômes

- 2014-2018 Doctorat en biologie-santé, Université de Bordeaux
- 2013-2014 : Master 2 - Mention biologie, santé, écologie - Spécialité physiologie, neurophysiologie biologie cellulaires et moléculaires - Université de Poitiers (FRANCE)
- 2012-2013 : Master 1 Sciences, technologies, santé - Mention biologie, santé, écologie - Spécialité biologie, physiologie, pathologie cellulaires et moléculaires - Université de Poitiers (FRANCE)
- 2009-2012 : Licence de Biologie - Spécialité immunologie, biologie cellulaire et moléculaire –Université Libanaise (LIBAN)
- 2009 : Baccalauréat Scientifique libanais

Expériences-Connaissances pratiques

2012-2013: Stage de M1 « **Contribution à l'étude de l'implication des gouttelettes lipidiques dans l'autophagie. » Laboratoires de génétique – ABG- Université De Poitiers**

- ✓ Microscopie confocale
- ✓ Culture bactérienne et levures
- ✓ Mini-préparation d'ADN plasmidique
- ✓ Transformation des levures avec des plasmides
- ✓ Extraction et analyse de lipides

2013-2014 : Stage de M2 « **Lung and heart Intragraft Donor-Specific Antibodies (DSA) as Determinant of Antibody Mediated Lesions. » CNRS UMR 5164 CIRID Université de Bordeaux II**

- ✓ Cytométrie en flux (Canto et Canto II)
- ✓ Typage de HLA chez les patients par la technique Luminex
- ✓ Culture cellulaire: isolement de cellules du sang, culture de lignées tumorales, cellules primaires, tissus, humains et murins
- ✓ Elution des DSA des greffes de cœur et de poumons
- ✓ Western blot

2014-2018 : Thèse « **Caractérisation des signaux de stress cellulaires reconnus par les lymphocytes T gamma-delta. » (Soutenance prévue Octobre 2018)**

- ✓ Expérimentation animale (souris) : modèle de métastase tumorale, mesure de luminescence sur souris vivante (Photoimageur)

- ✓ Culture cellulaire : isolement et culture de cellules à partir du sang et des organes, tests de cytotoxicité, mesure de la prolifération et de l'adhérence cellulaire en temps réel (technique Xcelligence), étude du cycle cellulaire par cytométrie.
- ✓ Cytométrie en flux : analyse et tri cellulaire (Fortessa, Aria)
- ✓ Amplification et titration de virus (CMV, Adénovirus)
- ✓ Immunohistochimie, immunofluorescence
- ✓ ELISA
- ✓ Biologie moléculaire : qPCR

Maîtrise d'outils informatiques : logiciels Word, Excel, PowerPoint, Publisher, Access, Création de sites Internet (outlook Internet), Photoshop, Endnote, Diva, FlowJo , imageJ et Graphpad prism 6.

Pédagogie et Communication

- 2016 : 20 h d'enseignements de biologie cellulaire niveaux L2 et M2. Université de Bordeaux
- 2017 : Participation à l'élaboration du module MOOC de la formation « intégrité scientifique » (Bordeaux)
- 2017 : Participation au concours ma thèse en 180 secondes (Bordeaux)

Publication et Congrès

- ***"LUNG INTRAGRAFT DONOR-SPECIFIC ANTIBODIES AS A RISK FACTOR FOR GRAFT LOSS"*** Authors: Jonathan VISENTIN, Albane CHARTIER, Layal MASSARA, Gabriel LINARES, Gwendaline GUIDICELLI, Elodie BLANCHARD, Marie PARRENS, Claire DROMER and Jean-Luc TAUPIN. The journal of Heart and Lung transplantation, 2016, Volume 35 , Issue 12 , 1418 – 1426.
- **"Impact of HCMV on native and modified HLA-I and consequences on gamma delta T cells activation"**
  Authors: Layal MASSARA, Romain MARLIN, Vincent PITARD, Jonathan VISENTIN, Gavin WILKINSON, Ceri FIELDINGS, Julie DÉCHANET-MERVILLE, 2016, poster à la journée FR TransBioMed (Bordeaux).
- **"Impact of HCMV on native and modified HLA-I and consequences on gamma delta T cells activation"**
  Authors: Layal MASSARA, Romain MARLIN, Vincent PITARD, Jonathan VISENTIN, Gavin WILKINSON, Ceri FIELDINGS, Julie DÉCHANET-MERVILLE, 2017, presentation orale a la journée FR transbiomed (Bordeaux)
- **"Impact of HCMV on native and modified HLA-I and consequences on gamma delta T cells activation"**
  Authors: Layal MASSARA, Romain MARLIN, Vincent PITARD, Jonathan VISENTIN, Gavin WILKINSON, Ceri FIELDINGS, Julie DÉCHANET-MERVILLE, 2017, poster au congres international du CMV (Amesterdam)
- **"Anti-tumor activity of murine cytomegalovirus on human tumor cells"**
  Authors: Layal MASSARA, Camille KHAIRALLAH, Benoit ROUSSEAU, Julien IZOTTE, Xavier GAUTHEREAU, Alban GIEZE , Julie DECHANET-MERVILLE, Myriam CAPONE, 2017, presentation orale aux journées du canceropole (GSO, Poitiers)

- **"The mechanisms developed by Cytomegalovirus to escape from ab T cells activate γδ T cells"**
  Authors: Layal MASSARA, Ceri FIELDINGS, Vincent PITARD, Annaelle Stum, Jonathan VISENTIN, Gavin WILKINSON, Julie DÉCHANET-MERVILLE, 2017 Congres γδ 2018**. Prix AAI young researcher, Prix Fr transbiomed**

Expérience sociale

- 2013 : Membre de l'association Picta-cèdres – Poitiers (pour l'intégration des étudiants étrangers)
- 2013 : Agent d'accueil CROUS - Poitiers
- 2013 : Membre de l'association Méli-mélo-Poitiers (Rencontres internationales)
- 2014 : Membre de l'association génération en Bio-santé AGBS – Poitiers (étudiants en master de biologie et santé)
- 2015 : membre de l'association AquiDoc, l'association TBM's Doc et de l'association 2D2B (doctorants de Bordeaux)
- 2015 : Présidente du conseil de résidence Village 1 CROUS - Bordeaux
- 2017 : Membre de la Commission Recherche (Université de Bordeaux)
- 2017 : Participations à la nuit des chercheurs et au village des sciences (Cap Sciences, Bordeaux)
- 2018 : Présidente et fondatrice de l'association des Libanais à Bordeaux AquiCèdre

Langues

- Français : écrit, lu et parlé (C2)
- Anglais : écrit, lu et parlé (Toeffel)
- Arabe : langue maternelle (C2)
- Allemand : notions (A0)

Loisirs

- Lecture de romans.
- Photographie.
- Badminton, natation.