



**HAL**  
open science

# Modalité d'activation antigénique des lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ humains : rôle des butyrophilines BTN3A et BTN2A1

Chirine Rafia

► **To cite this version:**

Chirine Rafia. Modalité d'activation antigénique des lymphocytes T  $V\gamma 9V\delta 2$  humains : rôle des butyrophilines BTN3A et BTN2A1. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1008 . tel-03872048

**HAL Id: tel-03872048**

**<https://theses.hal.science/tel-03872048>**

Submitted on 25 Nov 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.

# THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Immunologie

Par

**Chirine RAFIA**

## **Modalité d'activation antigénique des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 humains : rôle des butyrophilines BTN3A et BTN2A1**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 06 Septembre 2022

Unité de recherche : CRCI<sup>2</sup>NA, INSERM UMR 1307

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Emmanuel DONNADIEU

Directeur de recherche, Institut Cochin, Paris

Virginie LAFONT

Chargée de recherche, IRCM – Inserm UMR 1194, Montpellier

### **Composition du Jury :**

Président : Emmanuel DONNADIEU

Directeur de recherche, Institut Cochin, Paris

Examineur : Aude De GASSART

Chargée de recherche – ImCheck Therapeutics, Marseille

Invité : Steven NEDELLEC

Ingénieur d'étude – plateforme MicroPicell, Nantes

Dir. de thèse : Emmanuel SCOTET

Directeur de recherche, CRCI<sup>2</sup>NA – Inserm UMR 1307, Nantes

À mon grand-père,  
pour tout. Tu me manques.



# REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury et en particulier les Docteurs Lafont V. et Donnadiou E. pour leur travail de rapporteurs de ce travail de thèse, et le docteur Nedellec S. pour avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je suis honorée que vous ayez accepté de juger ce travail et je vous remercie pour le temps que vous y avez consacré.

A Emmanuel Scotet ; merci Chef pour ta confiance depuis mon stage de M1 et pour m'avoir proposé cette thèse. Je te remercie sincèrement pour ton soutien et pour avoir cru dès le départ dans cette collaboration avec Oxford et avoir tout fait pour la facilité, ce fut une superbe expérience.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe 12 pour leurs accueils et la bonne humeur qui règne chaque jour au labo. Plus particulièrement Laetitia et Xavier, merci pour m'avoir fait confiance et proposer de donner des cours, j'ai beaucoup aimé cette expérience ! Merci aussi à Christelle pour les discussions toujours intéressantes, à Marie-Claire pour ton aide en biomol et Jocelyn pour ta bonne humeur, et tous les autres pour les innombrables discussions, conseils et fou-rires. Morgane ne t'inquiète pas, tu es très bien partie et je suis sûre que tu vas faire une superbe thèse ! Cette équipe vivante est toujours animée de discussions (plus ou moins sérieuses) et ce fut un réel plaisir d'en faire partie.

Je tiens à remercier aussi M. Dustin pour son accueil au sein de son équipe lors de mes visites à Oxford, et surtout James et Elke pour tout le temps qu'ils m'ont accordés.

Merci à ImCheck Therapeutics pour cette thèse Cifre riche en émotions.

A la plateforme MicroPicell, merci de m'avoir formé à ce monde à part qu'est la microscopie. Philippe et Steven, merci pour toutes les discussions, pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes éternelles questions, pour les potins et autres, c'était toujours un plaisir de monter vous voir !

Un grand merci à Noémie, Lola et Laura ; ce module de filles qui a su rythmer mes stages et le début de ma thèse de tant de fou-rires et discussions ! J'espère que l'on continuera de rester en contact encore longtemps (Lola je ne te laisse pas vraiment le choix puisque je te rejoins à Stockholm).

Je remercie aussi les membres du bureau de Nan'Thèse, notamment les cofondateurs avec qui j'ai passé le plus de temps. J'ai découvert le monde associatif avec vous (et grâce à toi Chloé, il faut bien le dire), ce qui m'a poussé à plus entreprendre alors merci !

A mes amis, plus ou moins proches géographiquement, merci de votre soutien et d'avoir été là même sans forcément comprendre ce qu'il se passait. Merci Chouchou, pour tout ton soutien depuis si longtemps déjà ! Aude, Carmen et Guillemette, j'espère que notre tradition d'un voyage par an continuera longtemps ! Ophélie, Lucille, Louise, Kathleen, nos afterworks vont me manquer. A Ophélie et Louise, mes partenaires de rédaction, on a fini par le faire et je vous souhaite tout le meilleur pour la suite ! Lucine, je compte sur toi pour me présenter J. et tous ses amis lors de ton prochain voyage !

A ma famille, mon pilier, merci pour tout. Je n'en serais pas là sans toi mamounette, ta force est un exemple. Mes chers "petits" frères, votre soutien teinté de sarcasme est un moteur, vous êtes ma fierté.

A Clément, j'aurai trop de choses à dire alors simplement merci de me soutenir et de me supporter au quotidien, je suis pressée d'écrire notre prochain chapitre. A notre avenir.

# TABLE DES MATIERES

<i>Liste des figures</i> .....	1
<i>Liste des tableaux</i> .....	3
<i>Liste des abréviations</i> .....	4
<b>INTRODUCTION</b> .....	5
<b>Chapitre 1 : Les lymphocytes cytotoxiques</b> .....	6
A) Généralités du système immunitaire .....	6
B) Les cellules natural killer (NK).....	7
D) Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	10
E) Les MAIT.....	10
F) Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	10
G) Les lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	11
<b>Chapitre 2 : La synapse immunologique</b> .....	14
A) Formation de la synapse immunologique cytotoxique .....	14
B) Le rôle crucial des molécules d'adhésions .....	17
C) Le cytosquelette d'actine : un acteur essentiel.....	18
D) La signalisation TCR, moteur de la dégranulation .....	18
<b>Chapitre 3 : Les V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2, sentinelles sanguines</b> .....	19
A) Ontogénie et conservation au sein des espèces .....	19
B) Développement et sélection thymique du répertoire.....	20
C) Fonctions.....	21
D) Le récepteur T à l'antigène et corécepteurs .....	22
<b>Chapitre 4 : Les butyrophilines, une famille émergente de régulateurs immunitaires</b> .....	26
A) Généralités .....	26
B) BTN3A.....	27
C) BTN2A.....	30
<b>OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE</b> .....	32
I. Objectifs des travaux de recherche .....	33
II. Démarche scientifique.....	34
<b>RESULTATS</b> .....	35
<b>Chapitre 1 : Etude et caractérisation d'un anticorps anti-BTN3A</b> .....	36
A) Introduction.....	36
B) Méthodologie.....	36
C) Principaux résultats .....	38
D) Conclusion .....	42
<b>Chapitre 2 : Caractérisation de la synapse immunologique des LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2</b> .....	43
A) Introduction.....	43

B) Méthodologie .....	44
C) Principaux résultats .....	47
D) Conclusion .....	58
E) Article .....	59
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>82</b>
<b>LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2 et immunothérapies.....</b>	<b>83</b>
<b>Butyrophilines et synapse des LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2.....</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>89</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>116</b>
<b>LT V<math>\gamma</math>9V<math>\delta</math>2 au sein du microenvironnement tumoral .....</b>	<b>117</b>
A) Article soumis .....	118
B) Equiper les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pour renforcer leurs fonctions face aux tumeurs solides .....	136
<b>Liste des publications .....</b>	<b>154</b>
<b>Liste des communications.....</b>	<b>155</b>
<b>Conclusion personnelle.....</b>	<b>156</b>



# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> Les acteurs cellulaires du système immunitaire. ....	6
<b>Figure 2</b> Les cellules cytotoxiques du système immunitaire.....	8
<b>Figure 3</b> L'architecture de la synapse immunologique. ....	14
<b>Figure 4</b> Etapes de la formation d'une synapse cytotoxique.....	15
<b>Figure 5</b> Représentation schématique du développement du répertoire des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 au cours de la vie. ....	20
<b>Figure 6</b> Structure des TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ humains et leur interaction différentielle au CD3.. ....	23
<b>Figure 7</b> Modèle représentant l'interaction entre un dimère de BTN2A1 et le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2....	24
<b>Figure 8</b> Les gènes des butyrophilines humaines.....	26
<b>Figure 9</b> Structure des butyrophilines (BTN).. ....	27
<b>Figure 10</b> Profil d'expression des BTN3A dans les tissus sains et tumoraux. ....	29
<b>Figure 11</b> Expression différentielle des BTN2A1 et BTN2A2 au sein des tissus sains et tumoraux.....	30
<b>Figure 12</b> Représentation schématique du mécanisme d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 selon les dernières avancées.....	31
<b>Figure 13</b> La sensibilisation induite par ICT01 est stable pendant plusieurs heures avant de décroître, mais peut être rétablie.....	39
<b>Figure 14</b> ICT01 est internalisé et détruit dans les lysosomes.....	40
<b>Figure 15</b> Un traitement à l'ICT01 permet de sensibiliser les cellules tumorales à l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 lors de cultures 3D.....	41
<b>Figure 16</b> Représentation schématique des BTN chimériques utilisées et d'une SLB.....	46
<b>Figure 17</b> BTN2A1 et BTN3A1 se regroupent au niveau de la SI dans des conditions propices à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.....	48
<b>Figure 18</b> BTN2A1 et BTN3A1 interagissent ensemble dans des conditions activatrices des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. ....	49
<b>Figure 19</b> BTN3A1 est recrutée à la SI uniquement dans des conditions permettant l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.....	50
<b>Figure 20</b> Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 forment des SI en "œil-de-bœuf" pour lesquelles la présence de BTN2A1 permet leurs maturations.. ....	52
<b>Figure 21</b> En l'absence de signaux d'activation complémentaires, BTN3A1 n'est pas capable de lier le TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.. ....	53
<b>Figure 22</b> Un monomère de BTN2A1 est suffisant pour fixer des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de façon TCR-dépendante.....	54

<b>Figure 23</b> BTN2A1 seul induit un relargage de perforine par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 mais la présence de BTN3A1 potentialise son action, de façon ZAP70-indépendante.....	55
<b>Figure 24</b> BTN2A1 se colocalise au TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de façon constitutive tandis que BTN3A1 nécessite un signal d'activation. ....	56
<b>Figure 25</b> SLB sans BTN mais avec MICA met en évidence un 2ème type de synapse formée par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.....	57
<b>Figure 26</b> Mécanisme d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 proposé.....	88

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Table 1</b> Liste des ligands connus pour les TCR des LT $\gamma\delta$ humains. ....	12
<b>Table 2</b> Les différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$ . ....	13

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
APC	Antigen Presenting Cell
B.EBV	Lymphocyte B immortalisé par l'Ebstein-Barr Virus
BrHPP	Bromohydrine Pyrophosphate
BTN	Butyrophiline
CAMP	Changed Associated Molecular Pattern
CDR	Complementarity Determining Region
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
EFS	Etablissement Français du Sang
FcR	Récepteur au Fragment Constant
HLA	Human Leucocyte Antigen
Ig	Immunoglobuline
ILC	Innate Like Cells
LT	Lymphocyte T
MAIT	Mucosal Associated
mTOC	Microtubule Organizing Center
NK	Natural Killer
NKR	Natural Killer Receptor
NKT	Natural Killer T cell
pAg	Phospho-antigen
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
SI	Synapse Immunologique
SLB	glass-Supported Lipid Bilayer
SMAC (c, p, d)	Supramolecular Activation Center (central, peripheral, distal)
TCR	T-Cell Receptor
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TLR	Toll-Like Receptor
ULA	Ultra-Low Adhesion

# INTRODUCTION

# Chapitre 1 : Les lymphocytes cytotoxiques

## A) Généralités du système immunitaire

L'organisme se défend en permanence contre les agressions externes grâce à un réseau complexe d'organes, tissus, cellules, molécules et mécanismes divers ; on parle de système immunitaire. Celui-ci a évolué simultanément avec notre environnement pour adapter ses réponses et nous défendre face aux pathogènes étrangers mais aussi aux cellules du *Soi* altérées.

La classification historique des cellules de l'immunité par la communauté d'immunologistes a été de distinguer deux composantes : l'immunité Innée de l'immunité Adaptative (Figure 1). Cette division repose notamment sur le différentiel temporel de mise en place d'une réponse. L'immunité Innée reconnaît rapidement des motifs conservés de pathogènes et met en place une réponse peu spécifique. A l'inverse, l'immunité Adaptative est modulée spécifiquement et requiert donc plus de temps pour s'enclencher.

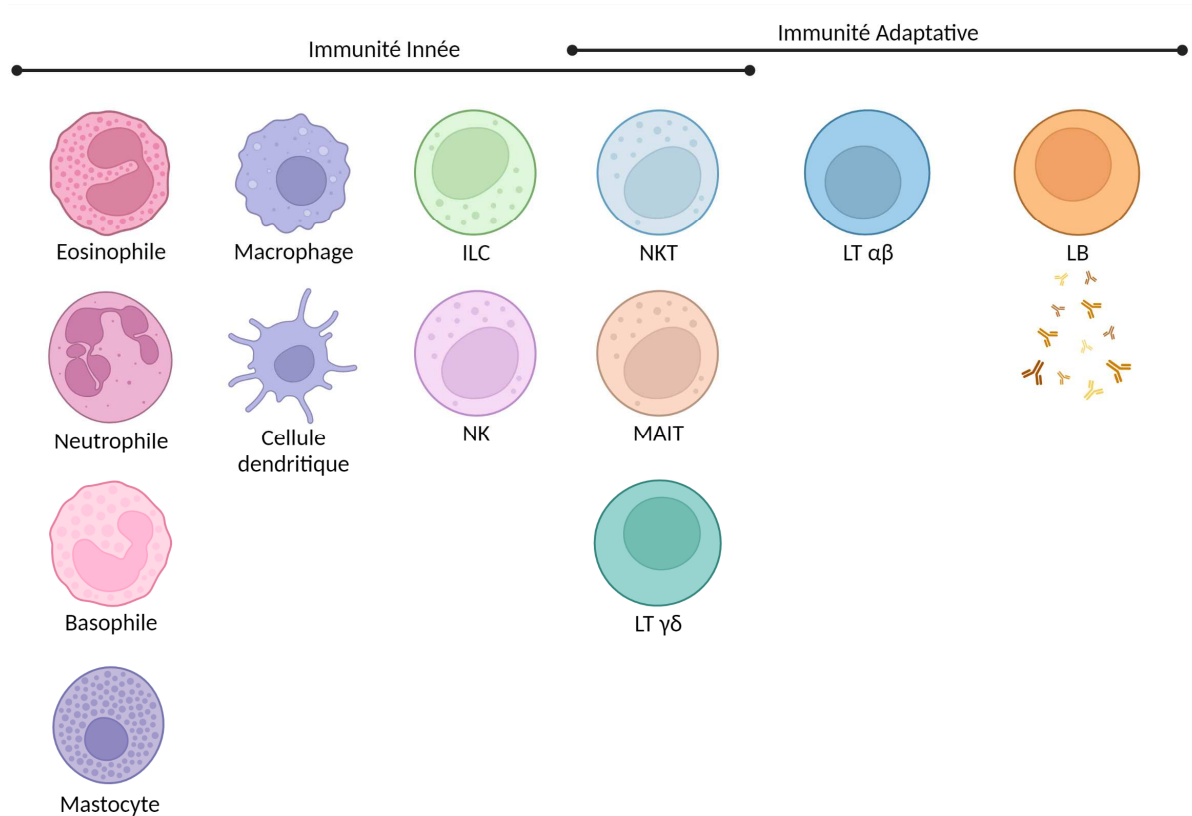


Figure 1 Les acteurs cellulaires du système immunitaire.

Cependant, suivant les avancées de la recherche fondamentale, cette dichotomie entre immunité innée et adaptative tend à s'amenuiser de plus en plus. Un dialogue important et une complémentarité des réponses entre ces deux pans démontrent leur étroite interconnexion. Aussi, de nombreuses cellules partagent finalement des caractéristiques de ces deux immunités comme les cellules MAIT ou les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Ces dernières sont alors regroupées dans l'immunité dite transitionnelle.

Il est alors intéressant de remarquer que certaines fonctions sont finalement partagées par différents types cellulaires appartenant aux différents types d'immunité. C'est le cas de la fonction cytotoxique ([Figure 2](#)).

La multiplicité de type cellulaire présentant cette fonction cytotoxique souligne l'importance de celle-ci au sein de notre système immunitaire. En effet, on comprend aisément l'intérêt d'un système de reconnaissance et d'élimination direct de pathogènes, ou de surveillance de développement tumoral dans l'arsenal de notre système immunitaire. Les premiers acteurs cytotoxiques à avoir été caractérisés sont les cellules « natural killer » (NK) ([Herberman et al., 1975](#) ; [Kiessling et al., 1975](#)). Depuis, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>, les NKT et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont aussi été caractérisés comme possédant une activité de lyse directe. De façon plus récente, les MAIT et certains lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> sont venus élargir les rangs des cellules cytotoxiques.

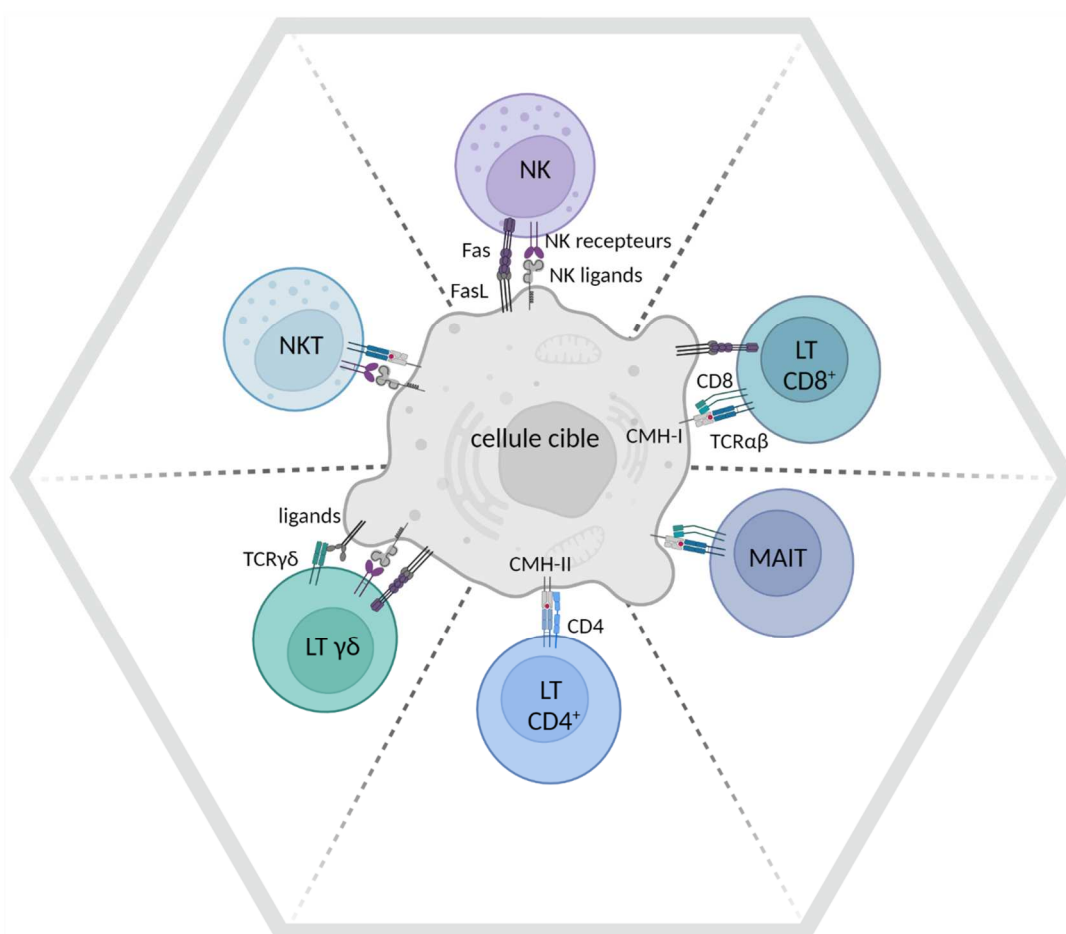
## B) Les cellules natural killer (NK)

Dans les années 1970, une nouvelle population cellulaire a été décrite chez la souris pour sa capacité cytotoxique spontanée face à des cellules tumorales sans sensibilisation au préalable ([Herberman et al., 1975](#) ; [Kiessling et al., 1975](#)). C'est basé sur cette caractéristique que ces cellules ont été nommées « natural killer » ou cellules NK. Certains chercheurs classent les cellules NK dans la famille des cellules lymphoïdes innées (ILC), et plus précisément des ILC1. Ce rapprochement est fondé notamment sur le partage de plusieurs fonctions et facteurs de transcriptions. En effet, ces deux types cellulaires sont capables de sécréter de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  en réponse à un combo d'IL-12 et d'IL-18, nécessitent tous deux de l'IL-15 tant pour leurs différenciations que leurs fonctions, et expriment le facteur de transcription T-bet. En revanche, si l'on s'intéresse quelque peu au lignage de ces cellules, une telle classification n'est pas correcte (pour une revue récente sur le sujet, voir [Riggan L. et al., 2019](#)). Aussi, les NK sont des cellules circulantes alors que les ILC1 sont résidentes des tissus muqueux et seules les cellules NK sont douées de capacité cytotoxique.

Quoi qu'il en soit, les cellules NK ressemblent en partie à des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, notamment du fait de leur taille, fonctions et facteurs de transcriptions utilisés. En revanche,

contrairement aux lymphocytes T ou B, ces cellules ne possèdent pas de récepteurs spécifiques à un antigène. Les cellules NK sont alors capables de différencier les cellules saines des cellules tumorales ou transformées grâce à un large éventail de récepteurs activateurs et inhibiteurs, on parle de reconnaissance du « Soi manquant ».

Parmi les principaux signaux activateurs de la fonction cytotoxique des cellules NK, on retrouve la perte de l'expression du CMH de classe I ainsi que l'activation de récepteurs NK tel que NKG2D ou DNAM-1 (revue par Long E et al., 2013). Présentant à leur surface des récepteurs de la partie constante des anticorps (tel que FcγRIII), les cellules NK sont aussi capables de déclencher une cytotoxicité anticorps-dépendante (ADCC).



**Figure 2 Les cellules cytotoxiques du système immunitaire.** Représentation des voies de signalisations directes et contact-dépendantes conduisant à la lyse de cellule cible en fonction des différentes populations immunitaires douées de la fonction cytotoxique. Cette cytotoxicité se manifeste par la sécrétion de granules cytolitiques (par exemple le granzyme B, la perforine etc.) ou de récepteur de mort tel que Fas. Il est à noter que certaines de ces populations, comme les NK ou les LT  $\gamma\delta$  expriment le FcR leurs permettant d'exercer une fonction cytotoxique aussi par le phénomène d'ADCC.



### C) Les NKT

Fin des années 1980, plusieurs équipes mettent en évidence chez la souris l'existence d'une population de lymphocytes T  $\alpha\beta$  exprimant leurs TCR de façon modérée et en l'absence de CD4 comme de CD8 (Budd et al., 1987 ; Fowlkes et al., 1987). De plus, ces derniers expriment la molécule NK1.1 à leurs surfaces jusqu'à lors considérée comme spécifique des cellules NK (Ballas et al., 1990 ; Sykes et al., 1990). Par la suite, la mise en évidence de leur forte sécrétion de cytokines telles que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  et leur capacité cytotoxique a intensifié l'intérêt de la recherche pour cette population.

Les NKT se déclinent en plusieurs sous-populations répertoriées selon leur répertoire TCR, les NKT de type 1 (aussi nommés iNKT), les NKT de type 2 et les NKT-like (Godfrey D. et al., 2004). Toutefois, lorsque l'on parle des NKT, on sous-entend généralement les iNKT pour « invariants ». Cette population présente un TCR semi-invariant chez la souris, composé des chaînes V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 8, V $\beta$ 7 ou V $\beta$ 2, et invariant chez l'homme V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 (Porcelli S. et al., 1993 ; Lantz O. et al., 1994). Les iNKT représentent la population de NKT majoritaire chez la souris, ce qui a permis de bien mieux décrire leurs biologie et fonctions. Cependant, ce sont les NKT de type 2 qui sont majoritaires chez l'homme (Exley MA. et al., 2001 ; Arrenberg P. et al., 2009).

Les iNKT, bien que présentant le même TCR restreint au complexe CD1d/ $\alpha$ -GalCer, démontrent une certaine hétérogénéité fonctionnelle. De ce fait et à l'instar des LT CD4<sup>+</sup> dit « helper », les populations de iNKT sont catégorisées en fonction des cytokines qu'elles secrètent. Les NKT1 secrètent principalement de l'IFN $\gamma$  et sont retrouvés dans le foie et la rate, les NKT2 secrètent majoritairement de l'IL-4 et sont retrouvés dans la rate et les poumons, tandis que les NKT17 secrètent de l'IL-17 et résident dans les ganglions, poumons et la peau (Lee YJ. Et al., 2013 ; Engel I. et al., 2016).

Les NKT de type 2 sont bien moins caractérisés que les iNKT. Ces cellules présentent un répertoire de TCR plus varié et ainsi, une spécificité antigénique diverse bien qu'ils restent restreints au CD1d (Porcelli S. et al., 1993 ; Godfrey D. et al., 2004). Les NKT de type 2 sont abondants dans le foie bien que leur fréquence reste inconnue dans de nombreux organes (Exley MA. et al., 2002).

Enfin, les NKT-like sont les seuls NKT à ne pas être restreints au CD1d. Ces cellules sont majoritairement CD8<sup>+</sup>, expriment plusieurs récepteurs NK mais n'expriment pas la molécule de stimulation CD28 retrouvée habituellement sur les LT  $\alpha\beta$  (Speiser D., et al., 1999). Les NKT-like sont relativement rares à la naissance mais leur nombre augmente avec l'âge et ils peuvent

représenter entre 5 et 15% des lymphocytes T périphériques (McNerlan SE. et al., 1998 ; Jiang Y. et al., 2014).

#### D) Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les LT  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> représentent une part puissante du système immunitaire adaptatif. Ces cellules sont circulantes et nécessitent de se faire activer par des cellules dendritiques au sein des ganglions avant de devenir cytotoxiques. En effet, bien qu'elles ne soient pas encore armées pour exercer leurs fonctions effectrices à l'état naïf, ces dernières deviennent matures et se multiplient considérablement une fois leur antigène rencontré à l'aide des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> expriment un répertoire de TCR très large restreint majoritairement par les molécules de CMH de classe I et reconnaissent une diversité d'antigènes. Ces LT ont aussi besoin de la présence de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN $\gamma$  et de signaux d'activations secondaires (induit par leur CD28 ou encore l'interaction CD40/CD40L) pour s'activer et ainsi produire des molécules lytiques, cytokines et autres récepteurs de mort leurs permettant d'effectuer leur fonction cytotoxique.

#### E) Les MAIT

Les lymphocytes MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) ont été découvert plus récemment grâce à l'identification d'un TCR semi-invariant composé de la chaîne V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 associée à un répertoire restreint de chaînes  $\beta$  (Porcelli S et al., 1993 ; Tilloy F et al., 1999). La plupart des MAIT chez l'homme sont CD8<sup>+</sup> $\alpha\alpha$  ou double négatif, c'est-à-dire CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>. Elles sont restreintes à une protéine non-polymorphique liée au CMH de classe I et hautement conservée dans l'évolution, MR1 (Treiner E et al., 2003) ce qui leur confère un rôle important de défense antimicrobienne. Elles sont ainsi capables de sécréter de nombreuses cytokines comme le TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  ou encore de l'IL-17. Cela leur permet notamment de recruter et activer d'autres effecteurs du système immunitaire, tels que les cellules dendritiques ou les lymphocytes B. À la suite de leur stimulation TCR-dépendante, les cellules MAIT vont exercer leur fonction cytotoxique, notamment à travers la sécrétion de perforine et granzyme B.

#### F) Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les fonctions effectrices des différents compartiments de LT sont critiques pour façonner la réponse immunitaire face aux nombreuses maladies et infections. Alors que les LT CD8<sup>+</sup> ont toujours été reconnus pour leur fonction cytotoxique directe face aux cellules cibles, les LT CD4<sup>+</sup> ont quant à eux été décrit pour leurs fonctions d'auxiliaires et soutiens aux autres populations de par leur production de cytokines.

Grâce aux recherches récentes, on se rend compte que ces délimitations sont finalement flexibles et que certains LT CD4<sup>+</sup> sont eux aussi capables de cytotoxicité. De premières observations de ces LT CD4<sup>+</sup> cytotoxiques ont pu être faites dans l'étude de la réponse antivirale, notamment grâce à des modèles de souris infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire, puis par l'étude de patients atteints de VIH, EBV ou encore hépatites B & C (Sun et al., 2001 ; van Leeuwen et al., 2004 ; Jellison et al., 2005 ; Aslan et al., 2006 ; Saez-Borderias et al., 2006 ; Soghoian et al., 2012). Ces études ont aussi démontré que cette cytotoxicité est engendrée par une reconnaissance TCR-dépendante d'antigènes viraux apparentés présentés par le CMH de type II, de façon similaire à la reconnaissance par les LT CD4<sup>+</sup> non-cytotoxique.

### G) Les lymphocytes T $\gamma\delta$

La découverte des lymphocytes T  $\gamma\delta$  s'est faite par sérendipité dans les années 1980 lorsque deux équipes mettent en évidence l'existence d'un TCR n'exprimant ni la chaîne  $\alpha$  ni la chaîne  $\beta$ , mais de nouvelles chaînes  $\gamma$  &  $\delta$  (Saito et al., 1984 ; Brenner et al., 1986). Le TCR de ces lymphocytes a la particularité de ne pas être restreint au complexe CMH/peptide comme l'est le TCR  $\alpha\beta$ . L'identification du répertoire d'antigènes reconnu par le TCR  $\gamma\delta$  se révèle être un vrai défi pour plusieurs raisons. Tout d'abord, aucun prérequis n'a pu être identifié, c'est-à-dire que ce TCR est virtuellement possiblement restreint à une protéine – famille déjà vaste et complexe en elle-même – mais aussi à des lipides, carbohydrates ou encore des acides nucléiques. Aussi, l'affinité des TCR  $\gamma\delta$  pour leurs ligands est généralement faible, de l'ordre de 1 à 100  $\mu$ M, ce qui freine grandement l'utilisation de méthode biochimique pour leur étude (Willcox BE & Willcox CR, 2019). De plus, les résultats obtenus chez la souris ne sont pas, dans la plupart des cas, généralisable à l'Homme puisque les séquences des TCR et les différentes sous-populations sont considérablement différentes. Malgré tout, plusieurs antigènes des TCR  $\gamma\delta$  humain ont pu être identifiés (Table 1).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  expriment un grand nombre de récepteurs NK, activateurs et inhibiteurs, qui contribuent de façon importante à leur réactivité (Bonneville et al., 2010 ; Pont et al, 2012). En plus de ce premier trait partagé, les LT  $\gamma\delta$  partage aussi l'expression du récepteur Fc $\gamma$ RIII avec les cellules NK et sont donc eux aussi capable d'induire le mécanisme d'ADCC. Tout comme pour les LT  $\alpha\beta$ , les LT  $\gamma\delta$  sont classés en diverses sous-populations. Le fait que les deux types de TCR  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  sont retrouvés chez tous les vertébrés à mâchoires de façon persistante depuis des millions d'années suggère que ces deux récepteurs doivent posséder des fonctions spécifiques à chacun. Malgré cela, il existe peu de conservation des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  entre les espèces (Sturm et al., 1992). Ainsi, cette introduction sera délibérément focalisée sur les LT  $\gamma\delta$  humain.

Table 1 Liste des ligands connus pour les TCR des LT  $\gamma\delta$  humains. Adapté de Deseke M. et Prinz I., 2020

Nom	TCR impliqué	Affinité	Commentaires	Références
<i>Reconnaissance CMH et CMH-like</i>				
HLA-A24	V $\delta$ 1	/	Reconnaissance allo-HLA	Cicccone E. et al, 1991
HLA-B27-ci	V $\gamma$ 4V $\delta$ 1	/	Reconnaissance allo-HLA	Del Porto P. et al, 1994
HLA-A24	V $\delta$ 1	/	Reconnaissance allo-HLA	Spits H. et al, 1990
HLA-A*24:2	V $\gamma$ 5V $\delta$ 1	/	Reconnaissance allo-HLA, nécessite un peptide pour améliorer la stabilité	Kierkels G. et al., 2019
HLA-A2/MART-1	V $\delta$ 1	2.9-71 $\mu$ M	/	Benveniste P. et al., 2018
CD1-c	V $\delta$ 1	23-125 $\mu$ M	Liaison au CD1-d seul, mais affinité supérieure si présence d'antigène	Roy S et al., 2016
CD1-d	V $\delta$ 1 / V $\delta$ 3	16-33 $\mu$ M	Liaison au CD1-c seul, mais affinité supérieure si présence d'antigène	Spada FM. Et al., 2000
MR1	V $\delta$ 1	2.7-30.6 $\mu$ M	/	Le Nours et al., 2019
EPCR	V $\gamma$ 4V $\delta$ 5	90 $\mu$ M	/	Willcox CR. Et al., 2012
MICA	V $\delta$ 1	110-900 $\mu$ M	Ligand de NKG2D de haute affinité	Groh V et al., 1998
ULBP4	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	/	Ligand de NKG2D de haute affinité	Kong Y et al., 2009
<i>Reconnaissance Ig-like</i>				
Annexine A2	V $\gamma$ 8V $\delta$ 3	3 $\mu$ M	/	Marlin R. et al., 2017
EphA2	V $\gamma$ 9V $\delta$ 1	/	Provoque l'activation du TCR si EphA2 est lié aux ephrines du LT $\gamma\delta$	Harly C. et al., 2021
hMSH2	V $\delta$ 2	/	Ligand de NKG2D de haute affinité	Dai Y. M. et al., 2018
Histidyl tRNA synthetase	V $\gamma$ 3V $\delta$ 2	/	Présence en surface non montrée	Dornmair K. et al., 2004
SEA	V $\gamma$ 9	/	Superantigène dérivé de <i>Staphylococcus aureus</i>	Rust CJJ. et al., 1990
OXYS	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	/	Superantigène dérivé de <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	Xi X. et al., 2011
DX2	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	/	Superantigène dérivé de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Xi X. et al., 2013
Phycoerythrine	V $\gamma$ 1V $\delta$ 1	/	Antigène non physiologique, dérivé d'algue rouge	Zeng X. et al., 2012
Peptide dérivé de Listeriolysin O	/	/	/	Guo Y. et al., 1995
HLA-DRw53/peptide dérivé de la toxine Tetanique	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	/	/	Kozbor D. et al., 1989
Chaîne- $\lambda$ des Ig	/	/	Reconnaissance si l'antigène n'est pas présent en surface	Wright A. et al., 1989
<i>Reconnaissance de molécules de la famille B7</i>				
BTN3A1	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	/	Aucune interaction directe n'a été montré	Harly C. et al., 2012
BTN2A1	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	40-50 $\mu$ M	Interaction avec la chaîne V $\gamma$ 9 via HV4 et CDR2	Karunakaran MM. et al., 2020
BTNL3	V $\gamma$ 4	3.5-20.7 $\mu$ M	Interaction avec la chaîne V $\gamma$ 4 via HV4 et CDR2, en hétérodimère BTNL8	Willcox CR. et al., 2019

Chez l'Homme, les LT  $\gamma\delta$  sont divisés en quatre sous-populations principales en fonction de l'expression de leur chaîne  $\delta$ . Ces quatre chaînes (V $\delta$ 1/2/3/5) peuvent se combiner avec les différentes chaînes  $\gamma$  (V $\gamma$ 2/3/4/5/8/9) pour former différentes sous-populations de lymphocytes  $\gamma\delta$  possédant différentes fonctions. De façon intéressante, chaque TCR $\delta$  ne va former qu'une ou plusieurs combinaisons avec un pool de TCR $\gamma$  restreint au sein d'un système fermé plutôt que de retrouver n'importe quelle combinaison aléatoire (Pang DJ. et al., 2012 ; Adams EJ. et Havran WL., 2015) (Table 2).

Sous-population	TCR $\gamma$ associé	Caractéristiques	Localisation
V $\delta$ 1	V $\gamma$ 2/3/4/5/8/9	- Expansion clonale lors d'infection CMV - Perte de la sous-population V $\gamma$ 4+ lors de la maladie cœliaque	Peau, intestin, foie, rate, sang périphérique
V $\delta$ 3	V $\gamma$ 2/3	- Expansion clonale lors d'infection HCV - Présence dans le sang périphérique de patients leucémiques lymphocytaires chroniques	Foie
V $\delta$ 2	V $\gamma$ 9	- Origine du thymus postnatal - Expansion polyclonale lors de stimulation antigénique	Sang périphérique
V $\delta$ 2	V $\gamma$ 9 <sup>-</sup>	- Expansion clonale lors d'infection CMV	Infiltration dans le foie
V $\delta$ 5	V $\gamma$ 4	- Représente 25% des CD3+ dans le sang périphérique lors d'infection CMV - Liaison directe au EPCR	Sang périphérique

**Table 2** Les différentes sous-populations de LT  $\gamma\delta$ . Liste des différentes sous-populations de LT  $\gamma\delta$  classifiées selon leurs chaînes  $\delta$ , les chaînes  $\gamma$  retrouvées associées ainsi que leurs principales caractéristiques et localisation. (Willcox CR. et al., 2012 ; Davey MS. et al., 2018 ; Yang L. et al., 2021)

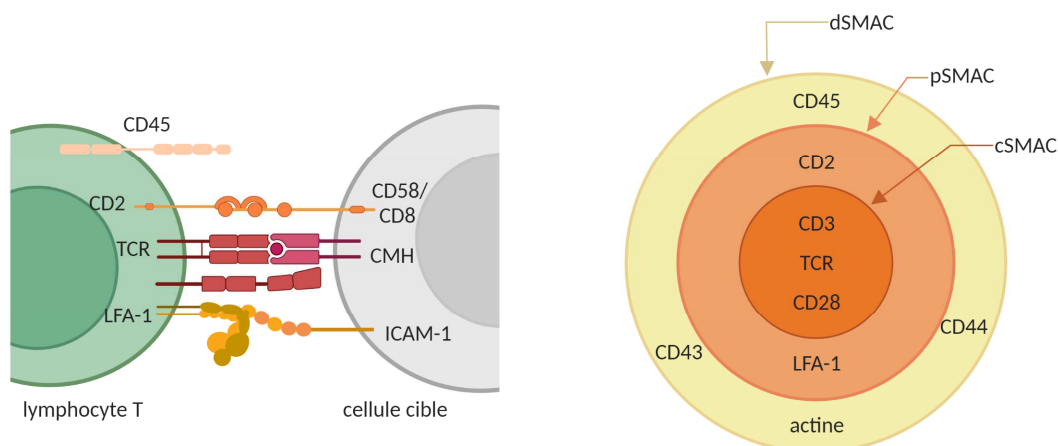
Après avoir passé en revue les différents acteurs immunitaires de la cytotoxicité, on s'aperçoit de l'importance du contact cellulaire pour le déclenchement de cette fonction primordiale (Figure 2). Ce contact entre la cellule cible et l'effecteur immunitaire doit être stable et est appelé synapse immunologique (SI).

## Chapitre 2 : La synapse immunologique

La formation de la SI joue un rôle crucial dans la mise en place de la cytotoxicité. Ce processus, loin d'être statique, est au contraire très dynamique et hautement régulé, et implique la réorganisation de composants cellulaires ainsi que de protéines de signalisation. C'est seulement après la bonne formation de cette interface que les effecteurs cytotoxiques vont libérer un cocktail de molécules contenues dans des granules cytolytiques afin de détruire la cellule cible.

### A) Formation de la synapse immunologique cytotoxique

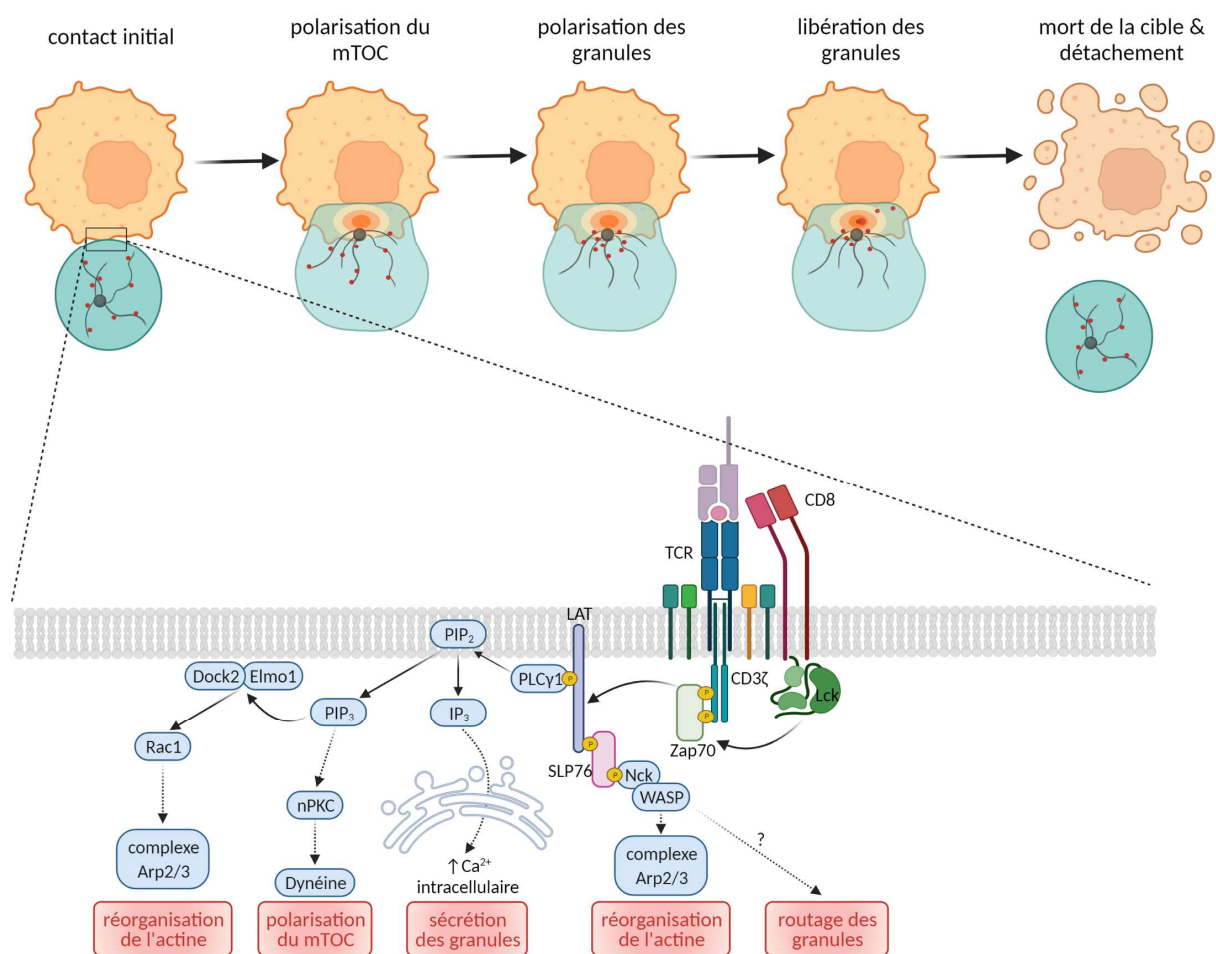
La formation de la SI se déroule en plusieurs étapes, comprenant la réorganisation de récepteurs impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion afin de former des domaines de fonctions spécialisés à l'interface des deux cellules. Dès la fin des années 1990s, la structure particulière de cette interface a pu être observée grâce aux premières bicouches lipidiques artificielles (Grakoui et al., 1999). De façon très caractéristique, les molécules impliquées dans la formation de la SI vont s'arranger entre-elles de façon à former des cercles concentriques appelés SMAC (cluster d'activation supramoléculaire). Les TCR se regroupent au centre de la synapse accompagnés du corécepteur activateur CD28 et forment ainsi le cSMAC pour « central ». Cette première zone est ensuite entourée de molécules d'adhésions telles que LFA-1 et CD2 formant ainsi la région « périphérique », le pSMAC. Enfin, la région dite « distale » correspond principalement à un regroupement d'actine et on y retrouve certaines molécules telle que CD45 (Figure 3). Cette formation singulière a par la suite été identifiée et confirmée pour d'autres types cellulaires, comme les LT  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> mais aussi de façon plus large à travers le



**Figure 3** L'architecture de la synapse immunologique. Visualisation du réarrangement spécifique des acteurs moléculaires principaux de la synapse immunologique d'un lymphocyte T  $\alpha\beta$  (adapté de Huppa J. et Davis M., 2003).

système immunitaire puisqu'elle peut être observée aussi lors de l'activation des lymphocytes B, et même chez les macrophages lors de la phagocytose (Goodridge et al., 2011 ; Freeman et al., 2016 ; Niedergang et al., 2016).

Par la suite et grâce au développement des techniques de vidéo-microscopie, les étapes clés de la formation des synapses et leurs temporalités conduisant à la mort de la cellule cible ont pu être déchiffré (Figure 4). Les cellules cytotoxiques, après avoir reconnues leurs cibles, s'arrêtent et accumulent de l'actine au centre de la zone de contact (Ritter et al., 2015). Cette actine forme ensuite très rapidement la zone dSMAC, et au même moment, les microclusters de TCR se regroupent au centre de l'interface pour former le cSMAC.



**Figure 4** Etapes de la formation d'une synapse cytotoxique. Le contact initial entre la cellule cytotoxique et sa cible permet l'engagement du TCR qui, à son tour, induit sa signalisation. Chaque étape de cette dernière est clé pour permettre la polarisation du centrosome, puis des granules cytotolytiques. Une fois la mort de la cible détectée, la cellule cytotoxique se détache et peut potentiellement se diriger vers une nouvelle cible et recommencer le processus.

Lorsque la rencontre d'une cellule cible induit la signalisation du TCR, le centrosome se déplace dans la cellule cytotoxique pour se rapprocher de la SI (Kuhn & Poenie, 2012). Celui-ci se stabilise dans le cytosol, aux abords du cSMAC, dans une région dépourvue d'actine. Les

## Encart 1 : Une diversité de structure

Comme mentionné précédemment, plusieurs types cellulaires sont doués de cytotoxicité et forment donc des SI. Aussi, bien que cette formation de la SI semble être régit par tout un tas de mécanismes moléculaires spontanés ou dépendants du cytosquelette, plusieurs différences émergent dans l'organisation des protéines au niveau des SI.

L'organisation la plus classique des synapses est celle dite en « œil-de-bœuf », où on retrouve les interactions TCR-pMHC et les signaux des protéines kinases PKC et Lck au centre, dans la région centrale appelée cSMAC. Autour, on retrouve des molécules d'adhésions telle que ICAM-1 qui forme un anneau autour du cSMAC dans la zone périphérique (pSMAC). Enfin, de façon distale, on retrouve une accumulation d'actine qui vient supporter la synapse et former la dernière zone dSMAC. Cette forme classique de synapse a pu être observée et décrite d'abord chez les LT CD4<sup>+</sup> (Kupfer A & Singer SJ, 1989), puis chez les LT CD8<sup>+</sup> (Monks CR et al., 1998 ; Grakoui A et al., 1999) et les cellules NK chez qui la cSMAC représente une accumulation de récepteurs NK activateurs ou inhibiteurs (Krzewski K & Strominger JL, 2008).

Bien que la plupart des études se focalisent sur la formation et la structure des synapses classiques ayant des SMAC bien définies, on retrouve plusieurs exemples de cellules formant des SI non-classiques. Par exemple, on sait que les thymocytes double-positifs sont incapables de former un cSMAC contenant une seule zone d'accumulation de TCR. A la place, ces cellules présentent des synapses « multifocales » caractérisées par une surface de contact contenant ICAM-1 entrecoupé de nombreuses petites accumulations de TCR et protéines kinases de signalisations (Hailman E et al., 2002). De même, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper 2 (Th2) aussi forment des synapses multicentriques contrairement aux Th1 qui forment des SI classiques (Balamuth F et al., 2001 ; Jackman RP et al., 2007 ; Thauland TJ et al., 2008).

En plus de ces structures stables, des interactions dynamiques ont pu être observées entre des lymphocytes T et des cellules dendritiques. Celles-ci sont caractérisées par des interactions migratoires brèves, tout de même suffisante pour induire un flux calcique, l'activation et la prolifération des LT (Gunzer M et al., 2000). Ces synapses migratoires sont appelées kinapses immunologiques et peuvent être observées notamment chez des LT CD4<sup>+</sup> (Krummel MF et al., 2000).

Il est fort probable que la décision de former une SI classique, multicentrique ou une kinapse dépend de multiples facteurs comme le niveau de stimulation du TCR, l'état de différenciation de la cellule, le phénotype de la cellule présentatrice d'antigène impliquée mais aussi le rôle *in fine* de la SI. En effet bien que les SI multicentrique et les kinapses soient capables de générer des signaux pour le priming des LT, la sécrétion de certaines molécules effectrices nécessite la formation d'une SI classique.

vésicules cytotoxiques se regroupent autour du centrosome, et migrent ainsi avec lui jusqu'à la SI où celles-ci relarguent perforine et granzyme entre la cellule cytotoxique et la cible (Ritter et al., 2015). De façon intéressante, la cellule cytotoxique va rester en contact de la cellule cible jusqu'à ce que cette dernière meure. En effet, contrairement à ce que l'on pouvait imaginer, la dégranulation de granzyme et perforine en elle-même ne constitue pas un signal d'arrêt de la cytotoxicité. Au contraire, le signal conduisant à la rupture de la SI est généré par la mort de la cellule cible de façon dépendante des caspases (Jenkins MR et al., 2015).



## B) Le rôle crucial des molécules d'adhésions

Au sein de la SI cytotoxique, les molécules d'adhésions jouent un double rôle. Elles permettent la stabilisation physique du contact naissant entre la cellule cytotoxique et la cellule cible, mais déclenchent aussi d'importantes voies de signalisation dans la cellule cytotoxique qui contribuent à la maturation de la SI. Plusieurs molécules d'adhésion ont été identifiées pour leur rôle important dans le déclenchement de la cytotoxicité comme LFA-1 (Anikeeva, 2005) et CD2 (Kaizuka Y et al., 2009) lorsqu'elles se lient à ICAM-1 et CD58 respectivement. Il est maintenant clair que LFA-1 est ségréguée dans le pSMAC lors de la formation de la synapse (Anikeeva, 2005), celle-ci sert d'ailleurs de marqueur pour cette zone de la SI et son importance n'est plus remise en question.

Pour CD2, son placement est plus discuté et semble différer en fonction du modèle d'étude utilisé (Kaizuka Y. et al., 2009 ; Singleton K. et al., 2009) même si elle semble rester proche du TCR en étant directement dans le cSMAC ou bien tout juste en périphérie, au sein du pSMAC. Ceci s'explique par la voie de signalisation déclenchée par CD2. En effet, celle-ci est fortement interconnectée à celle du TCR puisqu'elle passe par la sous-unité  $\zeta$  du CD3 (Alcover A. et al., 1988 ; Howard FD et al., 1992). Plus récemment, une étude a cependant pu mettre en évidence que le recrutement de CD2 au sein de la synapse dépend au moins en partie de l'état de maturité des cellules effectrices. En effet, les cellules naïves expriment un plus faible taux de CD2 qui se place alors de façon sporadique au sein du pSMAC ; tandis que les cellules mémoires présentent un anneau de CD2 en périphérie d'ICAM-1 (Demetriou P. et al., 2020). Les lymphocytes expriment de nombreuses autres intégrines plus ou moins impliquées lors de la formation de la SI, comme par exemple CD103,  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  ou encore  $\alpha 4\beta 1$ . Cette pluralité permettrait de compenser le déficit d'expression de certaines intégrines dans des contextes spécifiques de cancer (Vicente-Manzanares M. et Sanchez-Madrid F., 2018). Aussi, un rôle important de CD103 pour la délivrance de la cytotoxicité a pu être mis en évidence. Son implication a d'abord été montré dans la polarisation des granules lytiques à la SI (Le Floch et al., 2007 ; Smyth et al., 2007). Puis, sa liaison à son ligand la E-cadherine a été décrit comme suffisant en l'absence d'ICAM-1 pour permettre la maturation de la SI (Franciszkiwicz K. et al., 2013).

Par conséquent, la zone du pSMAC de la SI cytotoxique est une structure importante pour le maintien du contact cellulaire et les signaux de costimulation grâce aux molécules d'adhésion qu'elle contient.

### C) Le cytosquelette d'actine : un acteur essentiel

Lors de la formation de la synapse immunologique, la cellule effectrice s'étale sur la cellule cible. Cet étalement radial et symétrique du LT est induit par une polymérisation protrusive de l'actine conduisant à la formation de zones riches en actine où le TCR est regroupé en micro-cluster (revue par [Le Floch L. et Huse M., 2015](#)). Ces enrichissements en TCR vont se regrouper au centre de la synapse néoformée sous l'influence de l'initiation de la signalisation TCR et ainsi former le cSMAC. En effet, ZAP70 – tyrosine kinase majeure de la signalisation TCR – contrôle la réorganisation des filaments d'actine notamment par son action de phosphorylation sur LAT ([Morgan M. et al., 2001](#)) ([Figure 4](#)). Ainsi, au fur et à mesure de la formation de la synapse, la signalisation du TCR induit un mouvement rétrograde des filaments d'actine qui, à leur tour, poussent les micro-clusters de TCR dans le cSMAC et finissent par s'assembler pour former un anneau d'actine qui correspond au dSMAC. Ces mouvements d'actine sont aussi responsables du regroupement d'intégrines tel que LFA-1 au sein du pSMAC ([Comrie W. et al., 2015](#)) et permettent donc ainsi de renforcer l'adhésion entre les deux cellules.

### D) La signalisation TCR, moteur de la dégranulation

L'activation de la signalisation TCR est bien entendue cruciale pour l'induction de la polarisation cellulaire vers une SI cytotoxique. En effet, l'activité de protéines kinases dépendantes du TCR est essentielle pour promouvoir la polarisation du MTOC (microtubule organization center) à la SI ([Jenkins MR et al., 2009](#) ; [Tsun A et al., 2011](#) ; [Jenkins MR et al., 2014](#)) ([Figure 4](#)). Combiné à l'activation de l'actine, le MTOC migre de façon à se retrouver sous la synapse puis se fixe à la membrane plasmique. Ceci déclenche alors le transport dépendant des microtubules et aboutit à l'exocytose des granules cytotoxiques ([Stinchcombe JC et al., 2001](#) ; [Stinchcombe et al., 2015](#)).

De plus, l'un des résultats principaux de l'activation du TCR est l'induction d'un flux calcique par l'activation d'IP<sub>3</sub> ([Maul-pavicic A et al., 2011](#)). Une augmentation de Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique en provenance du réticulum suivi d'une entrée de Ca<sup>2+</sup> en provenance de l'espace extracellulaire sont des événements requis pour induire la dégranulation des cellules. Ainsi, l'activation de LAT puis l'augmentation rapide de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire servent d'indicateurs d'une polarisation des granules lytiques à la synapse.

## Chapitre 3 : Les V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, sentinelles sanguines

Comme expliqué précédemment, la découverte du récepteur T utilisant les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  s'est faite dans les années 1980.

La sous-population V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est la population de LT  $\gamma\delta$  majoritaire dans le sang périphérique d'un adulte sain, et y représente entre 1-10% des lymphocytes totaux. Du fait de leurs fortes fonctions anti-tumorales et leur relative abondance dans le sang périphérique, cette population de LT  $\gamma\delta$  est la plus étudiée. L'activation antigénique de cette population est dépendante de petites molécules non-peptidiques phosphorylées appelées phosphoantigènes (pAg) (Morita CT et al., 1995). Le pAg majeur est l'isopentenyl pyrophosphate (IPP), un métabolite issu de la voie de synthèse des isoprénoïdes (Tanaka Y. et al., 1995). Ces derniers, notamment à l'origine de la synthèse de cholestérol, sont essentiels au métabolisme cellulaire et sont donc retrouvés chez tous les être vivants. On comprend alors le rôle de senseur de stress cellulaire des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 qui sont capables de s'activer tant face à des cellules transformées, que face à des pathogènes bactériens ou parasitaires. Toutefois, les mécanismes précis de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ne sont pas encore complètement élucidés. Il est maintenant admis que les pAg n'entrent pas en contact direct avec le TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, mais vont plutôt se fixer dans le domaine intracellulaire B30.2 de la molécule BTN3A1 (Harly C. et al., 2012). Récemment, c'est une autre molécule qui a été mise en évidence comme ligand direct du TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 : BTN2A1, sur qui nous reviendrons plus tard dans ce manuscrit (Karunakaran MM et al., 2020 ; Rigau M. et al., 2020).

### A) Ontogénie et conservation au sein des espèces

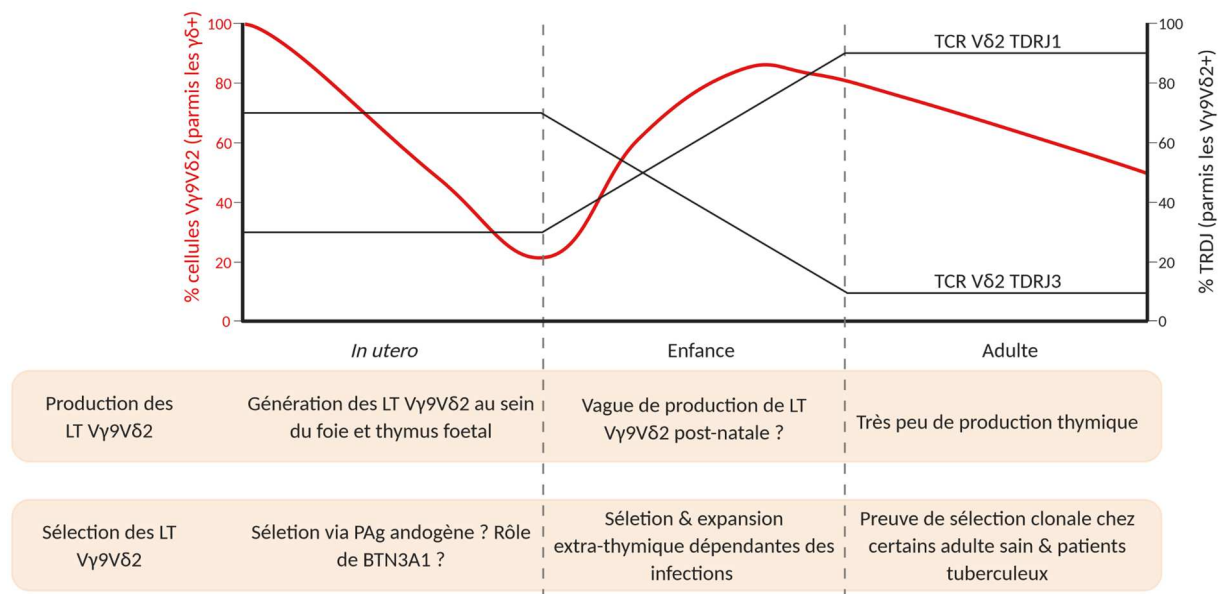
Les gènes codant pour les chaînes V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2 sont apparus avec les mammifères placentaires puisqu'on les retrouve chez toutes les espèces de cet ordre. Malgré cela et jusqu'à récemment, la présence de la population de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 n'avait été rapportée qu'au sein de l'ordre des primates supérieurs. Un petit nombre d'espèces non-primates ont depuis été identifiées, à savoir le paresseux, l'alpaga, le tatou, le grand dauphin, l'orque et le cheval (Karunakaran MM et al., 2014 ; Fichtner AS et al., 2020).

Cette conservation des gènes des chaînes V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2 mais l'absence de la population circulante et fonctionnelle dans de nombreux groupes phylogénétiques, est le reflet d'une perte ou perte de fonction de l'un ou l'autre de ces gènes. D'ailleurs, le gène codant pour V $\gamma$ 9 est plus conservé au sein de plusieurs espèces différentes comparé à celui de V $\delta$ 2 (Karunakaran MM et al., 2014). Ceci peut suggérer une certaine pression de sélection au cours de l'évolution

pour préserver la fonction du gène. De fait, il suffit de comparer les gènes codant pour les chaînes  $V\alpha$ ,  $V\beta$  et  $V\delta$  au gène  $V\gamma$ , pour se rendre compte que ce dernier est beaucoup plus divers et confère des fonctions qui ne sont pas partagées comme démontré par la diversité retrouver entre l'humain et la souris (Arden B. et al., 1995 ; Kazen A. et Adams E., 2011).

## B) Développement et sélection thymique du répertoire

Les LT  $V\gamma9V\delta2$  font partie des premiers LT à se développer chez le fœtus humain. En effet, les gènes des chaînes  $V\gamma9$  et  $V\delta2$  sont les premiers au sein des  $V\gamma/V\delta$  à subir leur réarrangement et sont détectable dans le thymus d'un fœtus de 8 semaines (McVay L. et al., 1998). Ensuite, la population  $V\gamma9V\delta2$  devient dominante au sein du répertoire des LT  $\gamma\delta$  puis les LT  $V\delta1^+$  deviennent majoritaire en fin de gestation dans le sang de cordon mais aussi le thymus (Morita CT. et al., 1994 ; Ribot JC. et al., 2014 ; Dimova T. et al., 2015) (Figure 5).



**Figure 5** Représentation schématique du développement du répertoire des LT  $V\gamma9V\delta2$  au cours de la vie. Le pourcentage des LT  $V\gamma9V\delta2$  parmi les LT  $\gamma\delta$  du sang périphérique est représenté en rouge ; tandis que le choix de la chaîne  $J\delta$  parmi les LT  $V\gamma9V\delta2$  est représenté en noir. (Adapté de Willcox CR et al., 2018)

Des études complémentaires sont nécessaires afin d'expliquer ce changement drastique de fréquence. Il s'agirait de déterminer si la population de LT  $V\gamma9V\delta2$  produite pendant le développement fœtal persiste dans le sang fœtal, ou si une majorité sort de la circulation pour envahir les tissus. Toutefois, après la naissance on observe une recrudescence brutale du nombre de LT  $V\gamma9V\delta2$  qui reprennent alors leur place de LT  $\gamma\delta$  majoritaire dans le sang périphérique (Parker CM. et al., 1990 ; De Rosa SC. et al., 2004). Ceci est probablement dû à la forte exposition microbienne lors de la naissance qui, en plus de favoriser leur forte expansion, induit une maturation de leur phénotype. Une démonstration parlante de cette

maturation dépendante de l'environnement est que l'on retrouve des profils de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 différents chez des jumeaux monozygotes (Parker CM. et al., 1990).

De plus, une étude a démontré que les LT  $\gamma\delta$  immatures sortent du thymus après la naissance pour maturer et acquérir leur fonction cytotoxique en périphérie (Ribot JC et al., 2014). En outre, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 néonataux répondent beaucoup moins lors d'une stimulation au HMBPP (pAg exclusivement bactérien et présentant une bioréactivité supérieure à celle de l'IPP) comparés à leurs homologues adultes. Pour autant, cette stimulation induit une expansion polyclonale chez les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 néonataux comme chez les adultes, bien que les répertoires des TCR présentent des différences (Fichtner AS. et al., 2020). En effet, comme pour leurs homologues LT  $\alpha\beta$ , les LT  $\gamma\delta$  subissent eux aussi un réarrangement génique pour permettre la maturation de leur TCR. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 néonataux sont caractérisés par des chaînes V $\delta$  contenant des CDR3 plus courts comparés à ceux des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 adultes. Ils présentent aussi une préférence pour un réarrangement impliquant la séquence TRDJ3, tandis que chez l'adulte on retrouve plus fréquemment la TRDJ1 (Ravens S. et al., 2017 ; Papadopoulou M. et al., 2019).

Ainsi, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 adultes sont distinguables des fœtaux et restent dans le sang périphérique, comme susmentionné. Cette distribution leur confère un véritable rôle de sentinelle et leur permet de patrouiller le corps en permanence. En cas d'anomalie détectée, comme par exemple un cancer, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont s'extraire de la circulation pour rejoindre le site concerné et exercer leurs multiples fonctions.

### C) Fonctions

Comme tous les LT  $\gamma\delta$ , les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 exercent diverses fonctions leur permettant notamment de faire le lien entre l'immunité Innée et l'immunité Adaptative. Ces cellules vont d'abord agir en tant que sentinelles et détecter les signaux de stress portés par des cellules infectées ou transformées. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont ensuite non seulement pouvoir s'activer et produire leur activité cytotoxique comme précédemment mentionnée ; mais aussi recruter différents acteurs de l'immunité Innée (Bonneville M. et al., 2010).

En effet, l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 va leur permettre de mettre en place une réponse pro-inflammatoire, notamment en sécrétant plusieurs cytokines et chimiokines telles que de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  (Dunne M. et al., 2010). Notamment, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont faciliter le recrutement des neutrophiles puis interagir avec eux de façon à faciliter leurs actions de chimiotactisme et phagocytose (Agrati C. et al., 2009). De plus, les facteurs solubles sécrétés par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont favoriser la différenciation des neutrophiles en cellule présentatrice d'antigène et ainsi, permettre l'activation des LT  $\alpha\beta$  (Davey MS. et al., 2011).

De plus, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont aussi permettre la maturation des cellules dendritiques grâce à un contact direct mais aussi aux diverses cytokines qu'ils produisent. Ce contact va aussi permettre aux LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de proliférer et maturer. Ces derniers vont alors pouvoir réguler les macrophages et acquièrent la capacité d'agir en cellules présentatrices d'antigènes auprès de LT  $\alpha\beta$  naïfs pour les activer à leur tour (Brandes M. et al., 2005).

Mais les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ne sont pas seulement capables d'induire la fonction de cellule présentatrice d'antigène dans d'autre type cellulaire. En effet, ils sont eux-mêmes capables de remplir cette fonction grâce à l'expression de molécules de costimulation telles que CD80 après endocytose de composés exogènes, et présentation des antigènes dans leurs molécules du CMH (Brandes M. et al., 2005 ; Meuter S. et al., 2010).

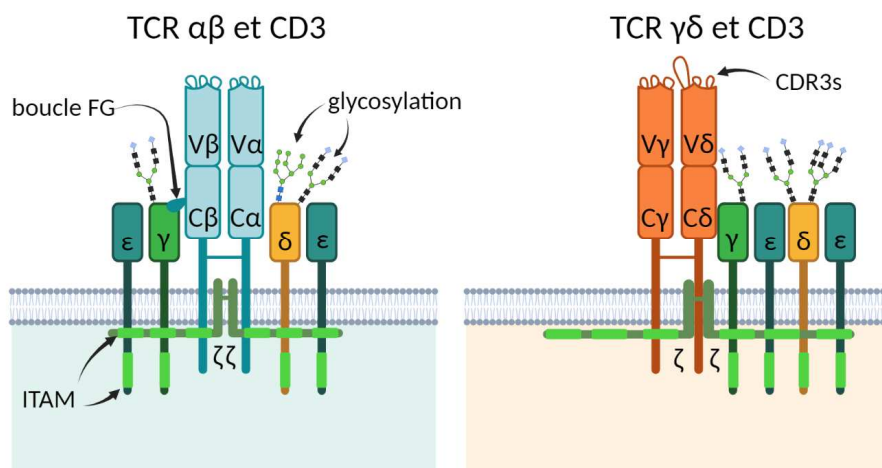
Aussi, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables d'influencer la réponse humorale en aidant à la maturation des LB et en leurs fournissent un support pour la production d'anticorps (Bansal R. et al., 2012).

#### D) Le récepteur T à l'antigène et corécepteurs

Le système immunitaire adaptatif se caractérise notamment par la présence de récepteurs issus de la recombinaison somatique. Ces récepteurs peuvent reconnaître une variété de molécules et on distingue le BCR des TCR  $\alpha\beta$  et TCR  $\gamma\delta$ . Les deux types de TCR sont constitués de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ou  $\gamma$  et  $\delta$  capables de se lier à leur antigène, associé à la protéine CD3 qui va transduire le signal. Les cellules présentant un TCR vont aussi exprimer de nombreux corécepteurs qui vont leur fournir des signaux complémentaires d'activation mais aussi des signaux inhibiteurs.

##### 1. *Le TCR, sa disposition et association au CD3*

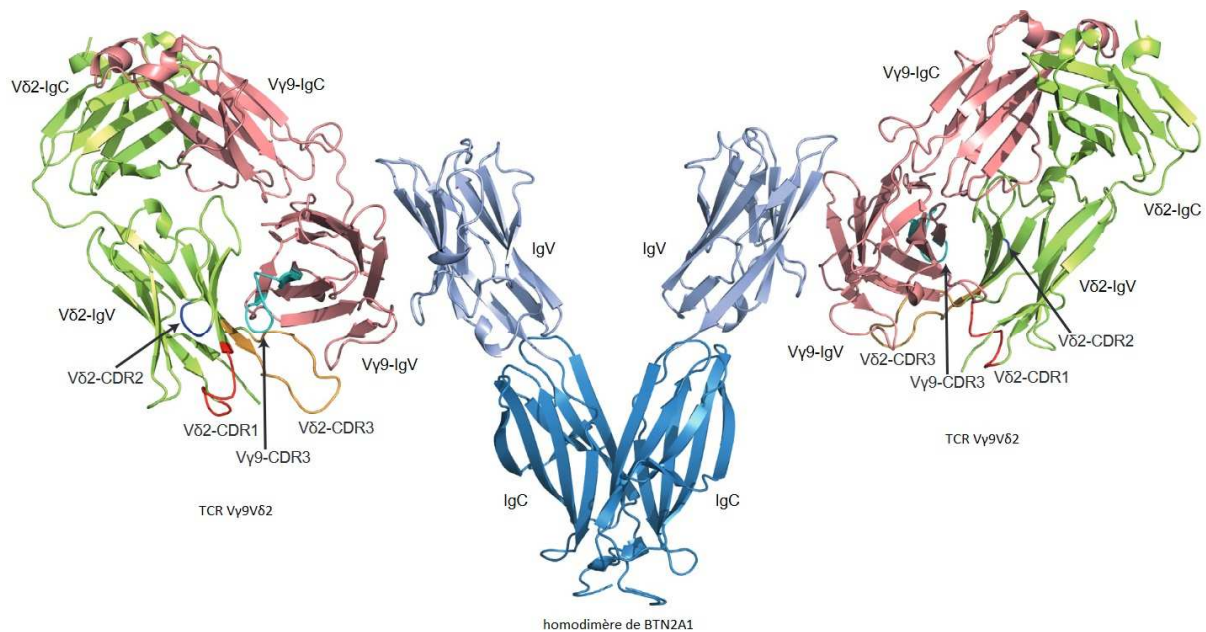
Bien que les régions variables (V) des TCR  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  présentent des similarités de structure, ce n'est pas le cas pour leurs régions constantes (C) (Allison TJ. et al., 2001). L'une de ces différences réside dans la région conservée qu'est la boucle FG. Cette dernière est bien plus petite dans la chaîne TCR- $\gamma$  comparée à celle du TCR- $\beta$ . Cette petite différence induit finalement un grand changement d'association. En effet, la boucle FG est supposée impliquée dans l'interaction TCR-CD3 et semble jouer un rôle dans la transduction du signal (Sasada T. et al., 2002 ; Touma M. et al., 2006) (Figure 6). Ces différences contenues dans les régions C des TCR  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  vont être responsable de plusieurs distinctions entre ces TCR. En effet, des variations dans l'assemblage au complexe CD3, sa glycosylation ou encore la liaison aux ligands de ces TCR peuvent être observées dues à ces variations des régions C (Morath A. et Schamel WW, 2020).



**Figure 6** Structure des TCR  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  humains et leur interaction différentielle au CD3. Le TCR  $\alpha\beta$  est composé des chaînes  $\alpha$  &  $\beta$  dont les régions des CDR3s porté par les parties variables des deux chaînes forment la zone d'interaction avec l'antigène. La boucle FG de chaîne  $\beta$  permet l'interaction avec la chaîne  $\gamma$  du complexe CD3. Les motifs intracellulaires activateurs portés les différentes chaînes du CD3 sont indiqués en vert (ITAM, pour immunoreceptor-based activation motif). Le TCR  $\gamma\delta$  s'associe différemment au CD3 puisque la boucle FC est ici bien plus petite. Ceci entraîne aussi une différence de glycosylation des chaînes du CD3. Adapté de Morath A. et Schamel W., 2020.

Récemment, la liaison entre le TCR  $V\gamma 9V\delta 2$  et son ligand a pu être mis en évidence (Karunakaran MM. et al., 2020). De façon surprenante pour les chercheurs habitués au fonctionnement des LT  $\alpha\beta$ , cette liaison repose entièrement sur le domaine variable de la chaîne  $V\gamma 9$  et n'implique pas directement les CDR (Figure 7). Cependant, ce modèle de liaison rejoint celui déjà observé entre les LT  $V\gamma 4$  et leur ligand le dimère BTNL3/8 (Willcox et al., 2019), et permet d'expliquer pourquoi les LT  $V\delta 2^+$  non- $V\gamma 9$  ne sont pas dépendants des pAg pour leur activation (Davey et al., 2018).

Cependant, les régions CDR3 semblent tout de même avoir une importance dans la détection des pAg puisque des mutations notamment au sein de la région CDR3 $\delta$  ont modulés la réponse des LT  $V\gamma 9V\delta 2$  (Wang H. et al., 2010). De plus, au sein d'une population de LT  $V\gamma 9V\delta 2$  issue d'un seul donneur, chaque clone de LT  $V\gamma 9V\delta 2$  va proliférer plus ou moins rapidement après stimulation et s'activer plus ou moins fortement (Hebbeler A. et al., 2007 ; Pauza C. et Cairo C., 2015) ce qui met en évidence une certaine diversité du TCR LT  $V\gamma 9V\delta 2$ .



**Figure 7** Modèle représentant l'interaction entre un dimère de BTN2A1 et le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Issu de Karunakaran MM. et al., 2020.

## 2. Les corécepteurs

### Absence des corécepteurs attendus

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont généralement dit double négatif car dépourvus des corécepteurs CD4 et CD8 classiquement retrouvés sur les LT  $\alpha\beta$ . Aussi, ils ne présentent pas ou en très faible quantité le corécepteur CD28 (Wang P. et Malkovsky M., 2000). Cette absence combinée à la différence de conformation du CD3 présent sur ces cellules peuvent expliquer la difficulté pratique à faire proliférer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à l'aide de billes CD3-CD28.

Toutefois, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 partageant certaines caractéristiques et fonctions avec l'immunité innée, sont loin d'être dépourvu de corécepteurs.

### Les corécepteurs NK

Renouant avec le côté immunité Innée des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, on retrouve à leurs surfaces de nombreux récepteurs de la famille NK (Pont F. et al., 2012). Notamment NKG2D qui fournit un signal activateur très important pour les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et est même capable de les activer en l'absence d'un signal TCR dans certaines conditions (Qin G. et al., 2009). NKG2D possède plusieurs ligands, généralement sur-exprimés en surface de cellules stressées. Notamment les molécules MICA et MICB du CMH de classe I non-classiques, ainsi que des molécules de type ULBP (Raulet D. et Guerra N., 2009).



Aussi, parmi les NKR inhibiteurs, NKG2A et ILT-2 induisent les signaux inhibiteurs les plus forts sur les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (Trichet V. et al., 2006). NKG2A s'associe au CD94 et reconnaît un ligand du CMH de classe I non-classique HLA-E (Poccia F. et al., 1997). Quant au ILT-2, celui-ci interagit avec la molécule HLA-G (Lesport E. et al., 2011).

### Les Toll-like Récepteurs

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 vont remplir leur fonction de sentinelle notamment grâce à l'expression de nombreux TLR qui leur permettent de détecter par exemple la présence de pathogène. Les TLR reconnaissent des CAMP (changed associated molecular pattern) qui peuvent être des DAMP (danger associated molecular pattern) ou des PAMP (pathogen associated molecular pattern). Ces ligands sont des molécules non-peptidiques hautement conservées et surexprimées en cas de stress cellulaire (Devilder MC. et al., 2009). Contrairement aux observations faites pour les NKR, les TLR ne semblent pas capables d'induire une activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en l'absence de signalisation TCR (Wesh D. et al., 2011).

### Les récepteurs Fc

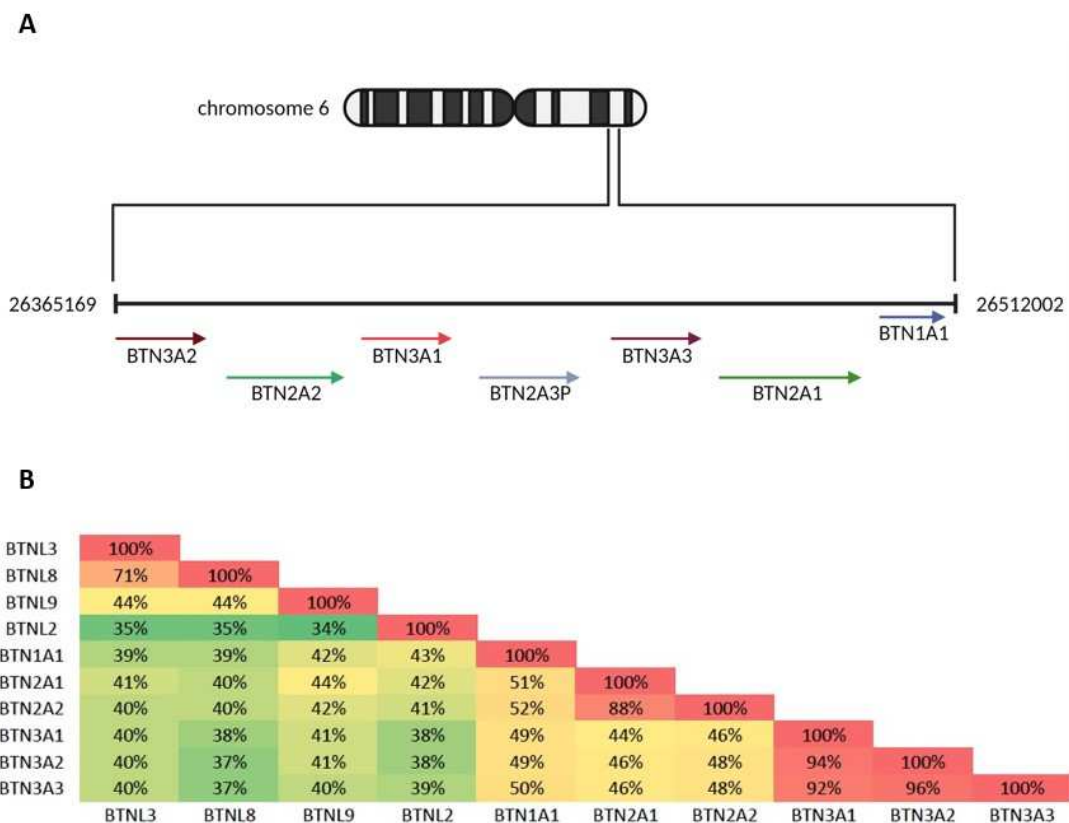
Un autre type de récepteur présent en surface des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est la famille des FcR, qui vont lier le domaine constant des immunoglobulines. Chez les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, on retrouve notamment l'expression du Fc $\gamma$ R11A (CD16) qui, malgré sa faible affinité pour les anticorps, permet de conduire à une cytotoxicité des cellules cibles par ADCC (Tokuyama H. et al., 2008).

Ainsi, tous les corécepteurs décrits ci-dessus vont moduler la réponse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 grâce à l'induction de signalisations indépendantes ou synergiques.

## Chapitre 4 : Les butyrophilines, une famille émergente de régulateurs immunitaires

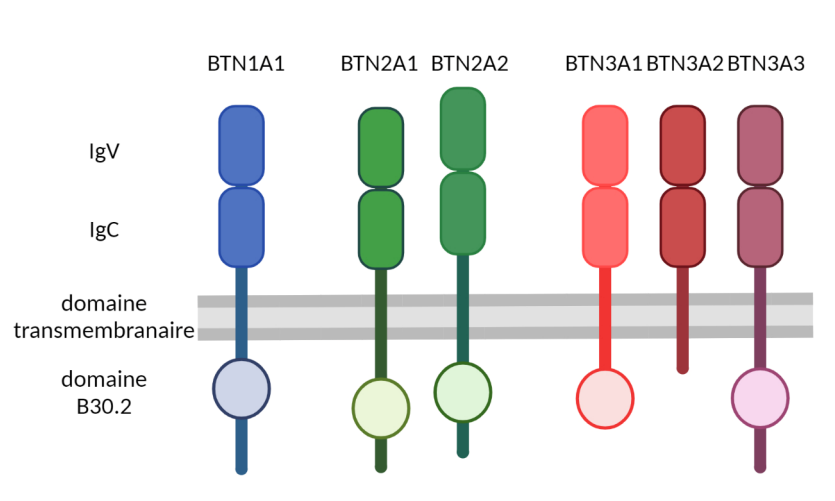
### A) Généralités

Les butyrophilines (BTN) sont des molécules de la superfamille des B7, comme par exemple CD80 ou PD-L1. Les gènes des BTN1 et BTN2 sont apparus avec l'évolution des vertébrés (Rhodes DA et al., 2018) ; tandis que ceux des BTN3 ont co-émergés avec les gènes des TCR- $\gamma$  et  $\delta$ , lors de l'apparition des mammifères placentaires (Fichtner AS et al., 2020). Les gènes codant pour les BTN forment un cluster localisé dans la région télomérique du complexe du CMH de classe I sur le chromosome 6p22.2 (Figure 8A). Ce cluster regroupe les six membres fonctionnels (BTN1A1, BTN2A1/2A1, BTN3A1/3A2/3A3) et le pseudogène de BTN2A3. Un cluster associé codant pour des molécules dites BTN-like (BTNL2/3/8/9) que nous ne détaillerons pas ici est retrouvé proche du locus du CMH de classe II (Rhodes DA. et al., 2001). Les gènes des BTN présentent une homologie de séquence d'environ 90% au sein de chaque famille et 50% entre elles (Henry J. et al., 1997) (Figure 8B).



**Figure 8** Les gènes des butyrophilines humaines. A) Les gènes codant pour les BTN humaines sont retrouvés sur le chromosome 6 en p22.2 et B) présentent de grandes homologies de séquence (d'après Abeler-Dörner L. et al., 2012).

Les protéines des BTN sont composées de deux domaines extracellulaires immunoglobulines (IgV et IgC). Leurs régions cytoplasmiques sont plus grandes que celles de la plupart des autres récepteurs immunitaires de la famille des Ig, et contiennent un domaine juxtamembranaire ainsi qu'un domaine B30.2 appelé aussi PRYSPRY (à l'exception de BTN3A2) (Figure 9). Malgré leur forte homologie et le partage du domaine B30.2, chaque B30.2 semble avoir évolué indépendamment pour développer une forte affinité à un ligand spécifique. De ce fait, les BTN remplissent diverses fonctions qui découlent de la liaison de leurs ligands dans le domaine B30.2. Par exemple, la molécule éponyme du groupe, BTN1A1, régule la quantité de gras contenu dans le lait et est ainsi retrouvée dans les membranes des cellules épithéliales des glandes mammaires (Ogg SL. et al., 2004).



**Figure 9 Structure des butyrophilines (BTN).** Les différents membres de la famille des BTN sont tous composés de deux domaines extracellulaires IgV et IgC et d'une région transmembranaire. C'est dans leurs régions intracellulaires que l'on retrouve le domaine B30.2 (excepté sur BTN3A2 qui en est dépourvu).

Cependant, les BTN sont principalement connues pour leur rôle d'immunomodulateurs, notamment via la modulation de l'activité des LT  $\gamma\delta$  (Harly C. et al., 2012 ; Vantourout P. et al., 2018 ; Karunakaran MM. et al., 2020). Aussi, leur rôle de biomarqueur pronostic est de plus en plus étudié. Une étude a pu mettre en évidence une corrélation entre la surexpression de BTN2A1 et BTN3A1 et un meilleur infiltrat immunitaire ainsi qu'un meilleur pronostic dans le contexte de cancer du sein (Ren H. et al., 2021).

## B) BTN3A

Les BTN3A regroupent trois isoformes dont le rôle ne serait pas uniquement de participer à l'activation des LT  $\gamma\delta$ . En effet, des études ont pu mettre en évidence le rôle régulateur voire inhibiteur de la réponse immunitaire T que les BTN3A peuvent mettre en place (Compte E. et al., 2004 ; Yamashiro H. et al., 2010). Par exemple, des cellules exprimant les

BTN3A ont pu diminuer la prolifération de LT ainsi que leur production de cytokines de type Th1 (Cubillos-Ruiz J. et al., 2010). Aussi, lors de l'engagement des BTN3A présents en surface des monocytes et cellules dendritiques à l'aide d'un anticorps, une régulation des cytokines pro-inflammatoires produites a pu être observé, notamment pour l'IL-8 et IL-12 (Simone R. et al., 2010). Aussi, les BTN3A semble être liées au CD45 en surface des LT  $\alpha\beta$ , leur confèrent ainsi un rôle de régulateur de la formation des synapses de ces effecteurs (Payne K. et al., 2020). Ainsi, les fonctions des BTN3A semblent tout de suite plus complexe et très impliqué dans la régulation des réponses immunitaires.

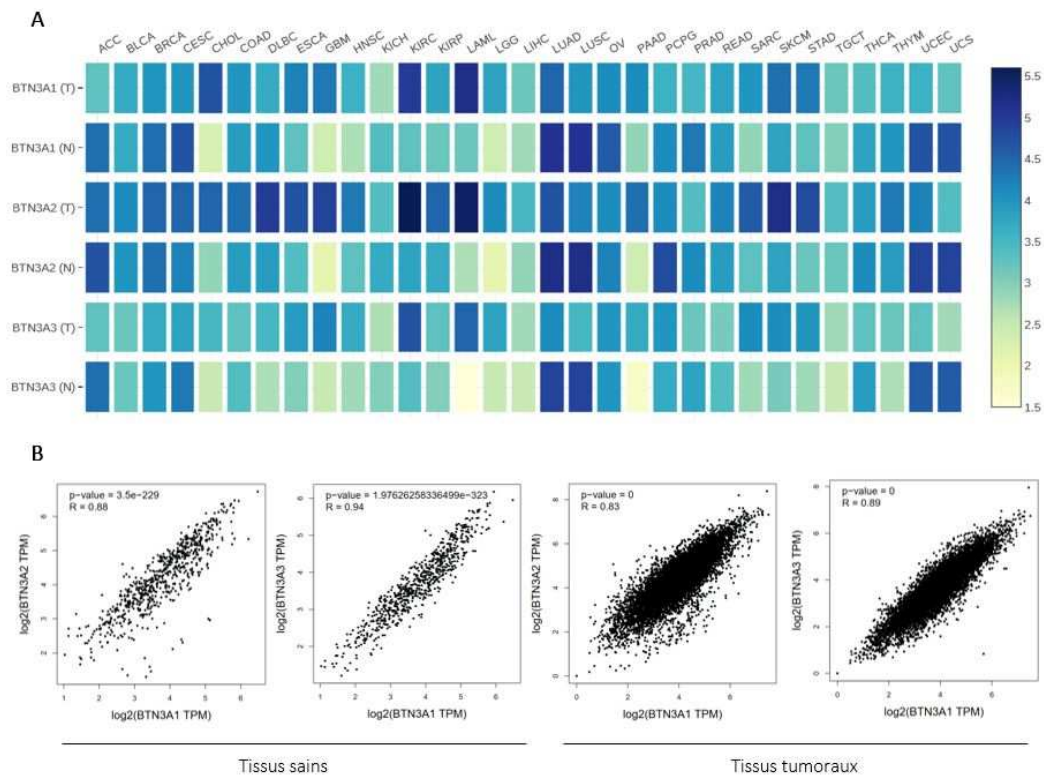
Les gènes des BTN3A sont exprimés de façon faible mais ubiquitaire, bien que leurs taux d'expressions varient d'un tissu à l'autre et en fonction du statut néoplasique dudit tissu (Figure 10A). Aussi, la régulation de l'expression de ces gènes est encore mal comprise bien que leur facteur de transcription a été mise en évidence récemment (Dang AT. et al., 2020). Bien que ces gènes semblent être exprimés de façon corrélée au sein d'un tissu sain, cette corrélation semble moins franche dans le cadre d'un cancer, laissant supposer que NLC5, le facteur de transcription identifié comme responsable de la production des BTN3A, pourrait être complété ou régulé par un ou plusieurs autres facteurs de transcription (Figure 10B).

La protéine de cette famille qui a reçu le plus d'attention ces dernières années est la BTN3A1 après la découverte de son implication clé dans la réactivité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en 2012 (Harly C et al., 2012). Celle-ci est capable de lier un petit métabolite phosphorylé appelé pAg dans son domaine B30.2. Cette liaison intracellulaire serait alors responsable d'un signal de type « inside-out » induisant un changement de conformation nécessaire à l'activation TCR-dépendante des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. De part cette fonction primordiale de liaison de l'antigène, il était supposé que BTN3A1 lie directement le TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En 2013, une interaction directe certes faible mais présente avait été rapportée (Vavassori S. et al., 2013). Finalement, cette hypothèse fût contredite dès l'année suivante par une autre équipe démontrant bien l'importance de BTN3A1 mais son absence de liaison directe au TCR (Sandstrom A. et al., 2014). Aucune autre étude à ce jour n'a pu mettre en évidence de liaison directe entre ces deux molécules et cette hypothèse a donc été délaissée.

Les BTN3A regroupent aussi deux autres isoformes : BTN3A2 et BTN3A3. BTN3A2 est dépourvu de domaine B30.2 et, de façon intéressante, son expression est augmentée dans certains cancers tels que les adénocarcinomes pancréatiques, les leucémies myéloïdes aiguës, les cancers gastriques (Benyamine A. et al., 2016 ; Zhu M. et al., 2017) (Figure 7A). Cette surexpression est même associée à un bon pronostic dans les cancers de l'ovaire épithélial (Le Page C. et al., 2012). En plus de son intérêt de biomarqueur potentiel dans certains

cancers susmentionnés, il est supposé que BTN3A2 serait essentiel pour permettre l'acheminement à la surface de BTN3A1 (Vantourout P. et al., 2018).

Le dernier isoforme de cette molécule est BTN3A3. Cette dernière possède bien un domaine B30.2 mais ce dernier présente une mutation en position 351 où une arginine prend la place d'une histidine (Sandstrom A. et al., 2014). Cette unique mutation rend impossible la fixation du pAg sur BTN3A3 qui ne peut donc pas activer les LT Vγ9Vδ2.

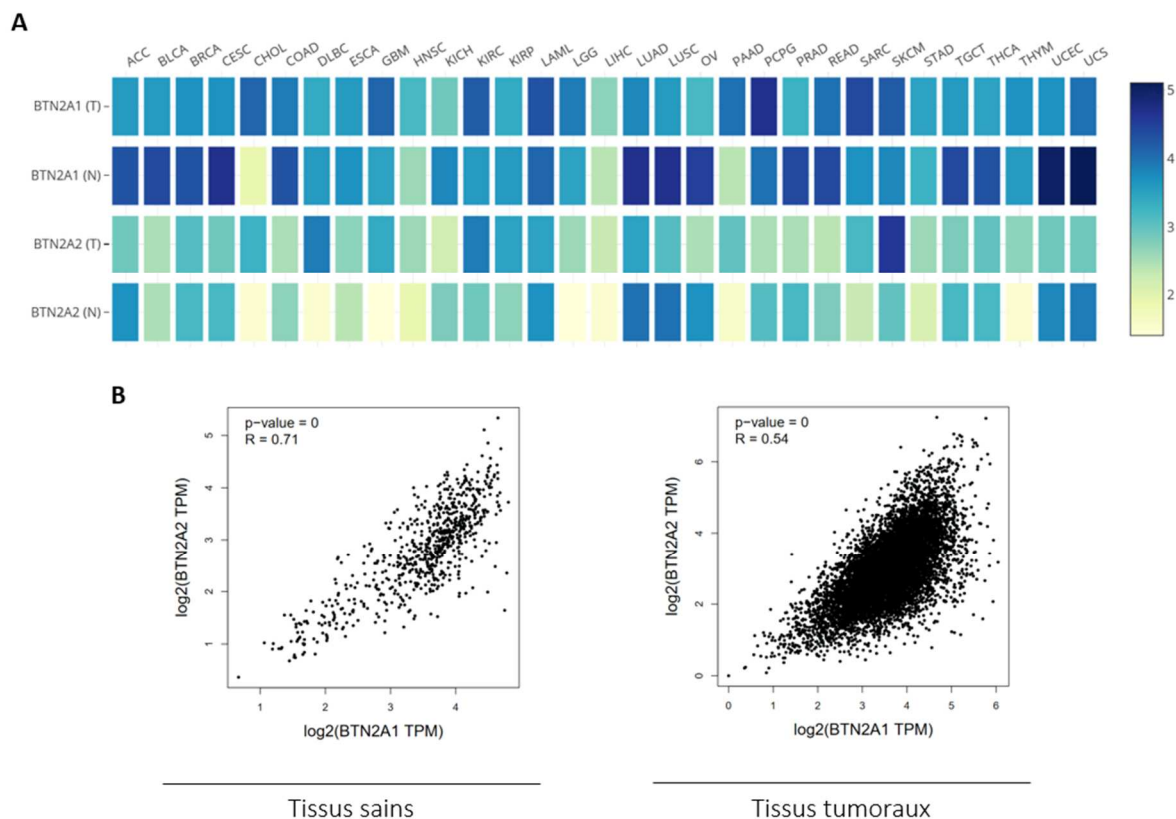


**Figure 10** Profil d'expression des BTN3A dans les tissus sains et tumoraux. **A)** Taux d'expression des différents gènes de BTN3A en fonction de différents tissus tumoraux ou normaux associés. Data issues de GEPIA et analysées avec Plotly. **B)** Spearman corrélation de l'expression des gènes de BTN3A1 avec BTN3A2 (gauche) ou BTN3A3 (droite), au sein de tissus sains ou tumoraux calculé par GEPIA. (ACC : Carcinome adénocortical ; BLCA : carcinome urothélial ; BRCA : carcinome invasif du sein ; CESC : carcinome cervical et adénocarcinome endocervical ; CHOL : cholangiocarcinome ; COAD : cancer colorectal ; DLBC : lymphome diffus à grandes cellules B ; ESCA : cancer de l'œsophage ; GBM : glioblastome multiforme ; HNSC : carcinome squameux de la tête et du cou ; KICH : carcinome rénal chromophile ; KIRC : carcinome rénal à cellules claires ; KIRP : carcinome rénal papillaire ; LAML : leucémie myéloïde aigüe ; LGG : gliome cérébral de bas grade ; LIHC : carcinome hépatocellulaire du foie ; LUAD : adénocarcinome des poumons ; LUSC : carcinome squameux du poumon ; MESO : mésothéliome ; OV : carcinome séreux ovarien ; PAAD : adénocarcinome pancréatique ; PCPG : phéochromocytomes et paragangliomes ; PRAD : adénocarcinome de la prostate ; READ : adénocarcinome du rectum ; SARC : sarcome ; SKCM : mélanome cutané ; STAD : adénocarcinome de l'estomac ; TGCT : tumeurs des cellules germinales testiculaires ; THCA : carcinome thyroïdien ; THYM : thymome ; UCEC : carcinome de l'endomètre ; UCS : carcinosarcome utérin ; UVM : mélanome uvéal) (GEPIA : <http://gepia.cancer-pku.cn/index.html> ; Plotly : <https://plotly.com/>).

On remarque donc ici que les différences entre ces isoformes sont principalement retrouvées dans leur partie intracellulaire. En effet, les BTN3A possèdent 95% d'homologie dans leur partie extracellulaire ce qui complique leur étude. A ce jour, il n'y a pas d'anticorps spécifique permettant de les distinguer les uns des autres. Toutefois, il existe des anticorps dirigés contre les trois isoformes qui permettent de moduler l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ainsi, un anticorps agoniste nommé 20.1 et un antagoniste appelé 103.2 ont pu être utilisés pour cette étude (Palakodeti A., et al., 2012).

### C) BTN2A

La sous-famille des BTN2A regroupe 2 molécules BTN2A1 et BTN2A2 ainsi qu'un pseudogène, BTN2A3. Les deux isoformes possèdent le domaine B30.2 mais des rôles bien différents. Contrairement aux BTN3A dont l'expression des différents isoformes est corrélée au sein de tissus sains, l'expression de BTN2A1 et BTN2A2 semblent indépendantes l'une de l'autre (Figure 11).

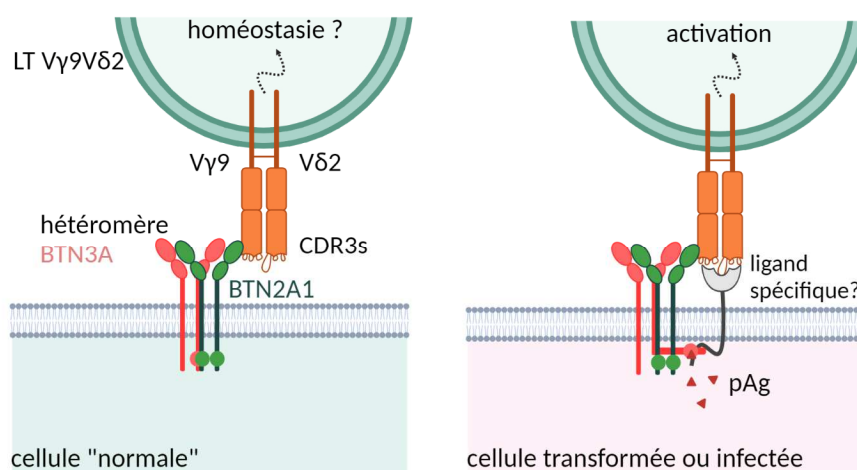


**Figure 11** Expression différentielle des BTN2A1 et BTN2A2 au sein des tissus sains et tumoraux. **A)** Taux d'expression des différents gènes de BTN2A en fonction de différents tissus tumoraux ou normaux associés. Data issues de GEPIA et analysées avec Plotly. **B)** Spearman correlation de l'expression des gènes de BTN2A1 et BTN2A2, au sein de tissus sains ou tumoraux calculé par GEPIA.

BTN2A2 semble jouer plusieurs rôles dans différentes conditions. En effet, BTN2A2 jouerait un rôle important en ostéoimmunologie puisqu'il est impliqué dans la différenciation des ostéoclastes (Frech M. et al., 2021). Aussi, il a récemment été montré chez la souris l'importance de *btn2a2* sur les ILC2 en tant que forte molécule de costimulation négative pour réguler l'axe ILC2-LT dans le cadre d'une inflammation (Frech M. et al., 2022).

Dans un premier temps, il a été démontré que BTN2A1 est un ligand de DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin aussi connu sous CD209) présent sur les cellules dendritiques immatures dérivées de monocytes mais ce, uniquement dans un contexte tumoral (Malchereck G. et al., 2007).

Plus récemment, BTN2A1 reçoit une attention toute particulière par la communauté de chercheurs car il a pu être identifié comme étant le contributeur indispensable de l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 qu'il restait à identifier (Karunakaran MM. et al, 2020 ; Rigau M. et al., 2020). En effet, BTN2A1 est capable de former un complexe avec BTN3A1 et se lie à la chaîne V $\gamma$ 9 du TCR. Ainsi, Karunakaran et son équipe proposent alors un nouveau modèle d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 : BTN2A1 et BTN3A1 forment des dimères, puis la fixation du pAg dans le domaine B30.2 de BTN3A1 permettrait à BTN2A1 de se fixer au TCR. Contrairement à ce qui pourrait être attendu par comparaison au mécanisme d'activation d'un TCR  $\alpha\beta$ , les régions CDR du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ne semble pas impliquées dans cette reconnaissance. Ceci laisse la porte ouverte à la possibilité d'un troisième parti se liant aux CDR du TCR qu'il resterait à découvrir (Figure 12).



**Figure 12** Représentation schématique du mécanisme d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 selon les dernières avancées (Adapté de Karunakaran NM. et al., 2020).

# OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE



## I. Objectifs des travaux de recherche

Après avoir été ignorées pendant plusieurs années, les populations de LT  $\gamma\delta$  ont finalement vu grandir l'intérêt pour leur utilisation dans les immunothérapies antitumorales. De par ses fonctions particulièrement intéressantes, la sous-population de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est notamment au centre des attentions puisqu'elle est impliquée dans plusieurs études cliniques. Toutefois, le fait de ne pas comprendre pleinement les conditions de leur activation antigénique freine la mise en place de ces études.

Après l'identification de l'importance de BTN3A1 dans l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, plusieurs équipes ont cherché à mettre en évidence le rôle des autres isoformes de BTN3A dans cette activation. Aussi, la question du ligand direct du TCR restait entière au commencement de ce travail de thèse puisque la liaison directe entre BTN3A1 et le TCR n'a pas pu être détectée. Le fait de ne pas réussir à cristalliser cette interaction a soulevé plusieurs questions dont la principale : celle-ci nécessite-t-elle la présence d'un partenaire ? S'agit-il de BTN3A2, BTN3A3 ou une autre molécule inconnue ?

De plus, la synapse immunologique formée par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 n'a pas été étudiée depuis la mise en évidence de l'implication des BTN et, même avant cela, seule une étude semblait s'y être intéressée (Favier B. et al., 2003). Les synapses formées par les cellules immunitaires présentent des différences et spécificités entre elles. Comme les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 partagent des caractéristiques et récepteurs avec les deux pans de l'immunité, il semblait intéressant de chercher à observer le type de synapses que ces derniers mettent en place.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a été de consolider les connaissances sur l'implications des isoformes de BTN3A dans le contexte de l'activation génique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et plus largement, d'étudier la synapse immunologique formée par ceux-ci.

## II. Démarche scientifique

Les techniques d'imageries sont parfaitement adaptées à l'étude de distribution cellulaire de protéines. De fait, le microscope est un système qui permet d'observer à fort grossissement des objets non visibles à l'œil nu. Ainsi, cet outil est particulièrement intéressant en biologie. La technique d'imagerie confocale de fluorescence permet d'obtenir des images de haute résolution. Ces images correspondent à des « coupes optiques » qui peuvent être obtenues à différents niveaux dans l'épaisseur de l'échantillon observé. Cette technique permet d'éliminer les signaux de fluorescence provenant des régions en dehors du plan focal et ainsi, d'observer l'intérieur ou la membrane d'une cellule, en limitant le parasitage.

Toutefois, même en ayant de parfaits objectifs, un alignement optimal et de belles ouvertures numériques, la résolution optique de cette technique est limitée par la diffraction à environ la moitié de la longueur d'onde de la lumière utilisée. Afin d'essayer de dépasser cette limite, plusieurs techniques de super-résolution ont été développées au cours des deux dernières décennies. Parmi ces dernières, la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) ou microscopie à champ évanescent, est une forme de microscopie de fluorescence où la lumière d'excitation est confinée à une petite zone au niveau de l'interface entre l'échantillon et son support. Ainsi, cette technique présente un grand intérêt pour l'étude de protéines membranaires.

Aussi, les interactions cellule-cellule gouvernent de nombreux processus biologiques mais ces interactions ont toujours été difficiles à étudier. L'un des principaux outils qui a émergé pour répondre à ce problème est l'utilisation de SLB (glass-Supported lipid bilayers) (Dustin M., 2009). M. Dustin et ses collègues ont développé et adapté cette technique à l'étude de la synapse immunologique formée entre un LT  $\alpha\beta$  et une cellule présentatrice d'antigène.

Lors de ce travail de thèse, j'ai eu l'opportunité de démarrer et d'entretenir une collaboration avec le Pr. M. Dustin et son équipe de l'université d'Oxford. Lors de déplacements, j'ai notamment pu apprivoiser et utiliser la technique de SLB combiné à l'utilisation d'un microscope TIRF dans le but d'apporter quelques réponses aux problématiques de départ.

# RESULTATS

# Chapitre 1 : Etude et caractérisation d'un anticorps anti-BTN3A

## A) Introduction

Comme énoncé dans le Chapitre 4, le taux de BTN3A en surface des cellules est modifié en cas de transformation tumorale et notamment augmenté dans plusieurs cancers solides (par exemple dans les mélanomes, les cancer colorectaux ou encore ovariens) mais aussi hématologiques (leucémies et lymphomes). Ainsi, l'utilisation d'un anticorps anti-BTN3A va rendre ces cellules tumorales sensibles à la reconnaissance et l'élimination par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Fondée notamment sur la base des travaux du Pr. D. Olive, ImCheck Therapeutics s'adonne tout particulièrement au développement de nouveaux thérapeutiques en immunoncologie ciblant différentes BTN ou BTNL. En l'occurrence, ils ont pu développer un anticorps anti-BTN3A capable d'activer les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Il s'agit ici de l'anticorps ICT01 qui fait désormais l'objet d'une étude clinique de phase I/IIa nommée EVICTION (NCT04243499).

Lors du début de mon contrat, l'étude de cet anticorps était déjà très avancée tant *in vitro* qu'*in vivo*. Pour essayer d'apporter des informations physiologiques concernant cet outil, je me suis intéressée à la clearance de cet anticorps à la surface des cellules cibles. En effet, bien que les BTN3A soient exprimées de façon relativement faible à la surface des cellules, cette expression reste ubiquitaire et de fait, la quantité d'anticorps injecté ne correspondra pas à la quantité d'anticorps à la zone d'intérêt. Aussi, une fois l'anticorps fixé à sa cible, reste la question du délai avant élimination par la cellule tumorale.

## B) Méthodologie

### 1. Culture cellulaire

Différentes lignées cellulaires tumorales ont été utilisées dans cette étude afin d'étendre l'observation à différents types tumoraux : les lignées cellulaires PC3 (cancer de la prostate), SKOV3 (cancer de l'ovaire), U87 (glioblastome), LN18 (gliome), KHOS (ostéosarcome), HT29 (cancer colorectal). Ces dernières ont toutes été cultivées en milieu adapté et utilisées avant 15 passages.

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 utilisés sont issus du sang de donneurs sain obtenu à l'EFS (établissement français du sang). Une fois les PBMC isolées par gradient de densité, les cellules sont mises en plaque à raison de  $1.10^6$  cellules par puits et traité avec de l'IL-2 et du BrHPP (Bromohydrine

Pyrophosphate) qui est un analogue de synthèse de l'IPP. Les cellules sont ensuite placées à incubation et supplémentées en IL-2 après 4 jours. 21 jours après la stimulation, un contrôle de la pureté de la population est réalisé par marquage en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD3 et anti-V $\delta$ 2. Seules les populations ayant une pureté en LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 supérieure à 85% sont conservées. À la suite de cette amplification spécifique, ces populations peuvent être amplifiées de façon non spécifique par activation PHA-feeders.

Pour ce faire, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont mis en petite flasque à raison de  $0,3 \cdot 10^6$  cellules par flasque. Des cellules nourricières (dites feeders) sont ajoutées après avoir été irradiées à 5Gy, il s'agit d'un mélange de PBMC issus de 3 donneurs différents ainsi que de deux lignées de B.EBV (LB transformés avec l'Epstein-Barr Virus). Enfin, de la PHA est ajoutée et les cellules sont cultivées pendant 21 jours avant de pouvoir être utilisées. Là aussi, une vérification de la pureté est effectuée.

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 utilisés ici ont subi seulement une amplification spécifique ou alors une seule amplification non-spécifique avant leurs utilisations.

## 2. Cytométrie en flux

Différents tests de réactivité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ont été réalisés. Pour ce faire, différents types de cellules tumorales sont mis en coculture pendant 4h avec des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en ratio effecteurs:cibles de 1:1. Un anticorps anti-CD107a est ajouté au moment de la coculture avec de l'annexine pour identifier les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ayant dégranulés. Une fois cette coculture terminée, un marquage avec un anticorps anti-V $\delta$ 2 est effectué. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un Accuri C6+ puis les résultats ainsi obtenus sont analysés grâce au logiciel FlowJo V10 puis GraphPad Prism 9.

## 3. Sphéroïdes

Pour former des sphéroïdes, des microplaques 96 puits spécifiques ont été utilisées. Ces dernières sont dites ULA (ultra-low attachment surface) ce qui permet de forcer l'adhérence des cellules entre-elles plutôt que sur la plaque. Des cellules SKOV3 ont été utilisées seules ou mélangées avec des HFF-2, une lignée de fibroblastes humains non transformés, en ratio 2:1. Elles sont ensuite marquées au eFluor-670 et enfin  $1,5 \cdot 10^4$  cellules sont déposées par puits et placées à incubation. Les sphéroïdes sont cultivés comme tel pendant 7 jours durant lesquels le milieu de culture est régulièrement remplacé. Des tests de réactivité et sensibilisation sont alors réalisés.

Pour ce faire, les sphéroïdes sont traités, ou non, pendant 24h à l'aide de l'anticorps ICT01 ou de zolédronate, un agent pharmaceutique permettant de bloquer la voie de synthèse des mévalonates et ainsi augmenter la quantité d'IPP au sein des cellules. Les sphéroïdes sont

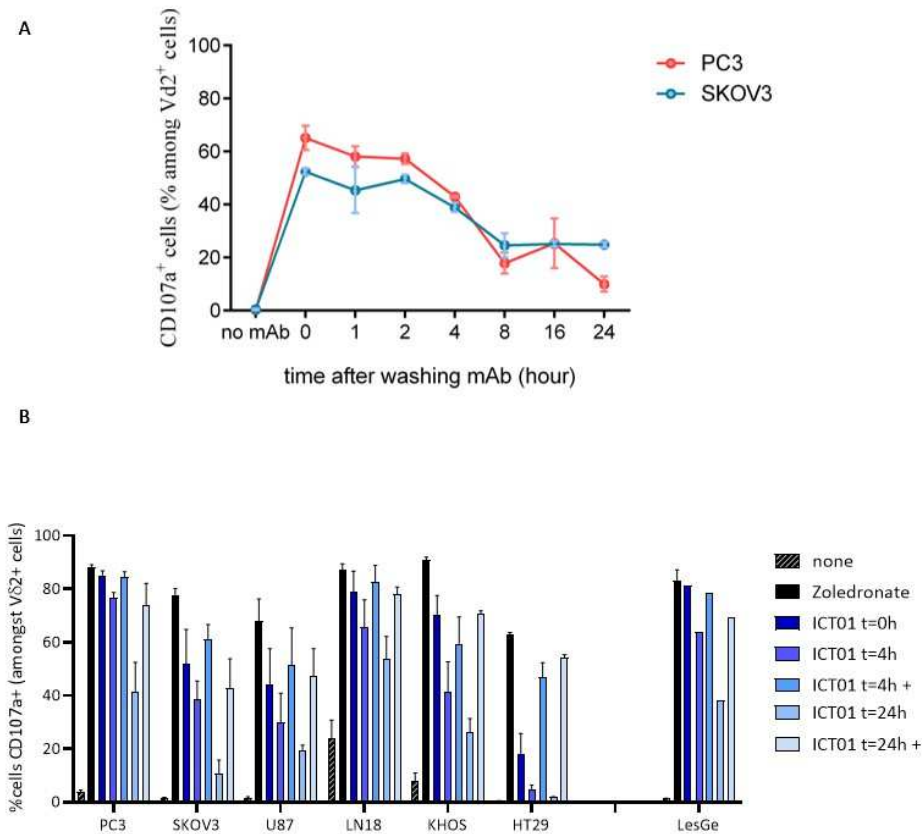
ensuite délicatement rincés. Des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont marqués à l'aide de CellTrace calcein green avant d'être ajouté aux sphéroïdes dans un ratio effecteurs:cibles de 10:1. La coculture est maintenue à incubation pendant 6h avant fixation à l'aide d'un tampon de fixation pendant 1h à 4°C puis perméabilisation à l'aide de PBS-Triton 2% sur la nuit à 4°C.

#### 4. Microscopie

Pour identifier une potentielle internalisation de l'anticorps par les cellules tumorales, des cellules SKOV3 ont été déposées dans une plaque Ibidi 8 puits puis traitées avec l'anticorps ICT01. Un anticorps secondaire est utilisé tout de suite après ou 16h plus tard afin de détecter ICT01. Pour pouvoir situer l'emplacement de l'anticorps au sein de la cellule, des marquages des membranes à l'aide de WGA, ainsi que du noyau avec du Hoechst et des lysosomes avec du LysoTracker sont réalisés. Les cellules sont ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1 et les images sont ensuite analysées grâce au logiciel Fiji.

#### C) Principaux résultats

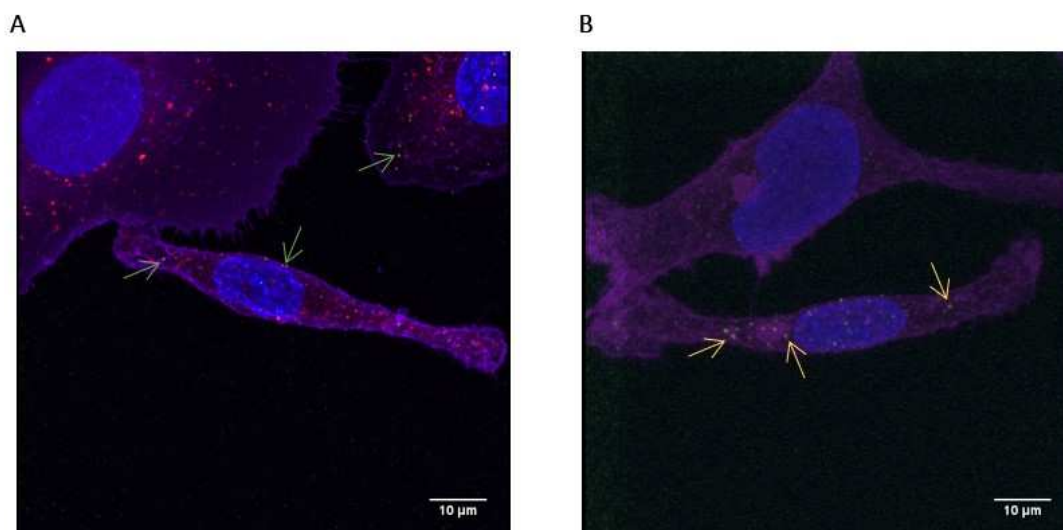
Dans un premier temps, une étude de sensibilisation a été réalisé pour déterminer combien de temps après traitement avec l'ICT01 les cellules restent sensibles aux LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Pour ce faire, après un traitement d'une heure à l'ICT01, des SKOV3 et PC3 ont été lavées et mises en coculture avec des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 après différents temps de culture ([Figure 13A](#)). En l'absence d'une quelconque stimulation, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ne sont pas capables de s'activer seuls face aux PC3 ni aux SKOV3. L'utilisation d'un traitement à l'ICT01 préalable à la coculture permet de sensibiliser ces deux types cellulaires à l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de façon importante (~70%). Celle-ci semble stable pendant 2h avant de commencer à décroître. Toutefois, une certaine sensibilisation reste détectable 24h après traitement puisque, par exemple, 40% des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 s'activent face aux cellules PC3 dans cette condition. L'intérêt de l'utilisation d'ICT01 ayant déjà été prouvé par les équipes d'ImCheck Therapeutics sur des tumeurs liquides, la question s'est posée pour les tumeurs solides. Une variété de lignées tumorales a donc été testée ici ([Figure 13B](#)). On observe une disparité de sensibilisation à l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en fonction de la lignée tumorale observée. Par exemple, bien que face aux SKOV3 les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 s'activent à hauteur de 65%, on ne retrouve pas une aussi bonne sensibilisation avec des cellules HT29 (~20%). Cependant, dans tous les cas on peut voir qu'un nouvel ajout d'ICT01 au moment de la coculture rétablit le niveau maximal d'activation observé. Ainsi, on peut se demander si l'anticorps se fait internaliser puis éliminer par les cellules cibles.



**Figure 13** La sensibilisation induite par ICT01 est stable pendant plusieurs heures avant de décroître, mais peut être rétablie. **A)** PC3 et SKOV3 ont été traité à l'ICT01 (10µg/mL) pendant 1h avant d'être lavé et placé à l'incubateur pendant différents temps. Une coculture de 4h en ratio E:C de 1:1 est réalisé avec des LT Vγ9Vδ2 en présence d'anticorps anti-CD107a. **B)** Différentes lignées tumorales ont été traité avec ICT01 (10µg/mL) pendant 1h puis mise en coculture avec des LT Vγ9Vδ2 0, 4 ou 24h plus tard. Les conditions « + » correspondent à un nouvel ajout d'ICT01 au moment de la coculture. Moyennes ± SD, n=4

Pour répondre à cette question, des SKOV3 ont été traitées avec ICT01 puis marquées et, grâce à différents marquages, sa localisation a pu être établie (Figure 14). Immédiatement après la sensibilisation, on retrouve quelques spots au niveau de la membrane des SKOV3, indiquant bien un marquage des BTN3A par cet anticorps. Aussi, ces molécules ont un faible taux d'expression, ce qui peut expliquer la petite quantité de marquage visible. Lorsque l'on observe les cellules 16h après traitement, on retrouve de l'anticorps au niveau de la membrane, mais surtout en intracellulaire, au niveau des lysosomes puisqu'on observe une colocalisation entre les deux marquages. Par conséquent, on peut supposer que la diminution de la sensibilisation induite par ICT01 peut venir du simple renouvellement des molécules cibles en surface.

Aussi, le but était d'évaluer l'intérêt de l'utilisation d'ICT01 dans le contexte d'une tumeur solide. Il semblait donc important d'essayer de s'affranchir de la culture 2D comme réalisée précédemment. Pour ce faire, une culture 3D a été mise en place afin de déterminer



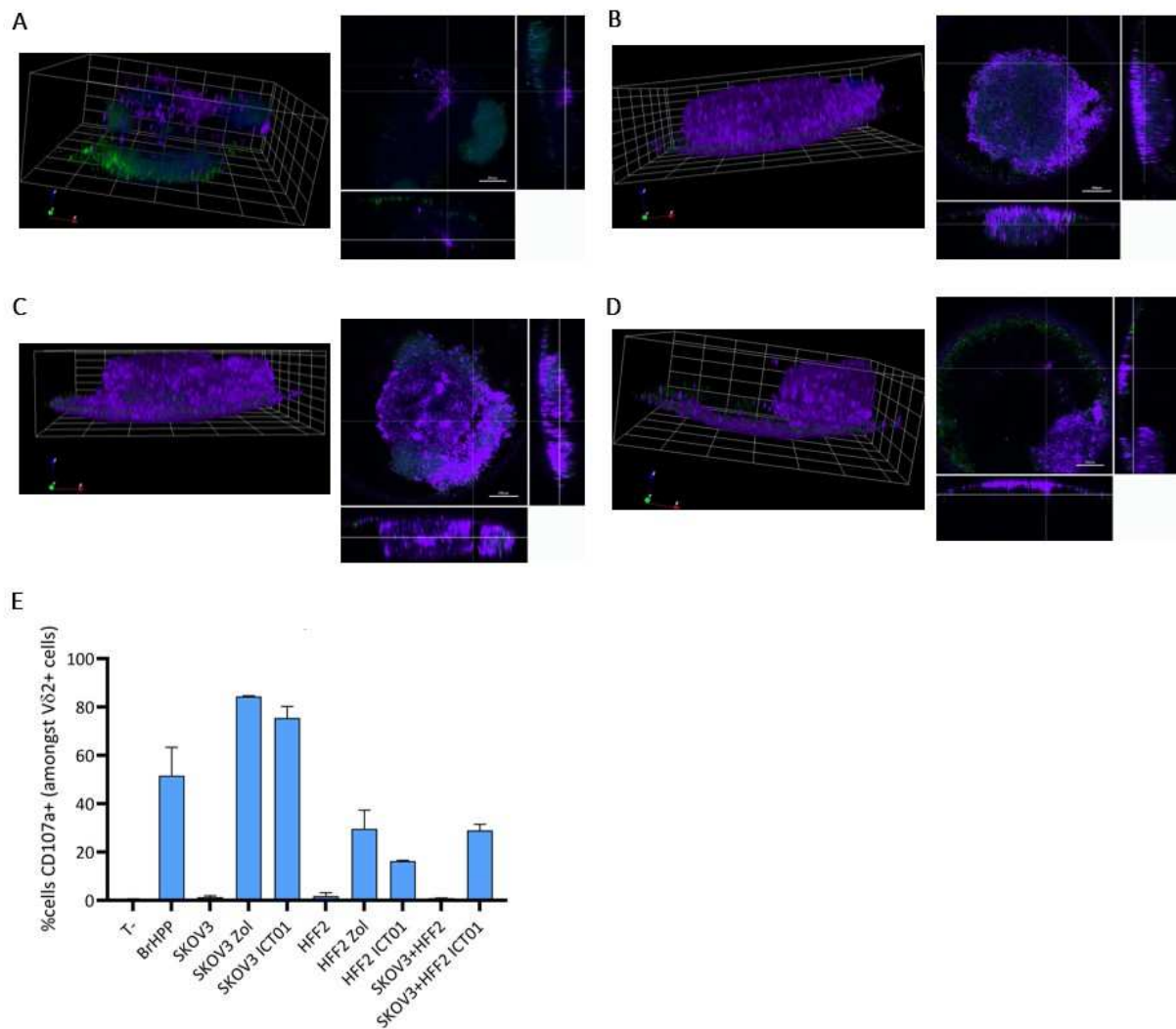
**Figure 14** ICT01 est internalisé et détruit dans les lysosomes. Des SKOV3 sont déposées en plaque IBIDI 8 puits et traité à l'ICT01 (10 $\mu$ g/mL) pendant 1h avant lavage. Ensuite, elles sont perméabilisées puis les membranes sont marquées à l'aide de WGA, les noyaux avec du Hoechst et un anticorps secondaire est utilisé pour détecter ICT01 soit **(A)** immédiatement après traitement, soit **(B)** après 16h d'incubation. Les cellules sont observées au microscope confocal Nikon A1. Images représentatives de 2 expériences indépendantes, n $\geq$ 20 cellules par condition.

le potentiel de sensibilisation et pénétration des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 au sein de la masse tumorale. Des sphéroïdes de cellules tumorales SKOV3 mélangées ou non à des fibroblastes non transformés ont été réalisés. Ces derniers ont ensuite été traité à l'ICT01 pendant 24h avant d'être lavé et mis en contact avec des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pendant 6h (**Figure 15**). Les sphéroïdes uniquement composés de cellules tumorales correspondent à un contexte idéal où il n'y aurait pas d'inquiétude à avoir pour les cellules normales adjacentes. Dans cette situation, un traitement à l'ICT01 permet aux LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de venir à bout de la masse tumorale démontrant ainsi qu'une sensibilisation est possible dans un contexte 3D (**Figure 15A**). Toutefois, ceci ne correspond pas à la réalité d'un microenvironnement tumoral, c'est pourquoi, dans le but de complexifier le modèle d'étude, un ajout de fibroblastes non transformés a été réalisé. En l'absence de traitement préalable, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ne réussissent pas à pénétrer le sphéroïde (**Figure 15B**). En revanche, après traitement à l'ICT01, les SKOV3 sont bien sensibilisées et les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont alors capables de pénétrer le sphéroïde et fracturer la masse tumorale (**Figure 15C**).

Les fibroblastes semblent tout de même fournir une certaine protection aux cellules tumorales puisqu'une grande fraction du sphéroïde reste intacte après la coculture. Toutefois, comme observé sur les cultures 2D précédentes, un nouvel ajout d'ICT01 au moment de la coculture a permis de détériorer encore plus le sphéroïde et de l'éliminer presque complètement (**Figure 15D**). Aussi, un contrôle de la sensibilisation induite par ICT01 sur des fibroblastes non transformés a été réalisé en cytométrie en flux (**Figure 15E**). En effet, comme mentionné précédemment, les molécules de BTN3A sont exprimées de façon ubiquitaire, et



sont donc présentes en surface de cellules saines. Il semblait donc important de vérifier que l'anticorps ICT01 ne sensibilise pas les cellules saines que les tumorales. C'est en effet le cas puisque sur des SKOV3, un traitement à l'ICT01 induit une réactivité de 75% des LT Vγ9Vδ2, tandis que sur des fibroblastes, moins de 20% d'entre eux s'activent. Aussi, on peut observer que même en coculture 2D la présence de fibroblastes protège les cellules tumorales puisque dans cette condition, il n'y a plus que 30% des LT Vγ9Vδ2 qui vont s'activer.



**Figure 15** Un traitement à l'ICT01 permet de sensibiliser les cellules tumorales à l'action des LT Vγ9Vδ2 lors de cultures 3D. Des SKOV3 ont été mise en culture en microplaque pour sphéroïde seules (A) ou en ratio 2:1 avec des HFF2 après marquage au eFluor670 pendant 7 jours. Les sphéroïdes ont été traité (A, C, D) ou non (B) à l'ICT01 (10µg/mL) pendant 24h avant d'être lavés puis mis en coculture avec des LT Vγ9Vδ2 préalablement marqués au CellTrace Calceine green pendant 6h. (D) Un nouvel ajout d'ICT01 a été effectué lors de la coculture. (E) Des LT Vγ9Vδ2 ont été mis en coculture avec des SKOV3 seules, des fibroblastes ou un mélange des deux (en ration 2:1) dans un ratio effecteurs:cibles de 1:1. Les cellules cibles ont été préalablement traitées ou non au zolédronate (20µM sur la nuit) ou à l'ICT01 (10µg/mL pendant 1h). Moyenne ± SD, n=3

## D) Conclusion

Pour contribuer à l'étude d'ICT01, un anticorps anti-BTN3A activateur des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, des expériences ont été menées pour valider son utilisation thérapeutique dans le contexte de tumeurs solides. Celles-ci ont permis de mettre en évidence l'efficacité d'ICT01 pour sensibiliser des tumeurs auparavant ignorées par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Bien que l'anticorps semble subir une internalisation puis être détruit dans les lysosomes des cellules cibles, ceci peut tout à fait correspondre au simple renouvellement des BTN3A. De plus, ICT01 ne semble pas perturber l'expression de la molécule cible en surface puisque les cellules tumorales restent sensibilisées à l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 24h post-traitement et lavages. Aussi, l'utilisation de cet anticorps dans le cadre de tumeurs solides semble tout à fait indiquée puisqu'un traitement à ICT01 a permis à des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de pénétrer une masse solide formée par des cellules tumorales et des fibroblastes. Cette preuve de concept *in vitro* a pu être complétée par une collègue qui a évalué l'efficacité d'ICT01 *in vivo* dans différents modèles de tumeurs solides impliquants des souris immunodéficientes. Notamment, ces expériences ont montré que l'utilisation d'ICT01 comme traitement sur des souris greffées de tumeurs ovariennes, augmente la survie de ces souris. Ces données très encourageantes ont pu compléter les résultats déjà solides obtenus par ImCheck Therapeutics et faire l'objet d'une publication prouvant l'efficacité d'ICT01 aussi sur les premiers patients inclus dans l'essai clinique en cours (De Gassart A. et al., 2021).

## Chapitre 2 : Caractérisation de la synapse immunologique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

### A) Introduction

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont les LT  $\gamma\delta$  majoritaires retrouvés dans le sang périphérique d'un adulte sain et présentent de nombreuses fonctions anti-tumorales, ce qui fait d'eux de très bons candidats pour le développement d'immunothérapies. Ainsi, leurs fonctions ont été très étudiées ces deux dernières décennies par de nombreuses équipes de recherche et des essais cliniques les impliquants ont été lancés (pour des exemples récents mais non exhaustifs voir [Kakimi K. et al., 2020](#) ; [Lin M. et al., 2020](#) ; [Xu Y. et al., 2021](#)). Toutefois, il semble nécessaire de continuer des études fondamentales de cette population puisque ses mécanismes d'activation sont encore mal connus à l'échelle moléculaire.

Bien que la reconnaissance de leurs cibles ne passe pas par un complexe CMH-peptide, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ont tout de même besoin d'un contact cellulaire pour s'activer. Il y a une dizaine d'années, l'implication cruciale de BTN3A1 dans cette réactivité antigénique a été mise en évidence ([Harly C. et al., 2012](#)). Malgré tout, aucune liaison directe de BTN3A1 au TCR n'a pu être identifiée jusqu'ici et le mécanisme d'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 restait donc un mystère. Ce n'est que très récemment que la pièce manquante au puzzle a pu être identifiée : il s'agit de BTN2A1, capable de lier directement le TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ([Karunakaran MM. et al., 2020](#) ; [Rigau M. et al., 2020](#)). Aussi, cette population présente de nombreux récepteurs de type NK à sa surface, agissant comme corécepteurs activateurs ou inhibiteurs. Sachant que les synapses immunologiques formées par les LT et par les NK peuvent parfois différer, il semble intéressant de se poser la question du type de synapse formée par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En effet, la formation d'une synapse fonctionnelle est la première étape que les effecteurs doivent réussir pour délivrer leurs fonctions.

Le but de cette étude a donc été d'apporter quelques précisions quant à la formation de la synapse immunologique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et les mécanismes d'activation antigénique nécessaire à leur activation.

## B) Méthodologie

### 1. Culture cellulaire

Pour réaliser cette étude, des populations de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ayant subi deux ou trois stimulations non-spécifiques après une amplification spécifique, issus de plusieurs donneurs sains ont été utilisés (protocoles pages 36-37).

Des cellules HEK 293 ont été utilisées natives (WT) ou modifiées par CRISPR-Cas9 pour ne plus exprimer les trois isoformes de BTN3A (KO).

### 2. Proximity Ligation Assay (PLA)

Des HEK293 ont été cotransfectées de façon transitoire à l'aide de JetPEI (Polyplus) pour exprimer BTN3A1\_flag et BTN2A1\_myc. Après 36h, les cellules sont mises en plaque IBIDI 8 puits revêtue de fibronectine et ensuite traité ou non sur la nuit à l'aide de Zolédronate (30  $\mu$ M). Ensuite, les cellules sont fixées à l'aide de PBS - 4% PFA pendant 10 minutes à température ambiante, puis perméabilisées à l'aide de tampon de perméabilisation. Les molécules d'intérêt sont marquées à l'aide d'anticorps anti-myc et anti-flag puis le PLA est réalisé grâce au kit Duolink (Sigma) et selon les instructions. Les signaux de PLA ont été révélés à l'aide du composé de détection Duolink *in situ* reagents orange. Les noyaux sont marqués à l'aide de Hoechst 33342 et les images sont prises à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1. L'analyse a été faite grâce au logiciel Fiji en utilisant le « spot detector » pour dénombrer les noyaux et les signaux PLA sur chaque image. Ensuite, le ratio du nombre de signaux PLA / nombres de noyaux a été calculé pour chaque image.

### 3. Conjuguas

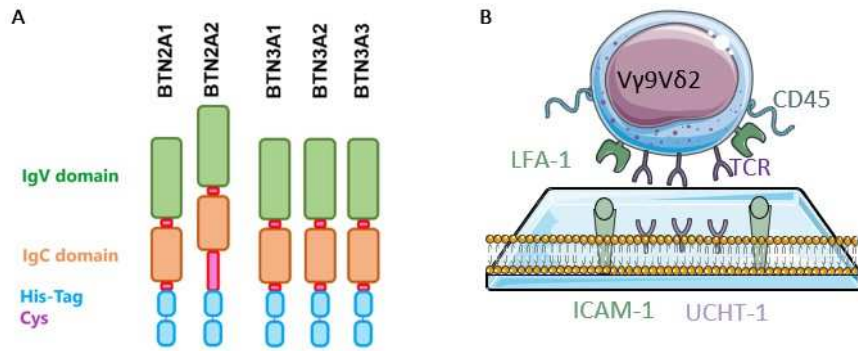
Des HEK293 KO pour les BTN3A ont été transfectées pour exprimer BTN2A1\_YFP et BTN3A1\_mCherry à l'aide de JetPrime (Polyplus) puis mises en plaque IBIDI 8 puits. Ces dernières ont été sensibilisées ou non à l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par zolédronate (30  $\mu$ M sur la nuit) ou *via* l'anticorps 20.1 (1  $\mu$ g/mL pendant 1h). Un blocage de l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est réalisé en ajoutant l'anticorps 103.2 (10  $\mu$ g/mL pendant 1h) à des cellules ayant été traitées au zolédronate. Des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 préalablement marqués à l'aide d'un anticorps anti- V $\delta$ 2 ont été ajoutés afin d'observer la formation de conjuguas. Après 20 minutes de coculture, les cellules sont fixées à l'aide de PBS - 4% PFA. Les images sont prises à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1 puis analysées à l'aide de Fiji.

#### 4. Vidéo-imagerie

Des HEK293 ont été transfectées pour exprimer BTN3A1\_GFP de façon stable. Celles-ci sont mises en plaque IBIDI 8 puits et sont sensibilisées ou non à l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à l'aide de zolédronate (30 $\mu$ M) ou de l'anticorps 20.1 (1 $\mu$ g/mL). Des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ont été marqué au Fura-2m sous agitation pendant 45 minutes à l'obscurité et ajouté au dernier moment avant imagerie. Un microscope widefield Leica DMI 6000B est utilisé pour prendre des images toutes les 10 secondes, pendant environ 25 minutes. Les données ainsi obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Imaris.

#### 5. Glass-Supported Lipid Bilayer (SLB)

Des protéines chimériques (Figure schéma) ont été synthétisées par Evitria. A réception, les protéines ont été purifiées par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) puis leur intégrité et pureté ont été mesurées par Nanodrop. Ensuite, ces protéines ont été marquées à l'aide de Maleimide Dye (ThermoFisher) sur leur Cysteine libre puis dialysées sur la nuit. Une vérification du ratio fluorophore:protéine a été effectuée pour être sûr de pouvoir comparer les conditions entre-elles. Une calibration est ensuite nécessaire pour déterminer la quantité de protéine à utiliser dans une bicouche. Pour ce faire, des bicouches lipidiques sont réalisées dans les mêmes conditions que les conditions test mais sur des billes, afin de pouvoir les analyser au cytomètre en flux. Les BTN étant exprimées en faible quantité à la surface des cellules, une concentration de 100 molécules par  $\mu$ m<sup>2</sup> est choisie. Différentes concentrations (en  $\mu$ g/mL) de protéines sont ajoutées aux billes, puis la fluorescence observées corrigée par le ratio de fluorophore:protéine permet de déterminer la quantité en  $\mu$ L de protéines à utiliser par SLB. Pour réaliser l'expérience, les SLB sont réalisés sur lame de verre montée de Sticky Slide VI 0.4 (IBIDI). Les lames de verre sont préalablement passées au four à plasma pour nettoyer la surface avant de coller la partie supérieure. Pour éviter les fuites, les lames une fois montées sont laissées à température ambiante pendant une nuit. Un mélange de DOPC – 12,5% NTA est effectué puis déposé sur la lame pendant 15 minutes avant de retirer l'excédent. Les protéines souhaitées sont ajoutées à la bonne concentration (la plupart du temps, 100 molécules/  $\mu$ m<sup>2</sup>) par simple dépôt à température ambiante pendant 20 minutes avant, là encore, de retirer l'excédent. Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont ajoutés pendant différents temps avant de fixer le système ou alors, au moment de l'acquisition pour les imager vivants. Les acquisitions se font au microscope Olympus TIRF IX83 et sont analysées grâce à FIJI.



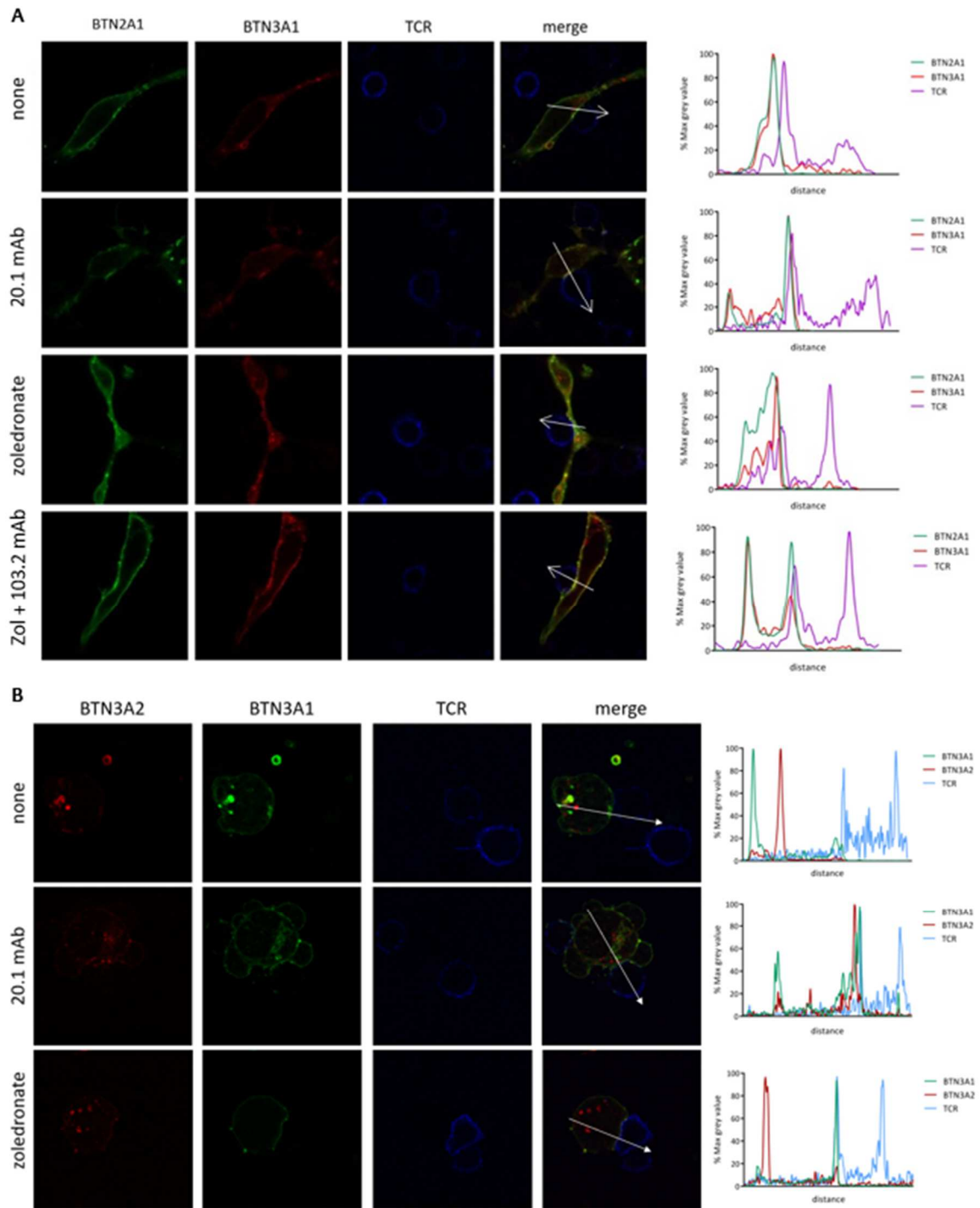
**Figure 16** Représentation schématique des BTN chimériques utilisées et d'une SLB. **A)** Les protéines synthétisées possèdent les domaines extramembranaires des BTN (composé d'un domaine IgV et d'un IgC), accolés à deux tag Histidine successifs séparés entre-eux par une Cystéine libre. **B)** Représentation schématique d'une SLB : bicouche lipidique composées de DOPC-12,5% NTA apposée sur une lame de verre où les protéines choisies sont ancrées grâce au résidu de Nickel des NTA.

### C) Principaux résultats

Dans un premier temps, il s'agissait d'évaluer la validité du modèle d'étude choisi, à savoir l'utilisation de HEK293 modifiées ou non pour leur expression des gènes de BTN3A. Pour ce faire, une observation des conjuguas formés en microscopie puis une évaluation de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans ces conditions a été réalisée (Figure 17). Il n'existe pas à ce jour d'anticorps suffisamment spécifique pour distinguer les différentes isoformes de BTN3A entre-elles. Pour identifier les isoformes présentes au niveau de la zone d'interaction avec le LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, des isoformes taguées ont été transfecté dans des HEK293. Après avoir été mise en contact avec des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pendant 20 minutes, les cellules sont fixées puis analysées au microscope confocal.

En l'absence de traitement des HEK, peu de conjuguas sont observables ce qui corrèle avec le test de dégranulation en cytométrie en flux, montrant peu d'activation dans cette condition (Figure 17A et data non montrée). En étudiant la moyenne de fluorescence de chaque isoforme le long d'une ligne traversant les conjuguas au niveau du contact cellulaire, on peut observer un recrutement de BTN2A1 mais pas de BTN3A1 dans cette condition. Toutefois, lorsque l'on traite les cellules HEK 293 avec un anticorps anti-BTN3A activateur des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (appelé 20.1) ou avec du zolédronate, est recrutement de BTN3A1 au niveau de la zone d'interaction est maintenant détectable. De façon intéressante, l'utilisation d'un anticorps inhibiteur (appelé 103.2) après traitement au zolédronate ne permet pas ce recrutement de BTN3A1 au niveau du LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Dans un second temps, cette expérience met aussi en évidence la quantité impressionnante de TCR présent à la surface des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 puisque le marquage des TCR V $\delta$ 2 ressemble ici à un marquage de membrane.

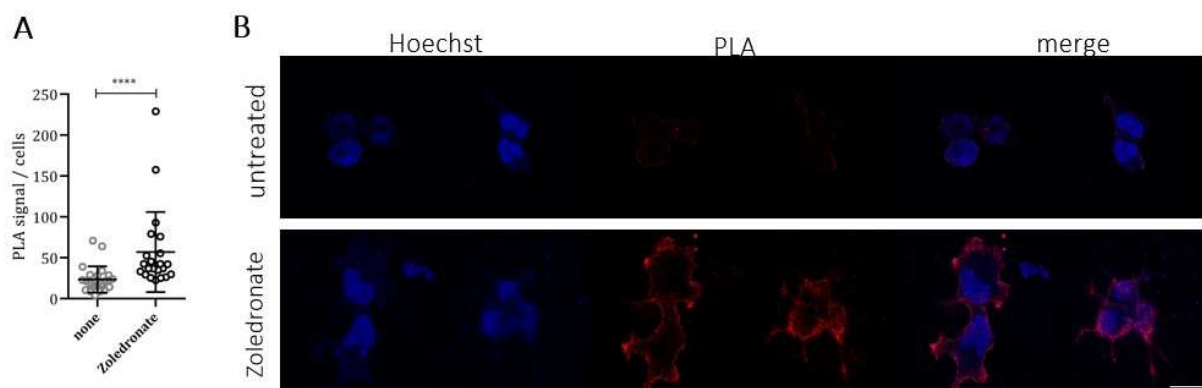
De la même façon, la localisation de BTN3A2 a été étudiée dans les mêmes conditions (Figure 17B). Cependant, dans ce contexte de surexpression au sein de HEK293, la localisation de cette isoforme est ressortie majoritairement intracellulaire et ne semble donc pas impliquée dans la synapse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. On retrouve dans cette expérience le recrutement de BTN3A1 à la zone d'interaction avec le LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de façon dépendante de la présence des pAg, ou forcé par la présence d'un anticorps.



**Figure 17** BTN2A1 et BTN3A1 se regroupent au niveau de la SI dans des conditions propices à l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. **A)** Des HEK293 ont été transfectées afin d'exprimer BTN2A1\_YFP & BTN3A1\_mCherry. Après 20 minutes de coculture avec des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 préalablement marqués avec un anticorps anti-V $\delta$ 2, les cellules sont fixées puis les conjuguas formés sont observés au microscope confocal Nikon A1. Les images sont analysées grâce à FIJI et l'intensité de chaque de chaque pixels le long d'une ligne traversant la zone de contact en son centre est analysée. **B)** La même expérience est réalisée sur des cellules HEK 293 transfectées avec BTN3A1\_GFP et BTN3A2\_mCherry. Images représentatives de 3 expériences indépendantes, n $\geq$ 15 par condition.



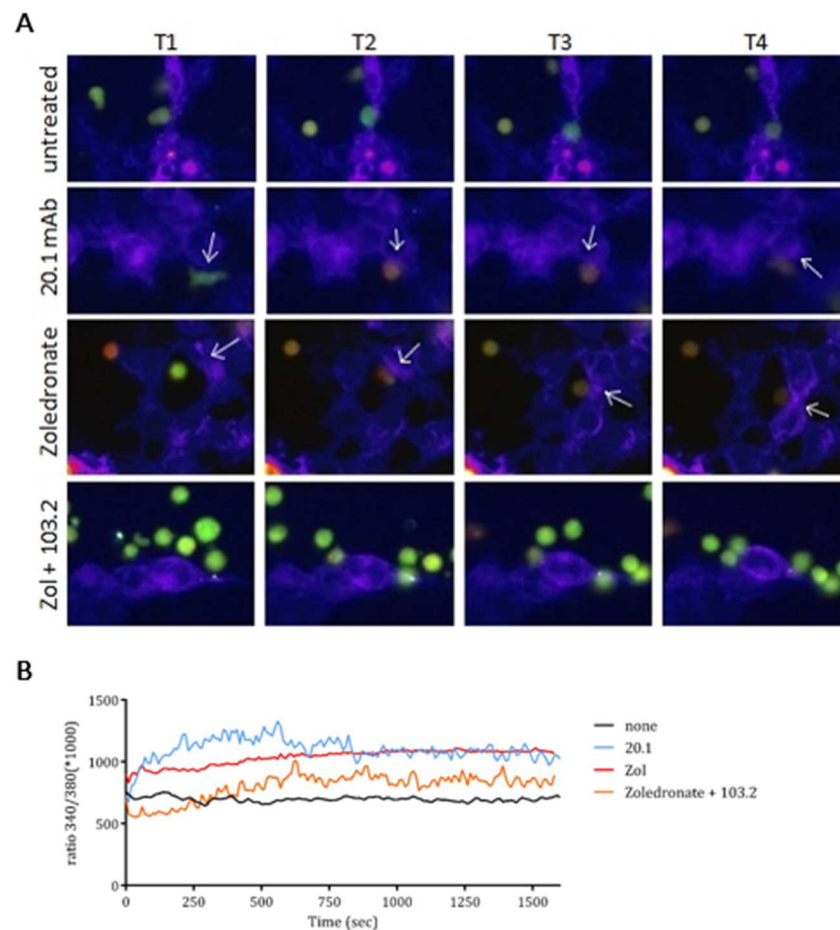
Cherchant à vérifier l'apparente absence de corrélation entre le positionnement de BTN2A1 et BTN3A1 dans des conditions non activatrices, des tests de PLA ont été réalisés. Cette technique permet de mettre en évidence la proximité de deux protéines grâce à deux marquages successifs et l'utilisation d'anticorps porteurs d'oligonucléotides complémentaires. Lorsque les deux molécules d'intérêt sont suffisamment proches, les oligos s'hybrident puis subissent des cycles d'hybridation puis d'amplification afin d'être détectés par une sonde fluorescente. Pour ce faire, des cellules HEK293 ont été transfectées de façon à exprimer des isoformes de BTN3A1 et BTN2A1 taguées. En l'absence de traitement des cellules, les HEK présentent peu de signaux de PLA, indiquant ainsi que BTN2A1 et BTN3A1 ne sont que peu en contact. Dans un contexte favorisant l'activation des LT Vγ9Vδ2, induit ici par l'utilisation de zolédronate, on observe une nette augmentation du rapprochement entre BTN2A1 et BTN3A1 (+ 45%).



**Figure 18** BTN2A1 et BTN3A1 interagissent ensemble dans des conditions activatrices des LT Vγ9Vδ2. Des HEK293 ont été transfectées pour exprimer BTN2A1\_myc & BTN3A1\_flag puis sont traitées ou non à l'aide de zolédronate. Après fixation et perméabilisation, un marquage à l'aide d'anticorps anti-myc et anti-flag est réalisé puis le PLA est effectué en suivant le protocole du kit Duolink PLUS MINUS Orange et les noyaux sont marqués avec du Hoechst. **A)** Ratio de signal PLA détecté par cellule selon les conditions. Mann et Whitney, \*\*\*\*p<0,001 et **B)** exemple représentatif d'images obtenues lors de n=3 expériences indépendantes.

Dans un effort de confirmation du recrutement de BTN3A1 dans des conditions activatrices observé précédemment, des HEK transfectées stablement pour exprimer BTN3A1-GFP ont été filmé lors de coculture avec des LT Vγ9Vδ2. Pour suivre l'état d'activation des effecteurs, ces derniers ont été marqués au Fura-2m, permettant de suivre la concentration plasmique en Ca<sup>2+</sup> (Figure 19). En effet, dans le cadre d'une activation d'un LT, on observe une augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme. Le Fura-2m permet de suivre cette concentration dans le temps de façon visuelle et quantifiable.

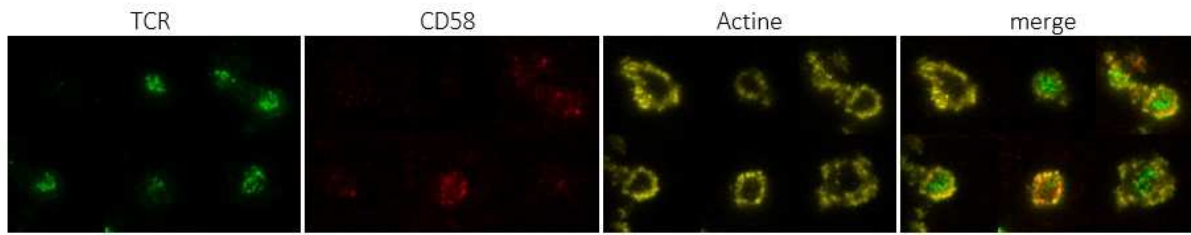
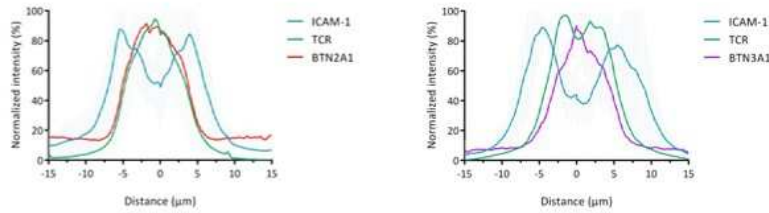
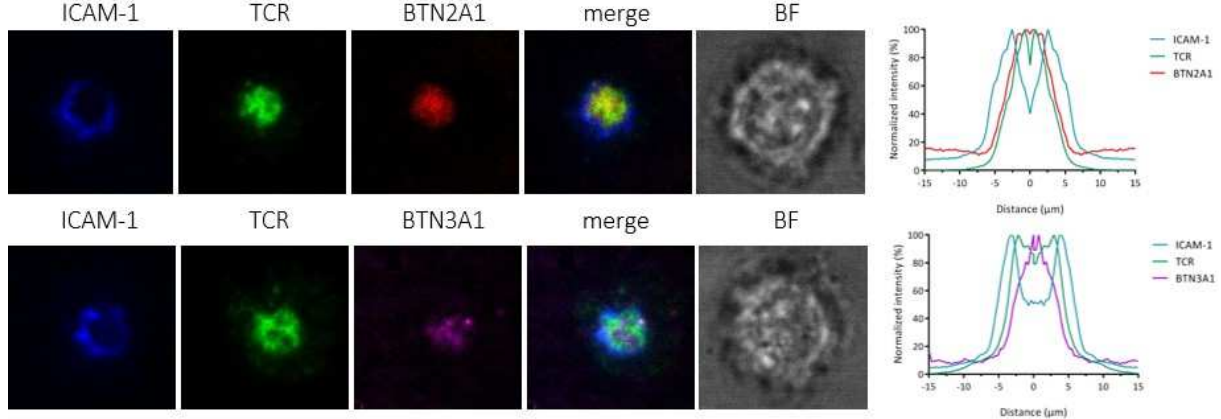
On observe qu'en l'absence de traitement, les LT Vγ9Vδ2 ne s'activent pas face aux HEK puisqu'ils ne montrent pas de variation de concentration en Ca<sup>2+</sup>. Dans cette condition, on n'observe peu de mouvement de BTN3A1-GFP et celle-ci n'est pas polarisée au niveau de la zone de contact ce qui semble confirmer son absence de recrutement à la synapse dans cette condition. Toutefois, un traitement des HEK de façon à les rendre sensibles à l'action des LT Vγ9Vδ2 – que ce soit via l'utilisation d'une drogue telle que le zolédronate ou d'un anticorps comme le 20.1 – permet l'induction d'une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, et donc l'activation de LT Vγ9Vδ2. De façon intéressante, le marquage de BTN3A1 nous permet de suivre ses mouvements dans la membrane des cellules et nous permet donc ici de visualiser le recrutement de BTN3A1 à la synapse. En effet, BTN3A1 semble être attirée au niveau de la zone de contact avec le LT Vγ9Vδ2 et continue de le « suivre » lors de ses déplacements le long de la membrane de la cellule cible.



**Figure 19** BTN3A1 est recrutée à la SI uniquement dans des conditions permettant l'activation des LT Vγ9Vδ2. Des HEK293 transfectées stablement pour exprimer BTN3A1\_GFP sont mise en plaque IBIDI puis traitées avec du zolédronate ± l'anticorps 103.2 ou avec l'anticorps 20.1. Des LT Vγ9Vδ2 sont marqués à l'aide de Fura-2m et ajoutés aux cellules au moment de l'acquisition. Des images sont prises toutes les 10 secondes pendant environ 25 minutes pour suivre (A) le positionnement de BTN3A1, ainsi que (B) le flux calcique des LT Vγ9Vδ2 (moyenne de n≥20 cellules par condition, représentatif de n=3 expériences différentes).

Afin d'améliorer la résolution d'observation de la synapse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans le but d'observer le placement des BTN dans la synapse, un autre système a été utilisé. Pour simplifier le système et s'affranchir de ses complexités, la technique de SLB a été utilisée. Celle-ci nous permet de recréer une bicouche lipidique synthétique dont on contrôle la composition lipidique, mais aussi et surtout la composition protéique. Étant déposées sur une lame de verre, les SLB peuvent être observées facilement au microscope mais de ce fait, les protéines ajoutées à la bicouche ne peuvent contenir que leurs portions extra-membranaires. Aussi, ce système permet de marquer chaque isoforme de façon différente, et ainsi de s'affranchir du problème de l'absence d'anticorps isoforme-spécifique.

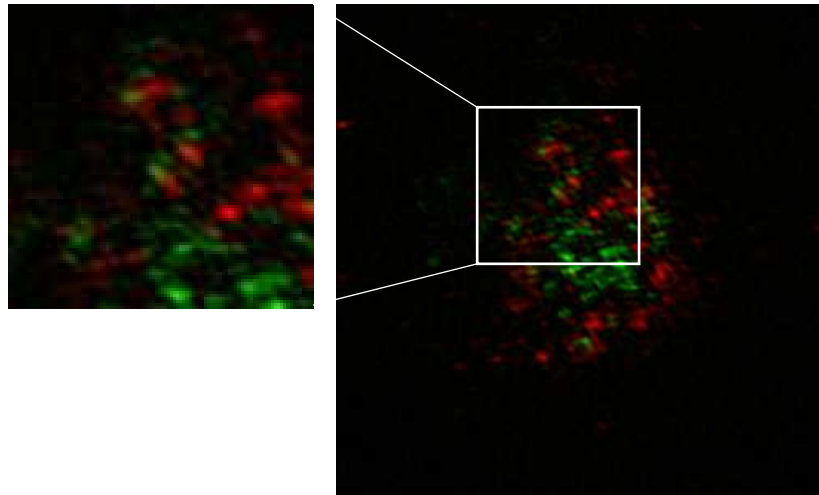
Dans un premier temps, une observation générale de la capacité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à former une SI fonctionnelle dans ces conditions a été vérifiée ([Figure 20A](#)). Pour ce faire, des SLB contenant du UCHT1 afin de stimuler les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, mais aussi ICAM-1 et CD58 afin de visualiser les anneaux concentriques d'une SI cytotoxique mature ont été utilisés. Après dépôt des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sur la surface, des images sont enregistrées au microscope TIRF. Dès 5 minutes après leurs dépôts, des synapses matures sont observables, validant ainsi les conditions d'observation.

**A****B****C**

**Figure 20** Les LT  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  forment des SI en "œil-de-bœuf" pour lesquelles la présence de BTN2A1 permet leurs maturations. Des SLB contenant UCHT1, ICAM-1 et CD58 sont réalisées puis des LT  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  sont ajoutés pendant 15 minutes avant fixation. Un marquage de l'actine est réalisé grâce à de la phalloïdine (A). Des SLB contenant UCHT1, ICAM-1 et BTN2A1 ou BTN3A1 sont réalisées puis des LT  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  préalablement marqués avec un anticorps anti-V $\delta 2$  et des images sont prises à l'aide d'un microscope Olympus TIRF après 15 minutes de contact. La position de chaque molécule dans la SI est déterminée sous FIJI (Radial profile). (B) La position moyenne à travers les échantillons et (C) un exemple représentatif de chaque condition. n=3 expériences indépendantes lors desquelles minimum 10 images (regroupant  $\geq 4$  cellules) par condition ont été prises.

Ensuite, le placement de BTN2A1 et de BTN3A1 au sein de la synapse a été observé séparément mais toujours en présence d'UCHT1 afin de faciliter la formation des SI, et d'ICAM-1 pour visualiser le pSMAC (Figure 20B et C). Tout d'abord, pour les SLB contenant BTN2A1, on observe des synapses matures puisque les TCR sont bien regroupés au cSMAC et un anneau d'ICAM-1 est aussi observable. Aussi, et de façon remarquable, le placement de BTN2A1 est toujours corrélé à celui du TCR  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ . De façon opposée, en présence de BTN3A1 sans BTN2A1, les LT  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  semblent ne pas atteindre la maturation de leurs synapses puisque la position des TCR n'est pas entièrement centrale. Aussi, le positionnement de BTN3A1, bien que

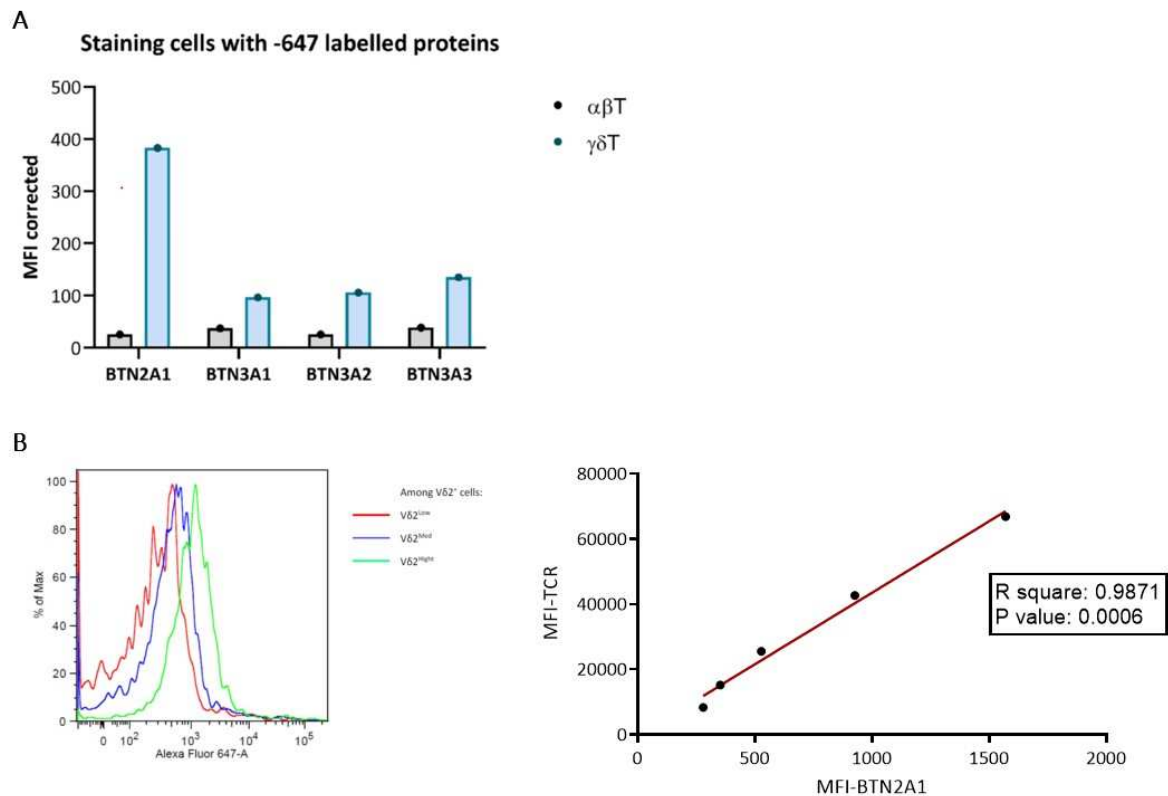
visiblement recruté au niveau de la synapse, ne correspond pas à celui du TCR. Pour vérifier cette observation, des LT  $V\gamma 9V\delta 2$  ont été fixées sur des SLB contenant UCHT1, ICAM-1 et BTN3A1 après 10 minutes de contact afin de les visualiser au TIRF-SIM. Ce microscope permet d'atteindre une résolution axiale jusqu'à 90nm et 150nm latérale. Ces images confirment la proximité de BTN3A1 avec le TCR au centre de la synapse, mais surtout l'absence de contact entre ces deux molécules dans ces conditions (Figure 21).



**Figure 21** En l'absence de signaux d'activation complémentaires, BTN3A1 n'est pas capable de lier le TCR des LT  $V\gamma 9V\delta 2$ . La SI formée entre un LT  $V\gamma 9V\delta 2$  et une SLB contenant UCHT1, ICAM-1 et BTN3A1 est observée au microscope TIRF-SIM. Vert : TCR ; rouge : BTN3A1

Au vu des premières expériences, une interaction entre BTN2A1 et le TCR des LT  $V\gamma 9V\delta 2$  semble spontanée et donc possible en l'absence de de signaux d'activation. Pour vérifier cette hypothèse, les protéines synthétisées pour leur intégration dans les SLB ont été ici utilisées comme des anticorps pour marquer les LT  $V\gamma 9V\delta 2$ . Celles-ci sont constituées des fragments extra-membranaires des BTN accolés à deux tag Histidine, séparés par une Cystéine libre, servant d'ancrage à un fluorophore (Figure 16). Des LT  $V\gamma 9V\delta 2$ , ainsi que des LT  $\alpha\beta$ , ont été marqués avec protéines de synthèse puis analysés par cytométrie en flux (Figure 22). Ni BTN2A1 ni aucune des isoformes de BTN3A ne semblent capables de se fixer aux LT  $\alpha\beta$ . En revanche, BTN2A1 se fixent très bien aux LT  $V\gamma 9V\delta 2$ . De façon remarquable, l'intensité de marquage de BTN2A1 corrèle à celle du marquage de TCR réalisé avec un anticorps anti- $V\delta 2$ . Ainsi, même sous forme de monomère et en l'absence de signal d'activation, BTN2A1 semble capable de se fixer au TCR des LT  $V\gamma 9V\delta 2$ . Le marquage n'est pas aussi clair pour les BTN3A qui

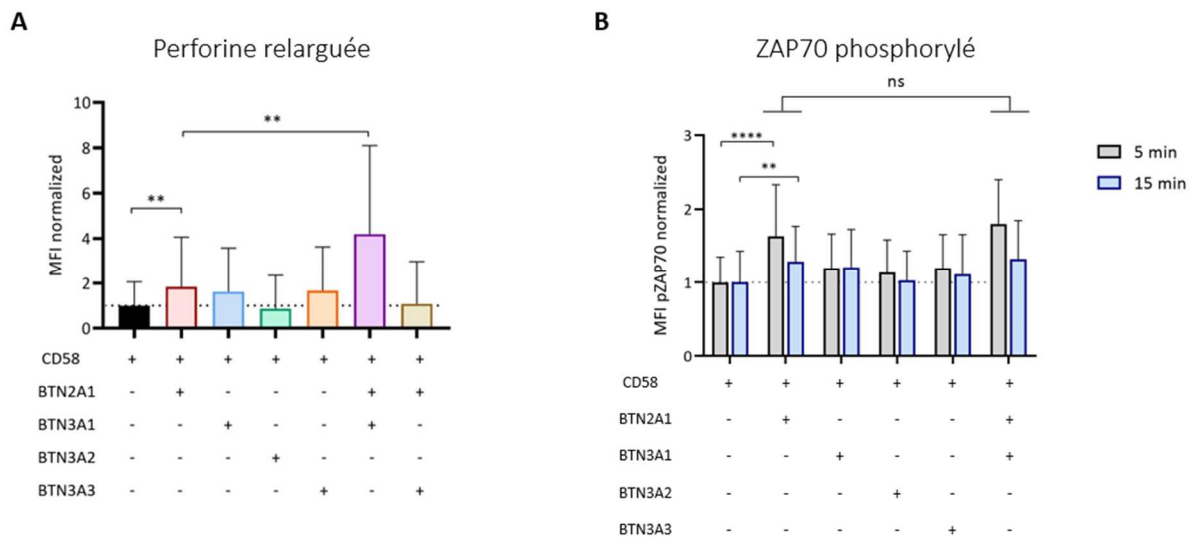
semblent accrocher plus facilement les LT  $\gamma\delta$  que des LT  $\alpha\beta$ , mais pas de façon aussi franche que BTN2A1.



**Figure 22** Un monomère de BTN2A1 est suffisant pour fixer des LT  $\gamma\delta$  de façon TCR-dépendante. Les monomères de protéines synthétisées pour l’ancrage dans les SLB sont utilisées comme des anticorps de marquage. **(A)** Comparaison du marquage obtenu pour chaque BTN sur des LT  $\gamma\delta$  ou des LT  $\alpha\beta$  et **(B)** corrélation de l’intensité de marquage obtenu avec BTN2A1 sur des LT  $\gamma\delta$ .

Le positionnement indépendant des deux BTN responsables de l’activation antigénique des LT  $\gamma\delta$  ayant été établi, un contrôle de la capacité des LT  $\gamma\delta$  à délivrer leur fonction cytotoxique sur ces SLB a été réalisé par marquage de la perforine relarguée sur les bicouches (**Figure 23A**). Pour cela, le système a été fixé après 15 minutes de contact avec des bicouches contenant l’une ou l’autre des BTN ou une combinaison de deux d’entre-elles avant marquage de la perforine. Pour éviter de fausser les analyses, UCHT1 a été remplacé par CD58, permettant ainsi de favoriser l’adhésion des LT  $\gamma\delta$  sur les SLB sans fournir de signal d’activation supplémentaire. Dans ces conditions, lorsqu’une seule isoforme de BTN est présente dans la bicouche, on peut voir que seul BTN2A1 est capable d’induire une dégranulation de perforine de façon significative. Aussi, de façon intéressante, la combinaison de BTN2A1 avec BTN3A1 potentialise fortement la dégranulation des LT  $\gamma\delta$ . Au vu de la forte homologie entre les isoformes BTN3A dans leurs régions extracellulaires et l’absence de la région intracellulaire dans ce système pour les différencier, nous pourrions supposer que la substitution de BTN3A1 par BTN3A3 ou BTN3A2 conduirait au même résultat. Pourtant, ce n’est

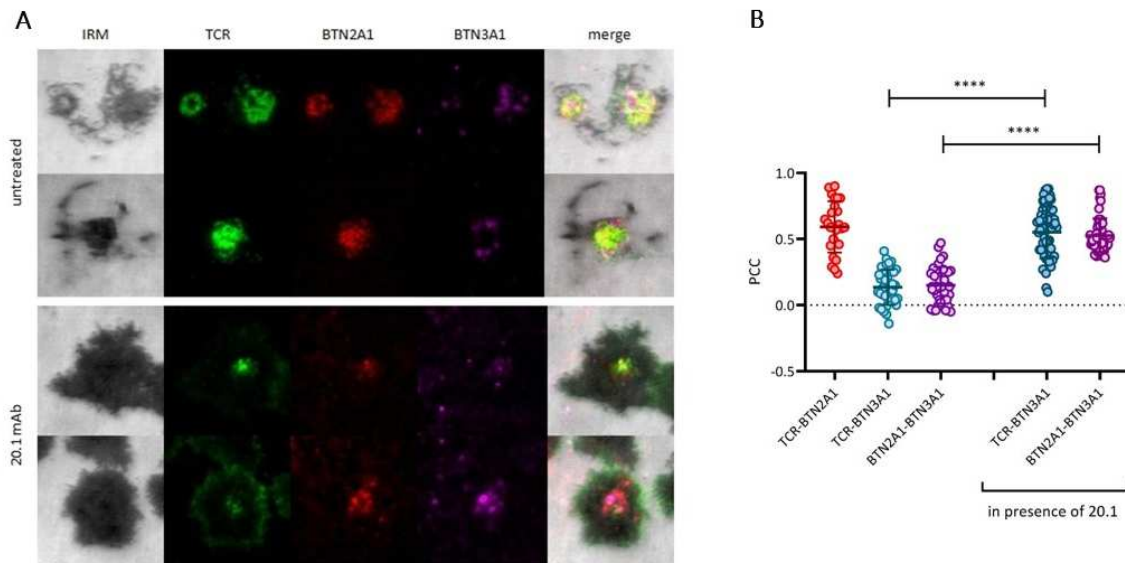
pas le cas puisque la combinaison de BTN2A1 avec BTN3A3 n'induit pas de relargage de perforine par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.



**Figure 23** BTN2A1 seul induit un relargage de perforine par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 mais la présence de BTN3A1 potentialise son action, de façon ZAP70-indépendante. Des SLB contenant ICAM-1, CD58 et une ou plusieurs BTN ont été réalisées. Des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 préalablement marqué à l'aide d'une anticorps anti-V $\delta$ 2 sont déposés soit (A) pendant 15 minutes avant fixation puis marquage de la perforine relarguée sur les SLB ; soit (B) pendant 5 ou 15 minutes avant marquage de ZAP70 phosphorylé. L'intensité de fluorescence par cellule est normalisée par rapport à la condition contrôle. Mann et Whitney, \*\*p<0,01, \*\*\*\* p<0,001, n=3 expériences indépendantes

De façon cohérente avec les précédents résultats, on observe bien une phosphorylation rapide de ZAP70 lorsque les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont déposés sur des SLB contenant BTN2A1, mais une absence de phosphorylation en réponse à des SLB contenant l'une ou l'autre des isoformes de BTN3A (Figure 23B). Cependant, et de façon intéressante, la présence de BTN3A1 additionnée à celle de BTN2A1, ne semble pas avoir d'impact sur le niveau de phosphorylation de ZAP70 ou la durée de celle-ci.

Toutefois, l'absence de la région intracellulaire des BTN empêche l'ajout de pAg et ne correspond donc pas tout à fait à une condition activatrice des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Pour vérifier le placement de BTN2A1 et BTN3A1 en condition activatrice, des SLB contenant CD58, ICAM-1, BTN2A1 et BTN3A1 ont été traités ou non à l'aide de l'anticorps 20.1, activateur des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (Figure 24). En l'absence de ce signal activateur, BTN2A1 semble interagir avec le TCR puisque leurs positions au sein de la zone de contact sont corrélées. Toutefois, ce n'est pas le cas de BTN3A1 dont le positionnement semble indépendant de celui du TCR en l'absence de signaux d'activation.

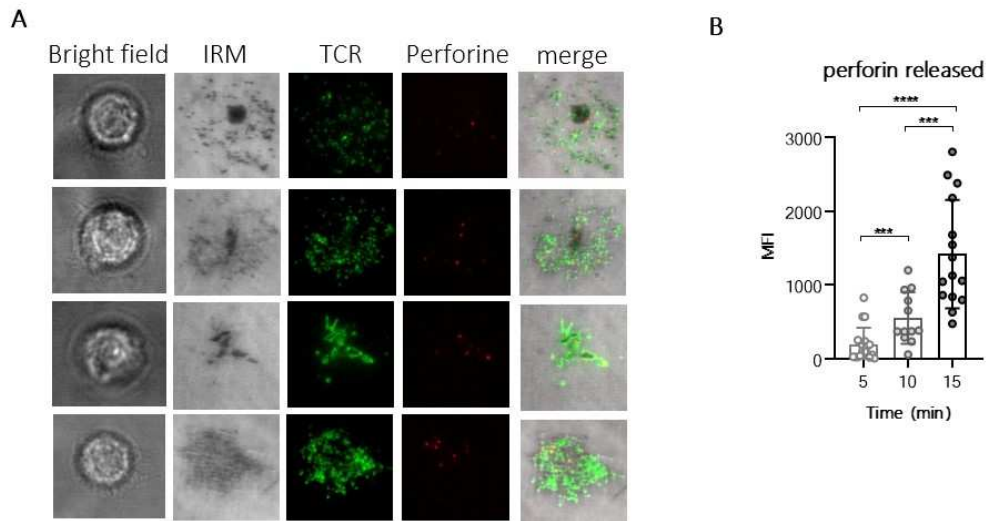


**Figure 24** BTN2A1 est colocalisé au TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de façon constitutive tandis que BTN3A1 nécessite un signal d'activation. Des SLB contenant CD58, ICAM-1, BTN2A1 et BTN3A1 ont été réalisées puis prétraitées ou non à l'aide de l'anticorps 20.1. Des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 préalablement marqués à l'aide d'un anticorps anti- V $\delta$ 2 ont été ajoutés et imagés après 15 minutes de contact. **(A)** Exemples d'images obtenues et **(B)** calcul du coefficient de Pearson (PCC) mettant en évidence la corrélation ou non entre les protéines d'intérêts. Mann et Whitney \*\*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 3$  expériences indépendantes

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent qu'en présence de signaux d'activation antigénique, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 forment des synapses classiques dites en « œil-de-bœuf » afin de délivrer leur fonction de cytotoxicité.

En outre, il a été reporté précédemment que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont capables de s'activer en l'absence de signaux TCR-dépendants grâce à leur récepteur NKG2D. Dans un effort d'observation du type de synapse formé par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans ces conditions, des SLB ne contenant aucune BTN mais MICA ont été produites (Figure 25). Une vérification de l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par marquage de la perforine relarguée a été faite en parallèle. Dans ces conditions, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont bel et bien capables d'exercer leur capacité cytotoxique puisque de la perforine est détectée dès 5 minutes après leur contact avec la bicouche, et en quantité croissante en fonction du temps. Cependant, on remarque ici que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 forment un autre type de synapse que celui précédemment observé. En effet, les TCR ne se regroupent pas de façon centrale dans la zone de contact. Au contraire, on observe ici une synapse multicentrique, plus largement observée entre un LT CD4<sup>+</sup> et une cellule présentatrice d'antigène, ou bien formée par des Jurkats.





**Figure 25** Les LT  $V\gamma 9V\delta 2$  forment des synapses multifocales en l'absence de signaux TCR. Des SLB contenant UCHT1, ICAM-1 et MICA ont été réalisées. Des LT  $V\gamma 9V\delta 2$  préalablement marqués avec un anticorps anti- $V\delta 2$  sont déposés puis le système est fixé après 5, 10 ou 15 minutes de contact. **A)** Exemple d'images obtenues après 5 minutes de contact et **B)** marquage de la perforine relarguée sur les membranes. Moyennes  $\pm$  SD, Mann et Whitney \*\*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\* $p < 0,001$

## D) Conclusion

Bien que les synapses immunologiques soient étudiées depuis de nombreuses années, une seule étude ne s'était jusqu'à lors portée sur celles formées par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (Favier B. et al., 2003). Lors de notre étude, nous avons pu mettre en évidence deux types de synapses distincts utilisés par ces cellules en fonction du type de signaux d'activation reçus. En effet, dans le cadre d'une activation antigénique, on observe la formation de SI classique dite en « œil-de-bœuf » tandis qu'en l'absence de signaux impliquant le TCR, des synapses multicentriques sont observables.

Grâce à la combinaison de techniques de biochimies et de microscopie de pointe, nous observons la SI d'un LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en haute résolution. Ceci nous a permis de mettre en évidence la capacité de ces cellules à mettre en place deux types de synapse différente en fonction des signaux reçus. Aussi, nous pouvons confirmer les études récentes avançant BTN2A1 comme le ligand du TCR (Karunakaran MM. et al., 2020 ; Rigau M. et al., 2020) et l'absence de liaison directe entre le TCR et BTN3A1. Toutefois, contrairement au modèle de reconnaissance antigénique proposé par Karunakaran et collègues, nous ne mettons pas en évidence la formation d'hétéromères entre BTN2A1 et BTN3A1 en surface de cellules ou sur des membranes synthétiques en condition non-activatrice pour les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En effet, dans des conditions « basales » BTN2A1 et BTN3A1 ne semblent pas s'associer de façon significative. En effet, cette association n'est pas observable sur des membranes synthétiques. Cependant, il est compliqué de tirer des conclusions là-dessus puisque les SLB ont le défaut de ne pas pouvoir contenir les régions intramembranaires des protéines et il est tout à fait envisageable que ces deux protéines se lient dans leurs régions intramembranaires. Malgré tout, s'appuyer sur les expériences de PLA est possible, et l'interaction entre BTN2A1 et BTN3A1 semble se faire en grande majorité en condition activatrice pour les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Dans cette étude nous mettons en évidence la grande affinité de BTN2A1 pour le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Effectivement, BTN2A1 est capable de se lier au TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en l'absence de signaux d'activation. Surtout, un monomère des domaines extramembranaires de BTN2A1 est suffisant pour marquer des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en cytométrie en flux.

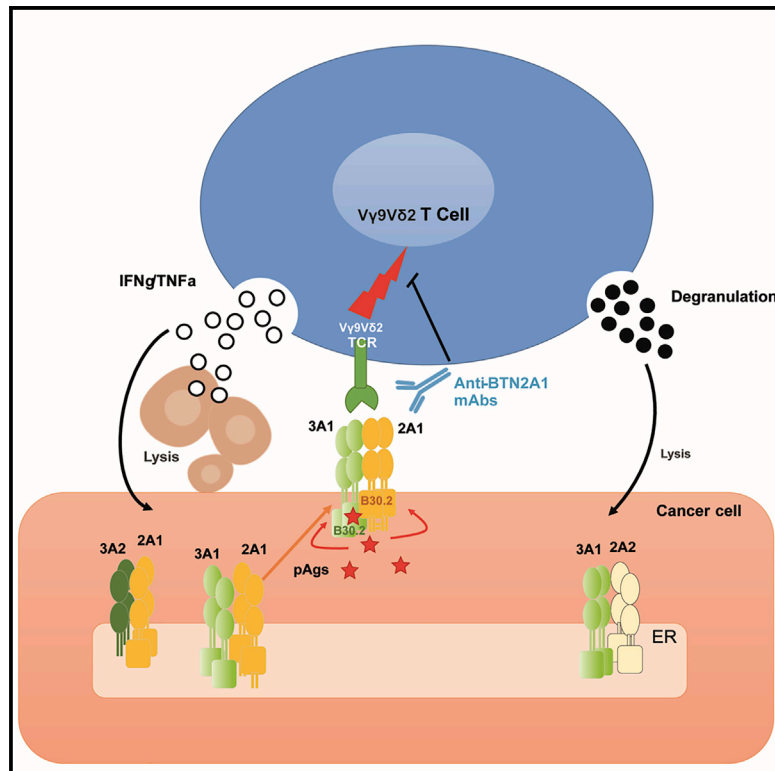
Ainsi, nous proposons un autre modèle d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 que celui récemment proposé où BTN2A1 se lie au TCR sans induire d'activation significative en l'absence de BTN3A1, qui agit alors comme un senseur de stress primordial.

## E) Article

Une fraction des résultats obtenus a pu être intégrée dans une publication réalisée en majorité au sein d'ImCheck Therapeutics (ci-après), tandis qu'une autre publication regroupant la majorité des résultats présentés ici est en cours de rédaction.

## BTN2A1, an immune checkpoint targeting V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against malignant cells

### Graphical abstract



### Authors

Carla E. Cano, Christine Pasero, Aude De Gassart, ..., Antoine Briantais, Anne Charlotte le Floch, Daniel Olive

### Correspondence

carla.cano@imcheck.fr (C.E.C.),  
daniel.olive@inserm.fr (D.O.)

### In brief

Cano et al. show that targeting BTN2A1 with mAbs allows modulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against primary cancer cells. BTN2A1 expression correlates with antitumoral V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell responses. BTN2A1 export at the plasma membrane is strongly enhanced by interaction with BTN3A1, and this interaction is enhanced by amino-biphosphonate treatment.

### Highlights

- BTN2A1 expression in cancer cells correlates with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity
- BTN2A1 interacts with BTN3A1/3A2/3A3, leading to enhanced plasma membrane export
- B30.2 domains of both BTN3A1 and BTN2A1 are required for pAg responsiveness
- Anti-BTN2A1 mAbs blocking V $\gamma$ 9V $\delta$ 2TCR binding antagonize V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity



## Article

# BTN2A1, an immune checkpoint targeting V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against malignant cells

Carla E. Cano,<sup>1,8,\*</sup> Christine Pasero,<sup>1</sup> Aude De Gassart,<sup>1</sup> Clement Kerneur,<sup>1</sup> Mélanie Gabriac,<sup>1</sup> Marie Fullana,<sup>1</sup> Emilie Granarolo,<sup>1</sup> René Hoet,<sup>1</sup> Emmanuel Scotet,<sup>2,3</sup> Chirine Rafia,<sup>1,2,3</sup> Thomas Hermman,<sup>4</sup> Caroline Imbert,<sup>5</sup> Laurent Gorvel,<sup>5</sup> Norbert Vey,<sup>6</sup> Antoine Briantais,<sup>5</sup> Anne Charlotte le Floch,<sup>5</sup> and Daniel Olive<sup>5,6,7,\*</sup>

<sup>1</sup>ImCheck Therapeutics, 31 Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France

<sup>2</sup>Université de Nantes, INSERM, CNRS, CRCINA, 44000 Nantes, France

<sup>3</sup>LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology,” Nantes 44000, France

<sup>4</sup>Institute for Virology and Immunobiology, University of Würzburg, 97078 Würzburg, Germany

<sup>5</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, 13009 Marseille, France

<sup>6</sup>Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France

<sup>7</sup>Aix-Marseille Université UM105, CNRS UMR 7258, 13009 Marseille, France

<sup>8</sup>Lead contact

\*Correspondence: [carla.cano@imcheck.fr](mailto:carla.cano@imcheck.fr) (C.E.C.), [daniel.olive@inserm.fr](mailto:daniel.olive@inserm.fr) (D.O.)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109359>

## SUMMARY

The anti-tumor response of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells requires the sensing of accumulated phosphoantigens (pAgs) bound intracellularly to butyrophilin 3A1 (BTN3A1). In this study, we show that butyrophilin 2A1 (BTN2A1) is required for BTN3A-mediated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against cancer cells, and that expression of the BTN2A1/BTN3A1 complex is sufficient to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR activation. Also, BTN2A1 interacts with all isoforms of BTN3A (BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3), which appears to be a rate-limiting factor to BTN2A1 export to the plasma membrane. BTN2A1/BTN3A1 interaction is enhanced by pAgs and, strikingly, B30.2 domains of both proteins are required for pAg responsiveness. BTN2A1 expression in cancer cells correlates with bisphosphonate-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell killing of cancer cells is modulated by anti-BTN2A1 monoclonal antibodies (mAbs), whose action relies on the inhibition of BTN2A1 binding to the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2TCR. This demonstrates the potential of BTN2A1 as a therapeutic target and adds to the emerging butyrophilin-family cooperation pathway in  $\gamma\delta$  T cell activation.

## INTRODUCTION

Unraveling the essential components of  $\gamma\delta$  T cell-mediated anti-tumor responses is critical for understanding  $\gamma\delta$  T cells and their use as novel therapies. Unlike conventional  $\alpha\beta$  T cells, which carry TCRs encoded by the *TRA* and *TRB* gene loci,  $\gamma\delta$  T cells do not require antigen presentation by the major histocompatibility complex (MHC). Instead, they respond to a variety of stimuli binding directly to their TCR, whose reactivities are determined by the different *TRG* and *TRD* gene loci used to produce the TCR (Adams et al., 2015). The predominant  $\gamma\delta$  T cells in the peripheral blood are V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. These cells represent 1%–10% of circulating T cells in healthy individuals, and they are activated by intracellular phosphoantigens (pAgs) from malignant or bacterial origins (Morita et al., 2007). pAgs are pyrophosphorylated intermediates from the isoprenoid mevalonate and non-mevalonate biosynthetic pathways found in vertebrates and bacteria, respectively (Heuston et al., 2012; Tanaka et al., 1995). Both pathways produce distinct pAg intermediates, which differ in their ability to stimulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells; for example, (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate (HMBPP) from the bacterial pathway is 10,000-fold more potent than isopentenyl

diphosphate (IPP) from the vertebrate pathway (Amslinger et al., 2007; Eberl et al., 2003). Despite this difference in sensitivity, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells activate in response to IPP accumulated in certain primary cancers and cancer cell lines, such as human B cell lymphoma Daudi cells (Gober et al., 2003; Vantourout et al., 2009). This innate pAg-dependent anti-cancer activity can be exploited and amplified by a variety of methods. Amino-bisphosphonates (ABPs), such as zoledronate, and alkylamines specifically activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by inhibition of the IPP metabolizing enzyme, farnesyl diphosphate synthase (FDPS), thus increasing intracellular IPP levels (Gober et al., 2003; Li et al., 2009; Thompson et al., 2006). Alternative methods are based on previous discovery that butyrophilin 3A1 (BTN3A1) is mandatory for pAgs V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation (Harly et al., 2012). Butyrophilins are a family of transmembrane (TM) proteins of which 8 (BTN1A1, BTN2A1/2A2, BTN3A1/3A2/3A3, MOG, and BTNL2) are located in the major histocompatibility complex (MHC) class I region of human chromosome 6. They are structurally similar to the B7 family, possessing immunoglobulin (Ig)C-IgV extracellular domains, a single-pass TM domain, a juxtamembrane (JTM) domain, and, in most members, an intracellular B30.2 domain (Blazquez et al., 2018; Rhodes et al., 2001).



Of note, no orthologs of BTN2A1 and the BTN3A isoforms exist in rodents, consistent with the absence of pAg signaling in murine cell lines (Harly et al., 2012). The noncompeting anti-BTN3A monoclonal antibodies 103.2 and 20.1 bind to the highly conserved IgV domains of all three BTN3A isoforms (Palakodeti et al., 2012), causing either a decrease or increase of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation, respectively (Harly et al., 2012; Starick et al., 2017). These monoclonal antibodies (mAbs) have been instrumental in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-based therapies (Benyamine et al., 2016) and mechanistic research into BTN3A and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation (Blazquez et al., 2018; Gu et al., 2017, 2018; Harly et al., 2012; Palakodeti et al., 2012; Starick et al., 2017; Wang et al., 2019; Yang et al., 2019). Among the BTN3A isoforms, BTN3A1 is unique in that its intracellular B30.2 domain binds pAgs (Compte et al., 2004; Sandstrom et al., 2014), while its intracellular JTM domain performs a critical function in BTN3A homodimerization and heterodimerization via predicted coiled-coil structures that also act as rods for correct B30.2 domain spacing (Peigné et al., 2017; Wang et al., 2019). Conformational changes in the JTM domain, induced by pAgs binding at the B30.2 domain, are involved in T cell activation (Yang et al., 2019).

Further information on the mechanism of pAg activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells was obtained from studies using transgenic human and mouse reporter cells expressing a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR. Studies from such murine reporter cells have shown that pAg activation is critically dependent on BTN3A1 expression in APCs (tumor or infected cells) and not in effector cells (Harly et al., 2012). In addition, studies from human cells showed that both cell-to-cell contact and the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR are required for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation (Morita et al., 1995; Wang et al., 2010). However, scarce evidence exists to suggest that BTN3A1 directly interacts with the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (Harly et al., 2012; Sandstrom et al., 2014). Indeed, previous studies have shown that BTN3A1 transfection alone failed to enable pAg reactivity, unless cells also contained human chromosome 6 (Riaño et al., 2014). Recently, BTN2A has emerged as the factor previously located on Chr6 and was reported to bind the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (Karunakaran et al., 2020; Rigau et al., 2020). Two BTN2A genes exist, *BTN2A1* and *BTN2A2*, both located within a cluster that encompasses the *BTN3A* locus, and both encoding proteins containing a B30.2 domain (Rhodes et al., 2001). BTN2A1 directly binds the V $\gamma$ 9 chain, and mutagenesis and structure modeling approaches mapped this interaction to the germline-encoded region between CDR2 and CDR3 of the V $\gamma$ 9 chain (Karunakaran et al., 2020; Rigau et al., 2020). However, the B30.2 domain of BTN2A1 was not found to bind IPP (Rigau et al., 2020).

In this study, we showed that BTN2A1 is a limiting factor for both pAg-driven  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity against cancer cells and BTN3A1 export to the plasma membrane. Using fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA) approaches, we demonstrated that BTN3A1/BTN2A1 interaction is enhanced by pAgs, emphasizing that crosstalk between BTN3A1 and BTN2A1 is essential for pAg-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against tumor cells. Interestingly, BTN2A2 was found insufficient for enabling V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell functions. Additionally, we developed anti-BTN2A1 mAbs and elaborated a proof-of-concept of their ability to modulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation and cancer cell killing. Finally, we estab-

lished a correlation between BTN2A1 expression in cancer cells and the bisphosphonate-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell response.

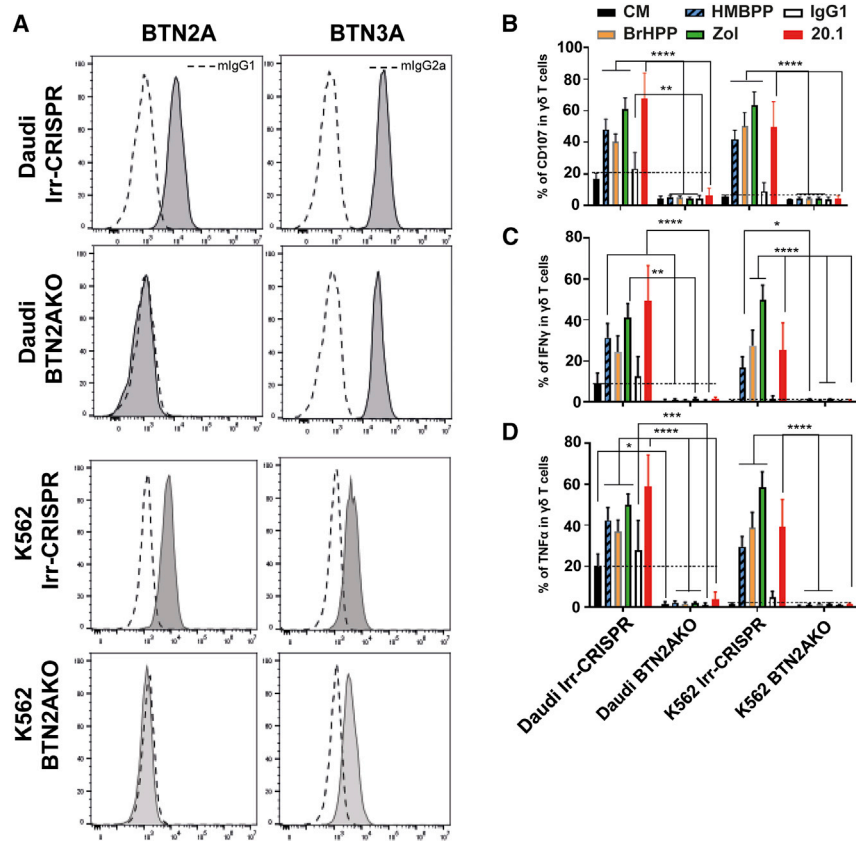
## RESULTS

### BTN2A expression at the plasma membrane of target cells is required to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity

To assess whether BTN2A expression at the plasma membrane was required to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against cancer cells, CRISPR-Cas9-mediated inactivation of BTN2A1/2A2 isoforms was performed in Daudi (B lymphoblast) and K562 (chronic myelogenous leukemia) cell lines to generate BTN2A knockout (BTN2AKO) cells. The absence of both BTN2A isoforms in Daudi and K562 BTN2AKO cells was confirmed by flow cytometry (Figure 1A). As expected, endogenous BTN3A expression was detected in BTN2AKO and control cells transduced with an irrelevant CRISPR (Irr-CRISPR). BTN2AKO cells were co-cultured with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expanded from healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), with or without bacterial or synthetic pAgs (HMBPP and bromohydrin pyrophosphate [BrHPP], respectively), zoledronate, or BTN3A agonist mAb 20.1, then V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation (extracellular CD107 expression) and intracellular tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN) $\gamma$  were assessed. As expected, co-culture of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells with control cells (Irr-CRISPR) expressing BTN2A led to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation as well as IFN $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production in all conditions (Figures 1B–1D). In contrast, both V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell effector functions were totally impaired in co-cultures with BTN2AKO cells, whatever the stimuli (Figures 1B–1D). Basal V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation and cytokine production were also impaired in co-cultures with BTN2AKO cells (Figures 1B–1D). Consistently, in co-cultures with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, apoptosis of BTN2AKO cells was significantly lower as compared to their wild-type counterpart (Figure S1). These results show that BTN2A expression in target cancer cells is required to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity.

### BTN3A1 requires BTN2A1, but not BTN2A2, expression in target cells to trigger human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity

Two different BTN2A isoforms exist in humans (2A1/2A2). In order to determine the involvement of these isoforms in triggering V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity, each isoform was reconstituted in HEK293T cells devoid of both BTN2A isoforms (BTN2AKO) using lentiviral transduction (Figures 2A, 2B, and S2). After restoring BTN2A isoforms in BTN2AKO cells (BTN2AKO+2A1, BTN2AKO+2A2, and BTN2AKO+2A1+2A2), V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation was assessed with or without zoledronate. As shown in Figure 2C, restoration of BTN2A1 expression in BTN2KO target cells was sufficient to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation. No such effect was observed when BTN2A2 alone was restored in BTN2AKO target cells. Although BTN2A2 expression at the plasma membrane was lower compared to BTN2A1 (Figure S2B), both BTN2A isoforms were readily detectable at higher levels than wild-type HEK293T cells, which precludes that lower BTN2A2 expression could explain its inability to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation. When compared to BTN2A1 alone, no additional/synergistic effect on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation was



**Figure 1. Plasma membrane expression of BTN2A in target cancer cell lines is required to trigger the cytotoxic response of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells**

(A) CRISPR-Cas9-mediated inactivation of BTN2A1/2A2 isoforms was performed in Daudi (Burkitt lymphoma) and K562 (chronic myelogenous leukemia) cell lines, and BTN2A and BTN3A expression levels were assessed by flow cytometry, as indicated.

(B–D) V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expanded from healthy donor PBMCs ( $n = 6$ ) were co-cultured with Daudi cells (effector-to-target cell [E:T] ratio of 1:1) with or without addition of BrHPP (1  $\mu$ M), HMBPP (0.1  $\mu$ M), zoledronate (45  $\mu$ M), anti-BTN3A 20.1, or mlgG1 (10  $\mu$ g/mL), as indicated.

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation (%CD107ab<sup>+</sup> cells) and intracellular TNF- $\alpha$  and IFN $\gamma$ , respectively, were assessed after 4 h incubation in the presence of GolgiStop and analyzed by flow cytometry. CM, culture medium. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , by two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test. See also Figure S1.

observed when both isoforms were re-introduced in target BTN2KO cells (Figure 2C). Results show that only BTN2A1 expression in target cells is required for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity.

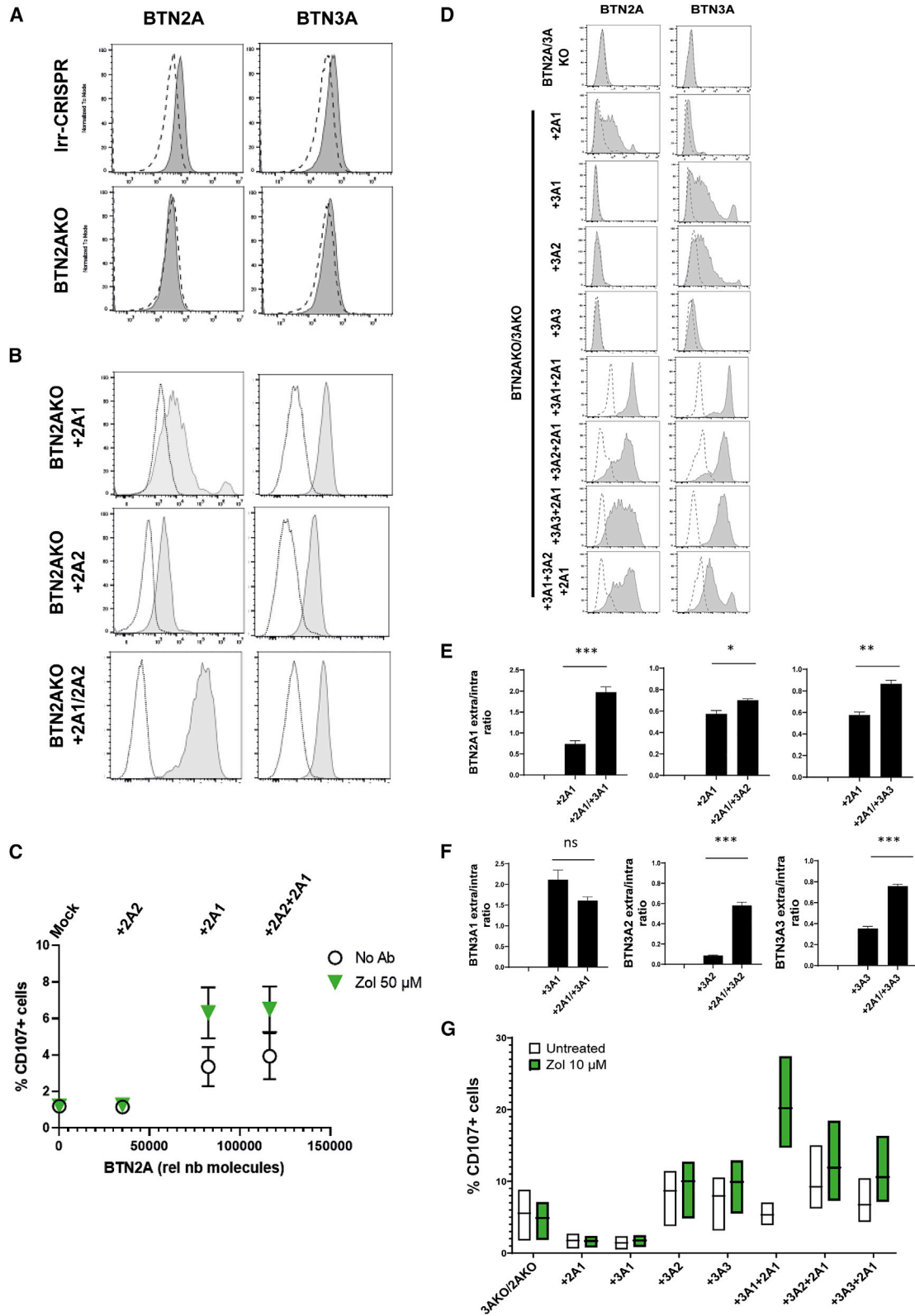
### BTN2A1 and BTN3A1 collaborate for plasma membrane export and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity

It was previously shown that BTN3A1 export to the plasma membrane is tightly regulated and enhanced by BTN3A2 expression (Vantourout et al., 2018). We sought to determine whether BTN2A1 action on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity was dependent on plasma membrane exposure. Hence, we quantified the number of BTN2A1 and BTN3A molecules exposed at the plasma membrane and after membrane permeabilization (intracellular staining) in BTN2AKO/BTN3AKO cells in which BTN2A1 and all BTN3A isoforms were expressed alone or in combination. As shown in Figure 2D, reconstitution of BTN2A1 or either BTN3A isoform alone led to a heterogeneous expression pattern at the plasma membrane that contrasted to reconstitution of BTN2A1 along with either BTN3A isoform that led to more homogeneous staining profiles and higher mean fluorescence intensities (MFIs) for both proteins. Plasma membrane exposure, as depicted by the ratio between extracellular and intracellular relative number of BTN molecules per cell, showed that a lower BTN2A1 extracellular/intracellular ratio was strongly enhanced by BTN3A1 co-expression, and to a lesser extent by BTN3A2 and BTN3A3 (Figures 2E and S2C). Conversely, BTN2A1 co-expres-

sion led to enhanced plasma membrane expression of BTN3A2 and BTN3A3 (Figure 2F). Consistent with this observation, BTN2AKO Daudi cells displayed fewer BTN3A molecules compared to their Irr-CRISPR counterpart (Figure S2E). We then assessed the ability of each BTN2A1/BTN3A combination to trigger V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation (Figures 2G and S2D) and found that only the BTN2A1/BTN3A1 combination allowed responsiveness to zoledronate. These results indicate that BTN2A1 and BTN3A1 trafficking to the plasma membrane are linked, and that BTN2A1 is mandatory for BTN3A1-mediated pAg sensing by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

### BTN2A1 and BTN3A1 interaction is enhanced by pAgs

To determine whether BTN2A1 and BTN3A1 form protein complexes, we performed co-immunoprecipitation (co-IP) experiments after BTN2AKO/3AKO HEK293T cell transfection with Myc-tagged BTN2A1, GFP-tagged BTN3A1, or both. As shown in Figure 3A (and Figure S3A), Myc-BTN2A1 was detected after GFP-BTN3A1 immunoprecipitation in cells expressing both tagged proteins, but not in their mock controls. Flow cytometry assessment of the FRET signal was used to assess homomeric and heteromeric interactions between different BTN2A and BTN3A isoforms in live cells (Figures 3B and S3B). A positive FRET signal indicated that BTN2A1 and BTN2A2 were able to form homodimers, as well as all BTN3A isoforms. However, only BTN2A1 was found to interact with all BTN3A isoforms. In contrast, BTN2A2 interacted with BTN3A1 only. No interaction between BTN2A1 and BTN2A2 was observed. To identify BTN2A1/2A2 protein domains involved in interactions with BTN3A1, FRET experiments using wild-type BTN3A1 and different BTN2A1 or BTN2A2 mutated domains (ectodomain [EC], B30.2, JTM, TM) were tested. As observed in Figures 3C



(legend on next page)



and S3C, regarding the BTN2A1/BTN3A1 complex (black bars), replacement of the BTN2A1 EC (2A1-mEC) disrupted interaction with BTN3A1, whereas for BTN2A2 (yellow bars), deletion of the BTN2A2 B30.2 domain prevented interaction with BTN3A1.

Treatment with zoledronate enhances BTN2A1/BTN3A1 interaction observed by FRET (Figure 3D). Zoledronate-dependent enhancement relies on the BTN3A1 B30.2 domain. In line with data shown in Figures 3C and S3D, deletion of the B30.2 domains of BTN3A1 did not prevent the interaction with BTN2A1. However, and more surprisingly, deletion of the B30.2 domain of BTN2A1 abolished zoledronate-induced degranulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to the same extent as did deletion of the BTN3A1 B30.2 domain (Figures 3E and S3E).

Because co-IP and FRET do not allow to restrict the analysis of interactions to the plasma membrane, we used microscopy-based PLA to interrogate BTN2A1/BTN3A1 interaction at the plasma membrane. Quantification of molecules proximity was performed at steady state or after treatment with zoledronate. As shown in Figures 3F, S3F, and S3G, the PLA approach confirmed BTN2A1/BTN3A1 interaction and its enhancement by zoledronate at the plasma membrane. Altogether, these data show that BTN2A1 and BTN3A1 interact through their ECs. Moreover, BTN2A1/BTN3A1 interaction appeared to be enhanced by zoledronate treatment.

### Ectopic expression of BTN2A1 and BTN3A1 in murine target cells empowers murine T cells with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2TCR responsiveness

It was previously shown that BTN3A1 alone was insufficient to restore pAg-mediated activation through the human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 MOP TCR expressed in a murine T cell hybridoma (Riaño et al., 2014; Starick et al., 2017). To test whether ectopic expression of human BTN2A1 in murine fibroblasts was able to drive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2TCR responsiveness, the murine V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 MOP TCR reporter T cell hybridoma was co-cultured with mouse NIH-3T3 fibroblasts transfected with both BTN2A isoforms, alone or in combination with BTN3A isoforms with or without HMBPP treatment (Figures 4A and S4). Consistently with results obtained in the human setting, only concomitant expression of BTN2A1 and BTN3A1 allowed HMBPP responsiveness of murine V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 MOP TCR reporter cells, as assessed by mouse interleukin (mIL)-2 secretion measured by ELISA. BTN2A1/BTN3A1 expression in NIH-3T3 cells granted dose-dependent activation of murine V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 MOP TCR reporter cells by HMBPP and anti-BTN3A agonist 20.1 mAbs (Figures 4B and 4C). Moreover,

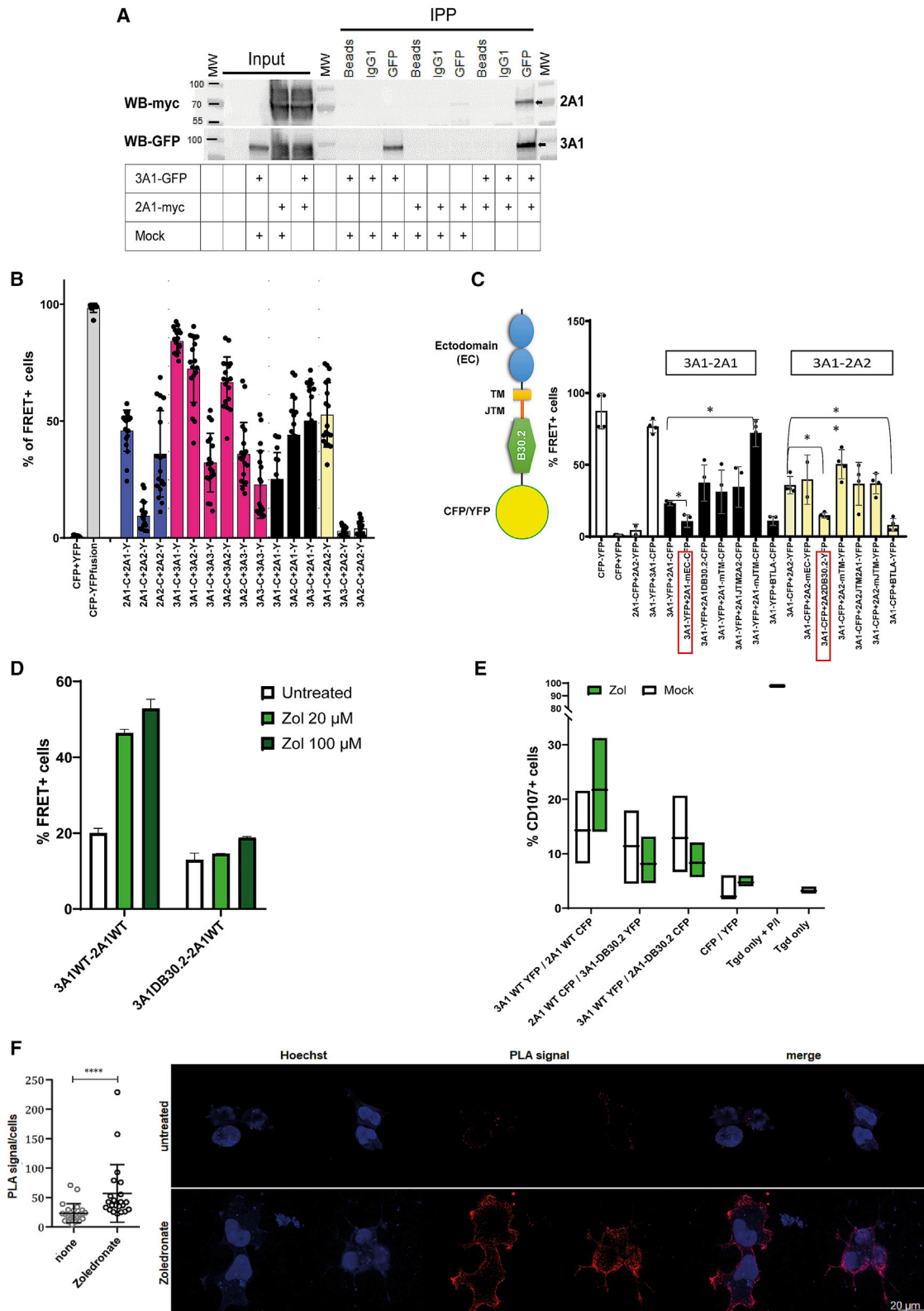
increasing concentrations of an anti-BTN3A antagonist mAb (103.2) inhibit HMBPP-driven mIL-2 production (Figure 4D). As in assays with HEK cells, B30.2 domains of BTN2A1 and BTN3A1 were required for HMBPP responsiveness in the murine setting (Figures S4B–S4D). Altogether, these results show that ectopic expression of BTN2A1 and BTN3A1 in murine target cells is required and sufficient to empower murine T cells with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR responsiveness to pAgs.

### V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell function can be modulated using anti-BTN2A1 mAbs

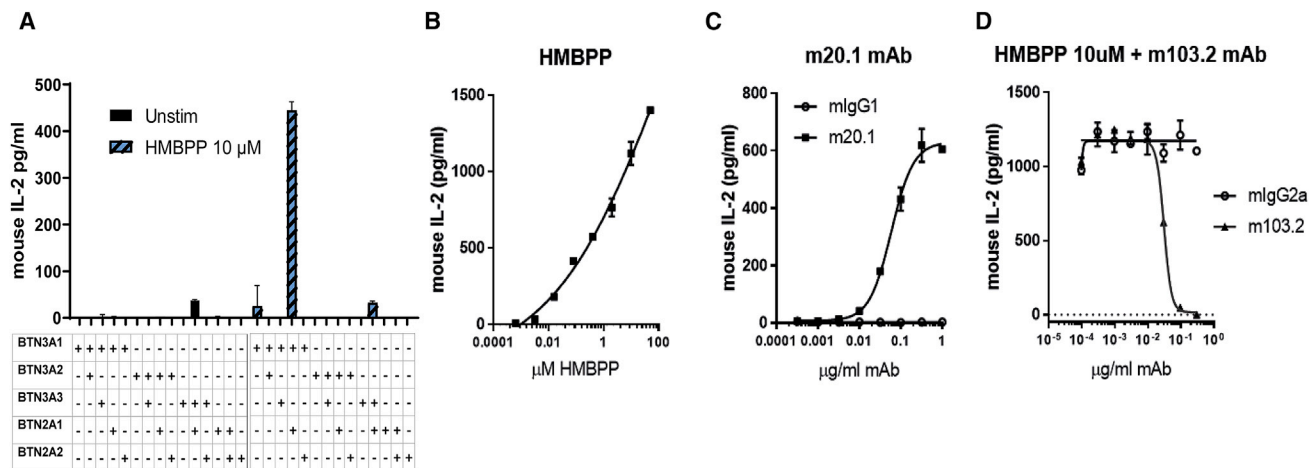
V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell anti-tumor activity involves degranulation and release of perforin and granzyme, as well as cytokine secretion, resulting in cancer cell killing. To determine whether BTN2A1 targeting was suitable to modulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell anti-tumor responses, we generated seven anti-BTN2A1 mAbs. Two of these mAbs shared identical VH/VL sequences (8.15 and 8.16, data not shown). Binding of anti-BTN2A1 mAbs *in cellulo* on HEK BTN2AKO+2A1 cells and affinity as assessed by biolayer interferometry (BLI) are shown in Figures S5A and S5B. BLI-based binning assays identified three different epitope bins covered by our anti-BTN2A1 mAbs (Figure S5C). Furthermore, we tested the effect of anti-BTN2A1 mAbs on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation against Daudi cells with or without zoledronate or anti-BTN3A agonist mAb 20.1 (Figure 5A). As expected, in co-cultures with Daudi cells alone, the mean ( $\pm$ SEM) of basal V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation was 23.1%  $\pm$  5.84% CD107<sup>+</sup> cells. These results remained unchanged in the presence of isotype controls (23.1%  $\pm$  5.42% and 24.9%  $\pm$  5.6% for IgG1 and IgG2a, respectively), and they were enhanced by the addition of mAb 20.1 (71.8%  $\pm$  4.7%). Zoledronate led to up to a 3-fold increase of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation against Daudi cells in all control conditions ( $p \leq 0.05$ ) but did not add to mAb 20.1 stimulation. Strikingly, six out of seven anti-BTN2A1 mAbs, namely clones 4.15, 8.15, 8.16, 7.28, 7.48, and 5.28, significantly inhibited basal V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation against Daudi cells up to 17-fold, and all of these clones but the 7.28 were able to inhibit V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation against Daudi cells in the presence of zoledronate or mAb 20.1 (Figure 5A). To determine whether anti-BTN2A1 mAbs modulated cancer cell killing induced by zoledronate and anti-BTN3A agonist 20.1, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were co-cultured with HL-60 cells in the presence of zoledronate or 20.1 mAb with or without anti-BTN2A1 mAbs. Apoptosis inhibition was estimated by flow cytometry analysis of caspase-3/7 cleavage in HL-60 cells. Consistent with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation,

### Figure 2. BTN2A1 and BTN3A1 expression in target cells allows triggering of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity

HEK293T cells transduced with an irrelevant CRISPR (Irr-CRISPR) guide or a guide targeting both BTN2A isoforms (BTN2AKO) (A and B) or guides targeting all BTN2A and BTN3A isoforms (BTN2AKO/3AKO) (D–F); BTN2AKO cells were transduced with lentiviruses encoding BTN2A1 (+2A1), BTN2A2 (+2A2), or both (+2A1/2A2, A, B, and C), and BTN2AKO/3AKO cells were transduced with lentiviruses encoding BTN2A1 (+2A1) or each BTN3A isoform alone or (D and F) in combination with BTN2A1, or with an empty lentiviral vector (mock), as indicated. (A and D) BTN2A1 and BTN3A expression were assessed by flow cytometry (D) and the ratio of extracellular/intracellular BTN2A1 or BTN3A molecule numbers was calculated after quantification using a CellQuant assay (E and F, respectively) using 7.48 (an anti-BTN2A antibody generated in this study, the properties of which are described elsewhere in this manuscript) and 103.2 mAbs, respectively. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.000$ , by two-tailed unpaired t test. (C and G) V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expanded from healthy donor PBMCs ( $n = 2$ ) were co-cultured with BTN2AKO cells (E:T ratio of 1:1) transduced with an empty pLV vector (mock), or the indicated BTN2A or 3A isoform combinations with or without addition of zoledronate (50  $\mu$ M), as indicated, and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation (%CD107<sup>+</sup> cells) was assessed after 4 h by flow cytometry. (C) Chart illustrates correlation between V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation (%CD107ab<sup>+</sup> cells, y axis) and the number of BTN2A molecules (as assessed with 7.48; x axis). Linear regression was used to calculate the correlation between %CD107<sup>+</sup> cells and the number of BTN2A molecules. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Statistics in (E) are compared to +2A1 cells. See also Figure S2.



(legend on next page)



**Figure 4. BTN2A1 and BTN3A1 expression in cognate cells is necessary and sufficient to empower murine T cells with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2TCR responsiveness to phosphoantigens**

(A) 53/4 mouse T cell hybridoma expressing TCRV $\gamma$ 9V $\delta$ 2 MOP was co-cultured overnight (ratio 1:1) with NIH-3T3 murine fibroblasts transfected with the indicated BTN3A- or BTN2A-encoding plasmids, with or without HMBPP (10  $\mu$ M); (B and C) or with plasmids encoding BTN2A1 and BTN3A1, with increasing doses of HMBPP or anti-BTN3 agonist 20.1 mAb, respectively; and (D) or in the presence of HMBPP and increasing doses of anti-BTN3A antagonist 103.2 mAb. Secreted mIL-2 was measured by ELISA and used as a readout in all panels. See also Figure S4.

anti-BTN2A1 mAbs abrogated zoledronate and anti-BTN3A 20.1-induced apoptosis with different efficiencies (Figure 5B). For each anti-BTN2A1 clone, the level of apoptosis inhibition after zoledronate and 20.1 treatment were correlated (Figure 5C). Anti-BTN2A1 mAbs inhibited perforin and granzyme B release in the same settings (Figure S5D). The anti-BTN2A1 7.48 mAb was the clone with the strongest inhibitory potential. Increasing concentrations of anti-BTN2A1 7.48 abrogated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell responses against Daudi cells in the presence of HMBPP or 20.1 in terms of degranulation (Figure 5D; half-maximal inhibitory concentration [IC<sub>50</sub>] = 0.067 and 0.056  $\mu$ g/mL, respectively), TNF- $\alpha$  (Figure 5E, IC<sub>50</sub> = 0.094 and 0.082  $\mu$ g/mL), and IFN $\gamma$  (Figure 5F, IC<sub>50</sub> = 0.114 and 0.13  $\mu$ g/mL) secretion.

Anti-BTN2A1 7.48 was able to inhibit HMBPP-induced mIL-2 secretion in mouse V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 MOP TCR reporter cells co-cultured with BTN2A1/BTN3A1-expressing NIH 3T3 cells (Figures S5E and S5F). A concentration of 10  $\mu$ g/mL anti-BTN2A1 7.48 mAb led to a strong inhibition of mIL-2 production. Although high concentrations of HMBPP were used to trigger activation, mIL-2 production remained very low in the presence of 7.48 mAb (Figure S5E). Reciprocally, in this setting anti-BTN2A1 7.48 inhibited mIL-2 production in a dose-dependent manner (Figure S5F).

### Figure 3. BTN2A1 and BTN3A1 protein interactions

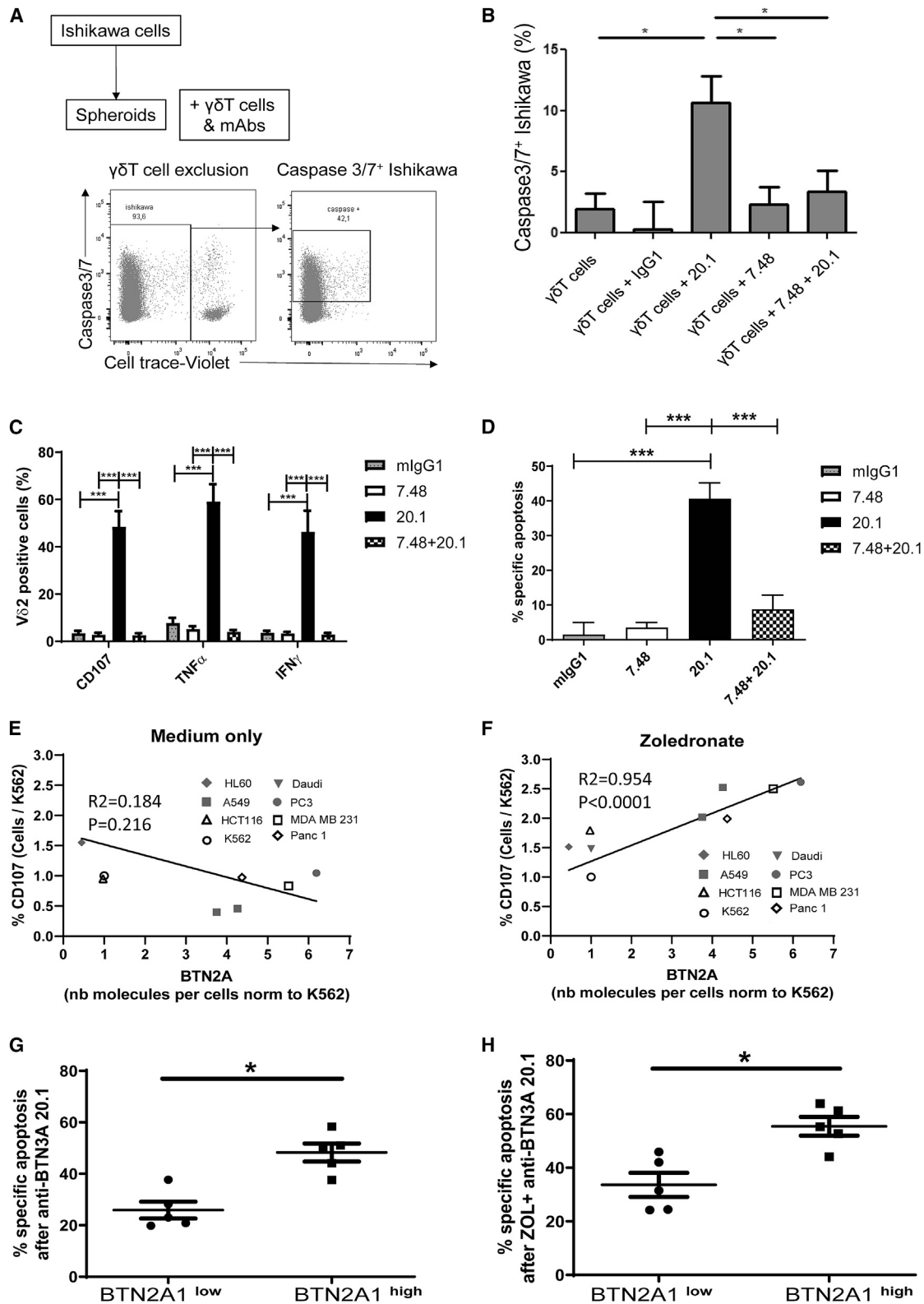
(A) BTN2AKO/BTN3AKO HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids (bottom table), before cell lysis and immunoprecipitation (IPP) with anti-GFP (targeting 3A1-GFP fusion) antibody and western blotting with anti-myc (for 2A1-myc fusion, top image) or anti-GFP (bottom image). (B–D) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) assays assessing homodimeric and heterodimeric interactions between different BTN2A and BTN3A isoforms (B), wild-type BTN3A1 with different BTN2A1 or BTN2A2 domain shuffled constructs (C, and see Figure S1B), and impact of zoledronate treatment (20 or 100  $\mu$ M, overnight [O/N]) and of B30.2 domain shuffling on BTN2A1/BTN3A1 dimer formation (D). (E) Expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (n = 3) were co-cultured, in the presence or absence of zoledronate (50  $\mu$ M), with BTN2AKO/3AKO cells (1:1) transfected with: (i) wild-type BTN3A1-YFP/wild-type BTN2A1-CFP, or (ii) wild-type BTN2A1-CFP/B30.2-deleted (DB30.2) BTN3A1-YFP, or (iii) wild-type BTN3A1-YFP/BTN2A1-B30.2 deleted (DB30.2)-CFP fusion constructs. Percentages of CD107<sup>+</sup> V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were assessed after 4h of co-cultures. A one-way ANOVA test was used for comparison. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001. (F) (left) Number of PLA signal per cell on WT HEK-293T transiently transfected with tagged BTN3A1 and BTN2A1 plasmids. Mann-Whitney: \*\*\*\*p < 0.001. (right). Representative images on untreated cells (top) or cells treated with zoledronate (bottom) for 4 h. Scale bar: 20  $\mu$ m. See also Figures S3 and S4.

### Anti-BTN2A1 antagonist mAb inhibits cytotoxic function of activated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

3D spheroids were used to assess the ability of the anti-BTN2A1 7.48 antagonistic mAb to inhibit V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell killing of cancer cells. Spheroids derived from the endometrial cancer cell line Ishikawa were cultured with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells from different healthy donors and treated with anti-BTN3A alone (20.1) or in combination with the anti-BTN2A1 7.48 antagonistic mAb. Apoptosis of Ishikawa cells within spheroids was evaluated by caspase-3/7 flow cytometry. Ishikawa cell spheroid apoptosis and release of perforin and granzyme B were observed in the presence of anti-BTN3A (20.1) and  $\gamma$  $\delta$ T cells (Figures 6A, 6B, and S6A–S6C). However, apoptosis and perforin/granzyme B release were inhibited when spheroid co-cultures were treated concomitantly with mAb 7.48. These results show that anti-BTN2A1 antagonist mAb 7.48 inhibits cytotoxic function of activated  $\gamma$  $\delta$ T cells in conditions closer to the tumor setting.

To determine whether BTN2A1 targeting by a mAb allowed modulation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against primary cancer cells, we assessed the ability of anti-BTN2A1 7.48 mAb to modulate a V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxic response against primary acute myelocytic leukemia (AML) blasts in terms of degranulation,





(legend on next page)

higher plasma membrane expression of BTN2A1 underwent significantly more V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-induced apoptosis than did those expressing low levels of BTN2A1. Hence, BTN2A1 expression is associated with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against both cancer cell lines and primary AML.

### Anti-BTN2A1 antagonist mAbs inhibit BTN2A1/V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR interaction

We sought to determine the effect of the different anti-BTN2A1 mAbs on BTN2A1/BTN3A1 interaction by using FRET. To this end, BTN2AKO/BTN3AKO HEK293T cells were transfected to express CFP/YFP-fusion BTN2A1 and BTN3A1 proteins and incubated with growing concentrations of different anti-BTN2A1 mAbs. Figure 7A shows that different anti-BTN2A1 clones had different impacts on BTN3A1/2A1 interaction. Strikingly, some V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell antagonists were found to increase BTN2A1/BTN3A1 FRET signal (8.15 and 7.28), whereas others (4.15, 7.48, and 5.28) decreased it. Interestingly, the anti-BTN3A antagonist 103.2 also mildly increased the BTN2A1/BTN3A1 dimer formation, whereas the 20.1 clone showed no effect.

Finally, we investigated whether the activity of our V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell antagonist anti-BTN2A1 mAbs was due to an inhibitory effect on the interaction between BTN2A1 and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR. We assessed the specific binding of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR G115 to HEK-BTN2AKO+2A1 cells and not to HEK-BTN2AKO cells (Figure 7B). Then, we determined whether anti-BTN2A1 mAbs impaired V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR G115 binding to the plasma membrane of HEK-BTN2AKO+2A1 cells. To this end, HEK-BTN2AKO+2A1 cells were pre-incubated with a saturating concentration of our antagonist anti-BTN2A1 antibodies (7.48, 7.28, 4.15, 5.28, 8.15) and the neutral clone (8.33) prior to incubation with Alexa Fluor 647 (AF647)-conjugated recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR G115, and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR binding was assessed by flow cytometry. As shown in Figure 7C, while the neutral (8.33) and weak inhibitor (7.28) did not affect V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR binding to BTN2A1, our stronger inhibitors, namely, 7.48, 4.15, 5.28, and 8.15, completely abolished BTN2A1/V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR interaction. Similar results were obtained when looking at the binding of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR G115 tetramers to

Daudi cells in the presence of our anti-BTN2A1 mAbs (Figures S7A and S7B), and when using ELISA to assess V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-Fc binding to BTN2A1-His, and the competition of anti-BTN2A mAbs for this binding (Figures S7C and S7D).

Hence, these data show that blocking V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR binding is associated with the antagonist effect of our anti-BTN2A1 mAbs, and that disruption of the BTN2A1/BTN3A1 dimer is not the only possible way to modulate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell function.

### DISCUSSION

In this study, we demonstrate that the interaction between BTN3A1 and BTN2A1, but not BTN2A2, is essential for the cytotoxic response of primary V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against cancer cells. These properties were identified not only in transfected models but also in primary human tumors. A link between BTN2A1 expression and pAgs triggering of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells was also demonstrated. At the molecular level, BTN3A1 and BTN2A1 form complexes at the plasma membrane. Their co-expression is critical for BTN2A1 export to the plasma membrane, and BTN2A1 can also interact and enhance plasma membrane exposure of BTN3A2 and BTN3A3 to a lesser extent. Interestingly, BTN2A1, but not BTN2A2, interacted with BTN3A2 and BTN3A3. The interaction between BTN3A1 and BTN2A1 involves at least two major mechanisms. First, the extracellular domains of BTN2A1 were critical to its interaction with BTN3A1, as shown in FRET experiments using domain shuffled BTN2A1 constructs. In addition, pAgs were an important factor to elicit a high level of complex formation, plasma membrane export, and function.

Despite compelling data demonstrating immunoregulatory properties of BTN2A2 in rodents (Sarter et al., 2016), we did not identify a crucial function in human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. The generation of a panel of anti-BTN2A1 mAbs allowed us to further decipher the interactions and functions of BTN2A1 and BTN3A1, with the discovery of antagonistic mAbs that inhibit V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity upon treatment with zoledronate or activating anti-BTN3A mAb.

### Figure 6. Anti-BTN2A1 antagonistic mAb inhibits the cytotoxic function of activated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

(A) Ishikawa cells were cultured for 7 days to obtain spheroids. CellTrace Violet (CTV)-stained V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were then added to the spheroids under the following conditions:  $\gamma$  $\delta$ T cells alone,  $\gamma$  $\delta$ T cells + mlgG1,  $\gamma$  $\delta$ T cells + 7.48,  $\gamma$  $\delta$ T cells + 20.1, or  $\gamma$  $\delta$ T cells + 7.48 and 20.1. After overnight culture with caspase-3/7 staining, spheroids were dissociated and processed for flow cytometry following the displayed gating strategy.

(B) Bar chart represents the percentage of caspase-3/7<sup>+</sup> Ishikawa cells after culture conditions detailed in (A). \* $p < 0.05$ .  $n = 4$  V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells donors.

(C) Bar charts represent the fraction of CD107ab<sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells ( $n = 3$ ) after a 4-h co-culture (E:T ratio of 1:1) with primary AML blasts ( $n = 6$ ) either with isotype control or anti-BTN2A1 7.48 mAb and/or anti-BTN3A 20.1 (10  $\mu$ g/mL).

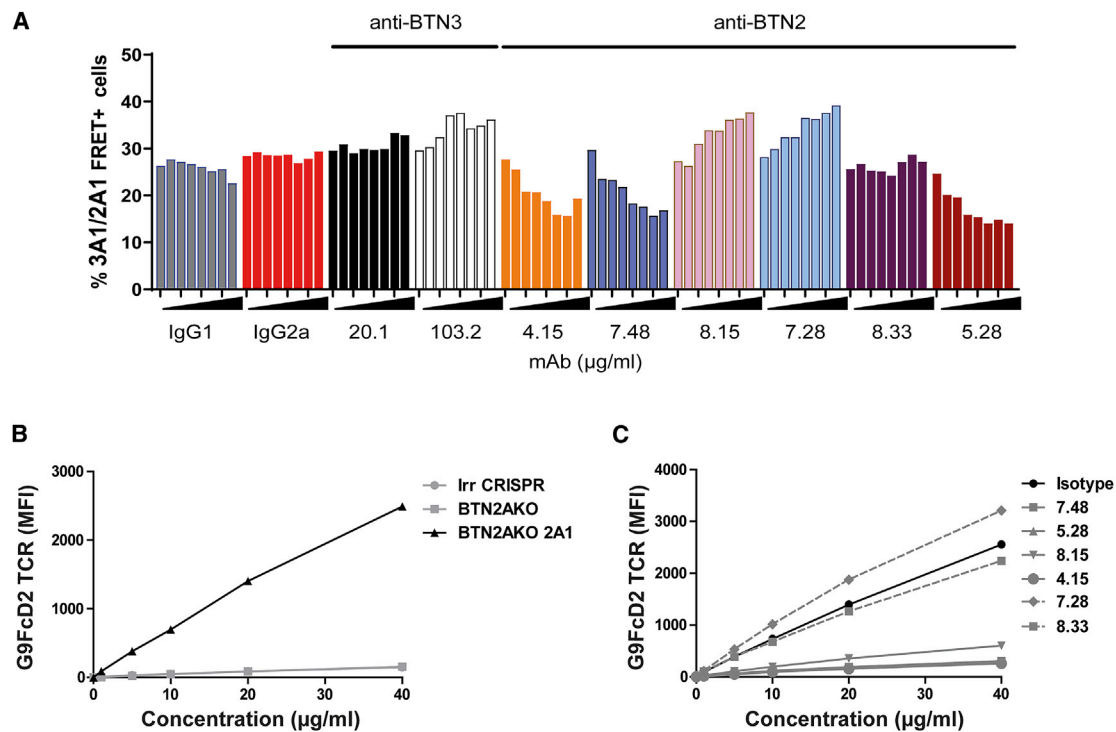
(D) Results from three independent experiments are depicted and expressed as mean  $\pm$  SEM. Caspase-3/7 expression is shown on primary AML blasts ( $n = 12$ ) after coculture for 3 h 30 min with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells ( $n = 3$ ) with an E:T ratio of 15:1. Cells were treated with isotype control or anti-BTN2A1 7.48 mAb and/or anti-BTN3A 20.1 (10  $\mu$ g/mL).

(C and D) AML blasts were preincubated overnight in medium. Results from six independent experiments are depicted, expressed as mean  $\pm$  SEM, by non-parametric paired ANOVA repeated-measures test with a Bonferonni post hoc test. \*\*\* $p < 0.001$ .

(E and F) Fraction of CD107<sup>+</sup> V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells triggered by the indicated cancer cell lines was assessed by flow cytometry. Graphs illustrate correlation between V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation (%CD107<sup>+</sup> cells, y axis) against the indicated cancer cell lines, in the absence or presence of zoledronate (50  $\mu$ M, G and H, respectively), and the number of BTN2A molecules (as assessed with 7.48; x axis). Linear regression was used to calculate the correlation between %CD107<sup>+</sup> cells and the number of BTN2A molecules. Results from two separate experiments were merged through normalization to the K562 cell line, present in both experiments.

(G and H) Caspase-3/7 expression on primary AML blasts ( $n = 10$ ) after a coculture for 3 h 30 min with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (E:T ratio of 15:1). Cells were treated with anti-BTN3A 20.1 agonist (10  $\mu$ g/mL) with and without zoledronate, as indicated. The BTN2A1 expression was assessed by flow cytometry analysis and expressed as median fluorescence intensity (MFI). The statistical significance was established using the Mann-Whitney test. \* $p < 0.05$ .

See also Figure S6.



**Figure 7. Anti-BTN2A1 mAbs inhibit recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR binding to BTN2A1**

(A) BTN2AKO/3AKO HEK293T cells were transfected with vectors encoding BTN2A1-CFP and BTN3A1-YFP, treated for 6 h with cycloheximide and bafilomycin to prevent dimer trafficking, and incubated with increasing concentrations (0–10  $\mu$ g/mL) of the indicated mAbs. Graph shows the percentage of BTN2A1/BTN3A1 FRET<sup>+</sup> cells for each condition.

(B) Binding curves of recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR to HEK-BTN2AKO+2A1 and HEK-BTN2AKO cells.

(C) Binding curves of recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR to HEK-BTN2AKO+2A1 cells, following saturation with a panel of anti-BTN2A antibodies compared to isotype control (black).

See also [Figure S7](#).

Using flow cytometry-based FRET experiments, we have shown that BTN2A1 was associated with BTN3A1 and to a lesser extent with BTN3A2 and BTN3A3. We have shown that interaction with BTN2A1 is the limiting factor for plasma membrane export of BTN3A2 and BTN3A3, which in turn regulate BTN3A1 trafficking (Vantourout et al., 2018), thus allowing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. Consistently, the level of BTN2A1 expression at the plasma membrane in different cancer cell lines is correlated to the potency of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation against these cells (Figure 6F). In addition, primary AML blasts with high BTN2A1 expression underwent significantly more apoptosis in co-cultures with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (Figures 6G and 6H). The initial experiments from Vantourout et al. (2018) could not address the involvement of BTN2A1 in BTN3A plasma membrane export since their BTN3AKO HEK cells expressed BTN2A1. In our experiments, not only could BTN2A1 enhance the export of all BTN3A isoforms to the plasma membrane, but also BTN3A2 and BTN3A3 isoforms reciprocally enhanced the plasma membrane exposure of BTN2A1. Reciprocally, the three BTN3A isoforms are limiting factors for BTN2A1 expression at the plasma membrane. These results suggest that changes in the expression of any of the three isoforms of BTN3A could have a consequence on BTN2A1 extracellular expression and, thus, an indirect impact on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity.

Another key demonstration in this study is the impact of pAgs in BTN3A1/BTN2A1 interaction. Indeed, zoledronate treatment enhances the interaction between BTN3A1 and BTN2A1. This effect, as expected, was totally prevented by the deletion of the BTN3A1 B30.2 domain, whereas the deletion of the B30.2 domain of BTN2A1 did not (data not shown). This latter observation is in line with data from Rigau et al. (2020) showing the absence of pAgs binding to the BTN2A1 B30.2 domain. One could predict that, similar to during amino bisphosphonate treatment, an IPP intracellular increase during pathologic conditions such as malignant transformation or infection will enhance BTN3A1/BTN2A1 interaction at the plasma membrane. Whether pAg levels also increase the formation of multimers including BTN3A1, BTN2A1, and other BTN3As remains to be demonstrated (Dustin et al., 2019). Unexpectedly, deletion of the B30.2 domain of BTN2A1 was as deleterious to zoledronate-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation as was deletion of the BTN3A1 B30.2 domain (Figure 3E). Although the BTN2A1 B30.2 domain does directly bind to pAgs (Rigau et al., 2020), it is possible that it participates in the formation of an asymmetrical pocket along with the BTN3A1 B30.2 domain, as shown by Yang et al. (2019) for BTN3A1 homodimers.

The literature available since 2010 has shown that BTN2A2 has an immune function. First, murine BTN2A2-Fc chimeric

protein was shown to inhibit the proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Smith et al., 2010). In addition, BTN2A2-Fc on activated murine T cells was able to inhibit TCR signaling and promoted *in vitro* generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells (Ammann et al., 2013). Later, Sarter et al. (2016) generated Btn2a2-KO mice and showed that BTN2A2 expression, mainly on antigen-presenting cells (APCs), might negatively regulate immune functions, presumably T cell functions, which were hypothetically associated with inhibitory signals controlling T cell anti-tumor responses. Altogether, these data using different *in vitro* and *in vivo* experimental settings demonstrated the role of BTN2A2 in immunomodulation, mainly via T cell regulation in mice. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are not present in rodents (Karunakaran et al., 2014). Data shown herein demonstrate that BTN2A2 is not required for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell function in humans (Figure 3). Whether BTN2A2 functions outside the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell compartment relying on other immune cells remains to be explored. Among the surprising observations regarding BTN2A2, we found that BTN2A2 did possess the ability to interact with BTN3A1 (Figure 6), yet it was unable to elicit V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation. Whether BTN2A2 might interfere with BTN3A1/BTN2A1 interaction, compete for it, and thus have an indirect regulatory role on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells function might be of interest to study in both solid tumors and infected cells.

Until 2020, our knowledge on BTN2A1 functions did not involve V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, except for our publication in 2014 (Riaño et al., 2014) indicating that genetic elements located in chromosome 6 were mandatory for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR triggering. Most of the studies analyzing gene polymorphisms and genome-wide association studies (GWASs) indicated that BTN2A1 could be involved in multiple human diseases. Without being exhaustive, several compelling studies have suggested that BTN2A1 gene polymorphisms might be associated with multiple human diseases, including myocardial infarction, metabolic syndrome, hypertension, dyslipidemia, and hepatitis C (Yamada et al., 2011) (Ampuero et al., 2015; Fujimaki et al., 2011; Horibe et al., 2011; Murakata et al., 2014; Oguri et al., 2011). At present, although evidence is available on the involvement of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in infectious diseases and cancer, their role in other human diseases is yet to be demonstrated. A careful study of BTN2A1 in these patient cohorts is important, and our anti-BTN2A1 mAbs could be valuable tools to provide a better understanding on the role of BTN2A1. Another consideration is the role of BTN2A1 in other cells types, including immune cells and somatic tissues. Currently, data on BTN2A1 protein expression are scarce, and although we have observed that in cancer patients T cells might express BTN2A1 (D.O., data not shown), a more comprehensive analysis of BTN2A1 expression in cancer and other pathologies is needed.

Our observations with BTN2A1 domain shuffling are consistent with nuclear magnetic resonance (NMR) data from Karunakaran et al. (2020) showing direct interaction of BTN2A1-V and BTN3A1-V domains, together with the knowledge of BTN2A1 interaction with the V $\gamma$ 9 chain TCR, a model can be proposed. In this model, BTN2A1 would elicit the first contact between the target cell and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, and drags along BTN3A1 to the immunological synapse, which in turn would transduce pAg signals from inside-out of the target cell to be exposed to

the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, hence activating them. However, in such a model there are several questions unsolved, including the existence and identity of the partner for BTN3A1 on the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell side. Moreover, Vantourout et al. (2009) showed that BTN3A2 was also essential for BTN3A1 export to the plasma membrane, and we found that BTN2A1 can also interact with BTN3A2 and BTN3A3. Hence, the actual composition and stoichiometry of BTN2A1- and BTN3A1-containing complexes at the plasma membrane, as well as the kinetics of the formations of such complexes during the immunological synapse between V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells and target cells, remain to be elucidated.

We generated BTN2A1 mAbs displaying variable ability to prevent V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell function against various tumor cell lines and primary leukemias. As was the case for anti-BTN3A 20.1 and 103.2 mAbs, once again mAbs proved to be valuable tools for addressing the cytotoxic function of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. This is an important observation, since it will help understanding the mechanisms of recognition of different cancers, in addition to what we have already found in leukemias and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) (Benyammine et al., 2016, 2017). We will be able to tackle the mechanisms of recognition of cancer cells by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells and specifically the role of BTN2A1 in different tumor types. In addition, this will allow us to show whether BTN2A1 is readily present on the tumor cell surface in tissues.

The inhibitory effects of our anti-BTN2A1 mAbs are seen using either amino bisphosphonate or anti-BTN3A activating mAb. Hence, inhibitory anti-BTN2A1 mAbs alter these two different immune responses to both intracellular pAgs in tumor cells or direct triggering with agonistic anti-BTN3A 20.1 mAb. Based on the recent observations (Rigau et al., 2020), we tested different hypotheses. One hypothesis would be that the inhibitory anti-BTN2A1 mAbs prevent BTN2A1 interaction with the V $\gamma$ 9 chain and consequently prevent V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. To test this hypothesis, we used soluble recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and assessed the eventual blocking effect of our mAbs on TCR binding to BTN2A1 at the membrane of BTN2A1-expressing cells. Our stronger antagonist anti-BTN2A1 mAb prevented V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR binding. Another mechanism of action has been evoked for anti-BTN2A1 mAb activity involving the ability to disrupt BTN3A1/BTN2A1 complexes and consequently interfere with V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. Among our seven different anti-BTN2A1 mAbs, some were able to enhance BTN3A1/BTN2A1 interaction whereas others prevented it. Hence, although we cannot rule out that modulation of the interaction between BTN2A1 and BTN3A1 could impact V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation, our data and recent studies indicate that other mechanisms might be at work. Hitherto, no ligand of BTN3A1 has been identified, although we have observed low-affinity binders of BTN3A1-Fc recombinant protein in various cells types (Compte et al., 2004; Vyborova et al., 2020), including V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (C.I., data not shown). We hypothesize that blocking anti-BTN2A1 mAbs might alter the binding of the BTN3A1/BTN2A1 complexes to a putative BTN3A1 ligand whether linked to the TCR or to another molecule. Herein, we have discussed the use of inhibiting BTN2A1 antibodies in an oncology setting as tools to understand the role of BTN2A1 in the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell anti-tumor response. For therapeutic applications, it would be interesting to investigate these inhibitory BTN2A1 antibodies in an



autoimmune setting, since V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells have been reported to be dysregulated in several autoimmune diseases (Bank, 2020).

In summary, we have shown a complex set of interactions between BTN2A1 and BTN3A molecules, modulated by pAgs and critical for their exposure to the plasma membrane. We demonstrated the impact of these interactions on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxicity against malignant cells, including primary human tumors, involving BTN2A1 but not BTN2A2. In addition, anti-BTN2A1 mAbs were generated that allowed us to understand the function of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells and the mechanism of action of their anti-tumor responses.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Cell lines
  - Primary cell cultures
- METHOD DETAILS
  - Lentiviral transduction and CRISPR-Cas9-mediated BTN2A knockout
  - Co-immunoprecipitation and immunoblot analysis
  - Functional assay on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells
  - Quantification of BTN2A and BTN3A expression at the plasma membrane
  - Fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments
  - Proximity ligation assay (PLA)
  - Murine V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR reporter assays
  - Anti-BTN2A1 mAb generation
  - V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxic activity using the Ishikawa spheroid model
  - Recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR production and competitive binding assay
  - Assessments of antibody affinity toward BTN2A1
  - Epitope binning assays
  - Quantitative PCR
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109359>.

## ACKNOWLEDGMENTS

The D.O. and E.S. teams are labeled Equipe Fondation Recherche Médicale DEQ20180339209 and DEQ20170839118, respectively. D.O. is a Senior Scholar of the Institut Universitaire de France. This study was supported by SATT Sud-Est under the agreement 793-SA-16-AMU. We would like to thank Pierre Pontarotti for advice and manuscript editing and Isabel Gregoire, Tim Carlton, and Lena Daher for careful reading of the manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.E.C., C.P., A.D.G., E.S., T.H., R.H., N.V., and D.O. designed the study/experiments. C.E.C., A.D.G., C.K., M.G., M.F., E.G., C.R., C.I., L.G., N.V., A.B., and A.C.I.F. performed experiments. C.E.C., C.P., A.D.G., and D.O. analyzed and interpreted the data. C.E.C. and D.O. wrote the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript.

## DECLARATION OF INTERESTS

D.O. is cofounder and shareholder of Imcheck Therapeutics. C.E.C., A.D.G., R.H., M.F., M.G., E.G., and C.K. are employees and shareholders of Imcheck Therapeutics. D.O. and C.P. are inventors of patent WO/2019/057933. The remaining authors declare no competing interests.

Received: April 3, 2020

Revised: August 27, 2020

Accepted: June 17, 2021

Published: July 13, 2021

## REFERENCES

- Adams, E.J., Gu, S., and Luoma, A.M. (2015). Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cell. Immunol.* 296, 31–40.
- Allison, T.J., Winter, C.C., Fournié, J.J., Bonneville, M., and Garboczi, D.N. (2001). Structure of a human  $\gamma\delta$  T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820–824.
- Ammann, J.U., Cooke, A., and Trowsdale, J. (2013). Butyrophilin Btn2a2 inhibits TCR activation and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway signaling and induces Foxp3 expression in T lymphocytes. *J. Immunol.* 190, 5030–5036.
- Ampuero, J., del Campo, J.A., Rojas, L., García-Lozano, R.J., Buti, M., Solá, R., Forns, X., Moreno-Otero, R., Andrade, R., Diago, M., et al. (2015). Fine-mapping butyrophilin family genes revealed several polymorphisms influencing viral genotype selection in hepatitis C infection. *Genes Immun.* 16, 297–300.
- Amslinger, S., Hecht, S., Rohdich, F., Eisenreich, W., Adam, P., Bacher, A., and Bauer, S. (2007). Stimulation of V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T-lymphocyte proliferation by the isoprenoid precursor, (E)-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl 4-diphosphate. *Immunobiology* 212, 47–55.
- Bank, I. (2020). The role of gamma delta T cells in autoimmune rheumatic diseases. *Cells* 9, 462.
- Banning, C., Votteler, J., Hoffmann, D., Koppensteiner, H., Warmer, M., Reimer, R., Kirchhoff, F., Schubert, U., Hauber, J., and Schindler, M. (2010). A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS ONE* 5, e9344.
- Benyamine, A., Le Roy, A., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Castanier, C., Orlanducci, F., Pouyet, L., Goubard, A., Collette, Y., Vey, N., et al. (2016). BTN3A molecules considerably improve V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells-based immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Oncolimmunology* 5, e1146843.
- Benyamine, A., Loncle, C., Foucher, E., Blazquez, J.-L., Castanier, C., Chretien, A.-S., Modesti, M., Secq, V., Chouaib, S., Gironella, M., et al. (2017). BTN3A is a prognosis marker and a promising target for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells based-immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Oncolimmunology* 7, e1372080.
- Blazquez, J.-L., Benyamine, A., Pasero, C., and Olive, D. (2018). New insights into the regulation of  $\gamma\delta$  T cells by BTN3A and other BTN/BNL in tumor immunity. *Front. Immunol.* 9, 1601.
- Compte, E., Pontarotti, P., Collette, Y., Lopez, M., and Olive, D. (2004). Front-line: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 2089–2099.
- Dustin, M.L., Scotet, E., and Olive, D. (2019). An X-ray vision for phosphoantigen recognition. *Immunity* 50, 1026–1028.
- Eberl, M., Hintz, M., Reichenberg, A., Kollas, A.-K., Wiesner, J., and Jomaa, H. (2003). Microbial isoprenoid biosynthesis and human  $\gamma\delta$  T cell activation. *FEBS Lett.* 544, 4–10.

- Fujimaki, T., Kato, K., Oguri, M., Yohida, T., Horibe, H., Yokoi, K., Watanabe, S., Satoh, K., Aoyagi, Y., Tanaka, M., et al. (2011). Association of a polymorphism of *BTN2A1* with dyslipidemia in East Asian populations. *Exp. Ther. Med.* **2**, 745–749.
- Gober, H.-J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., and De Libero, G. (2003). Human T cell receptor  $\gamma\delta$  cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* **197**, 163–168.
- Gu, S., Sachleben, J.R., Boughter, C.T., Nawrocka, W.I., Borowska, M.T., Tarasch, J.T., Skiniotis, G., Roux, B., and Adams, E.J. (2017). Phosphoantigen-induced conformational change of butyrophilin 3A1 (*BTN3A1*) and its implication on  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E7311–E7320.
- Gu, S., Borowska, M.T., Boughter, C.T., and Adams, E.J. (2018). Butyrophilin3A proteins and  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell activation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **84**, 65–74.
- Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C.-M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E.J., Netzer, S., et al. (2012). Key implication of *CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)* in cellular stress sensing by a major human  $\gamma\delta$  T-cell subset. *Blood* **120**, 2269–2279.
- Heuston, S., Begley, M., Gahan, C.G.M., and Hill, C. (2012). Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology (Reading)* **158**, 1389–1401.
- Horibe, H., Kato, K., Oguri, M., Yoshida, T., Fujimaki, T., Kawamiya, T., Yokoi, K., Watanabe, S., Satoh, K., Aoyagi, Y., et al. (2011). Association of a polymorphism of *BTN2A1* with hypertension in Japanese individuals. *Am. J. Hypertens.* **24**, 924–929.
- Karunakaran, M.M., Göbel, T.W., Starick, L., Walter, L., and Herrmann, T. (2014).  $V\gamma 9$  and  $V\delta 2$  T cell antigen receptor genes and butyrophilin 3 (*BTN3*) emerged with placental mammals and are concomitantly preserved in selected species like alpaca (*Vicugna pacos*). *Immunogenetics* **66**, 243–254.
- Karunakaran, M.M., Willcox, C.R., Salim, M., Paletta, D., Fichtner, A.S., Noll, A., Starick, L., Nöhren, A., Begley, C.R., Berwick, K.A., et al. (2020). Butyrophilin-2A1 directly binds germline-encoded regions of the  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR and is essential for phosphoantigen sensing. *Immunity* **52**, 487–498.e6.
- Li, J., Herold, M.J., Kimmel, B., Müller, I., Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., and Herrmann, T. (2009). Reduced expression of the mevalonate pathway enzyme farnesyl pyrophosphate synthase unveils recognition of tumor cells by  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells. *J. Immunol.* **182**, 8118–8124.
- Morita, C.T., Beckman, E.M., Bukowski, J.F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B.R., Golan, D.E., and Brenner, M.B. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity* **3**, 495–507.
- Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., and Wang, H. (2007). Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human  $V\gamma 2V\delta 2$  T cells: Discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol. Rev.* **215**, 59–76.
- Murakata, Y., Fujimaki, T., and Yamada, Y. (2014). Association of a butyrophilin, subfamily 2, member A1 gene polymorphism with hypertension. *Biomed. Rep.* **2**, 818–822.
- Oguri, M., Kato, K., Yoshida, T., Fujimaki, T., Horibe, H., Yokoi, K., Watanabe, S., Satoh, K., Aoyagi, Y., Tanaka, M., et al. (2011). Association of a genetic variant of *BTN2A1* with metabolic syndrome in East Asian populations. *J. Med. Genet.* **48**, 787–792.
- Palakodeti, A., Sandstrom, A., Sundaresan, L., Harly, C., Nedellec, S., Olive, D., Scotet, E., Bonneville, M., and Adams, E.J. (2012). The molecular basis for modulation of human  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell responses by *CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)*-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **287**, 32780–32790.
- Peigné, C.-M., Léger, A., Gesnel, M.-C., Konczak, F., Olive, D., Bonneville, M., Breathnach, R., and Scotet, E. (2017). The juxtamembrane domain of butyrophilin *BTN3A1* controls phosphoantigen-mediated activation of human  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells. *J. Immunol.* **198**, 4228–4234.
- Rhodes, D.A., Stammers, M., Malcherek, G., Beck, S., and Trowsdale, J. (2001). The cluster of *BTN* genes in the extended major histocompatibility complex. *Genomics* **71**, 351–362.
- Riaño, F., Karunakaran, M.M., Starick, L., Li, J., Scholz, C.J., Kunzmann, V., Olive, D., Amslinger, S., and Herrmann, T. (2014).  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (*BTN3A1*) and additional genes on human chromosome 6. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2571–2576.
- Rigau, M., Ostrouska, S., Fulford, T.S., Johnson, D.N., Woods, K., Ruan, Z., McWilliam, H.E.G., Hudson, C., Tutuka, C., Wheatley, A.K., et al. (2020). Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by  $\gamma\delta$  T cells. *Science* **367**, eaay5516.
- Sandstrom, A., Peigné, C.-M., Léger, 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  $V\gamma 9V\delta 2$  T cells. *Immunity* **40**, 490–500.
- Sarter, K., Leimgruber, E., Gobet, F., Agrawal, V., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Mastelic-Gavillet, B., Kamath, A., Fontannaz, P., Guéry, L., et al. (2016). *Btn2a2*, a T cell immunomodulatory molecule coregulated with MHC class II genes. *J. Exp. Med.* **213**, 177–187.
- Smith, I.A., Knezevic, B.R., Ammann, J.U., Rhodes, D.A., Aw, D., Palmer, D.B., Mather, I.H., and Trowsdale, J. (2010). *BTN1A1*, the mammary gland butyrophilin, and *BTN2A2* are both inhibitors of T cell activation. *J. Immunol.* **184**, 3514–3525.
- Starick, L., Riano, F., Karunakaran, M.M., Kunzmann, V., Li, J., Kreiss, M., Amslinger, S., Scotet, E., Olive, D., De Libero, G., and Herrmann, T. (2017). Butyrophilin 3A (*BTN3A*, *CD277*)-specific antibody 20.1 differentially activates  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation. *Eur. J. Immunol.* **47**, 982–992.
- Tanaka, Y., Morita, C.T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M.B., and Bloom, B.R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* **375**, 155–158.
- Thompson, K., Rojas-Navea, J., and Rogers, M.J. (2006). Alkylamines cause  $V\gamma 9V\delta 2$  T-cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway. *Blood* **107**, 651–654.
- Vantourout, P., Mookerjee-Basu, J., Rolland, C., Pont, F., Martin, H., Davrinche, C., Martinez, L.O., Perret, B., Collet, X., Périgaud, C., et al. (2009). Specific requirements for  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell stimulation by a natural adenylated phosphoantigen. *J. Immunol.* **183**, 3848–3857.
- Vantourout, P., Laing, A., Woodward, M.J., Zlatareva, I., Apolonia, L., Jones, A.W., Snijders, A.P., Malim, M.H., and Hayday, A.C. (2018). Heteromeric interactions regulate butyrophilin (BTN) and BTN-like molecules governing  $\gamma\delta$  T cell biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, 1039–1044.
- Vyborova, A., Beringer, D.X., Fasci, D., Karaiskaki, F., van Diest, E., Kramer, L., de Haas, A., Sanders, J., Janssen, A., Straetemans, T., et al. (2020).  $\gamma 9\delta 2$  T cell diversity and the receptor interface with tumor cells. *J. Clin. Invest.* **130**, 4637–4651.
- Wang, H., Fang, Z., and Morita, C.T. (2010).  $V\gamma 2V\delta 2$  T cell receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *J. Immunol.* **184**, 6209–6222.
- Wang, H., Nada, M.H., Tanaka, Y., Sakuraba, S., and Morita, C.T. (2019). Critical roles for coiled-coil dimers of butyrophilin 3A1 in the sensing of prenyl pyrophosphates by human  $V\gamma 2V\delta 2$  T cells. *J. Immunol.* **203**, 607–626.
- Yamada, Y., Nishida, T., Ichihara, S., Sawabe, M., Fuku, N., Nishigaki, Y., Aoyagi, Y., Tanaka, M., Fujiwara, Y., Yoshida, H., et al. (2011). Association of a polymorphism of *BTN2A1* with myocardial infarction in East Asian populations. *Atherosclerosis* **215**, 145–152.
- Yang, Y., Li, L., Yuan, L., Zhou, X., Duan, J., Xiao, H., Cai, N., Han, S., Ma, X., Liu, W., et al. (2019). A structural change in butyrophilin upon phosphoantigen binding underlies phosphoantigen-mediated  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell activation. *Immunity* **50**, 1043–1053.e5.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Mouse c-myc 9E10	Invitrogen	Cat#MA1-980
anti-GFP antibody	Sigma Aldrich	Cat#11814460001; RRID:AB_390913
anti-BTN2A mAb (clones 7.48, 7.28, 8.15, 8.16, 4.15, 5.28 and 8.33)	PCT/EP2018/075689	N/A
Anti-CD107(a)	BD biosciences	Cat#560949; RRID:AB_396134
Anti-CD107(b)	BD biosciences	Cat#555804; RRID:AB_396138
Rabbit anti-flag	Sigma Aldrich	Cat#Millipore F7425; RRID:AB_439687
anti-BTN3A1 20.1 mAb	UMR 599 INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. (Compte et al., 2004)	N/A
anti-BTN3A1 103.2 mAb	UMR 599 INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. (Compte et al., 2004)	N/A
PE Fab'2 Goat anti Human IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	Cat#109-116-088; RRID: AB_2337676
anti-human Fc-HRP	Biorad	Cat#AHP1323P; RRID AB_877442
anti-His-HRP	Biorad	Cat#MA1-135; RRID: AB_2610638
Mouse anti-human CD107a IGG1	BD BIOSCIENCES	Cat# 555800; batch 9311781; clone H4A3; RRID:AB_396134
Mouse anti-human anti-CD107b IGG1	BD BIOSCIENCES	Cat# 555804; batch 9207143; clone H4B4; RRID:AB_396138
Cytofix/Cytoperm	BD BIOSCIENCES	Cat# 554714
Mouse anti-human anti-perforin IGG2B	BD BIOSCIENCES	Cat#563764; clone δG9; RRID:AB_2738411
Mouse anti-human anti-granzyme B IGG1	BD BIOSCIENCES	Cat# 566996; clone 4B2G4; RRID:AB_2869996
Mouse anti-human IFN $\gamma$ IGG1	MILTENYI BIOTEC	Cat# 130-113-493; RRID: AB_2733589
Mouse anti-human TNF $\alpha$ IGG1	MILTENYI BIOTEC	Cat# 130-118-974; RRID: AB_2751595
Mouse anti-human IGG1	MILTENYI BIOTEC	Cat# 130-106-545; RRID: AB_2733683
Mouse anti-human CD3 IGG1	BECKMAN COULTER	Cat#B49204; batch 200030; clone UCHT1
Mouse anti-human TCR V $\delta$ 2 IGG1	BIOLEGEND	Cat#331422; batch B281873; clone B6; RRID: AB_2687328
<b>Biological samples</b>		
Blood samples from healthy volunteers	Local Blood Bank- <i>Etablissement Français du Sang</i> (EFS)-Marseille-France	<a href="https://dondesang.efs.sante.fr/">https://dondesang.efs.sante.fr/</a>
Blood samples from acute myeloid leukemia patients	Institut Paoli Calmettes, Marseille, France	<a href="https://www.institutpaolicalmettes.fr/">https://www.institutpaolicalmettes.fr/</a>
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
Recombinant human IL-2	Novartis (Proleukin)	N/A
Zoledronic acid monohydrate	Sigma Aldrich	SML0223; CAS: 165800-06-6
Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma Aldrich	Cat#P8139-1MG
Ionomycine	Sigma Aldrich	Cat#I0634-1MG
HMBPP	Sigma Aldrich	Cat#95098
BTN2A1-Fc fusion protein	R&D Systems	Cat# 9058-BT
AF647 labeling kit	ThermoFisher Scientific	Cat# A20186
DSB-X Biotin Protein Labeling Kit	ThermoFisher Scientific	Cat# D20655
Recombinant human BTN2A1-His protein	R&D Systems	Cat#9058-BT-050

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Critical commercial assays</b>		
LentiX concentrator	Takara Bio	Cat#631232
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific	Cat# 23225
Protein G chromatography column	GE Healthcare	Cat#17-0618-01
GolgiStop protein transport inhibitor	BD BIOSCIENCES	Cat# 554724
CellQuant calibrator kit	Biocytex	Cat# 7208
Duolink kit PLA	Sigma Aldrich	Cat# DUO92007
Mouse IL-2 ELISA kit	Invitrogen	Cat#88-7024-88
CellTrace Violet	Invitrogen	Cat#C34557
CellEvent Caspase-3/7 Reagent green	Invitrogen	Cat#C10423
Protein A chromatography column	GE Healthcare	GE17-0402-01
Cell Proliferation Dye eFluor 670	ThermoFisher Scientific	Cat# 65-0840-90
CellEvent caspase –3/7 Green	ThermoFisher Scientific	Cat# C10423
<b>Experimental models: Cell lines</b>		
HL-60 (promyelocytic leukemia)	ATCC	ATCC® CCL-240
Raji (Burkitt's lymphoma)	ATCC	ATCC® CCL-86
Daudi (B lymphoblast)	ATCC	ATCC® CCL-213
K562 (chronic myelogenous leukemia)	ATCC	ATCC® CCL-243
HCT116 (colorectal carcinoma)	ATCC	ATCC® CCL-247
PC3 (prostate adenocarcinoma)	ATCC	ATCC® CRL-1435
Panc-1 (pancreas adenocarcinoma)	ATCC	ATCC® CRL-1469
MDA-MB-231 (breast carcinoma)	ATCC	ATCC® HTB-26
HEK293T (human embryonic kidney)	ATCC	ATCC® CRL-1573
A549 (lung adenocarcinoma)	ATCC	ATCC® CCL-185
Mouse fibroblast cell line NIH 3T3	ATCC	ATCC® CRL-1658
53/4 hybridoma cells expressing the human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR	INSERM UMR 599, Universitéde laMéditerranée, Cancer and Immunology Institute of Marseille, IFR 137, Marseille, France INSERM UMR 599, Universitéde laMéditerranée, Cancer and Immunology Institute of Marseille, IFR 137, Marseille, France (Starick et al., 2017)	N/A
HEK293T BTN2AKO	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO +2A1	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO +2A2	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO +2A1	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO +3A1	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO +3A2	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO +3A3	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO +2A1+3A1	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO +2A1+3A2	This manuscript	N/A
HEK293T BTN2AKO/BTN3AKO +2A1+3A3	This manuscript	N/A
Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line	Dr. J. Downward laboratory at the Francis Crick Institute	N/A
Chinese hamster ovary cells	ECACC	85050302
Recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (clone G115,) with a C-terminal Fc-tag on the V $\gamma$ 9 chain	This manuscript	N/A

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Oligonucleotides</b>		
TaqManAssay_BTN3A1 Probe	ThermoFisher Scientific	Hs01063368_m1
TaqManAssay_BTN3A2 Probe	ThermoFisher Scientific	Hs00389328_m1
TaqManAssay_BTN3A3 Probe	ThermoFisher Scientific	Hs00757230_m1
TaqManAssay_TBP Probe	ThermoFisher Scientific	Hs00427620_m1
<b>Recombinant DNA</b>		
lentiCRISPR-v2 vector	Addgene	RRID: Addgene_52961
pMD2.G expression vector	Addgene	RRID: Addgene_12259
psPAX2 expression vector	Addgene	RRID: Addgene_12260
pLV-EF1 $\alpha$ -puro vector	Custom DNA Constructs	N/A
BTN2A guide 44 lentiviral vector (BTN2A1/A2 (exon3) specific sgRNA CACCGACA GTGTGGAGGGACCCCTA	This manuscript	N/A
pcDNA3.1_eCFP-eYFP (eCFP-YFP fusion cloned BamH1/Not1 into pcDNA3.1-Zeo)	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pLV-BTN2A1-myc	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN3A1_link_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN3A1_link_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN3A1_link_eGFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1-BTN3A1_DeltaB30.2_YFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN3A2_link_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN3A2_link_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN3A3_link_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN3A3_link_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A1_link_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A1_link_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A1_deltaB30.2_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A1_JTM-BTLA_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A1_EC-BTLA_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A1_JTM-BTLA_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A2_link_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A2_link_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A1_JTM-BTN2A2_eCFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A2_deltaB30.2_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A2_JTM-BTLA_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A2_JTM-BTN2A1_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A2_JTM-BTLA_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pcDNA3.1_BTN2A2_EC-BTLA_eYFP	Custom, GeneArt	N/A
pLV-BTN2A1-wt (BTN2A1 optimized from ...	Custom, GeneArt	N/A
pLV-BTN2A2-wt	Custom, GeneArt	N/A
pLenti_BTN3A1-MycDDK	Origene	RC216344L3
pLenti_BTN3A2-MycDDK	Origene	RC201183L3
pLenti_BTN3A3-MycDDK	Origene	RC220673
<b>Software and algorithms</b>		
FlowJo 10.5.3 software	FlowJo LLC	<a href="https://www.flowjo.com/solutions/flowjo">https://www.flowjo.com/solutions/flowjo</a>
ImageJ	ImageJ	<a href="https://imagej.net/">https://imagej.net/</a>

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Inc	<a href="https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a>
<b>Other</b>		
Turbofect reagent	ThermoFisher Scientific	Cat#R0531
TaqMan Fast Advanced Master Mix	ThermoFisher Scientific	4444557
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific	Cat#H3570
LIVE/DEAD fixable aqua dead cell stain	ThermoFisher Scientific	Cat# L34966

**RESOURCE AVAILABILITY**

**Lead contact**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead contact, Carla Cano ([carla.cano@imcheck.fr](mailto:carla.cano@imcheck.fr))

**Materials availability**

All anti-BTN2A antibodies generated in this study are available from the Lead Contact with a completed Materials Transfer Agreement.

**Data and code availability**

- All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request.
- This study did not generate any unique code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

**Cell lines**

HL-60 (promyelocytic leukemia), Raji (Burkitt's lymphoma), Daudi (B lymphoblast) and K562 (chronic myelogenous leukemia) cells were cultured in RPMI 1640 Glutamax medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% Na-Pyruvate. HCT116 (colorectal carcinoma) were cultured in McCoy's medium supplemented with 10% FBS, 1% Na-Pyruvate. PC3 (prostate adenocarcinoma), Panc-1 (pancreas adenocarcinoma), MDA-MB-231 (breast carcinoma), HEK293T (human embryonic kidney) and its derivatives were cultured in DMEM Glutamax medium supplemented with 10% FBS, 1% Na-Pyruvate. A549 (lung adenocarcinoma) cells were cultured in Ham's F12/Kaighn's 10% FCS, 1% Na-Pyruvate. The Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line was kindly provided by Dr. J. Downward laboratory at the Francis Crick Institute and cultured according to their recommendations. 53/4 hybridoma cells expressing the human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR were kindly provided by the research group of Professor Dr. Thomas Herrmann- Institute of Virology and Immunobiology- University of Würzburg and prepared as previously described ([Starick et al., 2017](#)).

**Primary cell cultures**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by centrifugation on density gradient (Eurobio) of whole blood from healthy volunteers (HV) provided by the local Blood Bank (Etablissement Français du Sang (EFS)).

Heparinized blood from 12 acute myeloid leukemia (AML) patients (8 men and 4 women) were obtained from the Department of Hematology (PI Pr. N. Vey, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France). The patient's age ranged between 31 and 90 years (mean age  $\pm$  SD: 58,8  $\pm$  16,7 years). Under the French-American-British (FAB) classification patients belonged to subtypes M1 to M6 as follows: 3 patients to subtype M1, one patient to subtype M2, 3 patients to subtype M4, 4 patients to subtype M5 and one patient to subtype M6. Written informed consent was obtained from all donors in accordance with the Declaration of Helsinki, and the research was approved by the local institutional review boards of the Institut Paoli Calmettes (N $^{\circ}$  ID IPC1996).

All cell culture media were obtained from Life Technologies.

**METHOD DETAILS**

**Lentiviral transduction and CRISPR-Cas9-mediated BTN2A knockout**

For generation of lentiviral particles, HEK293T cells were transfected with pMD2.G, psPAX2 and pLV lentiviral expression vector, which was either empty or encoding the indicated gene of interest, using TurboFect reagent (ThermoFisher) according to

manufacturer's instructions. Transfection medium was replaced by OptiMEM™ (ThermoFisher) after 24h. Culture supernatant containing lentiviral particles was collected after 24 hr and 48 hr, and concentrated LentiX concentrator (Takara) following manufacturer's instructions. For HEK-BTN2A overexpressing transductants, wild-type human BTN2A1 or BTN2A2 were cloned into pLV-EF1 $\alpha$ -puro vector using BamHI/SalI restriction sites. For all transductions, HEK293T cells were seeded in 12-wells plates ( $2.5 \times 10^5$  cells/well), and 25  $\mu$ L of concentrated lentiviral particles were added to the culture. After 24 hr, cells were washed twice in complete medium, and cultured in their regular culture medium for 48 hr. For BTN2A gene inactivation, optimized CRISPR target sequences targeting both BTN2A isoforms (guide 44, sequence available upon request) were cloned into the lentiCRISPR-v2 vector (Addgene #52961). BTN2AKO cells were obtained by transduction of the indicated cell lines with the above-mentioned lentiviral guide 44 vector. BTN2AKO/3AKO HEK293T cells were obtained by transducing HEK293T BTN3AKO (described in Blazquez et al. manuscript in preparation) with BTN2A guide 44 lentiviral vector. For selection of HEK293T transductants, 1  $\mu$ g/mL puromycin was added to the culture medium.

### Co-immunoprecipitation and immunoblot analysis

BTN2AKO/BTN3AKO HEK293T cells were co-transfected with with pcDNA3-Zeo vectors encoding BTN3A1-GFP, BTN2A1-myc or BTN3A1-GFP + BTN2A1-myc using Lipofectamine 2000 from ThermoFisher® in OptiMEM medium from GIBCO® according to manufacturer's instructions. After 48 hr, cells were lysed in 50mM Tris 1M pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP-40, 1%, containing protease inhibitors cocktail (MERCCK®). After centrifugation 10 min at 13.000 rpm at 4°C, protein content in lysate supernatants were quantified using Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher). Samples were brought to a concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ L in lysis buffer, and then incubated with the indicated antibodies overnight at 4°C. Next day, immunocomplexes were captured on protein G (GE Healthcare) for 45 minutes on rotary shaker at 4°C. Beads were washed five times in lysis buffer, and proteins were eluted in 4  $\times$  laemmli buffer (Biorad) with  $\beta$ -Mercaptoethanol (Euromedex) for 5 minutes at 95°C and on an 4%–15% SDS-PAGE (Biorad), before Western Blotting with the indicated mAbs. Mouse c-myc 9E10 was from Invitrogen® and anti-GFP antibody from ROCHE®. Whole cell lysates (input) were used to check for transfection efficiency.

### Functional assay on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

Purified V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells from expanded healthy volunteers PBMCs (in presence of 1  $\mu$ g/mL zoledronate, 200 UI/mL rhIL-2 for 12-14 days) and cultured overnight in rhIL-2 (200 UI/mL) prior to stimulation. Then, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were co-cultured at 37°C with the indicated target cell lines (effector: target (E:T) ratio 1:1) with or without 10  $\mu$ g/mL purified anti-BTN2A1 mAb or 1 or 10  $\mu$ g/mL 20.1, or Zoledronate (10  $\mu$ M), as indicated. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/mL) with ionomycin (1  $\mu$ g/mL) were used as positive control for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation was assessed after 4 hr incubation in presence of GolgiStop (BD Biosciences) and soluble CD107(a+b)-FITC. For assessment of perforin/granzyme B release, experiment was performed in the absence of GolgiStop. After 4 hr, cells were collected, fixed in PBS 2% paraformaldehyde and analyzed on a CytoFlex LX (Beckman Coulter) using FlowJo 10.5.3 software (FlowJo). Degranulation was determined by the percentage of CD107ab + cells among V $\delta$ 2 T cells (defined as CD3+ Pan $\gamma$  $\delta$ TCR+).

### Quantification of BTN2A and BTN3A expression at the plasma membrane

The number of BTN2A and BTN3A molecules displayed at the plasma membrane of the indicated cells was assessed using the Cell-Quant calibrator kit (Biocytex) according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were stained with primary antibodies (10  $\mu$ g/mL or as indicated otherwise) for 30 min at 4°C, with or without permeabilization using CytoFix/Cytoperm kit according to manufacturer's instructions (BD Biosciences), then staining was detected using PE-conjugated goat anti-mouse probe (Jackson Immunoresearch), which was previously incubated with CellQuant beads. Cells were fixed using Cytofix (BD Bioscience) and analyzed by flow cytometry (Cytoflex S, Beckman Coulter). Bead counts were analyzed by linear regression to obtain a calibration curve, depicting mean fluorescence intensity (MFI) correlation to the number of molecules displayed at the plasma membrane. Ratio between extracellular/intracellular number of molecules was calculated as an indicator of plasma membrane export. For evaluating the eventual correlation between BTN expression in target cells and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell degranulation, BTN quantification and degranulation assays were run simultaneously. Results were analyzed with linear regression between the percentage of CD107ab+ cells and the number of BTN molecules. Pearson correlation test was calculated for each graph. To merge results from two independent experiments, K562 cells were assessed twice and used as « reference cell line » for normalization (results for K562 cells were considered equal to 1). Then, results for each cell line was compared to K562 using « Cell / K562 value ».

### Fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments

For eCFP or eYFP constructs, cDNA was synthesized (GeneArt) and cloned into pCDN3.1-Zeo+ backbone (Invitrogen™). A 39 aa linker was included between BTN3A/2A C-terminal end and -eXFP molecule in order to provide with flexibility and not interfere with molecule function. The reference sequence for BTN3A1 was the NM\_007048, for BTN3A2, the reference coding sequence was the NM\_001197246 and NM\_006994 for BTN3A3. For BTN2A1 and BTN2A2, the reference sequences were NM\_007049.5 and NM\_006995.5 respectively. eCFP-eYFP fusion protein sequences (eCFP linked to eYFP by a 14 aa linker) were kindly provided by Pascal Schneider and Cristian Smulski (Lausanne; Switzerland). HEK293T cells were transiently transfected with eCFP and eYFP fusion proteins using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen™) according to manufacturer's instruction and analyzed by Flow

Cytometry 20–24 h post-transfection using a MacsQuant VYB Analyzer (Miltenyi™) or CytoFLEX (Beckman Coulter). eYFP signal was recorded using the 488 nm laser with a 525/50 filter, eCFP signal was recorded using the 405 nm laser with a 450/50 filter and FRET signal was recorded using the 405 nm laser with a 525/50 filter. Careful removal of background signals in the FRET channel is achieved using a FRET gate whose shape is function of the eYFP to eCFP ratio. Co-transfection of equal amounts of eCFP and eYFP is used to establish the background FRET levels whereas transfection of an eCFP–eYFP fusion protein serves to define FRET-positive cells according to Banning et al. (Banning et al., 2010). Signals obtained in the FRET channel with the experimental sample can, therefore, only be interpreted as bona fide FRET for cells expressing equal amount of the eYFP- and eCFP-fusion partners (i.e., for cells falling into gate of ratio 1:1). To achieve this, for each combination tested, plasmid DNA were titrated in order to determine the DNA quantity leading to 1:1 protein expression. For shuffling experiments, reference wild-type sequences of BTN2A1, BTN2A2 and BTN3A1 cDNAs were analyzed using InterProScan protein analysis tool (EMBL-EBI, UK) in order to identify the B30.2, transmembrane (TM) and ectodomain (EC) of each protein. Juxtamembrane (JTM) region was defined as the sequence between the end of the TM region and the DVVLD, which was considered as the equivalent of the DVILD motif in BTN3A1 (Peigné et al., 2017). In all shuffled constructs but the DB30.2 (in which the whole B30.2 domain was deleted), the indicated domains were replaced by their equivalent in the BTLA cDNA. All BTN2A1 shuffled constructs contained a C-terminal linker followed by eCFP, whereas all BTN2A2 and BTN3A1 shuffled constructs bared C-terminal linker followed by eYFP. Sequences are available upon request. For assessment of the impact of anti-BTN2A mAbs on BTN2A1/BTN3A1 complex, cells were transfected concomitantly with BTN2A1-eCFP and BTN3A1-eYFP and treated with cycloheximide (10  $\mu$ g/mL, Sigma) and bafilomycin A1 (0.1  $\mu$ M, Invivogen) for 6 hr, then incubated with the indicated concentrations of anti-BTN2A and anti-BTN3A mAbs.

### Proximity ligation assay (PLA)

HEK293T cells were co-transfected with plasmids encoding BTN2A1-myc and BTN3A1-flag using the JetPEI (Polyplus, Illkirch, France). After 36h, cells were plated on Ibidi®  $\mu$ -Slide 8 well previously coated with human fibronectin (Merk™, Darmstadt, Germany). Cells were then treated with 30  $\mu$ M zoledronate overnight. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) for 10 minutes at RT, then permeabilized using permeabilization buffer (eBioscience). BTN2A1 and BTN3A1 were labeled with a mouse anti-myc (eBioscience, clone 9E10) and a rabbit anti-flag (Abcam), respectively. PLA was performed by using the Duolink kit according to manufacturer's instructions (Sigma), using the MINUS Mouse and PLUS Rabbit components. PLA signals were then revealed using Duolink *in situ* detection reagents orange. Hoechst 33342 (ThermoFisher) was added to the wells to stain nuclei. Imaging was performed with a Nikon A1, 60x objective, N.A 1.4 (Nikon®, Minato-ku, Tokyo, Japan) and their analysis was performed with ImageJ software as follow: nuclei and PLA signal spots were counted per image using the spot detector function. The number of PLA signal spots / number of nuclei was calculated for each image.

### Murine V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR reporter assays

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (MOP) expressing 53/4 hybridoma cells were generated as reported earlier (Li et al., 2009; Starick et al., 2017). For assessment of the ability BTN2A isoforms to allow V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR responsiveness in a fully murine setting, the mouse fibroblast cell line NIH 3T3 was transiently transfected with the indicated eCFP and eYFP fusion BTN3A and BTN2A isoforms using Lipofectamine LTX & PLUS Reagent kit (Invitrogen™) according to manufacturer's instructions. After 24 hr, 10<sup>5</sup> transfected cells were analyzed by flow cytometry for BTN3A and BTN2A expression. Then, 5x10<sup>4</sup> transfected NIH 3T3 cells were co-cultured with 5x10<sup>4</sup> 53/4 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR MOP reporter cells overnight, in presence of indicated stimuli (10  $\mu$ M HMBPP, 10  $\mu$ g/mL 20.1 or 103.2 mAb). In all experiments, Raji cells co-cultured with 53/4 hybridoma cells expressing the human MOP V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR in presence of 10 $\mu$ M HMBPP, 10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M Zoledronate were used as positive control (data not shown). 53/4 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR MOP reporter cells activation was measured by quantitation of mouse IL-2 secreted in co-culture supernatants by ELISA (Invitrogen #88-7024-88) as per manufacturer's protocol.

### Anti-BTN2A1 mAb generation

Mouse anti-human BTN2A1 antibodies were generated by mouse immunization using recombinant human BTN2A1-Fc fusion protein (R&D Systems). Mice were bled after 21 days and mice displaying the highest BTN2A1-specific antibodies titer were euthanized. Splenic B cells were isolated via positive selection and underwent PEG-induced fusion to myeloma cells for hybridoma generation and cloned in HAT. Anti-BTN2A1 clones 7.48, 7.28, 8.15, 8.16, 4.15, 5.28 and 8.33 were described in patent PCT/EP2018/075689. VH and VL sequences of 8.15 and 8.16 were identical (data not shown).

### V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell cytotoxic activity using the Ishikawa spheroid model

To form spheroids, 3x10<sup>4</sup> Ishikawa cells were plated in low-attachment U-bottom plates (Costar) in cell culture media containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Cells were incubated for 7 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Spheroids were then used for functional assay. To discriminate expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells from Ishikawa cells, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells from 4 different donors were stained using CellTrace Violet (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 2x10<sup>4</sup> V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were added to the spheroid culture following different conditions: spheroids alone,  $\gamma$  $\delta$ T cells,  $\gamma$  $\delta$ T cells + IgG1 isotype (10  $\mu$ g/mL),  $\gamma$  $\delta$ T cells + anti-BTN3A1 20.1 mAb (10  $\mu$ g/mL),  $\gamma$  $\delta$ T cells + anti-BTN2A1 7.48 mAb (10  $\mu$ g/mL) or  $\gamma$  $\delta$ T cells + 20.1 + 7.48 mAbs. Spheroids and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were co-cultured overnight in the presence of CellEvent Caspase-3/7 Reagent green (4  $\mu$ M), a dye labeling apoptotic cells. Spheroids and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were then dissociated by pipetting to obtain a suspension of cells. Caspase 3/7 positivity was then assessed by flow cytometry



(FACS Canto II, Becton Dickinson, FACS Diva software), analyzed using FlowJo X software, and plotted using the GraphPad Prism software. Spheroids alone were used to assess the percentage of apoptotic cells in normal conditions and were used to normalize the results obtained in presence of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. For V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell perforin and granzyme-B staining,  $15 \times 10^4$  expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were co-cultured with one spheroid following the conditions described above. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were resuspended and washed in PBS, strained over a 40  $\mu$ M filter and stained for FACS for 20 min at 4°C in the dark. Antibodies used were FITC-conjugated anti-human TCR $\gamma$ /d (REA591, Miltenyi Biotec), BV421 anti-human CD3 (SK7, BD Biosciences) for extracellular staining and a viability marker (LIVE/DEAD Aqua, Life Technologies). After a Fixation/permeabilization for 20 at 4°C using Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and washes in Permwash buffer (BD Bioscience), V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were stained intracellularly for 20 min at 4°C in the dark. Antibodies used were PE-conjugated anti-Human Perforin ( $\delta$ G9, BD Biosciences) and PECF594 conjugated anti-human Granzyme-B (GB11, BD Biosciences) for intra-cellular staining. Samples were assessed using FACS LSR2 (Becton Dickinson), analyzed using FlowJo X software, and plotted using the GraphPad Prism software.

### Recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR production and competitive binding assay

A recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (clone G115) (Allison et al., 2001) with a C-terminal Fc-tag on the V $\gamma$ 9 chain was produced in CHO cells, then purified using protein A column chromatography followed by buffer-exchange into PBS, then conjugated to AF647 fluorochrome (ThermoFisher) following manufacturer's instructions. In some experiments V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-Fc were biotinylated using protein labeling kit following manufacturer's instructions (ThermoFisher). Biotinylated proteins were then tetramerized with streptavidin-APC (Biolegend) at 4:1 molar ratio by adding the streptavidin over 10 times intervals to maximize tetramer formation. Cells were incubated with human Fc Block (Miltenyi Biotec) and then saturated with anti-BTN2A1 mAbs or isotype control (10  $\mu$ g/mL) for 1 hr at 4°C. Cells were then washed and stained with the indicated concentrations of recombinant V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-Fc-AF647 or tetrameric V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-Fc at 10  $\mu$ g/ml for 1 additional hour. After new wash, AF647 mean fluorescence intensity (MFI) was assessed by flow cytometry. For ELISA assay, recombinant human BTN2A1-His protein (R&D Systems) was coated (1  $\mu$ g/mL) overnight at 4°C in Maxisorb 96-well plates (Nunc). Wells were washed 3-times in PBS, then saturated for 2h at RT in PBS-BSA 5%, and for 1 h at RT with the indicated anti-BTN2A mAbs or mouse IgG1 (2  $\mu$ g/mL). Wells were washed 3-times before incubation with the indicated concentrations of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-Fc for 1 h at RT, and further 3 washes in PBS. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR-Fc binding was revealed with anti-human Fc-HRP (ThermoFisher) with TMB substrate. For coating control, an anti-His-HRP (Biorad) was used.

### Assessments of antibody affinity toward BTN2A1

Antibody affinity toward BTN2A1 protein was conducted at using Biolayer Interferometry (BLI) technology on Octet Red96 platform (Fortebio/PALL). Recombinant human BTN2A1-His protein was used as analytes, and anti-murine Fc AMC Sensors (Fortebio/PALL). For affinity assessments, the antibody of interest was diluted in kinetic Buffer (1X, ForteBio/PALL) and loaded on the sensor with a loading target level of around 1 nm. Experiments were conducted at +30°C under shaking conditions (1000 rpm). A standard 5 steps protocol was used: (i) loading step: capture of the antibody (ligand) on the sensors, (ii) equilibration step (Baseline) in kinetics buffer 10X, (iii) association step: dipping of sensors into the analyte, (iv) dissociation step: dipping of sensors into Kinetics Buffer 10X, and (v) regeneration. For the first run, the standard working concentration ranged from 200 nM to 3.125 nM with 1/2 dilution. When necessary, for the second run, working concentrations were adjusted (from 80 nM to 1.25 nM).

### Epitope binning assays

Epitope binning assays were also conducted using the same BLI platform. All antibodies were diluted at a concentration of 10  $\mu$ g/mL in Kinetic buffer (Fortebio/PALL) and were tested in a pairwise combinatorial manner against their target (BTN2A1). The « in-tandem » format was used for this assay. Before proceeding to binning experiment on BTN2A1 antigen, antigen binding to the antibodies was confirmed following the capture on HIS1K biosensors. For this kinetic screening, the loading of BTN2A1 on HIS1K (signal intensity: 1 nm) was followed by an association step for 3 min, then by a dissociation step of 3 min. Then, the antigen (BTN2A1-His) was immobilized on the biosensor (anti-Penta-His HIS1K biosensor #18-0038, Fortebio/PALL) and presented to the 2 competing antibodies in consecutive steps, as follows: baseline, antigen capture, baseline, saturating antibody, baseline, competing antibody, regeneration.

### Quantitative PCR

Relative BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3 expression in HEK BTN2AKO cells and derived transductants were measured by quantitative real-time PCR using Fast Advanced TaqMan Master Mix and TaqMan<sup>TM</sup> probes (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's protocol (ThermoFisher Scientific). TBP housekeeping gene was assessed for normalization. The qPCR was performed on QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) analyzed with QuantStudio 5 Real-Time PCR Software.

### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All statistics and graphs were calculated and depicted using GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, Inc). See figure legends for details on statistical tests.

## DISCUSSION

## LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et immunothérapies

Les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 font partie des cellules dites de l'immunité transitionnelle et possèdent ainsi des caractéristiques de l'immunité Innée et de l'immunité adaptative. Le partage de ces deux facettes leur confèrent des fonctions particulièrement intéressantes pour défendre l'organisme face au développement de tumeurs (Deng J. et Yin H., 2022). Plusieurs immunothérapies tant actives que passives ont été testées lors d'essais cliniques impliquant des LT  $\gamma\delta$  depuis maintenant une vingtaine d'années (pour une revue récente listant ces essais, voir Sebestyen Z. et al., 2020). Les résultats obtenus, bien qu'encourageants, n'ont pas été à la hauteur des attentes escomptées et restent insuffisants.

On note toutefois que les essais conduits jusqu'à lors reposent majoritairement soit sur l'injection de molécules activatrices, soit sur le transfert de cellules autologues après amplification *ex vivo* (Hoeres T. et al., 2018). Or, sachant que la reconnaissance des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est indépendante des molécules du CMH, le risque de GVHD n'est pas un frein et des transferts de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 allogéniques sont envisageables. Ainsi, la création d'une banque de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 issus de différents donneurs sains est envisageable et permettrait de disposer d'une grande quantité de cellules saines prêtes à être utilisées. En effet, un transfert autologue suggère l'utilisation de cellules que l'on peut supposer non optimales voire affaiblies, dépendamment de l'état du patient et des potentiels traitements reçus en amont. Un transfert allogénique de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 permettrait de dépasser cette complication.

Bien sûr, il faut prendre en compte que le risque de rejet du greffon n'est pas inexistant. Cependant, l'élaboration de ce type de banque de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 permettrait la création de « divisions » en fonctions des haplotypes de CMH les plus courants, ce qui limiterait le risque de rejet. Le rôle des ligands KIR dans les rejets de greffe étant de plus en plus démontré, il semblerait intéressant d'inclure aussi ce phénotypage (Dhuyser A. et al., 2022 ; Kawahara Y. et al., 2022). Une première étude de cas démontre la faisabilité et les bons résultats obtenus grâce à un transfert adoptif de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 allogéniques chez un patient atteint de cholangiocarcinome (Alnaggar M. et al., 2019).

Aussi, la création d'une banque de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 permettrait de les modifier génétiquement afin d'améliorer leur arsenal pour combattre les tumeurs solides. Certains évaluent par exemple l'efficacité de CAR-T porté par des LT  $\gamma\delta$  pour améliorer leurs réactivité (Johanna I. et al., 2021 ; Nashimoto KP., et al., 2022).

Toutefois, la plus grande faiblesse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pour combattre les tumeurs solides reste leur propre nature : celle d'être circulant. Cette population n'est tout simplement pas équipée

génétiqnement parlant pour résider au sein d'un tissu. Il est alors très intéressant de s'intéresser au programme génétique conduisant à la résidence de population spécifique au sein des tissus. L'identification du, ou plus probablement, des facteurs de transcription responsable pour la résidence au sein des tissus permettrait d'induire et d'activer ces facteurs dans des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (Rafia C. et al, 2020). Très récemment, une équipe a réussi à caractériser et induire un programme de résidence tissulaire dans des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans le contexte d'hépatocarcinome (Zakeri N. et al., 2022), prouvant ainsi la faisabilité et l'intérêt de cette idée.

Dans un second temps, d'autres approches commencent à voir le jour dans le but de faciliter la pénétration des LT  $\gamma\delta$  du patient dans la tumeur. Ces immunothérapies actives se basent notamment sur l'utilisation d'anticorps, bispécifiques ou non, activateurs ou inhibiteurs. En effet, des anticorps bispécifiques engageant les LT (BiTEs) dirigés contre le CD3 et un antigène de tumeur ont été développés et présentent une certaine efficacité clinique (Horn L. et al., 2017 ; Kantarjian H. et al., 2017 ; Robinson H. et al., 2018 ; Einsele H. et al., 2020). Plus récemment, des BiTEs dirigés contre le TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et le récepteur du facteur de croissance EGFR ont été développés dans le but de recruter ces effecteurs au site tumoral et de les activer (de Bruin R., et al., 2017). Une entreprise spécialisée dans le développement de bispécifiques activateurs des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 a d'ailleurs été créée pour donner suite à ces résultats encourageants, et deux essais cliniques sont en cours (NCT04887259 débuté en 2021 et NCT05369000 débuté en 2022).

Comme mentionné dans ce manuscrit, un premier anticorps activateur des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 est en cours de test (De Gassart A., et al., 2021 ; NCT04243499). Celui-ci semble prometteur puisque lors de ces premiers tests, aucune toxicité n'a été observée et une certaine efficacité a déjà pu être observée. Notamment, lors d'un essai de combinaison avec un anticorps anti-PD1, un patient atteint de mélanome métastatique présentait une métastase cérébrale qui a entièrement disparu après traitement et de façon stable pour le moment. Précédemment, l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA4 chez des patients atteints de mélanome avait pu mettre en évidence qu'un tel traitement permettait l'augmentation de la proportion de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 au site de la tumeur, mais pas des LT  $\gamma\delta$  non V $\delta$ 2<sup>+</sup> (Wistuba-Hamprecht K. et al., 2016). Ceci nous permet de supposer que les LT V $\delta$ 2<sup>+</sup> et V $\delta$ 2<sup>-</sup> présentent des mécanismes de régulations différents, et ne sont donc pas sensibles de la même manière au anticorps anti-ICP. Ainsi, une combinaison entre un anticorps anti-ICP et un anticorps activateur des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 semble être une idée pertinente et efficace.

Précédemment envisagé uniquement dans le contrôle des populations de LT  $\alpha\beta$ , l'utilisation d'anticorps anti-ICP semble alors très intéressante aussi sur des populations  $\gamma\delta$ , tant pour faciliter l'activation des LT  $V\gamma9V\delta2$  que pour inhiber les LT  $V\delta1$  pro-tumoraux. Une entreprise s'attèle justement au développement d'un anticorps dirigé contre les LT  $V\delta1$  pro-tumoraux et bien que l'étude soit encore préclinique, il sera intéressant de suivre le développement de ce type de molécules ([PureTech, News release avril 2021](#)).

Les résultats obtenus par ces diverses immunothérapies impliquant les LT  $V\gamma9V\delta2$  sont très encourageants mais non suffisants pour les patients. En effet, une limitation des effets observés chez les patients comparés à ceux attendus peut – en partie – venir du fait que les études menées en laboratoire reposent sur l'utilisation de LT  $V\gamma9V\delta2$  issus de donneurs sains. Chez un patient atteint de cancer, on peut facilement envisager que le système immunitaire ne soit pas dans la plus grande forme. Aussi, on ne peut négliger l'impact du microenvironnement tumoral immunosuppresseur sur des populations probablement déjà affaibli. Une meilleure compréhension de ces environnements et de leurs effets est indispensable pour l'amélioration des immunothérapies futures.

Par conséquent, envisager des combinaisons diverses de ces immunothérapies pourrait permettre d'atteindre plus facilement des réponses complètes. La création d'une banque de LT  $V\gamma9V\delta2$  allogéniques modifié ou non, permettrait dans un premier temps de disposer d'effecteurs puissants. Ensuite, et surtout de façon personnalisable, l'addition de molécules thérapeutiques telles qu'un anticorps activateur, une cytokine ou encore un anticorps suppresseur des populations pro-tumorales faciliterait leur action.

## Butyrophilines et synapse des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

Lors de ce travail de thèse, nous avons pu fournir les premières images permettant de visualiser les synapses formées par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Le fait que cette population utilise tant un TCR que des récepteurs NK rend cette formation particulièrement intéressante. En effet, il semblerait que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 soient capables de former des synapses multicentriques en l'absence de signal TCR fort. Celles-ci sont fonctionnelles et permettent la dégranulation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ceci est en accord avec la littérature puisqu'une activation TCR-indépendante et NKG2D-dépendante des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 avaient pu être mise en évidence (Qin G. et al., 2009).

Toutefois, l'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 reste un mécanisme complexe dont quelques points restent à élucider. Alors que l'identification de l'implication des pAgs a été mise en évidence dès les années 90s (Tanaka Y. et al., 1994), et celle de BTN3A1 au début des années 2010 (Harly C. et al., 2012), les recherches continuent pour identifier les pièces manquantes. Récemment l'identification de BTN2A1 comme ligand du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 a permis une nouvelle avancée vers la résolution complète de ce mécanisme (Karunakaran MM. et al., 2020 ; Rigau M. et al., 2020). Ces équipes ont alors proposé un mécanisme d'activation antigénique dans lequel BTN2A1 et BTN3A1 forment des hétéromères qui, en présence de pAg sont alors capables de lier le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et d'induire une activation des lymphocytes, potentiellement grâce à un recrutement d'un ligand putatif des CDR du TCR encore inconnu aujourd'hui. Cependant, cela ne correspond pas entièrement à ce que nous avons pu observer lors de cette étude.

Lors de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence que la liaison de BTN2A1 avec le TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ainsi que l'initiation de la formation de la synapse immunologique, ne nécessite pas la présence de pAg ni celle de BTN3A1. En l'absence de BTN2A1, BTN3A1 n'est pas suffisant pour induire la formation d'une synapse fonctionnelle, ce qui permet de confirmer une nouvelle fois la non-liaison entre BTN3A1 et le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 puisque la signalisation du TCR est moteur de l'initiation d'une SI. Toutefois, on a pu observer la formation de cluster de BTN3A1 au sein des SLB et proches du TCR, mais non colocalisés. Ceci suggère la présence d'un récepteur spécifique à la surface des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 restant en proximité des TCR, et ainsi la possibilité que BTN3A1 agisse en corécepteur primordial. Aussi, l'ajout de BTN3A1 dans un système minimaliste comme les SLB potentialise le relargage de perforine, sans pour autant augmenter la phosphorylation de ZAP70. On peut alors supposer que BTN3A1 agisse sur les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 comme le fait CD28 pour les LT  $\alpha\beta$ , en renforçant la signalisation TCR mais ce, en aval de ZAP70.

Le recrutement de BTN3A1 dans ces conditions est plus lent que celui de BTN2A1, et laisse ainsi penser une affinité plus faible pour son récepteur. Cependant, ces conditions ne permettent pas d'inclure de pAg. On peut ainsi supposer que la liaison du pAg dans la poche du domaine B30.2 induit un signal de type « inside-out » induisant un changement de conformation de BTN3A1, ce qui lui permettrait alors de se lier à son récepteur. L'utilisation d'anticorps activateurs tel que 20.1 induits probablement un démasquage de l'épitope de BTN3A1 nécessaire à cette fixation.

Mais qu'en est-il des autres isoformes de BTN3A ? Sont-elles impliquées dans la formation de la synapse immunologique ? De précédents travaux ont pu montrer l'importance de BTN3A2 pour l'acheminement à la membrane de BTN3A1 (Vantourout P. et al., 2018). Il est à noter que les BTN ne présentent pas de peptide signal pour permettre leur adressage à la membrane (Rhodes D. et al., 2016). Ainsi, il est tout à fait possible d'envisager la nécessité des BTN3A de se dimériser entre les différentes isoformes pour faciliter ce recrutement à la membrane. De plus, au vu de leur forte homologie dans leurs régions extra-membranaires, on pourrait penser qu'une substitution de BTN3A1 par BTN3A3 voire BTN3A2 serait envisageable. Cependant, lors de cette étude, nous avons pu observer une absence de formation de synapse en réalisant cette substitution. Enfin, alors même qu'un recrutement de BTN3A1 à la zone de contact était visible, un tel recrutement de BTN3A2 ou BTN3A3 n'a pas pu être observé, renforçant ainsi l'idée d'un corécepteur spécifique de BTN3A1 en surface des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Aussi, nous avons pu effectivement observer un recrutement de BTN3A1 au niveau de la zone de contact avec le LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de pAg. Ce recrutement avait pu être observé par une autre équipe (Vyborova A., et al., 2020). Lorsque l'on augmente la résolution, on peut voir que ce recrutement se fait au niveau de BTN2A1 et du TCR, indiquant son recrutement au niveau du cSMAC et confirmant ainsi son importance dans l'activation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Ce recrutement de BTN3A1 dépendant de la présence de pAg confirme la différence de temporalité de liaison entre les BTN impliquées. Aussi, une diminution de réactivité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 a pu être observée lorsque les cellules cibles présentent BTN2A1 tronqué de son domaine B30.2 (Cano C. et al, 2021), alors même que ce dernier est incapable de fixer les pAg. On peut alors supposer que ce domaine B30.2 sert au recrutement de BTN3A1 lorsque celui-ci présente un pAg dans sa poche B30.2.

Certaines équipes ont pu suggérer la formation d'hétéromères entre BTN2A1 et BTN3A1 en absence de pAg, et nous avons pu aussi visualiser un léger signal PLA dans ces conditions. Cependant, ces observations reposent sur des systèmes figés à un temps T, et il est toujours très compliqué d'interpréter des données de colocalisations. Il serait intéressant de vérifier la durée et la force de ces interactions pour en confirmer l'existence. En effet, il convient

de se rappeler que les molécules sont en mouvements permanent et, à l'exception de molécules mutuellement exclusives, deux molécules données se retrouveront proches l'une de l'autre à un moment donné, sans pour autant forcément interagir entre elles. De la même façon, l'IPP – pAg principal des cellules humaines – est présent dans toutes les cellules, il n'est donc pas impossible qu'une certaine portion soit piégée par le domaine B30.2 de BTN3A1 au sein d'une cellule saine. Le stress induit par une infection ou une transformation cellulaire est responsable de l'augmentation de la quantité de pAg dans les cellules, induisant alors un plus grand nombre d'hétéromères de BTN3A1-BTN2A1 en surface ce qui sera ensuite « capté » par les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

Par conséquent, un autre mécanisme d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 peut être proposé pour correspondre aux observations faites. Dans un premier temps, BTN2A1 se lie au TCR des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 de façon constitutive et induit l'initiation d'une synapse immunologique. Dans un second temps, et seulement en présence d'une forte concentration en pAg, BTN3A1 se rapproche conséquemment voire interagit avec BTN2A1, permettant ainsi le rapprochement d'un potentiel corécepteur et ainsi, la stabilisation de la synapse (Figure 26).

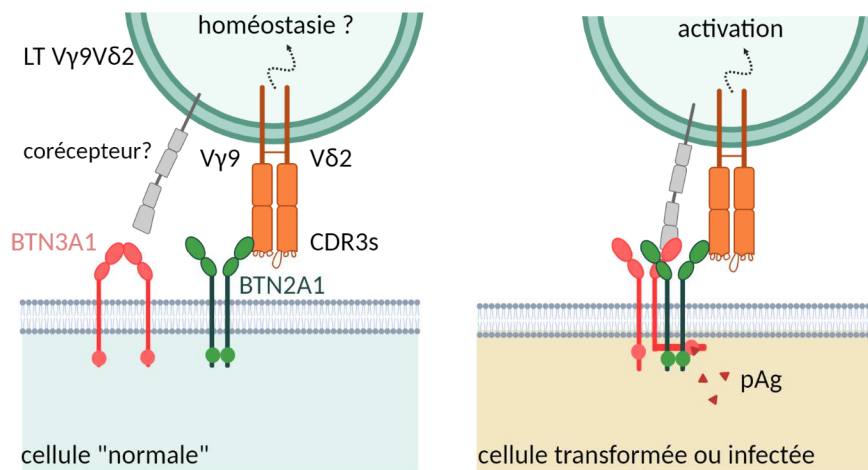


Figure 26 Mécanisme d'activation antigénique des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 proposé.



## BIBLIOGRAPHIE

## A

- Abeler-Dörner, Lucie, Mahima Swamy, Gareth Williams, Adrian C. Hayday, et Anna Bas. « Butyrophilins: An Emerging Family of Immune Regulators ». *Trends in Immunology* 33, n° 1 (1 janvier 2012): 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.09.007>.
- Adams, Erin J., et Wendy L. Havran. « Introduction to Cellular Immunology Special Issue on  $\Gamma\delta$  T Cells ». *Cellular Immunology*, Gamma delta T cells: 30 years post-discovery, 296, n° 1 (1 juillet 2015): 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.06.001>.
- Agrati, Chiara, Eleonora Cimini, Alessandra Sacchi, Veronica Bordoni, Cristiana Gioia, Rita Casetti, Federica Turchi, Marco Tripodi, et Federico Martini. « Activated  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells Trigger Granulocyte Functions via MCP-2 Release ». *The Journal of Immunology* 182, n° 1 (1 janvier 2009): 522-29. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.522>.
- Akhurst, Rosemary J., et Akiko Hata. « Targeting the TGF $\beta$  Signalling Pathway in Disease ». *Nature Reviews Drug Discovery* 11, n° 10 (octobre 2012): 790-811. <https://doi.org/10.1038/nrd3810>.
- Alcover, Andres, Cristina Alberini, Oreste Acuto, Linda K. Clayton, Cartherine Transy, Giulio C. Spagnoli, Philippe Moingeon, Peter Lopez, et Ellis L. Reinherz. « Interdependence of CD3-Ti and CD2 activation pathways in human T lymphocytes. » *The EMBO Journal* 7, n° 7 (juillet 1988): 1973-77. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03035.x>.
- Allison, Timothy J., Christine C. Winter, Jean-Jacques Fournié, Marc Bonneville, et David N. Garboczi. « Structure of a Human  $\Gamma\delta$  T-Cell Antigen Receptor ». *Nature* 411, n° 6839 (juin 2001): 820-24. <https://doi.org/10.1038/35081115>.
- Alnaggar, Mohammed, Yan Xu, Jingxia Li, Junyi He, Jibing Chen, Man Li, Qingling Wu, et al. « Allogenic  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cell as New Potential Immunotherapy Drug for Solid Tumor: A Case Study for Cholangiocarcinoma ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7, n° 1 (1 décembre 2019): 36. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0501-8>.
- Anikeeva, Nadia, Kristina Somersalo, Tasha N. Sims, V. Kaye Thomas, Michael L. Dustin, et Yuri Sykulev. « Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, n° 18 (3 mai 2005): 6437-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502467102>.
- Arden, Bernhard, Stephen P. Clark, Dieter Kabelitz, et Tak W. Mak. « Human T-Cell Receptor Variable Gene Segment Families ». *Immunogenetics* 42, n° 6 (1 octobre 1995): 455-500. <https://doi.org/10.1007/BF00172176>.

Arrenberg, Philomena, Ramesh Halder, et Vipin Kumar. « Cross-Regulation between Distinct Natural Killer T Cell Subsets Influences Immune Response to Self and Foreign Antigens ». *Journal of Cellular Physiology* 218, n° 2 (février 2009): 246-50. <https://doi.org/10.1002/jcp.21597>.

Aslan, N., C. Yurdaydin, J. Wiegand, T. Greten, A. Ciner, M. F. Meyer, H. Heiken, et al. « Cytotoxic CD4+ T Cells in Viral Hepatitis ». *Journal of Viral Hepatitis* 13, n° 8 (2006): 505-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00723.x>.

## B

Bal, Suzanne M., Korneliusz Golebski, et Hergen Spits. « Plasticity of Innate Lymphoid Cell Subsets ». *Nature Reviews Immunology* 20, n° 9 (septembre 2020): 552-65. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0282-9>.

Balamuth, Fran, David Leitenberg, Juli Unternaehrer, Ira Mellman, et Kim Bottomly. « Distinct Patterns of Membrane Microdomain Partitioning in Th1 and Th2 Cells ». *Immunity* 15, n° 5 (1 novembre 2001): 729-38. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00223-0).

Ballas, Z. K., et W. Rasmussen. « NK1.1+ Thymocytes. Adult Murine CD4-, CD8- Thymocytes Contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V Beta 8+ Subset. » *The Journal of Immunology* 145, n° 4 (15 août 1990): 1039-45.

Bansal, Raj R., Charles R. Mackay, Bernhard Moser, et Matthias Eberl. « IL-21 Enhances the Potential of Human  $\gamma\delta$  T Cells to Provide B-Cell Help ». *European Journal of Immunology* 42, n° 1 (2012): 110-19. <https://doi.org/10.1002/eji.201142017>.

Barcia, Carlos, Clare E. Thomas, James F. Curtin, Gwendalyn D. King, Kolja Wawrowsky, Marianela Candolfi, Wei-Dong Xiong, et al. « In Vivo Mature Immunological Synapses Forming SMACs Mediate Clearance of Virally Infected Astrocytes from the Brain ». *Journal of Experimental Medicine* 203, n° 9 (4 septembre 2006): 2095-2107. <https://doi.org/10.1084/jem.20060420>.

Beatson, Richard E., Ana C. Parente-Pereira, Leena Halim, Domenico Cozzetto, Caroline Hull, Lynsey M. Whilding, Olivier Martinez, et al. « TGF- $\beta$ 1 Potentiates V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Adoptive Immunotherapy of Cancer ». *Cell Reports. Medicine* 2, n° 12 (21 décembre 2021): 100473. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100473>.

Benveniste, Patricia M., Sobhan Roy, Munehide Nakatsugawa, Edward L. Y. Chen, Linh Nguyen, Douglas G. Millar, Pamela S. Ohashi, Naoto Hirano, Erin J. Adams, et Juan Carlos Zúñiga-Pflücker.

« Generation and Molecular Recognition of Melanoma-Associated Antigen-Specific Human  $\Gamma\delta$  T Cells ». *Science Immunology* 3, n° 30 (14 décembre 2018): eaav4036. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav4036>.

Benyamine, Audrey, Aude Le Roy, Emilie Mamessier, Julie Gertner-Dardenne, Céline Castanier, Florence Orlanducci, Laurent Pouyet, et al. « BTN3A molecules considerably improve V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T cells-based immunotherapy in acute myeloid leukemia ». *Oncot Immunology* 5, n° 10 (2 octobre 2016): e1146843. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1146843>.

Bonneville, Marc, Rebecca L. O'Brien, et Willi K. Born. «  $\Gamma\delta$  T Cell Effector Functions: A Blend of Innate Programming and Acquired Plasticity ». *Nature Reviews Immunology* 10, n° 7 (juillet 2010): 467-78. <https://doi.org/10.1038/nri2781>.

Brandes, Marlène, Katharina Willmann, et Bernhard Moser. « Professional Antigen-Presentation Function by Human  $\gamma\delta$  T Cells ». *Science* 309, n° 5732 (8 juillet 2005): 264-68. <https://doi.org/10.1126/science.1110267>.

Brenner, Michael B., Joanne McLean, Deno P. Dialynas, Jack L. Strominger, John A. Smith, Frances L. Owen, J. G. Seidman, Stephen Ip, Fred Rosen, et Michael S. Krangel. « Identification of a Putative Second T-Cell Receptor ». *Nature* 322, n° 6075 (juillet 1986): 145-49. <https://doi.org/10.1038/322145a0>.

Bruder, Jessica, Katherina Siewert, Birgit Obermeier, Joachim Malotka, Peter Scheinert, Josef Kellermann, Takuya Ueda, Reinhard Hohlfeld, et Klaus Dornmair. « Target Specificity of an Autoreactive Pathogenic Human  $\Gamma\delta$ -T Cell Receptor in Myositis\* ». *Journal of Biological Chemistry* 287, n° 25 (15 juin 2012): 20986-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356709>.

Bruin, Renée C. G. de, John P. Veluchamy, Sinéad M. Loughheed, Famke L. Schneiders, Silvia Lopez-Lastra, Roeland Lameris, Anita G. Stam, et al. « A bispecific nanobody approach to leverage the potent and widely applicable tumor cytolytic capacity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T cells ». *Oncot Immunology* 7, n° 1 (2 janvier 2018): e1375641. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1375641>.

Budd, R. C., J. C. Cerottini, et H. R. MacDonald. « Phenotypic Identification of Memory Cytolytic T Lymphocytes in a Subset of Lyt-2+ Cells. » *The Journal of Immunology* 138, n° 4 (15 février 1987): 1009-13.

## C

- Cano, Carla E., Christine Pasero, Aude De Gassart, Clement Kerneur, Mélanie Gabriac, Marie Fullana, Emilie Granarolo, et al. « BTN2A1, an Immune Checkpoint Targeting V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Cytotoxicity against Malignant Cells ». *Cell Reports* 36, n° 2 (13 juillet 2021): 109359. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109359>.
- Castiglione, Francesca, Antonio Taddei, Anna Maria Buccoliero, Francesca Garbini, Chiara Francesca Gheri, Giancarlo Freschi, Paolo Bechi, Duccio Rossi Degl'Innocenti, et Gian Luigi Taddei. « TNM Staging and T-Cell Receptor Gamma Expression in Colon Adenocarcinoma. Correlation with Disease Progression? » *Tumori Journal* 94, n° 3 (1 mai 2008): 384-88. <https://doi.org/10.1177/030089160809400315>.
- Chauvin, Cynthia, Noémie Joalland, Jeanne Perroteau, Ulrich Jarry, Laura Lafrance, Catherine Willem, Christelle Retière, et al. « NKG2D Controls Natural Reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Lymphocytes against Mesenchymal Glioblastoma Cells ». *Clinical Cancer Research* 25, n° 23 (2 décembre 2019): 7218-28. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0375>.
- Ciccione, Ermanno, Oriane Viale, Daniela Pende, Mauro Malnati, Giovan Battista Ferrara, Sergio Barocci, Alessandro Moretta, et Lorenzo Moretta. « Specificity of Human T Lymphocytes Expressing a  $\gamma/\delta$  T Cell Antigen Receptor. Recognition of a Polymorphic Determinant of HLA Class I Molecules by a  $\gamma/\delta$  Clone ». *European Journal of Immunology* 19, n° 7 (1989): 1267-71. <https://doi.org/10.1002/eji.1830190718>.
- Compte, Elsa, Pierre Pontarotti, Yves Collette, Marc Lopez, et Daniel Olive. « Frontline: Characterization of BT3 Molecules Belonging to the B7 Family Expressed on Immune Cells ». *European Journal of Immunology* 34, n° 8 (2004): 2089-99. <https://doi.org/10.1002/eji.200425227>.
- Comrie, William A., Alexander Babich, et Janis K. Burkhardt. « F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse ». *Journal of Cell Biology* 208, n° 4 (9 février 2015): 475-91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406121>.
- Cubillos-Ruiz, Juan R., Diana Martinez, Uciane K. Scarlett, Melanie R. Rutkowski, Yolanda C. Nesbeth, Ana L. Camposeco-Jacobs, et Jose R. Conejo-Garcia. « CD277 Is a Negative Co-Stimulatory Molecule Universally Expressed by Ovarian Cancer Microenvironmental Cells ». *Oncotarget* 1, n° 5 (11 septembre 2010): 329-38. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.165>.

## D

- Dai, Yumei, Hui Chen, Chen Mo, Lianxian Cui, et Wei He. « Ectopically Expressed Human Tumor Biomarker MutS Homologue 2 Is a Novel Endogenous Ligand That Is Recognized by Human  $\Gamma\delta$  T Cells to Induce Innate Anti-Tumor/Virus Immunity\* ». *Journal of Biological Chemistry* 287, n° 20 (11 mai 2012): 16812-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327650>.
- Dai, Yu-mei, Hai-ying Liu, Yun-feng Liu, Yuan Zhang, et Wei He. « EBV Transformation Induces Overexpression of HMSH2/3/6 on B Lymphocytes and Enhances  $\Gamma\delta$ T-Cell-Mediated Cytotoxicity via TCR and NKG2D ». *Immunology* 154, n° 4 (2018): 673-82. <https://doi.org/10.1111/imm.12920>.
- Dang, Anh Thu, Juliane Strietz, Alessandro Zenobi, Hanif J. Khameneh, Simon M. Brandl, Laura Lozza, Gregor Conradt, et al. « NLRC5 Promotes Transcription of BTN3A1-3 Genes and  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cell-Mediated Killing ». *iScience* 24, n° 1 (22 janvier 2021): 101900. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101900>.
- Davey, Martin S., Chan-Yu Lin, Gareth W. Roberts, Sinéad Heuston, Amanda C. Brown, James A. Chess, Mark A. Toleman, et al. « Human Neutrophil Clearance of Bacterial Pathogens Triggers Anti-Microbial  $\Gamma\delta$  T Cell Responses in Early Infection ». *PLOS Pathogens* 7, n° 5 (12 mai 2011): e1002040. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002040>.
- Davey, Martin S., Carrie R. Willcox, Stuart Hunter, Sofya A. Kasatskaya, Ester B. M. Remmerswaal, Mahboob Salim, Fiyaz Mohammed, et al. « The Human  $V\delta 2+$  T-Cell Compartment Comprises Distinct Innate-like  $V\gamma 9+$  and Adaptive  $V\gamma 9-$  Subsets ». *Nature Communications* 9, n° 1 (2 mai 2018): 1760. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04076-0>.
- De Gassart, Aude, Kieu-Suong Le, Patrick Brune, Sophie Agaugué, Jennifer Sims, Armelle Goubard, Rémy Castellano, et al. « Development of ICT01, a first-in-class, anti-BTN3A antibody for activating  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell-mediated antitumor immune response ». *Science Translational Medicine* 13, n° 616 (20 octobre 2021): eabj0835. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj0835>.
- Demetriou, Philippos, Enas Abu-Shah, Salvatore Valvo, Sarah McCuaig, Viveka Mayya, Audun Kvalvaag, Thomas Starkey, et al. « A Dynamic CD2-Rich Compartment at the Outer Edge of the Immunological Synapse Boosts and Integrates Signals ». *Nature Immunology* 21, n° 10 (octobre 2020): 1232-43. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0770-x>.

- Deng, Jiechu, et Hongna Yin. « Gamma Delta ( $\Gamma\delta$ ) T Cells in Cancer Immunotherapy; Where It Comes from, Where It Will Go? » *European Journal of Pharmacology* 919 (15 mars 2022): 174803. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174803>.
- Deseke, Malte, et Immo Prinz. « Ligand Recognition by the  $\Gamma\delta$  TCR and Discrimination between Homeostasis and Stress Conditions ». *Cellular & Molecular Immunology* 17, n° 9 (septembre 2020): 914-24. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0503-y>.
- Devilder, Marie-Claire, Sophie Allain, Christelle Dousset, Marc Bonneville, et Emmanuel Scotet. « Early Triggering of Exclusive IFN- $\gamma$  Responses of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells by TLR-Activated Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells ». *The Journal of Immunology* 183, n° 6 (15 septembre 2009): 3625-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901571>.
- Dhuyser, Adèle, Alice Aarnink, Michaël Pérès, Jyothi Jayaraman, Neda Nemat-Gorgani, Marie Thérèse Rubio, John Trowsdale, et James Traherne. « KIR in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Need for a Unified Paradigm for Donor Selection ». *Frontiers in Immunology* 13 (2022). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2022.821533>.
- Dimova, Tanya, Margreet Brouwer, Françoise Gosselin, Joël Tassignon, Oberdan Leo, Catherine Donner, Arnaud Marchant, et David Vermijlen. « Effector V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells dominate the human fetal  $\gamma\delta$  T-cell repertoire ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, n° 6 (10 février 2015): E556-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412058112>.
- Dornmair, Klaus, Christian K. Schneider, Joachim Malotka, Georg Dechant, Heinz Wiendl, et Reinhard Hohlfeld. « Antigen Recognition Properties of a V $\gamma$ 1.3V $\delta$ 2-T-Cell Receptor from a Rare Variant of Polymyositis ». *Journal of Neuroimmunology* 152, n° 1-2 (juillet 2004): 168-75. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.03.016>.
- Dunne, Margaret R., Bozguna A. Mangan, Laura Madrigal-Estebas, et Derek G. Doherty. « Preferential Th1 Cytokine Profile of Phosphoantigen-Stimulated Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells ». *Mediators of Inflammation* 2010 (21 février 2011): e704941. <https://doi.org/10.1155/2010/704941>.
- Dustin, Michael L. « Supported bilayers at the vanguard of immune cell activation studies ». *Journal of structural biology* 168, n° 1 (octobre 2009): 152-60. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.05.007>.

## E

Einsele, Hermann, Hossein Borghaei, Robert Z. Orlowski, Marion Subklewe, Gail J. Roboz, Gerhard Zugmaier, Peter Kufer, Karim Iskander, et Hagop M. Kantarjian. « The BiTE (Bispecific T-Cell Engager) Platform: Development and Future Potential of a Targeted Immuno-Oncology Therapy across Tumor Types ». *Cancer* 126, n° 14 (2020): 3192-3201. <https://doi.org/10.1002/cncr.32909>.

Exley, M. A., S. M. Tahir, O. Cheng, A. Shaulov, R. Joyce, D. Avigan, R. Sackstein, et S. P. Balk. « A Major Fraction of Human Bone Marrow Lymphocytes Are Th2-like CD1d-Reactive T Cells That Can Suppress Mixed Lymphocyte Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167, n° 10 (15 novembre 2001): 5531-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5531>.

## F

Favier, Benoit, Eric Espinosa, Julie Tabiasco, Cédric Dos Santos, Marc Bonneville, Salvatore Valitutti, et Jean-Jacques Fournié. « Uncoupling between Immunological Synapse Formation and Functional Outcome in Human  $\Gamma\delta$  T Lymphocytes ». *The Journal of Immunology* 171, n° 10 (15 novembre 2003): 5027-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5027>.

Fichtner, Alina S, Anja Bubke, Francesca Rampoldi, Anneke Wilharm, Likai Tan, Lars Steinbrück, Christian Schultze-Florey, et al. « TCR Repertoire Analysis Reveals Phosphoantigen-Induced Polyclonal Proliferation of  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells in Neonates and Adults ». *Journal of Leukocyte Biology* 107, n° 6 (2020): 1023-32. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MA0120-427RR>.

Fichtner, Alina S., Mohindar M. Karunakaran, Siyi Gu, Christopher T. Boughter, Marta T. Borowska, Lisa Starick, Anna Nöhren, Thomas W. Göbel, Erin J. Adams, et Thomas Herrmann. « Alpaca (*Vicugna pacos*), the first nonprimate species with a phosphoantigen-reactive  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell subset ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, n° 12 (24 mars 2020): 6697-6707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909474117>.

Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, H. Ton-That, M. A. Weston, J. E. Coligan, R. H. Schwartz, et D. M. Pardoll. « A Novel Population of T-Cell Receptor  $A\beta$ -Bearing Thymocytes Which Predominantly Expresses a Single  $V\beta$  Gene Family ». *Nature* 329, n° 6136 (septembre 1987): 251-54. <https://doi.org/10.1038/329251a0>.



Franciszekiewicz, Katarzyna, Audrey Le Floch, Marie Boutet, Isabelle Vergnon, Alain Schmitt, et Fathia Mami-Chouaib. « CD103 or LFA-1 Engagement at the Immune Synapse between Cytotoxic T Cells and Tumor Cells Promotes Maturation and Regulates T-cell Effector Functions ». *Cancer Research* 73, n° 2 (16 janvier 2013): 617-28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2569>.

Frech, Michael, Yasunori Omata, Angelika Schmalzl, Stefan Wirtz, Leila Taher, Georg Schett, Mario M. Zaiss, et Kerstin Sarter. « Btn2a2 Regulates ILC2–T Cell Cross Talk in Type 2 Immune Responses ». *Frontiers in Immunology* 13 (2022). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2022.757436>.

Frech, Michael, Gregor Schuster, Fabian T. Andes, Georg Schett, Mario M. Zaiss, et Kerstin Sarter. « RANKL-Induced Btn2a2 – A T Cell Immunomodulatory Molecule – During Osteoclast Differentiation Fine-Tunes Bone Resorption ». *Frontiers in Endocrinology* 12 (2021). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2021.685060>.

Freeman, Spencer A., Jesse Goyette, Wendy Furuya, Elliot C. Woods, Carolyn R. Bertozzi, Wolfgang Bergmeier, Boris Hinz, P. Anton van der Merwe, Raibatak Das, et Sergio Grinstein. « Integrins Form an Expanding Diffusional Barrier That Coordinates Phagocytosis ». *Cell* 164, n° 1 (14 janvier 2016): 128-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.048>.

## G

Godfrey, Dale I., H. Robson MacDonald, Mitchell Kronenberg, Mark J. Smyth, et Luc Van Kaer. « NKT Cells: What's in a Name? » *Nature Reviews Immunology* 4, n° 3 (mars 2004): 231-37. <https://doi.org/10.1038/nri1309>.

Goodridge, Helen S., Christopher N. Reyes, Courtney A. Becker, Tamiko R. Katsumoto, Jun Ma, Andrea J. Wolf, Nandita Bose, et al. « Activation of the Innate Immune Receptor Dectin-1 upon Formation of a 'Phagocytic Synapse' ». *Nature* 472, n° 7344 (avril 2011): 471-75. <https://doi.org/10.1038/nature10071>.

Grakoui, Arash, Shannon K. Bromley, Cenk Sumen, Mark M. Davis, Andrey S. Shaw, Paul M. Allen, et Michael L. Dustin. « The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation ». *Science* 285, n° 5425 (9 juillet 1999): 221-27. <https://doi.org/10.1126/science.285.5425.221>.

Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, et T. Spies. « Cell Stress-Regulated Human Major Histocompatibility Complex Class I Gene Expressed in Gastrointestinal Epithelium ».

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, n° 22 (29 octobre 1996): 12445-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12445>.

Groh, Veronika, Alexander Steinle, Stefan Bauer, et Thomas Spies. « Recognition of Stress-Induced MHC Molecules by Intestinal Epithelial  $\gamma\delta$  T Cells ». *Science* 279, n° 5357 (13 mars 1998): 1737-40. <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1737>.

Guo, Y, H K Ziegler, S A Safley, D W Niesel, S Vaidya, et G R Klimpel. « Human T-cell recognition of *Listeria monocytogenes*: recognition of listeriolysin O by TcR alpha beta + and TcR gamma delta + T cells ». *Infection and Immunity* 63, n° 6 (juin 1995): 2288-94. <https://doi.org/10.1128/iai.63.6.2288-2294.1995>.

## H

Hailman, Eric, W. Richard Burack, Andrey S. Shaw, Michael L. Dustin, et Paul M. Allen. « Immature CD4+CD8+ Thymocytes Form a Multifocal Immunological Synapse with Sustained Tyrosine Phosphorylation ». *Immunity* 16, n° 6 (1 juin 2002): 839-48. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00326-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00326-6).

Harly, Christelle, Yves Guillaume, Steven Nedellec, Cassie-Marie Peigné, Hannu Mönkkönen, Jukka Mönkkönen, Jianqiang Li, et al. « Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human  $\gamma\delta$  T-cell subset ». *Blood* 120, n° 11 (13 septembre 2012): 2269-79. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-430470>.

Harly, Christelle, Stephen Paul Joyce, Charlotte Domblides, Thomas Bachelet, Vincent Pitard, Charlotte Mannat, Angela Pappalardo, et al. « Human  $\gamma\delta$  T cell sensing of AMPK-dependent metabolic tumor reprogramming through TCR recognition of EphA2 ». *Science Immunology* 6, n° 61 (30 juillet 2021): eaba9010. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba9010>.

Hebbeler, Andrew M., Cristiana Cairo, Jean Saville Cummings, et C. David Pauza. « Individual V $\gamma$ 2-J $\gamma$ 1.2+ T Cells Respond to Both Isopentenyl Pyrophosphate and Daudi Cell Stimulation: Generating Tumor Effectors with Low Molecular Weight Phosphoantigens ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56, n° 6 (1 juin 2007): 819-29. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0235-6>.

Henry, J., M.-T. Ribouchon, D. Depetris, M.-G. Mattei, C. Offer, R. Tazi-Ahnini, et P. Pontarotti. « Cloning, Structural Analysis, and Mapping of the B30 and B7 Multigenic Families to the Major

Histocompatibility Complex (MHC) and Other Chromosomal Regions ». *Immunogenetics* 46, n° 5 (1 septembre 1997): 383-95. <https://doi.org/10.1007/s002510050292>.

Herberman, Ronald B., Myrthel E. Nunn, Howard T. Holden, et David H. Lavrin. « Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells against Syngeneic and Allogeneic Tumors. II. Characterization of Effector Cells ». *International Journal of Cancer* 16, n° 2 (1975): 230-39. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160205>.

Hoeres, Timm, Manfred Smetak, Dominik Pretscher, et Martin Wilhelm. « Improving the Efficiency of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Cell Immunotherapy in Cancer ». *Frontiers in Immunology* 9 (2018). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00800>.

Holoshitz, J., L. M. Vila, B. J. Keroack, D. R. McKinley, et N. K. Bayne. « Dual Antigenic Recognition by Cloned Human Gamma Delta T Cells. » *The Journal of Clinical Investigation* 89, n° 1 (1 janvier 1992): 308-14. <https://doi.org/10.1172/JCI115577>.

Horn, Lucas A., Nicholas G. Ciavattone, Ryan Atkinson, Netsanet Woldergerima, Julia Wolf, Virginia K. Clements, Pratima Sinha, Munanchu Poudel, et Suzanne Ostrand-Rosenberg. « CD3xPDL1 Bi-Specific T Cell Engager (BiTE) Simultaneously Activates T Cells and NKT Cells, Kills PDL1 + Tumor Cells, and Extends the Survival of Tumor-Bearing Humanized Mice ». *Oncotarget* 8, n° 35 (3 août 2017): 57964-80. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19865>.

Howard, F D, P Moingeon, U Moebius, D J McConkey, B Yandava, T E Gennert, et E L Reinherz. « The CD3 zeta cytoplasmic domain mediates CD2-induced T cell activation. » *Journal of Experimental Medicine* 176, n° 1 (1 juillet 1992): 139-45. <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.139>.

Huppa, Johannes B., et Mark M. Davis. « T-Cell-Antigen Recognition and the Immunological Synapse ». *Nature Reviews Immunology* 3, n° 12 (décembre 2003): 973-83. <https://doi.org/10.1038/nri1245>.

## I, J

Jellison, Evan R., Sung-Kwon Kim, et Raymond M. Welsh. « Cutting Edge: MHC Class II-Restricted Killing In Vivo during Viral Infection ». *The Journal of Immunology* 174, n° 2 (15 janvier 2005): 614-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.614>.

Jenkins, Misty R., Jesse A. Rudd-Schmidt, Jamie A. Lopez, Kelly M. Ramsbottom, Stuart I. Mannering, Daniel M. Andrews, Ilia Voskoboinik, et Joseph A. Trapani. « Failed CTL/NK cell killing and

cytokine hypersecretion are directly linked through prolonged synapse time ». *Journal of Experimental Medicine* 212, n° 3 (2 mars 2015): 307-17. <https://doi.org/10.1084/jem.20140964>.

Jenkins, Misty R, Jane C Stinchcombe, Byron B Au-Yeung, Yukako Asano, Alex T Ritter, Arthur Weiss, et Gillian M Griffiths. « Distinct structural and catalytic roles for Zap70 in formation of the immunological synapse in CTL ». Édité par Diane Mathis. *eLife* 3 (4 mars 2014): e01310. <https://doi.org/10.7554/eLife.01310>.

Jenkins, Misty R., Andy Tsun, Jane C. Stinchcombe, et Gillian M. Griffiths. « The Strength of T Cell Receptor Signal Controls the Polarization of Cytotoxic Machinery to the Immunological Synapse ». *Immunity* 31, n° 4 (16 octobre 2009): 621-31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.024>.

Jiang, Yongjun, Xiaojian Cui, Chen Cui, Jian Zhang, Fangyuan Zhou, Zining Zhang, Yajing Fu, et al. « The Function of CD3+CD56+ NKT-Like Cells in HIV-Infected Individuals ». *BioMed Research International* 2014 (20 mars 2014): e863625. <https://doi.org/10.1155/2014/863625>.

Johanna, Inez, Patricia Hernández-López, Sabine Heijhuurs, Wouter Scheper, Laura Bongiovanni, Alain de Bruin, Dennis X. Beringer, et al. « Adding Help to an HLA-A\*24:02 Tumor-Reactive  $\Gamma\delta$ TCR Increases Tumor Control ». *Frontiers in Immunology* 12 (2021): 752699. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.752699>.

## K

Kabanova, Anna, Vanessa Zurli, et Cosima Tatiana Baldari. « Signals Controlling Lytic Granule Polarization at the Cytotoxic Immune Synapse ». *Frontiers in Immunology* 9 (2018): 307. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00307>.

Kaizuka, Yoshihisa, Adam D. Douglass, Santosh Vardhana, Michael L. Dustin, et Ronald D. Vale. « The coreceptor CD2 uses plasma membrane microdomains to transduce signals in T cells ». *Journal of Cell Biology* 185, n° 3 (27 avril 2009): 521-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809136>.

Kakimi, Kazuhiro, Hirokazu Matsushita, Keita Masuzawa, Takahiro Karasaki, Yukari Kobayashi, Koji Nagaoka, Akihiro Hosoi, et al. « Adoptive Transfer of Zoledronate-Expanded Autologous V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Cells in Patients with Treatment-Refractory Non-Small-Cell Lung Cancer: A Multicenter, Open-Label, Single-Arm, Phase 2 Study ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 8, n° 2 (1 septembre 2020): e001185. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001185>.

- Kantarjian, Hagop, Anthony Stein, Nicola Gökbüget, Adele K. Fielding, Andre C. Schuh, Josep-Maria Ribera, Andrew Wei, et al. « Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia ». *New England Journal of Medicine* 376, n° 9 (2 mars 2017): 836-47. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609783>.
- Karunakaran, Mohindar M., Thomas W. Göbel, Lisa Starick, Lutz Walter, et Thomas Herrmann. « V $\gamma$ 9 and V $\delta$ 2 T Cell Antigen Receptor Genes and Butyrophilin 3 (BTN3) Emerged with Placental Mammals and Are Concomitantly Preserved in Selected Species like Alpaca (*Vicugna Pacos*) ». *Immunogenetics* 66, n° 4 (1 avril 2014): 243-54. <https://doi.org/10.1007/s00251-014-0763-8>.
- Karunakaran, Mohindar M., Carrie R. Willcox, Mahboob Salim, Daniel Paletta, Alina S. Fichtner, Angela Noll, Lisa Starick, et al. « Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing ». *Immunity* 52, n° 3 (17 mars 2020): 487-498.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.014>.
- Kawahara, Yuta, Sae Ishimaru, Junji Tanaka, Shinichi Kako, Masahiro Hirayama, Minoru Kanaya, Hisashi Ishida, et al. « Impact of KIR-Ligand Mismatch on Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Unrelated Cord Blood Transplantation ». *Transplantation and Cellular Therapy*, 1 juin 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2022.05.037>.
- Kazen, Allison R., et Erin J. Adams. « Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate  $\gamma\delta$  T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, n° 29 (19 juillet 2011): E332-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105105108>.
- Kierkels, G. J. J., W. Scheper, A. D. Meringa, I. Johanna, D. X. Beringer, A. Janssen, M. Schiffler, et al. « Identification of a tumor-specific allo-HLA-restricted  $\gamma\delta$ TCR ». *Blood Advances* 3, n° 19 (4 octobre 2019): 2870-82. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019032409>.
- Kiessling, R., Eva Klein, et H. Wigzell. « „Natural” Killer Cells in the Mouse. I. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Specificity and Distribution According to Genotype ». *European Journal of Immunology* 5, n° 2 (1975): 112-17. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>.
- Kim, H. T., E. L. Nelson, C. Clayberger, M. Sanjanwala, J. Sklar, et A. M. Krensky. « Gamma Delta T Cell Recognition of Tumor Ig Peptide. » *The Journal of Immunology* 154, n° 4 (15 février 1995): 1614-23.

Kong, Yan, Wei Cao, Xueyan Xi, Chi Ma, Lianxian Cui, et Wei He. « The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR $\gamma$ 9/ $\delta$ 2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR $\gamma$  $\delta$  and NKG2D ». *Blood* 114, n° 2 (9 juillet 2009): 310-17. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-196287>.

Kozbor, D, G Trinchieri, D S Monos, M Isobe, G Russo, J A Haney, C Zmijewski, et C M Croce. « Human TCR-gamma+/delta+, CD8+ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. » *Journal of Experimental Medicine* 169, n° 5 (1 mai 1989): 1847-51. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1847>.

Krzewski, Konrad, et Jack L Strominger. « The Killer's Kiss: The Many Functions of NK Cell Immunological Synapses ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell-to-cell contact and extracellular matrix*, 20, n° 5 (1 octobre 2008): 597-605. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.05.006>.

Kuhn, Jeffrey R., et Martin Poenie. « Dynamic Polarization of the Microtubule Cytoskeleton during CTL-Mediated Killing ». *Immunity* 16, n° 1 (1 janvier 2002): 111-21. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00262-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00262-5).

Kupfer, A., et S. J. Singer. « The Specific Interaction of Helper T Cells and Antigen-Presenting B Cells. IV. Membrane and Cytoskeletal Reorganizations in the Bound T Cell as a Function of Antigen Dose. » *Journal of Experimental Medicine* 170, n° 5 (1 novembre 1989): 1697-1713. <https://doi.org/10.1084/jem.170.5.1697>.

## L

Le Floc'h, Audrey Le, Abdelali Jalil, Isabelle Vergnon, Béatrice Le Maux Chansac, Vladimir Lazar, Georges Bismuth, Salem Chouaib, et Fathia Mami-Chouaib. «  $\alpha$ E $\beta$ 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis ». *The Journal of Experimental Medicine* 204, n° 3 (19 mars 2007): 559-70. <https://doi.org/10.1084/jem.20061524>.

Le Floc'h, Audrey, et Morgan Huse. « Molecular Mechanisms and Functional Implications of Polarized Actin Remodeling at the T Cell Immunological Synapse ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, n° 3 (1 février 2015): 537-56. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1760-7>.

Le Nours, Jérôme, Nicholas A. Gherardin, Sri H. Ramarathinam, Wael Awad, Florian Wiede, Benjamin S. Gully, Yogesh Khandokar, et al. « A class of  $\gamma$  $\delta$  T cell receptors recognize the underside of the antigen-presenting molecule MR1 ». *Science* 366, n° 6472 (20 décembre 2019): 1522-27. <https://doi.org/10.1126/science.aav3900>.

- Lee, You Jeong, Keli L. Holzapfel, Jinfang Zhu, Stephen C. Jameson, et Kristin A. Hogquist. « Steady-State Production of IL-4 Modulates Immunity in Mouse Strains and Is Determined by Lineage Diversity of INKT Cells ». *Nature Immunology* 14, n° 11 (novembre 2013): 1146-54. <https://doi.org/10.1038/ni.2731>.
- Leeuwen, Ester M. M. van, Ester B. M. Remmerswaal, Mireille T. M. Vossen, Ajda T. Rowshani, Pauline M. E. Wertheim-van Dillen, René A. W. van Lier, et Ineke J. M. ten Berge. « Emergence of a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Granzyme B<sup>+</sup>, Cytomegalovirus-Specific T Cell Subset after Recovery of Primary Cytomegalovirus Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173, n° 3 (1 août 2004): 1834-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1834>.
- Lesport, Emilie, Jeremy Baudhuin, Sylvie Sousa, Joel LeMaout, Alessia Zamborlini, Nathalie Rouas-Freiss, Edgardo D. Carosella, et Benoit Favier. « Inhibition of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Cell Antitumoral Activity through HLA-G: Implications for Immunotherapy of Cancer ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, n° 20 (1 octobre 2011): 3385-99. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0632-7>.
- Li, Yang, Gen Li, Jian Zhang, Xiaoli Wu, et Xi Chen. « The Dual Roles of Human  $\gamma\delta$  T Cells: Anti-Tumor or Tumor-Promoting ». *Frontiers in Immunology* 11 (2021). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.619954>.
- Lin, Mao, Xiaoyan Zhang, Shuzhen Liang, Haihua Luo, Mohammed Alnaggar, Aihua Liu, Zhinan Yin, Jibing Chen, Lizhi Niu, et Yong Jiang. « Irreversible Electroporation plus Allogenic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells Enhances Antitumor Effect for Locally Advanced Pancreatic Cancer Patients ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, n° 1 (23 octobre 2020): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00260-1>.
- Long, Eric O., Hun Sik Kim, Dongfang Liu, Mary E. Peterson, et Sumati Rajagopalan. « Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition ». *Annual Review of Immunology* 31 (2013): 227-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075005>.

## M

- Ma, Chunling, Qunyuan Zhang, Jian Ye, Fang Wang, Yanping Zhang, Eric Wevers, Theresa Schwartz, et al. « Tumor-Infiltrating  $\Gamma\delta$  T Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Human Breast Cancer ». *The Journal of Immunology* 189, n° 10 (15 novembre 2012): 5029-36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201892>.

- Malcherek, Georg, Luzia Mayr, Pedro Roda-Navarro, David Rhodes, Nigel Miller, et John Trowsdale. « The B7 Homolog Butyrophilin BTN2A1 Is a Novel Ligand for DC-SIGN ». *The Journal of Immunology* 179, n° 6 (15 septembre 2007): 3804-11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3804>.
- Marlin, Romain, Angela Pappalardo, Hannah Kaminski, Carrie R. Willcox, Vincent Pitard, Sonia Netzer, Camille Khairallah, et al. « Sensing of Cell Stress by Human  $\Gamma\delta$  TCR-Dependent Recognition of Annexin A2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, n° 12 (21 mars 2017): 3163-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621052114>.
- Maul-Pavicic, Andrea, Samuel C. C. Chiang, Anne Rensing-Ehl, Birthe Jessen, Cyril Fauriat, Stephanie M. Wood, Sebastian Sjöqvist, et al. « ORA1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, n° 8 (22 février 2011): 3324-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013285108>.
- McNerlan, S. E., I. M. Rea, H. D. Alexander, et T. C. Morris. « Changes in Natural Killer Cells, the CD57CD8 Subset, and Related Cytokines in Healthy Aging ». *Journal of Clinical Immunology* 18, n° 1 (janvier 1998): 31-38. <https://doi.org/10.1023/a:1023283719877>.
- McVay, Laila D., Sheila S. Jaswal, Christine Kennedy, Adrian Hayday, et Simon R. Carding. « The Generation of Human  $\Gamma\delta$  T Cell Repertoires During Fetal Development ». *The Journal of Immunology* 160, n° 12 (15 juin 1998): 5851-60.
- Meininger, Isabel, Anna Carrasco, Anna Rao, Tea Soini, Efthymia Kokkinou, et Jenny Mjösberg. « Tissue-Specific Features of Innate Lymphoid Cells ». *Trends in Immunology* 41, n° 10 (1 octobre 2020): 902-17. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.08.009>.
- Melandri, Daisy, Iva Zlatareva, Raphaël A. G. Chaleil, Robin J. Dart, Andrew Chancellor, Oliver Nussbaumer, Oxana Polyakova, et al. « The  $\Gamma\delta$ TCR Combines Innate Immunity with Adaptive Immunity by Utilizing Spatially Distinct Regions for Agonist Selection and Antigen Responsiveness ». *Nature Immunology* 19, n° 12 (décembre 2018): 1352-65. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0253-5>.
- Meuter, Simone, Matthias Eberl, et Bernhard Moser. « Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human  $\gamma\delta$  T cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, n° 19 (11 mai 2010): 8730-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002769107>.



Monks, Colin R. F., Benjamin A. Freiberg, Hannah Kupfer, Noah Sciaky, et Abraham Kupfer. « Three-Dimensional Segregation of Supramolecular Activation Clusters in T Cells ». *Nature* 395, n° 6697 (septembre 1998): 82-86. <https://doi.org/10.1038/25764>.

Morath, Anna, et Wolfgang W. Schamel. « A $\beta$  and  $\Gamma\delta$  T Cell Receptors: Similar but Different ». *Journal of Leukocyte Biology* 107, n° 6 (2020): 1045-55. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR1219-233R>.

Morgan, Margaret M., Christine M. Labno, Gijs A. Van Seventer, Michael F. Denny, David B. Straus, et Janis K. Burkhardt. « Superantigen-Induced T Cell:B Cell Conjugation Is Mediated by LFA-1 and Requires Signaling Through Lck, But Not ZAP-70 ». *The Journal of Immunology* 167, n° 10 (15 novembre 2001): 5708-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5708>.

Morita, C. T., C. M. Parker, M. B. Brenner, et H. Band. « TCR Usage and Functional Capabilities of Human Gamma Delta T Cells at Birth. » *The Journal of Immunology* 153, n° 9 (1 novembre 1994): 3979-88.

Morita, Craig T., Evan M. Beckman, Jack F. Bukowski, Yoshimasa Tanaka, Hamid Band, Barry R. Bloom, David E. Golan, et Michael B. Brenner. « Direct Presentation of Nonpeptide Prenyl Pyrophosphate Antigens to Human  $\Gamma\delta$  T Cells ». *Immunity* 3, n° 4 (1 octobre 1995): 495-507. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90178-7](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90178-7).

## N

Niedergang, Florence, Vincenzo Di Bartolo, et Andrés Alcover. « Comparative Anatomy of Phagocytic and Immunological Synapses ». *Frontiers in Immunology* 7 (2016). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00018>.

Nishimoto, Kevin P., Taylor Barca, Aruna Azameera, Amani Makkouk, Jason M. Romero, Lu Bai, Mary M. Brodey, et al. « Allogeneic CD20-Targeted  $\Gamma\delta$  T Cells Exhibit Innate and Adaptive Antitumor Activities in Preclinical B-Cell Lymphoma Models ». *Clinical & Translational Immunology* 11, n° 2 (2022): e1373. <https://doi.org/10.1002/cti2.1373>.

## O

Ogg, Sherry L., Anne K. Weldon, Lorraine Dobbie, Andrew J. H. Smith, et Ian H. Mather. « Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of

milk–lipid droplets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, n° 27 (6 juillet 2004): 10084-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402930101>.

## P

Page, Cécile Le, Alexandre Marineau, Patrick K. Bonza, Kurosh Rahimi, Louis Cyr, Ingrid Labouba, Jason Madore, et al. « BTN3A2 Expression in Epithelial Ovarian Cancer Is Associated with Higher Tumor Infiltrating T Cells and a Better Prognosis ». *PLOS ONE* 7, n° 6 (7 juin 2012): e38541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038541>.

Palakodeti, Aparna, Andrew Sandstrom, Lakshmi Sundaresan, Christelle Harly, Steven Nedellec, Daniel Olive, Emmanuel Scotet, Marc Bonneville, et Erin J. Adams. « The Molecular Basis for Modulation of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Responses by CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A)-Specific Antibodies\* ». *Journal of Biological Chemistry* 287, n° 39 (21 septembre 2012): 32780-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384354>.

Pang, Dick J., Joana F. Neves, Nital Sumaria, et Daniel J. Pennington. « Understanding the Complexity of  $\Gamma\delta$  T-Cell Subsets in Mouse and Human ». *Immunology* 136, n° 3 (juillet 2012): 283-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03582.x>.

Papadopoulou, Maria, Paola Tieppo, Naomi McGovern, Françoise Gosselin, Jerry K. Y. Chan, Glenn Goetgeluk, Nicolas Dauby, et al. « TCR Sequencing Reveals the Distinct Development of Fetal and Adult Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells ». *The Journal of Immunology* 203, n° 6 (15 septembre 2019): 1468-79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900592>.

Parker, C M, V Groh, H Band, S A Porcelli, C Morita, M Fabbi, D Glass, J L Strominger, et M B Brenner. « Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. » *Journal of Experimental Medicine* 171, n° 5 (1 mai 1990): 1597-1612. <https://doi.org/10.1084/jem.171.5.1597>.

Pauza, C. David, et Cristiana Cairo. « Evolution and Function of the TCR Vgamma9 Chain Repertoire: It's Good to Be Public ». *Cellular Immunology, Gamma delta T cells: 30 years post-discovery*, 296, n° 1 (1 juillet 2015): 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.02.010>.

Payne, Kyle K., Jessica A. Mine, Subir Biswas, Ricardo A. Chaurio, Alfredo Perales-Puchalt, Carmen M. Anadon, Tara Lee Costich, et al. « BTN3A1 governs antitumor responses by coordinating  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells ». *Science* 369, n° 6506 (21 août 2020): 942-49. <https://doi.org/10.1126/science.aay2767>.

Poccia, F., B. Cipriani, S. Vendetti, V. Colizzi, Y. Poquet, L. Battistini, M. López-Botet, J. J. Fournié, et M. L. Gougeon. « CD94/NKG2 Inhibitory Receptor Complex Modulates Both Anti-Viral and Anti-Tumoral Responses of Polyclonal Phosphoantigen-Reactive V Gamma 9V Delta 2 T Lymphocytes. » *The Journal of Immunology* 159, n° 12 (15 décembre 1997): 6009-17.

Pont, Frédéric, Julien Familiades, Sébastien Déjean, Séverine Fruchon, Delphine Cendron, Mary Poupot, Rémy Poupot, et al. « The Gene Expression Profile of Phosphoantigen-Specific Human  $\gamma\delta$  T Lymphocytes Is a Blend of A $\beta$  T-Cell and NK-Cell Signatures ». *European Journal of Immunology* 42, n° 1 (2012): 228-40. <https://doi.org/10.1002/eji.201141870>.

Porcelli, S, C E Yockey, M B Brenner, et S P Balk. « Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. » *Journal of Experimental Medicine* 178, n° 1 (1 juillet 1993): 1-16. <https://doi.org/10.1084/jem.178.1.1>.

Porto, P. Del, M. D'Amato, M. T. Fiorillo, L. Tuosto, E. Piccolella, et R. Sorrentino. « Identification of a Novel HLA-B27 Subtype by Restriction Analysis of a Cytotoxic Gamma Delta T Cell Clone. » *The Journal of Immunology* 153, n° 7 (1 octobre 1994): 3093-3100.

« PureTech Presents Promising Preclinical Data from LYT-210 Immuno-Oncology Program at American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting | PureTech Health », 2021. <https://news.puretechhealth.com/news-releases/news-release-details/puretech-presents-promising-preclinical-data-lyt-210-immuno/>.

## Q

Qin, Gang, Huawei Mao, Jian Zheng, Sin Fun Sia, Yinping Liu, Ping-Lung Chan, Kwok-Tai Lam, J. S. Malik Peiris, Yu-Lung Lau, et Wenwei Tu. « Phosphoantigen-Expanded Human  $\gamma\delta$  T Cells Display Potent Cytotoxicity against Monocyte-Derived Macrophages Infected with Human and Avian Influenza Viruses ». *The Journal of Infectious Diseases* 200, n° 6 (1 septembre 2009): 858-65. <https://doi.org/10.1086/605413>.

## R

- Rafia, Chirine, Christelle Harly, et Emmanuel Scotet. « Beyond CAR T Cells: Engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells to Fight Solid Tumors ». *Immunological Reviews* 298, n $^{\circ}$  1 (2020): 117-33. <https://doi.org/10.1111/imr.12920>.
- Raulet, David H., et Nadia Guerra. « Oncogenic Stress Sensed by the Immune System: Role of Natural Killer Cell Receptors ». *Nature Reviews Immunology* 9, n $^{\circ}$  8 (août 2009): 568-80. <https://doi.org/10.1038/nri2604>.
- Ravens, Sarina, Christian Schultze-Florey, Solaiman Raha, Inga Sandrock, Melanie Drenker, Linda Oberdörfer, Annika Reinhardt, et al. « Human  $\Gamma\delta$  T Cells Are Quickly Reconstituted after Stem-Cell Transplantation and Show Adaptive Clonal Expansion in Response to Viral Infection ». *Nature Immunology* 18, n $^{\circ}$  4 (avril 2017): 393-401. <https://doi.org/10.1038/ni.3686>.
- Ren, He, Shuliang Li, Xin Liu, Wanjing Li, Jianlei Hao, et Na Zhao. « Multi-Omics Analysis of the Expression and Prognostic Value of the Butyrophilins in Breast Cancer ». *Journal of Leukocyte Biology* 110, n $^{\circ}$  6 (2021): 1181-95. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MA0321-158RR>.
- Rhodes, D. A., Walter Reith, et John Trowsdale. « Regulation of Immunity by Butyrophilins » 34 (2016): 151-72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055435>.
- Rhodes, D. A., M. Stammers, G. Malcherek, S. Beck, et J. Trowsdale. « The Cluster of BTN Genes in the Extended Major Histocompatibility Complex ». *Genomics* 71, n $^{\circ}$  3 (1 février 2001): 351-62. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6406>.
- Ribot, Julie C., Sérgio T. Ribeiro, Daniel V. Correia, Ana E. Sousa, et Bruno Silva-Santos. « Human  $\Gamma\delta$  Thymocytes Are Functionally Immature and Differentiate into Cytotoxic Type 1 Effector T Cells upon IL-2/IL-15 Signaling ». *The Journal of Immunology* 192, n $^{\circ}$  5 (1 mars 2014): 2237-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303119>.
- Rigau, Marc, Simone Ostrouska, Thomas S. Fulford, Darryl N. Johnson, Katherine Woods, Zheng Ruan, Hamish E.G. McWilliam, et al. « Butyrophilin 2A1 Is Essential for Phosphoantigen Reactivity by  $\Gamma\delta$  T Cells ». *Science* 367, n $^{\circ}$  6478 (7 février 2020): eaay5516. <https://doi.org/10.1126/science.aay5516>.
- Riggan, Luke, Aharon G. Freud, et Timothy E. O'Sullivan. « True Detective: Unraveling Group 1 Innate Lymphocyte Heterogeneity ». *Trends in Immunology* 40, n $^{\circ}$  10 (1 octobre 2019): 909-21. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.08.005>.

- Ritter, Alex T., Yukako Asano, Jane C. Stinchcombe, N. M. G. Dieckmann, Bi-Chang Chen, C. Gawden-Bone, Schuyler van Engelenburg, et al. « Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse ». *Immunity* 42, n° 5 (19 mai 2015): 864-76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.013>.
- Robinson, Hannah R., Junpeng Qi, Erika M. Cook, Cydney Nichols, Eman L. Dadashian, Chingiz Underbayev, Sarah E. M. Herman, et al. « A CD19/CD3 bispecific antibody for effective immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia in the ibrutinib era ». *Blood* 132, n° 5 (2 août 2018): 521-32. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-830992>.
- Rosa, Stephen C. De, James P. Andrus, Stephen P. Perfetto, John J. Mantovani, Leonard A. Herzenberg, Leonore A. Herzenberg, et Mario Roederer. « Ontogeny of  $\Gamma\delta$  T Cells in Humans ». *The Journal of Immunology* 172, n° 3 (1 février 2004): 1637-45. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1637>.
- Roy, Sobhan, Dalam Ly, Caitlin D. Castro, Nan-Sheng Li, Andrew J. Hawk, John D. Altman, Stephen C. Meredith, Joseph A. Piccirilli, D. Branch Moody, et Erin J. Adams. « Molecular Analysis of Lipid-Reactive  $V\delta 1$   $\Gamma\delta$  T Cells Identified by CD1c Tetramers ». *The Journal of Immunology* 196, n° 4 (15 février 2016): 1933-42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502202>.
- Russano, Anna M., Elisabetta Agea, Lanfranco Corazzi, Antyony D. Postle, Gennaro De Libero, Steven Porcelli, Fernando M. de Benedictis, et Fabrizio Spinazzi. « Recognition of Pollen-Derived Phosphatidyl-Ethanolamine by Human CD1d-Restricted  $\Gamma\delta$  T Cells ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, n° 5 (1 mai 2006): 1178-84. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.01.001>.
- Rust, Chantal J. J., Frank Verreck, Henk Vietor, et Frits Koning. « Specific Recognition of Staphylococcal Enterotoxin A by Human T Cells Bearing Receptors with the V $\gamma$ 9 Region ». *Nature* 346, n° 6284 (août 1990): 572-74. <https://doi.org/10.1038/346572a0>.

## S

- Sáez-Borderías, Andrea, Mónica Gumá, Ana Angulo, Beatriz Bellosillo, Daniela Pende, et Miguel López-Botet. « Expression and Function of NKG2D in CD4+ T Cells Specific for Human Cytomegalovirus ». *European Journal of Immunology* 36, n° 12 (décembre 2006): 3198-3206. <https://doi.org/10.1002/eji.200636682>.

- Saito, Haruo, David M. Kranz, Yohtaroh Takagaki, Adrian C. Hayday, Herman N. Eisen, et Susumu Tonegawa. « A Third Rearranged and Expressed Gene in a Clone of Cytotoxic T Lymphocytes ». *Nature* 312, n° 5989 (novembre 1984): 36-40. <https://doi.org/10.1038/312036a0>.
- Sandstrom, Andrew, Cassie-Marie Peigné, Alexandra Léger, James E. Crooks, Fabienne Konczak, Marie-Claude Gesnel, Richard Breathnach, Marc Bonneville, Emmanuel Scotet, et Erin J. Adams. « The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells ». *Immunity* 40, n° 4 (17 avril 2014): 490-500. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.003>.
- Sasada, Tetsuro, Maki Touma, Hsiu-Ching Chang, Linda K. Clayton, Jia-huai Wang, et Ellis L. Reinherz. « Involvement of the TCR C $\beta$  FG Loop in Thymic Selection and T Cell Function ». *Journal of Experimental Medicine* 195, n° 11 (28 mai 2002): 1419-31. <https://doi.org/10.1084/jem.20020119>.
- Sebestyen, Zsolt, Immo Prinz, Julie Déchanet-Merville, Bruno Silva-Santos, et Jurgen Kuball. « Translating Gammadelta ( $\Gamma\delta$ ) T Cells and Their Receptors into Cancer Cell Therapies ». *Nature Reviews Drug Discovery* 19, n° 3 (mars 2020): 169-84. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0038-z>.
- Silva-Santos, Bruno, Wolfgang W. A. Schamel, Paul Fisch, et Matthias Eberl. «  $\Gamma\delta$  T-Cell Conference 2012: Close Encounters for the Fifth Time ». *European Journal of Immunology* 42, n° 12 (2012): 3101-5. <https://doi.org/10.1002/eji.201270101>.
- Simone, Rita, Bernadette Barbarat, Andrea Rabellino, Giancarlo Icardi, Marcello Bagnasco, Giampaola Pesce, Daniel Olive, et Daniele Saverino. « Ligation of the BT3 Molecules, Members of the B7 Family, Enhance the Proinflammatory Responses of Human Monocytes and Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *Molecular Immunology* 48, n° 1 (1 novembre 2010): 109-18. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.09.005>.
- Singleton, Kentner L., Kole T. Roybal, Yi Sun, Guo Fu, Nicholas R. J. Gascoigne, Nicolai S. C. van Oers, et Christoph Wülfing. « Spatiotemporal Patterning During T Cell Activation Is Highly Diverse ». *Science Signaling* 2, n° 65 (7 avril 2009): ra15-ra15. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000199>.
- Smyth, L. J. C., J. A. Kirby, et A. C. Cunningham. « Role of the Mucosal Integrin AE(CD103)B7 in Tissue-Restricted Cytotoxicity ». *Clinical and Experimental Immunology* 149, n° 1 (juillet 2007): 162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03385.x>.
- Soghoian, Damien Z., Heiko Jessen, Michael Flanders, Kailan Sierra-Davidson, Sam Cutler, Thomas Pertel, Srinika Ranasinghe, et al. « HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cell Responses during Acute HIV

Infection Predict Disease Outcome ». *Science Translational Medicine* 4, n° 123 (29 février 2012): 123ra25. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003165>.

Spada, Franca M., Ethan P. Grant, Peter J. Peters, Masahiko Sugita, Augustín Melián, David S. Leslie, Hoi K. Lee, et al. « Self-Recognition of Cd1 by  $\gamma/\delta$  T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 191, n° 6 (20 mars 2000): 937-48.

Speiser, D. E., D. Valmori, D. Rimoldi, M. J. Pittet, D. Liénard, V. Cerundolo, H. R. MacDonald, J. C. Cerottini, et P. Romero. « CD28-Negative Cytolytic Effector T Cells Frequently Express NK Receptors and Are Present at Variable Proportions in Circulating Lymphocytes from Healthy Donors and Melanoma Patients ». *European Journal of Immunology* 29, n° 6 (juin 1999): 1990-99. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199906\)29:06<1990::AID-IMMU1990>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1990::AID-IMMU1990>3.0.CO;2-9).

Spits, H., X. Paliard, V. H. Engelhard, et J. E. de Vries. « Cytotoxic Activity and Lymphokine Production of T Cell Receptor (TCR)-Alpha Beta+ and TCR-Gamma Delta+ Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Clones Recognizing HLA-A2 and HLA-A2 Mutants. Recognition of TCR-Gamma Delta+ CTL Clones Is Affected by Mutations at Positions 152 and 156. » *The Journal of Immunology* 144, n° 11 (1 juin 1990): 4156-62.

Stinchcombe, Jane C., Giovanna Bossi, Sarah Booth, et Gillian M. Griffiths. « The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges ». *Immunity* 15, n° 5 (1 novembre 2001): 751-61. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00234-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00234-5).

Stinchcombe, Jane C., Lyra O. Randzavola, Karen L. Angus, Judith M. Mantell, Paul Verkade, et Gillian M. Griffiths. « Mother Centriole Distal Appendages Mediate Centrosome Docking at the Immunological Synapse and Reveal Mechanistic Parallels with Ciliogenesis ». *Current Biology* 25, n° 24 (21 décembre 2015): 3239-44. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.028>.

Suni, M. A., S. A. Ghanekar, D. W. Houck, H. T. Maecker, S. B. Wormsley, L. J. Picker, R. B. Moss, et V. C. Maino. « CD4(+)CD8(Dim) T Lymphocytes Exhibit Enhanced Cytokine Expression, Proliferation and Cytotoxic Activity in Response to HCMV and HIV-1 Antigens ». *European Journal of Immunology* 31, n° 8 (août 2001): 2512-20. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200108\)31:8<2512::aid-immu2512>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200108)31:8<2512::aid-immu2512>3.0.co;2-m).

Sykes, M. « Unusual T Cell Populations in Adult Murine Bone Marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and Alpha Beta TCR+NK1.1+ Cells. » *The Journal of Immunology* 145, n° 10 (15 novembre 1990): 3209-15.

## T

- Tanaka, Y, S Sano, E Nieves, G De Libero, D Rosa, R L Modlin, M B Brenner, B R Bloom, et C T Morita. « Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, n° 17 (16 août 1994): 8175-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8175>.
- Tanaka, Yoshimasa, Craig T. Morita, Yoko Tanaka, Edward Nieves, Michael B. Brenner, et Barry R. Bloom. « Natural and Synthetic Non-Peptide Antigens Recognized by Human  $\Gamma\delta$  T Cells ». *Nature* 375, n° 6527 (mai 1995): 155-58. <https://doi.org/10.1038/375155a0>.
- Tilloy, Florence, Emmanuel Treiner, Se-Ho Park, Corinne Garcia, François Lemonnier, Henri de la Salle, Albert Bendelac, Marc Bonneville, et Olivier Lantz. « An Invariant T Cell Receptor  $\alpha$  Chain Defines a Novel TAP-independent Major Histocompatibility Complex Class Ib–restricted  $\alpha/\beta$  T Cell Subpopulation in Mammals ». *Journal of Experimental Medicine* 189, n° 12 (21 juin 1999): 1907-21. <https://doi.org/10.1084/jem.189.12.1907>.
- Tokuyama, Hirotake, Tomomi Hagi, Stephen R. Mattarollo, Jacqueline Morley, Qiao Wang, Hang Faiso, Fuminori Moriyasu, Mie Nieda, et Andrew J. Nicol. «  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cell Cytotoxicity against Tumor Cells Is Enhanced by Monoclonal Antibody Drugs—Rituximab and Trastuzumab ». *International Journal of Cancer* 122, n° 11 (2008): 2526-34. <https://doi.org/10.1002/ijc.23365>.
- Touma, Maki, Hsiu-Ching Chang, Tetsuro Sasada, Maris Handley, Linda K. Clayton, et Ellis L. Reinherz. « The TCR C $\beta$  FG Loop Regulates A $\beta$  T Cell Development ». *The Journal of Immunology* 176, n° 11 (1 juin 2006): 6812-23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6812>.
- Treiner, Emmanuel, Livine Duban, Seiamak Bahram, Mirjana Radosavljevic, Valerie Wanner, Florence Tilloy, Pierre Affaticati, Susan Gilfillan, et Olivier Lantz. « Selection of Evolutionarily Conserved Mucosal-Associated Invariant T Cells by MR1 ». *Nature* 422, n° 6928 (mars 2003): 164-69. <https://doi.org/10.1038/nature01433>.
- Trichet, Valérie, Cécile Benezech, Christelle Dousset, Marie-Claude Gesnel, Marc Bonneville, et Richard Breathnach. « Complex Interplay of Activating and Inhibitory Signals Received by  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells Revealed by Target Cell B2-Microglobulin Knockdown ». *The Journal of Immunology* 177, n° 9 (1 novembre 2006): 6129-36. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6129>.
- Tsun, Andy, Ihjaaz Qureshi, Jane C. Stinchcombe, Misty R. Jenkins, Maïke de la Roche, Joanna Kleczkowska, Rose Zamoyska, et Gillian M. Griffiths. « Centrosome docking at the immunological synapse is controlled by Lck signaling ». *Journal of Cell Biology* 192, n° 4 (21 février 2011): 663-74. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008140>.



## U, V

- Vantourout, Pierre, Adam Laing, Martin J. Woodward, Iva Zlatareva, Luis Apolonia, Andrew W. Jones, Ambrosius P. Snijders, Michael H. Malim, et Adrian C. Hayday. « Heteromeric Interactions Regulate Butyrophilin (BTN) and BTN-like Molecules Governing  $\Gamma\delta$  T Cell Biology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, n° 5 (30 janvier 2018): 1039-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701237115>.
- Vavassori, Stefano, Anil Kumar, Gan Siok Wan, Gundimeda S. Ramanjaneyulu, Marco Cavallari, Sary El Daker, Travis Beddoe, et al. « Butyrophilin 3A1 Binds Phosphorylated Antigens and Stimulates Human  $\Gamma\delta$  T Cells ». *Nature Immunology* 14, n° 9 (septembre 2013): 908-16. <https://doi.org/10.1038/ni.2665>.
- Vicente-Manzanares, Miguel, et Francisco Sánchez-Madrid. « Targeting the Integrin Interactome in Human Disease ». *Current Opinion in Cell Biology, Differentiation and disease*, 55 (1 décembre 2018): 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.05.010>.
- Vyborova, Anna, Dennis X. Beringer, Domenico Fasci, Froso Karaiskaki, Eline van Diest, Lovro Kramer, Aram de Haas, et al. «  $\gamma\delta$ 2T Cell Diversity and the Receptor Interface with Tumor Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 130, n° 9 (1 septembre 2020): 4637-51. <https://doi.org/10.1172/JCI132489>.

## W

- Wang, Hong, Zhimei Fang, et Craig T. Morita. «  $V\gamma 2V\delta 2$  T Cell Receptor Recognition of Prenyl Pyrophosphates Is Dependent on All CDRs ». *The Journal of Immunology* 184, n° 11 (1 juin 2010): 6209-22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000231>.
- Wang, P., et M. Malkovsky. « Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human  $V\gamma 9/V\delta 2$  T cells. » *Molecular Medicine* 6, n° 3 (mars 2000): 196-207.
- Wesch, Daniela, Christian Peters, Hans-Heinrich Oberg, Kathrin Pietschmann, et Dieter Kabelitz. « Modulation of  $\Gamma\delta$  T Cell Responses by TLR Ligands ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, n° 14 (1 juillet 2011): 2357-70. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0699-1>.

- Willcox, Benjamin E., et Carrie R. Willcox. «  $\Gamma\delta$  TCR Ligands: The Quest to Solve a 500-Million-Year-Old Mystery ». *Nature Immunology* 20, n° 2 (février 2019): 121-28. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0304-y>.
- Willcox, Carrie R., Martin S. Davey, et Benjamin E. Willcox. « Development and Selection of the Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+ T-Cell Repertoire ». *Frontiers in Immunology* 9 (2018): 1501. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01501>.
- Willcox, Carrie R., Vincent Pitard, Sonia Netzer, Lionel Couzi, Mahboob Salim, Tobias Silberzahn, Jean-François Moreau, Adrian C. Hayday, Benjamin E. Willcox, et Julie Déchanet-Merville. « Cytomegalovirus and Tumor Stress Surveillance by Binding of a Human  $\Gamma\delta$  T Cell Antigen Receptor to Endothelial Protein C Receptor ». *Nature Immunology* 13, n° 9 (septembre 2012): 872-79. <https://doi.org/10.1038/ni.2394>.
- Willcox, Carrie R., Pierre Vantourout, Mahboob Salim, Iva Zlatareva, Daisy Melandri, Leonor Zanardo, Roger George, et al. « Butyrophilin-like 3 Directly Binds a Human V $\gamma$ 4+ T Cell Receptor Using a Modality Distinct from Clonally-Restricted Antigen ». *Immunity* 51, n° 5 (19 novembre 2019): 813-825.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.006>.
- Wistuba-Hamprecht, Kilian, Alexander Martens, Karin Haehnel, Marnix Geukes Foppen, Jianda Yuan, Michael A. Postow, Phillip Wong, et al. « Proportions of Blood-Borne V $\delta$ 1+ and V $\delta$ 2+ T-Cells Are Associated with Overall Survival of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 64 (septembre 2016): 116-26. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.06.001>.
- Wright, A, J E Lee, M P Link, S D Smith, W Carroll, R Levy, C Clayberger, et A M Krensky. « Cytotoxic T lymphocytes specific for self tumor immunoglobulin express T cell receptor delta chain. » *Journal of Experimental Medicine* 169, n° 5 (1 mai 1989): 1557-64. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1557>.

## X

- Xi, Xueyan, Xiqin Han, Liang Li, et Zhendong Zhao. « Identification of a New Tuberculosis Antigen Recognized by  $\gamma\delta$  T Cell Receptor ». *Clinical and Vaccine Immunology* 20, n° 4 (avril 2013): 530-39. <https://doi.org/10.1128/CVI.00584-12>.
- Xi, XueYan, XiaoYan Zhang, Bei Wang, Ji Wang, He Huang, LianXian Cui, XiQin Han, Liang Li, Wei He, et ZhenDong Zhao. « A Novel Strategy to Screen Bacillus Calmette-Guérin Protein Antigen

Recognized by  $\Gamma\delta$  TCR». *PLOS ONE* 6, n° 4 (22 avril 2011): e18809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018809>.

Xu, Yan, Zheng Xiang, Mohammed Alnaggar, Léonce Kouakanou, Jiawei Li, Junyi He, Jiashuang Yang, et al. « Allogeneic  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Cell Immunotherapy Exhibits Promising Clinical Safety and Prolongs the Survival of Patients with Late-Stage Lung or Liver Cancer ». *Cellular & Molecular Immunology* 18, n° 2 (février 2021): 427-39. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0515-7>.

## Y

Yamashiro, Hiromichi, Shinji Yoshizaki, Toshimasa Tadaki, Kohji Egawa, et Naohiro Seo. « Stimulation of Human Butyrophilin 3 Molecules Results in Negative Regulation of Cellular Immunity ». *Journal of Leukocyte Biology* 88, n° 4 (2010): 757-67. <https://doi.org/10.1189/jlb.0309156>.

## Z

Zakeri, Nekisa, Andrew Hall, Leo Swadling, Laura J. Pallett, Nathalie M. Schmidt, Mariana O. Diniz, Stephanie Kucykowicz, et al. « Characterisation and Induction of Tissue-Resident Gamma Delta T-Cells to Target Hepatocellular Carcinoma ». *Nature Communications* 13, n° 1 (16 mars 2022): 1372. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29012-1>.

Zeng, Xun, Yu-Ling Wei, Jun Huang, Evan W. Newell, Hongxiang Yu, Brian A. Kidd, Michael S. Kuhns, et al. «  $\Gamma\delta$  T Cells Recognize a Microbial Encoded B Cell Antigen to Initiate a Rapid Antigen-Specific Interleukin-17 Response ». *Immunity* 37, n° 3 (21 septembre 2012): 524-34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.011>.

Zhu, Meng, Caiwang Yan, Chuanli Ren, Xiaodan Huang, Xun Zhu, Haiyong Gu, Meilin Wang, et al. « Exome Array Analysis Identifies Variants in SPOCD1 and BTN3A2 That Affect Risk for Gastric Cancer ». *Gastroenterology* 152, n° 8 (juin 2017): 2011-21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.017>.

# ANNEXE

## LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 au sein du microenvironnement tumoral

Comme décrit précédemment, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 présentent de grand intérêt pour le développement d'immunothérapies antitumorales. Toutefois, les quelques essais cliniques réalisés à ce jour présentent des résultats limités en termes d'efficacité, notamment dans le contexte de certaines tumeurs solides (Castiglione F. et al., 2008 ; Ma C. et al., 2012). Cette dichotomie peut suggérer l'existence de populations de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dotées de fonctions suppressives ou pro-tumorales ; ou bien la possibilité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 d'être polarisé en fonction de leurs environnements. De précédents résultats obtenus dans l'équipe et comparable à la littérature (Dunne MR. et al., 2011) ont pu montrer que les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 retrouvés dans le sang périphérique de donneur sain présentent un profil de type Th1, suggérant ainsi l'absence de sous-population pro-tumorales. De ce fait, une meilleure connaissance de la plasticité possible des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et une compréhension des mécanismes impliqués semblent nécessaire pour une meilleure utilisation des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en immunothérapies.

Le TGF- $\beta$  est l'une des cytokines immunorégulatrices les plus puissantes, et l'une des plus représentée au sein des micro-environnements tumoraux (Akhurst RJ. Et Hata A., 2012). Son impact, bien décrit sur des LT  $\alpha\beta$ , commence à être étudié chez les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Notamment, une action positive de la présence de TGF- $\beta$  lors de l'expansion *in vitro* de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 a pu être mis en évidence (Beatson RE., et al., 2021). Ceci présente un potentiel intérêt pour le développement d'une banque de LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dans le but de transfert adoptif. Toutefois, une question différente est posée ici. En effet, il s'agit ici de déterminer l'impact du TGF- $\beta$  sur les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 circulants, arrivant potentiellement sur le lieu d'une tumeur solide. Que se passerait-il alors ?

Pour répondre à cette question, des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 isolés du sang de donneurs sains ont été cultivés en présence de TGF- $\beta$  puis différents tests ont été conduits afin de déterminer l'impact de celle-ci sur cette population. Ceci nous a permis de mettre en évidence la perte d'efficacité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 en présence de TGF- $\beta$  mais surtout, de mettre en évidence un parti du mécanisme impliqué. En effet, une grande diminution des capacités de réactivité et cytotoxicité des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 a pu être observée, ainsi qu'une modification phénotypique. Lors de cette étude, nous avons pu montrer que ces effets sont régis au niveau transcriptionnel. De plus, le TGF- $\beta$  ralentit fortement le fonctionnement de ces cellules en atténuant leurs capacités métaboliques.

A) Article soumis

**A dramatic impairment of the antitumor activity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is induced by TGF- $\beta$  through combined phenotype, transcriptomic and metabolic changes**

Chirine Rafia<sup>a,b</sup>, Clément Loizeau<sup>a,b</sup>, Ophélie Renoult<sup>a,b</sup>, Christelle Harly<sup>a,b</sup>, Claire Pecqueur<sup>a,b</sup>, Noémie Joalland<sup>a,b,\*</sup>, Emmanuel Scotet<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Nantes Université, Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075, Université d'Angers, CRCI2NA, F-44000 Nantes, France

<sup>b</sup>LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, F-44000, France

\*Co-last authors

**Running title:** TGF- $\beta$  alters the antitumor activity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

**Correspondence:** Emmanuel Scotet, INSERM UMR1307 CNRS UMR6075, CRCI2NA Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes-Angers, IRS\_UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France. Emmanuel.Scotet@inserm.fr

**Keywords:** Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, Tumor, Inhibition, TGF- $\beta$

## **Abstract**

Despite significant advances, the eradication of cancer remains a clinical challenge which justifies the urgent exploration of additional therapeutic strategies such as immunotherapies. Human peripheral V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells represent an attractive candidate subset for designing safe, feasible and effective adoptive T cell transfer-based therapies. However, following their infiltration within tumors,  $\gamma\delta$  T cells are exposed to various regulating constituents and signals from the tumor microenvironment (TME), which severely alter their antitumor functions. Here, we show that TGF- $\beta$ , whose elevated production in some solid tumors is linked to a poor prognosis, interferes with the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells *in vitro*. This regulatory cytokine strongly impairs their cytolytic activity, which is accompanied by the induction of particular phenotypic, transcriptomic and metabolic changes. Collectively, these observations provide informations for better understanding and targeting the impact of TME components to regulate the antitumor activity of human T cell effectors.



## Introduction

In the wake of revolutionary cancer immunotherapies, adoptive transfer strategies harnessing effector functions of particular immune cell subsets have been proposed. Among the most attractive candidates, human peripheral V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, which represent 1 to 10% of blood CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in healthy adults, contribute to host defenses against various infections and malignancies<sup>1,2</sup>. These conserved and non-alloreactive unconventional T lymphocytes are selectively activated in a TCR/CD3-dependent but MHC-independent, manner by non-peptidic small metabolites of isoprenoid synthesis pathways called PAg (*phosphoantigen*), such as IPP (*isopentenyl pyrophosphate*). This peculiar and exquisitely specific stress sensing process, which remains ill defined, also involves BTN (*butyrophilin*)2A/BTN3A, which are expressed at the surface of target cells<sup>3-5</sup>. The sensitization of target cells with elevated pinocytic activity by pharmacological NBP (*amino-bisphosphonate*) compounds, such as Zoledronate, which inhibit a key IPP-degrading enzyme of the mammalian mevalonate pathway, upregulate the reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes<sup>6</sup>. This *Self*-targeted reactivity process needs to be tightly controlled by a set of molecules, such as NK (*natural killer*) receptors, adhesion molecules, Toll-like receptors or immune checkpoint inhibitors. The activating NKG2D (*natural killer group 2, member D*) receptor is expressed by cytotoxic immune cell subsets, including V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. Once engaged by stress-induced determinants that are barely, if not, expressed by healthy cells, these receptors play a key role in sustaining TCR/CD3-induced reactivities and subsequent antitumor functions, such as perforin/granzyme-mediated cytolysis. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells integrate activation and inhibition signals to deliver, or not, rapid and strong functional responses, such as proliferation, cytolysis and cytokines (i.e. TNF (*tumor necrosis factor*)- $\alpha$ , IFN (*interferon*)- $\gamma$ ) release<sup>7</sup>.

Importantly, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes sense and eliminate a broad range of human circulating and solid tumor cells. The range of tumor cell lines detected by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, which was initially restricted to circulating tumors (e.g. hematopoietic tumors), has been next extended to various solid tumors (e.g. renal cancer and colon carcinomas)<sup>8</sup>. The development of clinical grade synthetic agonist molecules such as NBP, PAg or anti-BTN3A agonist antibodies enabled the implementation of passive or active V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell immunotherapies with modest therapeutic effects<sup>9</sup>. However, while several groups initially reported tumor infiltration by human  $\gamma\delta$  T cells, additional work evidenced that some tumor-associated  $\gamma\delta$  T cells display pro-tumor functions<sup>10,11</sup>. This result highlights the role played by the TME (*tumor microenvironment*) on tumor-infiltrated  $\gamma\delta$  T cells in fostering immune escape. Among TME factors, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*- $\beta$ ), a highly conserved multi-functional cytokine, is secreted by different cell types (e.g. lymphocytes, macrophages) and regulates various biological functions of tumor and T cells<sup>12,13</sup>. Indeed, different studies have shown its strong suppressive activity within solid tumors by inducing death or converting effector T cells into T helper 17 or T regulatory lymphocytes.

On the basis of the strong and well described impact of TGF- $\beta$  on antitumor  $\alpha\beta$  T cells reactivities, we investigated its influence on the human effector V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subset. Our results evidenced that antitumor functions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells are greatly impaired by TGF- $\beta$ . More importantly, they demonstrate that this impairment is not only profound, as it affects the transcriptome and the metabolism of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, but also long lasting.

## Materials & Methods

### Reagents, human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T and primary tumor cells

Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were amplified from PBMC (peripheral blood mononuclear cells) obtained from healthy donor blood samples provided by the Etablissement Français du Sang (EFS, Nantes, France) and after Ficoll density centrifugation (Eurobio). For specific *ex vivo* expansions of peripheral allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, PBMCs were incubated with 3  $\mu$ M of BrHPP (bromohydrin pyrophosphate), kindly provided by Innate Pharma (Marseille, France) in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 10 mg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin, and 100 IU/mL human recombinant IL-2 (Proleukin, Novartis). After 4 days, cell cultures were supplemented with 300 IU/mL IL-2. On day 21, the purity of cultures was checked by flow cytometry and the population with a purity >90% were conserved. Human primary GBM (Glioblastoma Multiforme) cultures were obtained after mechanical dissociation of surgical resection tumor samples from patients. All procedures involving human patients were performed in accordance with the ethical standards of the ethic national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual patients included in this study. Primary cultures were established and stored at  $-180^{\circ}\text{C}$ . Cell-frozen vials were grown in defined medium [DMEM/Ham F12 (Gibco), 2 mmol/L l-glutamine (Gibco), N2- and B27-supplement (Gibco), 2  $\mu$ g/mL heparin (Sigma Aldrich), 20 ng/mL EGF and 25 ng/mL bFGF (Peprotech), and 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Gibco)] at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ . All experiments were performed with GBM cells in culture for less than 3 months and cells were routinely checked for mycoplasma contamination. Recombinant human transforming growth factor  $\beta$ 1 (premium grade, Miltenyi Biotec) was diluted and used at the indicated concentrations.

### Flow cytometry

Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were stained with FITC-labeled anti-human TCR V $\delta$ 2 mAb (#IMMU389, Beckman Coulter) and APC-labeled anti-human CD3 $\epsilon$  mAb (#UCHT1, Beckman Coulter), to check the purity of the populations. Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were phenotyped using PE-labeled anti-NKG2A (#Z199, Beckman Coulter), PE-labeled anti-NKG2D (#ON72, Beckman Coulter), PE-labeled anti-CD85j/ILT2 (#HP-F1 Beckman Coulter), APC-labeled anti-ICAM1 (#HA58, Biolegend), Acquisition was performed using an Accuri C6 PLUS flow cytometer (BD Biosciences) and the collected events were analyzed using FlowJo software (Treestar).

### Functional assays *in vitro*

For CD107a surface mobilization assays, primary human GBM cells or cell lines were sensitized, or not, with various quantities of Zoledronate (Zometa, Sigma) overnight before incubation with human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (effector to target ratio 1:1). Cocultures were performed in RPMI medium containing 5  $\mu$ M monensin (Sigma) and Alexa Fluor 647-labeled anti-human CD107a mAb

(#H4A3, Biolegend). After 4 h, human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes were collected and stained with a FITC-labeled anti-human TCR V $\delta$ 2 mAb (#IMMU389, Beckman Coulter) and analyzed by flow cytometry. To perform cytotoxic assays, tumor cells were previously treated with Zol overnight and then incubated with  $^{51}\text{Cr}$  (75  $\mu\text{Ci}/10^6$  cells) for 1 h. After washes, cells were cocultured with human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes (effector to target ratio 10:1) for 4 h. The activity of  $^{51}\text{Cr}$  released in supernatants was measured using a MicroBeta counter (Perkin Elmer). Specific target cell lysis was calculated as follows: % Lysis =  $\frac{(\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release})}{(\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release})} \times 100$ . Spontaneous and maximum release values were obtained by adding culture medium or 1% Triton X-100, respectively, to  $^{51}\text{Cr}$ -labeled target cells in the absence of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes.

### **Transcriptional analyses**

Briefly, RNA from dry pellets of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes was extracted and purified using the NucleoSpin RNA plus isolation kit from Macherey-Nagel. DGE-sequencing was performed by the BIRD core facility and data were analyzed using R programming languages and tools.

### **Metabolic analyses**

Mitochondrial oxygen consumption (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured in non-buffered medium containing 0.2 mM cystine supplemented with glucose (5 mM), pyruvate (1 mM), and glutamine (2 mM) using an XF24 Analyzer (SeaHorse Bioscience). Specific mitochondrial respiration in the presence of a stimulus (BrHPP, PMA-ionomycin) was calculated as follows: difference between the mean of the 3 values of OCR in the absence of substrate and the mean of the 4 values of OCR after injection of the substrate. Briefly, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes are washed in the analysis medium and plated at  $8 \times 10^4$  cells per well using Cell-Tak at 22,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The plate is then placed at 37°C to equilibrate for 1h prior to starting the analysis. First, points of measurement are taken every 10 minutes. After 3 cycles, BrHPP is next injected and 3 measures are taken rapidly, every 3 min, followed by 5 cycles of 10 min. PMA-ionomycin is then injected and the same protocol of measurement is applied than after BrHPP. Analysis of the obtained values is performed using Wave 2.6 (Agilent) software.

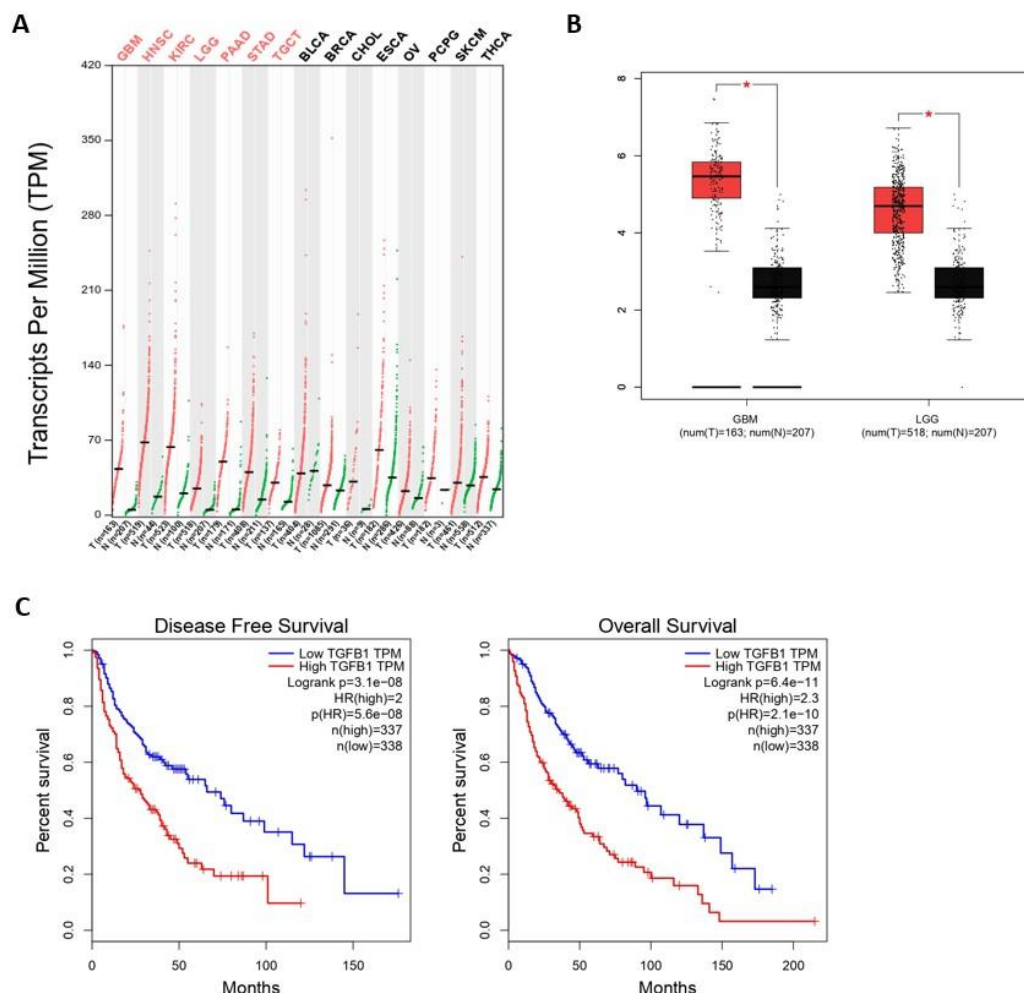
### **Statistical analyses**

Data are expressed as mean  $\pm$  SD and were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software). Two-way ANOVA and Mann & Whitney tests were calculated to assess or not for significant differences.

## Results

### *Elevated levels of TGF- $\beta$ transcripts are detected in human brain tumors with a poor prognosis*

The abundance of TGF- $\beta$  transcripts was analyzed within human tumors, such as brain tumors, using GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*, <http://gepia.cancer-pku.cn/>) which is an interactive web-based tool developed to deliver fast and customizable functionalities based on TCGA and GTEx data<sup>14</sup>. These *in silico* transcriptomic analyses evidenced high quantities of TGF- $\beta$  transcripts in Glioblastoma (GBM) and Low-Grade Gliomas (LGG), as compared to normal brain tissues (**Figure 1A** and **1B**). GEPIA also provides interactive functions such as correlation and patient survival analyses. Interestingly, these analyses revealed that increased abundance of TGF- $\beta$  transcripts in brain tumors is correlated to a dismal prognosis (i.e. overall and disease-free survivals) of these brain tumor patients (**Figure 1C**). These analyses indicate that elevated levels of TGF- $\beta$  transcripts are produced in human brain cancers with poor prognosis.

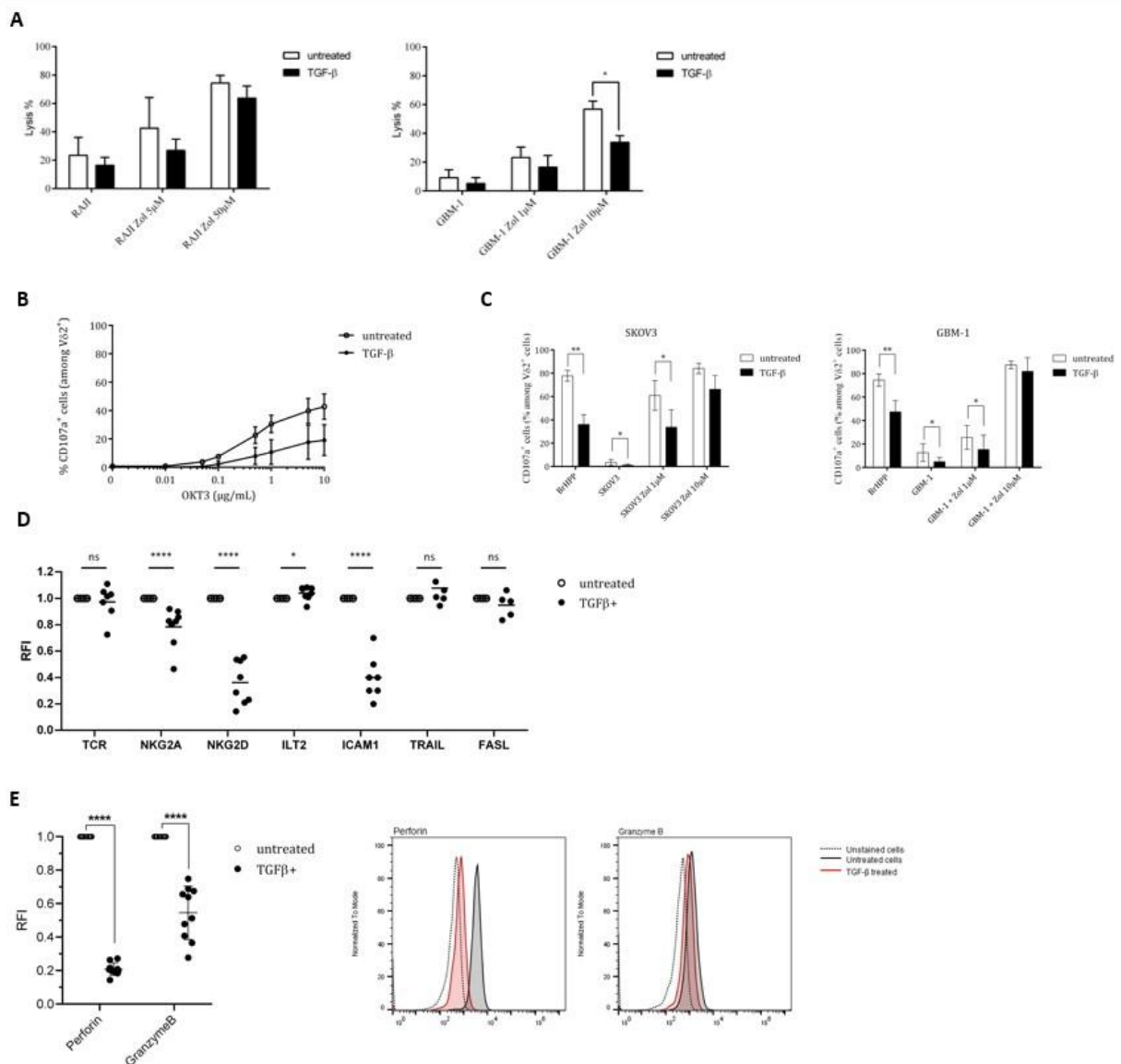


**Figure 1. High levels of TGF- $\beta$  transcripts are present in human brain tumors with poor prognosis.** (A) The abundance of TGF- $\beta$  transcripts across multiple cancers and the normal tissues associated was analyzed by matching TCGA normal and GTEx data. A particular interest was taken upon brain tumors (B). (C) Survival curves (Disease free, left; Overall, right) for levels (low, blue; high, red) of

TGFB1 transcripts analyzed for GBM and LGG (Kaplan-Meier). Data were obtained from GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

### ***TGF- $\beta$ inhibits the antitumor cytotoxic reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells***

Considering elevated levels of TGF- $\beta$  transcripts in brain human tumors with a dismal prognosis and the role of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against GBM cells<sup>15,16</sup>, we investigated the inhibitory effect induced by TGF- $\beta$ . <sup>51</sup>Cr-release assays performed using Raji and GBM primo-culture showed that zoledronate-induced cytolytic activities were inhibited in the presence of TGF- $\beta$  (**Figure 2A**). V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells which have been pre-incubated for 3 days with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) expressed significantly reduced levels of T cell surface-translocated CD107a when activated by increasing doses of anti-CD3 antibody, as compared to control conditions (*untreated*). Importantly, both natural and zoledronate induced-reactivities (CD107a) of TGF- $\beta$ -treated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against tumor cells from ovarian cancer (SKOV3) and GBM primo-cultures (GBM-1), were significantly reduced, as compared to control conditions (*untreated*) (**Figure 2B**). Interestingly, strong antigenic activation conditions (zoledronate, 10  $\mu$ M) reduced the intensity of this inhibition.



**Figure 2. TGF- $\beta$  inhibits both antitumor cytotoxicity and antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** PBL-derived V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were pretreated or not with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 3 days. (A) Anti-tumor cytotoxic reactivities of TGF- $\beta$ -treated (*closed*) vs untreated (*open*) V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes against human tumor cells (Raji, left; GBM-1, right) using  $^{51}\text{Cr}$  release assays. Target cells have been pretreated, or not, with zoledronate (Zol) at 5 and 50  $\mu\text{M}$ . Results are expressed as % of cytotoxicity (mean  $\pm$  SD). (B) and (C) Frequency of CD107a $^{+}$  cells among TGF- $\beta$ -treated (*closed*) vs untreated (*open*) TCRV $\delta$ 2 $^{+}$  lymphocytes (%) after stimulation with increasing concentrations of anti-CD3 $\epsilon$  mAb (OKT3) (B) or zoledronate (Zol)-treated, or not, human SKOV3 (*left*) or GBM-1 (*right*) tumor cells (C). E/T ratio 1. Positive control: BrHPP (3  $\mu\text{M}$ ).  $n \geq 5$ , mean  $\pm$  SD. (D) and (E) Expression levels of activation-related molecules (TCR, NKG2A, NKG2D, ICAM1, TRAIL, FASL) (D) and cytolytic (Perforin, Granzyme B) molecules (E) by TGF- $\beta$ -treated (*closed*) vs untreated (*open*) TCRV $\delta$ 2 $^{+}$  lymphocytes measured by flow cytometry. RFI: Relative Fluorescence Intensity. Mann-Whitney \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,001$ .

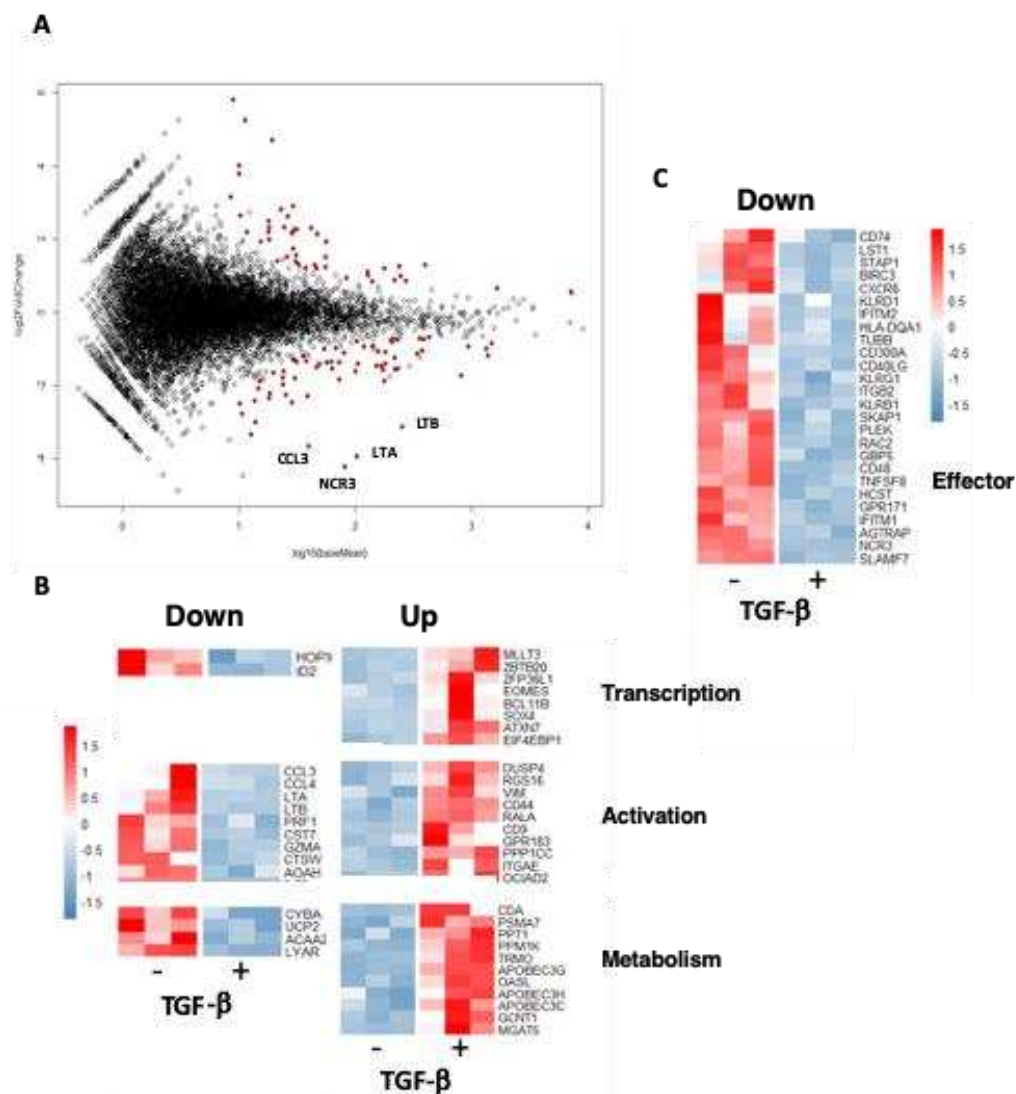
In an effort to provide mechanistic explanation(s) for this diminished activation potential and antitumor reactivity, the levels of expression of key selected surface molecules were analyzed and compared by flow cytometry with a focus on markers playing a role in the antitumor reactivity such as TCR, ICAM-1, activatory (NKG2D) or inhibitory (i.e. CD94/NKG2A; ILT2) NK receptors as well as cytolytic pathway associated molecules (i.e. perforin (perf), granzyme B (GzmB), Fas Ligand (FASL), TRAIL)) (**Figure 2C**). The most striking effect of this TGF- $\beta$  exposure was the strongly reduced expression of the activating receptor NKG2D, the cell adhesion molecule ICAM-1 and perforin/granzyme B which all represent key mediators of major antitumor cytolytic activities. TGF- $\beta$  exposure did not significantly affect the expression of TCR, FASL and TRAIL molecules and slightly affected the expression of inhibitory receptors. Following dose-responses analyses to determine optimal TGF- $\beta$  concentrations for inducing a significant reduction of NKG2D expression (**Supplemental Figure S1A**), the kinetics of effects induced by TGF- $\beta$  were established, at the protein level, by measuring the levels of expression of NKG2D at different time-points following addition of TGF- $\beta$  (**Supplemental Figure S1B**). The expression of NKG2D remained stable for about 4 h in the presence of TGF- $\beta$  and started to decrease after 8 h by reaching its lowest expression levels between 24 h and 72 h. Interestingly, next experiments showed that, following exposure to TGF- $\beta$  for different durations and washes, the impact of this cytokine on NKG2D expression was lasting for days, with a partial restoration of initial expression levels 5 days after withdrawing TGF- $\beta$  (**Supplemental Figure S1C**).

From these observations, the impact of TGF- $\beta$  on antitumor functions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes was next assessed *in vitro*. The intracellular levels of expression of cytolytic molecules from TGF- $\beta$ -treated and untreated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were measured and compared (**Figure 2D**). These analyses focused on perforin/granzyme B, which constitute the major pathway implicated in the antitumor cytolytic activity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. TGF- $\beta$ -treated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expressed significantly lower levels of perforin and granzyme B, as compared to untreated conditions (*Relative Fluorescence Intensity* (RFI)=20 % and 50 %, respectively). Taken together, these results show that TGF- $\beta$  significantly inhibits the antigenic reactivity as well as the antitumor cytolytic potential and activity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.

## The transcriptome of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is significantly modified upon TGF- $\beta$ exposure

To check whether inhibition of the antitumor V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells reactivity induced by TGF- $\beta$  could also be linked to transcriptome modifications, comparative DGE-seq analyses from bulk RNA-seq data have been performed. RNA samples were prepared from PBL-derived V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells exposed, or not, for 3 days to TGF- $\beta$  *in vitro*. Exploratory analyses were performed on more than 10.000 genes across the samples. Multiple differentially expressed genes were found between TGF- $\beta$ -treated and -untreated groups (**Figure 3A**). Interestingly, MA plot analysis, which represents log fold-change versus mean expression of genes between TGF- $\beta$  treated and non-treated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, shows that well-expressed down-regulated genes mainly encode for surface-bound receptors such as NCR3/NKP30 or inflammatory factors such as CCL3/MIP1- $\alpha$ , LT (lymphotoxin) A/TNF- $\beta$ , LTB/TNF-C. Conversely, these analyses did not evidence strong a up-regulation of well-expressed genes following TGF- $\beta$  exposure. As confirmed by functional heat maps (**Figure 3B**), the expression of several genes related to either transcription, activation or metabolic functions was significantly affected (up-regulation, *red*; down-regulation, *blue*) upon TGF- $\beta$  exposure. This cytokine diminished the expression levels of important genes related to effector functions such as CD40LG or CXCR6 described to regulate tissue trafficking of T lymphocytes (**Figure 3C**).

These analyses show that the TGF- $\beta$  induces the establishment of a particular transcriptional program in exposed V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells which could be distinguished from regulatory or exhausted T cell signatures<sup>17</sup>.

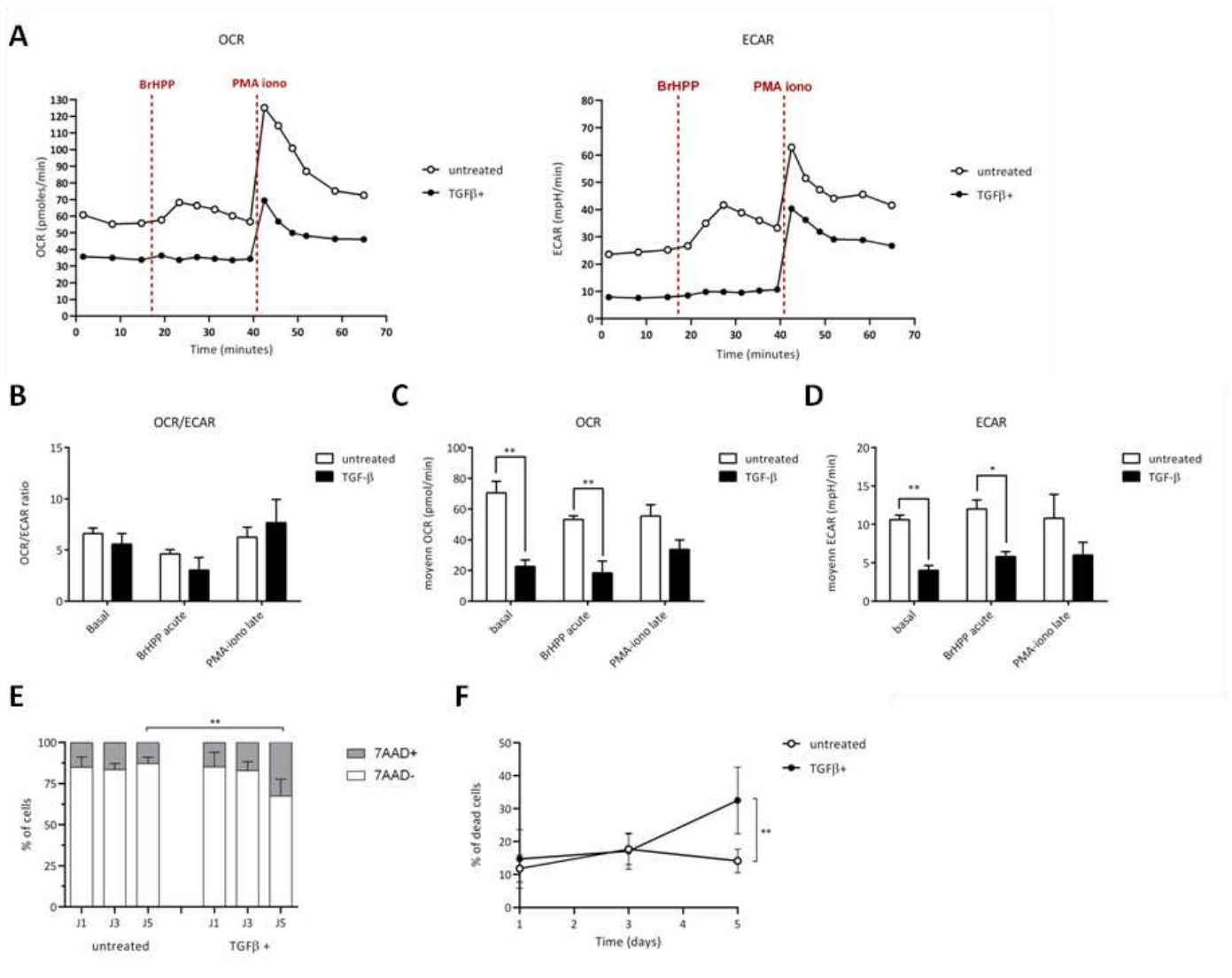




**Figure 3: TGF- $\beta$  exposure impacts the transcriptome of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** Human PBL-expanded V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were pretreated, or not, with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 3 days prior to RNA extraction. Comparative DGE-seq analysis was performed on bulk RNA-seq samples and data were analyzed using R software. MA plot (A) and heat maps (B) and (C) representing genes (indicated functions) that have been retrieved as differentially expressed following TGF- $\beta$  exposure (+) or not (-). Colored scale, fold change expression. *Down*, down-regulated genes (*blue*); *Up*, upregulated genes (*red*).

### **TGF- $\beta$ alters the metabolic functions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells**

A growing number of studies shows that TME can alter the functions of infiltrating T cell effectors by affecting their metabolic activity<sup>18,19</sup>. To further investigate the existence of similar effects induced upon TGF- $\beta$  exposure of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells which was suggested by our transcriptome analyses, the energy metabolism was measured and compared in different conditions through real-time live cell analysis using Seahorse Extracellular Flux analyzer that enables direct quantification of mitochondrial respiration and glycolysis.  $\gamma\delta$  T cells were monitored at a resting state and after specific antigenic (BrHPP) or non-specific (PMA+ionomycin) activations (**Figure 4**). In resting conditions, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells exposed to TGF- $\beta$  (*closed symbols*) showed a weaker oxygen consumption (OCR, *oxygen consumption rate*) and media acidification rate (ECAR, *extracellular acidification rate*), as compared to their untreated counterparts. As expected, both specific and non-specific activations increased ECAR and OCR levels of control V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (*untreated*). However, a strong specific antigenic activation (BrHPP, 3  $\mu$ M) of TGF- $\beta$ -exposed V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells induced barely detectable, if any, increase of ECAR or OCR metabolic activities. Moreover, upon exposure to TGF- $\beta$ , OCR and ECAR levels were significantly lower in V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, as compared to untreated  $\gamma\delta$  T lymphocytes. Non-specific activation increased these metabolic levels without reducing these differences between these exposure conditions. Taken together, these results show that TGF- $\beta$ , which is produced in various TME of solid tumors, strongly impairs the metabolism of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by both reducing their mitochondrial respiration and their glycolytic activity which are key parameters for antitumor functions<sup>20</sup>.



**Figure 4. TGF- $\beta$  alters the metabolism of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.** V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were pretreated (closed symbols) or not (open symbols) with TGF- $\beta$  (10 ng/mL) for 3 days. Metabolic activities of T lymphocytes were measured using Seahorse XF8. **(A-D)** Detection of mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were performed at resting state, after BrHPP stimulation or PMA-ionomycin injection as described in the Materials and Methods Section. Rates were calculated as follows: difference between the mean of the 3 values in the absence of substrate and the mean of the 4 values after injection of the substrate, as well as a ratio of the 2 for each condition **(B)**. **(E)** and **(F)** Cell death induced by TGF- $\beta$  added within the media of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells was measured by measuring fluorescent non-viable cells following 7-AAD staining after the indicated dead culture timepoints days of culture. n=6, mean  $\pm$  SD. Mann-Whitney \*p<0,05 ; \*\*p<0,01

## Discussion

Our results indicate that TGF- $\beta$ , whose transcription is detected at high levels in brain tumors with a poor prognosis, interferes with the antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells *in vitro*. Importantly, they show that this tumor-produced regulatory cytokine strongly impairs their antitumor cytolytic reactivity, through multiple phenotypic, transcriptomic changes as well as metabolic alterations.

Regarding tumor surveillance, the immune system orchestrates with broad molecular and cellular networks for sensing and eliminating tumor cells. Numerous studies focused on innate-like T cell subsets including  $\gamma\delta$  T cells, and particularly on non-alloreactive peripheral human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells which represent promising effector candidates for designing novel immunotherapies. The implication of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in antitumor immune response is supported by the identification of tumor-infiltrated  $\gamma\delta$  T cells, which might be considered as a prognosis tool for some oncological indications<sup>21,22</sup>. However, the clinical efficacy of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-based therapies is still disappointing. Although their conserved and MHC-independent specificity is expected to overcome issues related to antigen presentation and recognition, their efficacy against solid tumors remains limited and hampered by various immunological, biochemical and tumor-linked constraints. Once T cells have successfully reached and infiltrated the tumors, they need to evolve within a strong immunoregulatory environment that aims at both taming their antitumor functions and promoting tumor development.

The TME is a complex network constituted by cancer-associated fibroblasts, myofibroblasts, extracellular matrix, immune/inflammatory cells, blood, and vascular networks as well as signaling components including cytokines, chemokines and growth factors. Previous studies have shown the particular sensitivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to two TME-produced immunosuppressive factors: PGE2 and TGF- $\beta$ <sup>23,24</sup>. PGE2 potently suppresses the proliferation, cytokine production, and cytotoxic capacity of  $\gamma\delta$  T cells. TGF- $\beta$ , a secreted dimeric multifunctional cytokine that signals via specific receptors on plasma membranes, contributes to cancer progression by its ability to promote epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells, angiogenesis, and immune evasion<sup>25</sup>. Our results show that TGF- $\beta$  exposure severely impacts the cytolytic activity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Interestingly, this inhibition was durable *in vitro* (up to 3 days) and reversible in the absence of the cytokine. TGF- $\beta$  exposure reduces the expression of lytic molecules (e.g. perforin, granzyme B), as well as surface molecules mediating this antitumor reactivity such as NKG2D. NKG2D has been extensively described as a key receptor for sustaining the reactivity of some lymphoid subsets, including human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, against several tumor cells. Supporting this observation, we previously evidenced the major role played by NKG2D for the elimination of human mesenchymal GBM tumor cells by allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells<sup>16</sup> which can infiltrate GBM<sup>26</sup>. Therefore, in such pathological contexts, one could expect that NKG2D-controlled antitumor T cell reactivities would be altered by TGF- $\beta$  whose transcription is elevated in brain tumors<sup>27,28</sup>.

Some studies have reported opposite effects of this cytokine in which the antitumor activity of TGF- $\beta$ -conditioned V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is potentiated and could be used for improving their efficacy in adoptive transfer therapies<sup>29,30</sup>. These results highlight the complex pleiotropic effects of some regulatory cytokines on effector T cells, according to the context of exposure (e.g. sensitization of resting T cells *vs* conditioning for amplification) which might introduce several different parameters such as the cellular environment, the kinetics as well as the differentiation status/plasticity of T cells. As indicated here, TGF- $\beta$  does not only directly inhibit the antitumor reactivity of infiltrated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells but can also induce specific modifications of their transcriptional program and phenotype. Comparative RNA-seq analysis performed on resting V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells exposed to TGF- $\beta$ , did not show any polarization towards Th17 (e.g. STAT3, IL-22), Th9 (e.g. IRF4, IL-9) or regulatory (e.g. FoxP3) functional profiles. The lack of TGF- $\beta$ -induced regulatory functions was also confirmed in T cell proliferation assays *in vitro* (CR & ES, data not shown). TGF- $\beta$  exposure affects the expression of genes either implicated in lymphocyte activation processes (down-regulation) or particular metabolic pathways, such as pyrimidine and cytidine catabolism (up-regulation). Both glycolysis and mitochondrial respiration, which are key metabolic anti-tumor effector pathways<sup>31</sup> are strongly abated upon cytokine exposure. This plunges TGF- $\beta$ -exposed V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in a hypoxia-*like*-induced state through raising their activation threshold, thus leading to a dramatic reduced reactivity against tumor cells.

Altogether, these results indicate that TGF- $\beta$ , a cytokine that is frequently and massively produced in the TME of several solid tumors, can act as a potent taming cytokine on resting PBL-expanded human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, at different levels. It does not only directly target the key NKG2D axis, to inhibit the antitumor cytolytic activity but also affects their transcriptional and metabolic program to reduce their functional activity. This should be taken in account for designing improved V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-based cancer immunotherapies, by proposing genome editing technologies (e.g. CRISPR-Cas9) for preparing engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells that can effectively counter tumor escape promoted by TME-derived factors<sup>32</sup>.

### **Acknowledgments**

We thank the staff of the Cytometry Facility (Cytocell) from Nantes for their technical assistance, B. Navet and the BIRD facility for expert bioinformatic assistance.

### **Disclosure of interest statement**

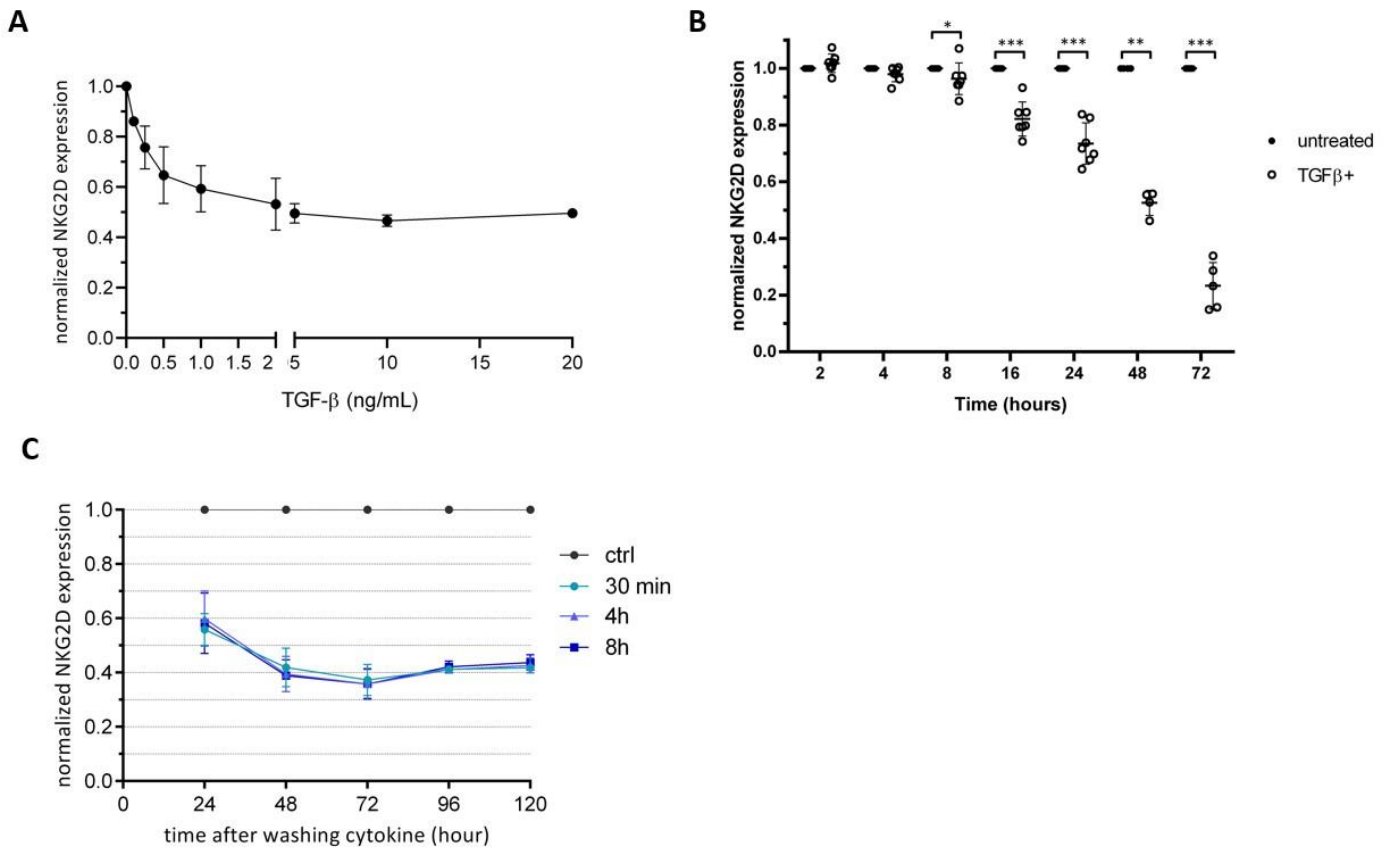
The authors report there are no competing interests to declare.

## References

1. Chien Y, Meyer C, Bonneville M.  $\gamma\delta$  T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:121–155. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120216
2. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):88–100. doi:10.1038/nri3384
3. Boutin L, Scotet E. Towards Deciphering the Hidden Mechanisms That Contribute to the Antigenic Activation Process of Human  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells. *Front. Immunol.* 2018;9:828. doi:10.3389/fimmu.2018.00828
4. Herrmann T, Karunakaran MM, Fichtner AS. A glance over the fence: Using phylogeny and species comparison for a better understanding of antigen recognition by human  $\gamma\delta$  T-cells. *Immunol Rev.* 2020;298(1):218–236. doi:10.1111/imr.12919
5. Herrmann T, Karunakaran MM. Butyrophilins:  $\gamma\delta$  T Cell Receptor Ligands, Immunomodulators and More. *Front Immunol.* 2022;13:876493. doi:10.3389/fimmu.2022.876493
6. Gober H-J, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med.* 2003;197(2):163–168. doi:10.1084/jem.20021500
7. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder M-C, Allain-Maillet S, Fournié J-J, Scotet E, Bonneville M. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev.* 2007;215:123–135. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00468.x
8. Silva-Santos B, Serre K, Norell H.  $\gamma\delta$  T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(11):683–691. doi:10.1038/nri3904
9. Sebestyen Z, Prinz I, Déchanet-Merville J, Silva-Santos B, Kuball J. Translating gammadelta ( $\gamma\delta$ ) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(3):169–184. doi:10.1038/s41573-019-0038-z
10. Chabab G, Barjon C, Bonnefoy N, Lafont V. Pro-tumor  $\gamma\delta$  T Cells in Human Cancer: Polarization, Mechanisms of Action, and Implications for Therapy. *Front Immunol.* 2020;11:2186. doi:10.3389/fimmu.2020.02186
11. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB.  $\gamma\delta$  T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(7):392–404. doi:10.1038/s41568-019-0153-5
12. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(8):554–567. doi:10.1038/nri2808
13. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019;50(4):924–940. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.024

14. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(Web Server issue):W98–W102. doi:10.1093/nar/gkx247
15. Jarry U, Chauvin C, Joalland N, Léger A, Minault S, Robard M, Bonneville M, Oliver L, Vallette FM, Vié H, et al. Stereotaxic administrations of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors. *OncoImmunology.* 2016;5(6):e1168554. doi:10.1080/2162402X.2016.1168554
16. Chauvin C, Joalland N, Perroteau J, Jarry U, Lafrance L, Willem C, Retière C, Oliver L, Gratas C, Gautreau-Rolland L, et al. NKG2D Controls Natural Reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Lymphocytes against Mesenchymal Glioblastoma Cells. *Clinical Cancer Research.* 2019;25(23):7218–7228. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0375
17. Winkler F, Bengsch B. Use of Mass Cytometry to Profile Human T Cell Exhaustion. *Frontiers in Immunology.* 2020;10.
18. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell.* 2017;168(4):657–669. doi:10.1016/j.cell.2016.12.039
19. Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab.* 2017;26(1):49–70. doi:10.1016/j.cmet.2017.06.004
20. Madden MZ, Rathmell JC. The Complex Integration of T-cell Metabolism and Immunotherapy. *Cancer Discov.* 2021;11(7):1636–1643. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0569
21. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, Nair VS, Xu Y, Khuong A, Hoang CD, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med.* 2015;21(8):938–945. doi:10.1038/nm.3909
22. Tosolini M, Pont F, Poupot M, Vergez F, Nicolau-Travers M-L, Vermijlen D, Sarry J-E, Dieli F, Fournié J-J. Assessment of tumor-infiltrating TCRV $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology.* 2017;6(3):e1284723. doi:10.1080/2162402X.2017.1284723
23. Martinet L, Jean C, Dietrich G, Fournié J-J, Poupot R. PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(6):838–845. doi:10.1016/j.bcp.2010.05.002
24. Capietto A-H, Martinet L, Cendron D, Fruchon S, Pont F, Fournié J-J. Phosphoantigens overcome human TCRV $\gamma$ 9 $\delta$ 2  $\gamma\delta$  Cell immunosuppression by TGF-beta: relevance for cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2010;184(12):6680–6687. doi:10.4049/jimmunol.1000681
25. Tauriello DVF, Sancho E, Batlle E. Overcoming TGF $\beta$ -mediated immune evasion in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2022;22(1):25–44. doi:10.1038/s41568-021-00413-6

26. Lee M, Park C, Woo J, Kim J, Kho I, Nam D-H, Park W-Y, Kim Y-S, Kong D-S, Lee HW, et al. Preferential Infiltration of Unique V $\gamma$ 9J $\gamma$ 2-V $\delta$ 2 T Cells Into Glioblastoma Multiforme. *Front Immunol.* 2019;10:555. doi:10.3389/fimmu.2019.00555
27. Birch JL, Coull BJ, Spender LC, Watt C, Willison A, Syed N, Chalmers AJ, Hossain-Ibrahim MK, Inman GJ. Multifaceted transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ) signalling in glioblastoma. *Cell Signal.* 2020;72:109638. doi:10.1016/j.cellsig.2020.109638
28. Gong L, Ji L, Xu D, Wang J, Zou J. TGF- $\beta$  links glycolysis and immunosuppression in glioblastoma. *Histol Histopathol.* 2021;36(11):1111–1124. doi:10.14670/HH-18-366
29. Peters C, Meyer A, Kouakanou L, Feder J, Schricker T, Lettau M, Janssen O, Wesch D, Kabelitz D. TGF- $\beta$  enhances the cytotoxic activity of V $\delta$ 2 T cells. *Oncoimmunology.* 2019;8(1):e1522471. doi:10.1080/2162402X.2018.1522471
30. Beatson RE, Parente-Pereira AC, Halim L, Cozzetto D, Hull C, Whilding LM, Martinez O, Taylor CA, Obajdin J, Luu Hoang KN, et al. TGF- $\beta$ 1 potentiates V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell adoptive immunotherapy of cancer. *Cell Rep Med.* 2021;2(12):100473. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100473
31. Rangel Rivera GO, Knochelmann HM, Dwyer CJ, Smith AS, Wyatt MM, Rivera-Reyes AM, Thaxton JE, Paulos CM. Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* 2021;12.
32. Freen-van Heeren JJ. Using CRISPR to enhance T cell effector function for therapeutic applications. *Cytokine X.* 2021;3(1):100049. doi:10.1016/j.cyttox.2020.100049



**Supplemental Figure S1. (A)** Normalized expression of NKG2D measured by flow cytometry at the surface of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells incubated for 3 days with indicated increasing doses of recombinant human TGF- $\beta$ . **(B)** Kinetics of expression of NKG2D expressed at the surface of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells at different time-points, following addition of TGF- $\beta$  (10 ng/mL). Cell surface stainings were measured by flow cytometry. **(C)** NKG2D expression at the surface of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells incubated with recombinant human TGF- $\beta$  (10 ng/mL) at the indicated time-points (ctrl, negative control). NKG2D expression levels were next measured and normalized, at the indicated time-points after washing the cells. n>5 Mann-Whitney tests \*p<0.05; \*\*p<0.01.



## B) Equiper les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 pour renforcer leurs fonctions face aux tumeurs solides

Comme mentionné précédemment, les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 présentent de grandes fonctions antitumorales. Cependant, ces dernières ont du mal à être exploitées pleinement une fois les LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 arrivés au site tumoral. Il convient alors de se souvenir qu'il s'agit d'une population circulante et non résidente de tissu. Ainsi, bien que cette population agisse comme une sentinelle, une fois le lieu de la tumeur atteint, cette dernière ne survit probablement pas longtemps ou n'est pas en mesure de développer son plein potentiel. De ce fait, proposer de nouvelles modifications *in vitro* semble nécessaire pour faciliter l'action des LT V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.



## INVITED REVIEW

# Beyond CAR T cells: Engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to fight solid tumors

Chirine Rafia<sup>1,2,3</sup> | Christelle Harly<sup>1,2</sup> | Emmanuel Scotet<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>INSERM, CNRS, CRCINA, Université de Nantes, Nantes, France<sup>2</sup>LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France<sup>3</sup>ImCheck Therapeutics, Marseille, France**Correspondence**

Christelle Harly and Emmanuel Scotet, INSERM UMR1232 &amp; CNRS ERL6001, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, IRS\_UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 1, France.

Emails: christelle.harly@inserm.fr; Emmanuel.Scotet@inserm.fr

**Funding information**

Association pour la Recherche contre le Cancer, Grant/Award Number: PJA 20191209404; Ligue Contre le Cancer, Grant/Award Number: AOGO2019; IMCHECK THERAPEUTICS; Association pour la Recherche sur le Cancer, Grant/Award Number: PJA20191209404; Fondation pour la Recherche Médicale, Grant/Award Number: FRM DEQ20170839118

**Abstract**

Despite recent significant progress in cancer immunotherapies based on adoptive cell transfer(s)(ACT), the eradication of cancers still represents a major clinical challenge. In particular, the efficacy of current ACT-based therapies against solid tumors is dramatically reduced by physical barriers that prevent tumor infiltration of adoptively transferred effectors, and the tumor environment that suppress their anti-tumor functions. Novel immunotherapeutic strategies are thus needed to circumvent these issues. Human peripheral blood V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, a non-alloreactive innate-like T lymphocyte subset, recently proved to be a promising anti-tumor effector subset for ACT-based immunotherapies. Furthermore, new cell engineering tools that leverage the potential of CRISPR/Cas technology open astounding opportunities to optimize their anti-tumor effector functions. In this review, we present the current ACT strategies based on engineered T cells and their limitations. We then discuss the potential of engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell to overcome these limitations and improve ACT-based cancer immunotherapies.

**KEYWORDS**ACT, CAR T cells, CRISPR, engineering, solid tumor, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

## 1 | INTRODUCTION

Cancer, a general term used to describe a large group of life-threatening malignancies, represented the second leading cause of death in the world in 2018, according to the World Health Organization. Cancer cells can establish and develop in almost any organ or tissue of every individual. Solid tumors, which represent more than 90% of adult cancers, correspond to masses of cancer cells deeply enmeshed with tissues of origin (eg, lung, breast, prostate, colon, bladder). Liquid tumors such as lymphomas and leukemias develop in body fluids (eg, blood). Physiologically speaking, abnormal cells with somatic mutations and aberrant/dysregulated pathways grow

uncontrollably, destroy adjacent tissues, and eventually spread into other organs.<sup>1</sup> Because of the difficulty to establish diagnosis at early stages, cancer eradication is very challenging. Standard treatments to cure cancer are based on chemotherapy or radiotherapy, but their poor specificity for cancer cells induces a substantial toxicity. Furthermore, because of inter-individual variability and tumor heterogeneity, the outcomes of these treatments are often unpredictable.

A major recent advance of biomedical research is a better understanding of key roles played by the immune system in tumor surveillance, and the mechanisms developed by tumor cells to evade this surveillance and hack immune pathways to promote tumorigenesis.<sup>2</sup> Accordingly, novel strategies have emerged over the last decades that aim at enhancing, complementing, or restoring the ability of patient's immunity to generate specific and efficient responses,

This article is part of a series of reviews covering  $\gamma\delta$  T cells appearing in Volume 298 of *Immunological Reviews*.

by overcoming evading strategies established by tumors. The most widely proposed strategies include immune checkpoint blockades, cancer vaccines, cytokine administrations, and adoptive cell transfers (ACT).<sup>3-5</sup> These strategies have been used in clinical trials across a broad range of cancers, and gave some encouraging results. However, a significant number of patients still do not efficiently respond to these treatments, and many of them even experience immune-related adverse events. Improved or novel strategies that take advantage of beneficial effects of immune cells while alleviating their potentially deleterious effects are thus urgently needed.

T cell-based ACT constitutes an important therapeutic line to treat advanced and metastatic cancers that become resistant to conventional therapies. This approach is particularly promising given the potential of T cells to specifically target tumors. This strategy involves intravenous administration(s) of autologous or allogeneic tumor-specific T cytotoxic cells, whose primary objective is to detect and eradicate tumor cells. Adoptively transferred T cells can be engineered to improve their direct anti-tumor function by increasing their recognition of the tumors, their trafficking to the tumor site, and their resistance to the suppressing effect of the tumor micro-environment.<sup>5-8</sup> Moreover, adoptively transferred T cells can be engineered as "armored" T cells, to harness the endogenous immune system in mounting an effective anti-tumor response, generally through local delivery of molecules within the tumor.<sup>9</sup>

In this review, we present the current T cell-based ACT strategies, their limitations, and the solutions currently proposed to circumvent these limitations through genetic engineering of adoptively transferred T cells. In particular, we discuss the unique functional features of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, a promising immune effector subset that can circumvent some of the key issues encountered by T cell effectors currently used in ATC strategies, and is newly targeted in some cancer therapies. Finally, we propose some strategies based on complex engineering of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, to overcome the remaining limitations and improve cancer immunotherapies.

## 2 | TUMOR-SPECIFIC EFFECTORS FOR CANCER IMMUNOTHERAPIES

### 2.1 | Tumor antigens

A major challenge in the design of T cell-based ACT strategies is to identify antigens expressed by tumor cells that could be targeted by adoptively transferred T cells.<sup>10</sup> Tumor antigens can be classified into two main groups: (a) tumor-specific antigens that are expressed exclusively on tumor cells (eg, neoantigens), and can arise from mutations, aberrant post-translational modifications, altered antigen processing or presentation, or other processes; (b) tumor-associated antigens that are expressed at low levels on normal tissues but are overexpressed on tumor cells.<sup>10</sup> The targeting of tumor-specific antigens by adoptively transferred T cells is expected to achieve the most specific and significant efficacy, but their elevated individual specificity reduces the clinical scope of this strategy. On the other

hand, tumor-associated antigens are often shared between patients. However, low level of expression of tumor-associated antigens by normal tissues can result in significant toxicities due to targeting of normal tissues,<sup>11-13</sup> which can have catastrophic effects such as the cytokine release syndrome<sup>14,15</sup> and encephalopathy syndrome.<sup>16</sup> The discovery of new tumor-associated antigens using novel large-scale screening approaches might help design more efficient and safer T cell-based ACT strategies in the future.<sup>10</sup>

Importantly, the efficacy of T cell-based ACT strategies critically depends on the high expression of the targeted antigen(s) by tumor cells. However, expression of tumor antigens can be variegated, and tumor cells often experience antigen downregulation or loss following treatment by antigen-specific T cells, leading to immune evasion and cancer relapse.<sup>17,18</sup> This is particularly problematic for solid tumors, which are highly heterogeneous, and particularly prone to mutations and selection of antigen-negative variants.<sup>19,20</sup> To mitigate these issues and improve the safety and efficacy of T cell-based ACT, combinations of tumor-associated antigens can be targeted by adoptively transferred T cells, either using multiple anti-tumor effectors,<sup>21,22</sup> or effectors engineered with multiple tumor-specific receptors (NCT03241940)<sup>23</sup> or multispecific receptors (eg, bivalent or trivalent chimeric antigen receptors)<sup>24-27</sup> For a review, see Ref. 28.

### 2.2 | Tumor cell targeting by natural and engineered conventional T lymphocyte effectors

Most current ACT strategies aim to target tumor cells by using conventional  $\alpha\beta$  T lymphocytes. These cells are either natural tumor-specific (ie, isolation from tumor tissues or tumor-draining lymph nodes) or effectors engineered with tumor-specific receptor T cells, either natural TCR<sup>29</sup> or chimeric antigen receptors (CAR).<sup>30</sup> Although the use of natural tumor-specific T cells has demonstrated some success, it remains a highly personalized and cost-ineffective therapy. Manufacturing autologous T cells engineered with tumor-specific receptors could represent a more streamlined alternative strategy.<sup>31</sup>

Most CAR constructions combine selected tumor antigen-binding ectodomains from antibodies linked to various intracellular signaling domains (eg, CD3), which enables the recognition and killing of tumor cells in an MHC-independent and antibody-like manner. Alternatively, CAR can be engineered using TCR recognition domains to target tumor antigens.<sup>32</sup> The MHC-independent recognition of tumor antigens by traditional CAR confers key advantages to CAR T cell-based immunotherapeutic strategies over strategies based on TCR. CAR can be designed and used independently of MHC restrictions; thus, CAR T cells whose endogenous TCR and MHC-I molecules have been ablated to prevent, respectively, graft versus host disease and graft rejection can be used as an "off-the-shelf" therapeutic product (NCT03166878).<sup>33</sup> Furthermore, CAR-mediated tumor recognition bypasses MHC downregulation by tumor cells, a common mechanism used by tumors to escape detection by T cells. Finally, whereas strategies based on TCR rely on the existence of natural anti-tumor reactivities and thus might depend on tumor

immunogenicity, strategies based on CAR are applicable to virtually any tumor antigen. One major downside of CAR-mediated tumor recognition is that native tumor antigens have to be expressed at the cell surface in order to engage CAR. However, only about 1% of total cellular proteins are actually expressed on the cell surface; thus, a huge number of potential tumor antigens are not detected by CAR T cells. On the other hand, TCR expressed by conventional CD8<sup>+</sup> T cells recognize peptides presented by MHC class I molecules, which reflect the whole protein content of a cell, both from the cell surface and from the cytosol. In addition, important issues such as CAR degradation upon engagement,<sup>34-36</sup> suboptimal CAR signaling,<sup>37</sup> or tonic CAR signaling that lead to T cell dysfunction<sup>38</sup> still limit the anti-tumor function of CAR T cells, as well as their expansion and persistence. Nonetheless, ACT based on CAR T cells targeting the pan-B-cell marker CD19 have shown unprecedented response rates in treating refractory B cell malignancy,<sup>12,13,39,40</sup> although less than 50% of patients achieve long-term disease control.<sup>13,39</sup> Continuous and rapid improvements in the design of CAR should improve anti-tumor function of CAR T cells in vivo in a close future.

Although T cell- and in particular CAR T cell-based ACT approaches represent promising strategies against cancers, the application of these strategies is currently limited to a small number of malignancies for which antigens are well characterized. Furthermore, despite unprecedented success in some B-cell malignancy, many cancer patients that receive ACT based on conventional T cells fail to achieve complete responses, suffer frequent relapses, or develop potentially life-threatening toxicities. Novel and broadly applicable strategies are thus urgently needed to improve the efficacy and specificity of tumor targeting by T cells used in ACT. Finally, the efficacy of current T cell-based ACT therapies against solid tumors remains severely impaired, and most patients with solid tumors show no significant benefit from CAR T cell therapy.<sup>41,42</sup> Additional improvements are thus needed to tackle issues such as T cell trafficking to the tumor, long-term persistence, and maintenance of anti-tumor function, in order to achieve tumor eradication.

### 2.3 | Tumor cell sensing and elimination by human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells

The immune system orchestrates with broad complementary molecular and cellular networks, which act to sense and eliminate exogenous and endogenous threats (eg, infections, cancers). An increasing number of studies focus on a particular class of T lymphocytes that share phenotypical and functional characteristics with both innate and adaptive immune systems. These cells have been identified as "transitional immunity," "unconventional," or "innate-like" T cell effectors. The best described cell subsets falling at this interface are invariant natural killer T (iNKT), mucosal-associated invariant T (MAIT), and  $\gamma\delta$  T cells, which express a heterodimeric TCR composed of  $\gamma$  and  $\delta$  chains associated with the CD3 signaling complex.<sup>43,44</sup>

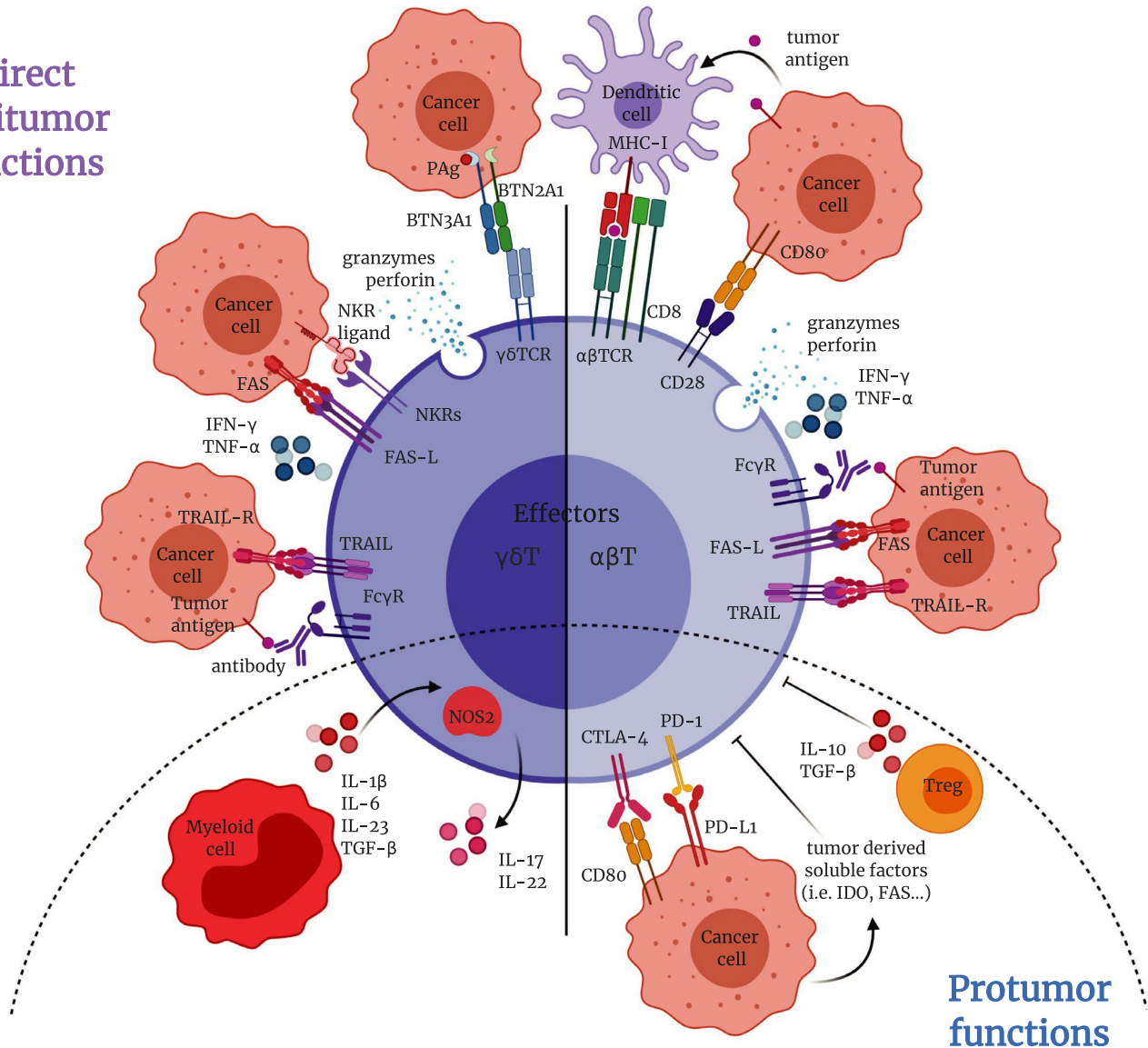
In humans,  $\gamma\delta$  T cells are distributed into four main subsets, identified according to the expression of TCR  $\delta$  chain variable segments,

V $\delta$ 1<sup>+</sup>, V $\delta$ 2<sup>+</sup>, V $\delta$ 3<sup>+</sup>, and V $\delta$ 5<sup>+</sup> populations. Following thymic selection, most  $\gamma\delta$  T cells emigrate with a preferential tropism for particular tissues/organs, through yet unclear mechanisms. As a typical example, human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells<sup>45</sup> preferentially colonize the peripheral blood and represent about 5%-10% of the peripheral CD3<sup>+</sup> and 80% of  $\gamma\delta$  T lymphocytes of healthy adults. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, which embody prototypical immune sensors of cellular stress, are activated under various pathological contexts including infections and cancers.<sup>43</sup> The antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is contact- and TCR-dependent. It is important to note that this antigenic activation is not restricted by conventional MHC class I or II molecules. This key feature minimizes the risk of any alloreactive incident during allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell therapies (eg, graft versus host disease). The antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is based on the sensing of expression of small phosphorylated carbohydrate metabolites named phosphoantigens (PAg). These compounds (eg, isopentenyl pyrophosphate) are produced by endogenous (MEV mammalian mevalonate) or exogenous (MEP microbial) pathways, and their expression levels are frequently altered in particular pathological situations such as cancer. Accordingly, pharmacological compounds that either inhibit the synthesis (ie, statins) or the degradation (ie, aminobisphosphonates, alkylamines) of PAg in mammalian cells can respectively block, or induce, the antigenic activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.<sup>46</sup> Recent studies showed the contribution of BTN2/3 butyrophilins (BTN) expressed by target cells in this process.<sup>47-50</sup> Importantly, the self-reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is carefully controlled by different pathways such as adhesion molecules (eg, CD54), and activating (eg, NKG2D) or inhibiting (eg, CD94/NKG2A) natural killer cell receptors. Numerous V $\delta$ 2 T cell dysfunctions in cancer indications (eg, hyporeactivity, exhaustion) are associated with altered expression profiles of these molecules by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T or target cells.<sup>51</sup> Following this exquisite sensing process, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells rapidly deliver strong functional responses including cytotoxicity implicating several distinct cell death-inducing pathways (eg, granzyme B/perforin, TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), and Fas-FasL), and pro-inflammatory Th1 cytokine (eg, TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$ , IFN (interferon)- $\gamma$ ) release. Such key anti-tumor functions make human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells the most promising effector subset, as compared to conventional lymphocytes, for designing novel cancer immunotherapies (Figure 1).<sup>52,53</sup>

A set of compelling in vitro studies evidence a natural reactivity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against a broad range of human tumor cell lines and normal cells infected by viruses, parasites, and bacteria.<sup>54</sup> The range of tumor cell lines detected by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, initially restricted to liquid tumors (eg, hematopoietic tumors), was next extended to several solid tumors (eg, renal and colon carcinomas). This landscape was further modified by the identification of aminobisphosphonates (eg, pamidronate, zoledronate), synthetic PAg (eg, BrHPP, BromoHydrin PyroPhosphate), and anti-CD277 (BTN3A) agonist antibodies that help sensitizing a broad variety of cells to V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell reactivity.<sup>47,55,56</sup>

The unique combination of phenotypic and functional features of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (summarized below), which are only partially shared by other immune cell subsets, makes them ideal effector cells for cancer immunotherapies:

Direct antitumor functions



**FIGURE 1** Compared anti-tumor functions of effector  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells. Both  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells display direct and indirect anti-tumor functions (not represented here). They mainly diverge in the mode of TCR/CD3-driven antigenic activation induced by tumor cells. While conventional  $\alpha\beta$  T cells detect tumor-peptide antigens tumor presented by restricting MHC class I/II molecules,  $\gamma\delta$  T cells can directly sense and recognize tumor cells expressing a wide range of antigenic structures, conserved or not, from diverse origins (eg, proteins, lipids, carbohydrates). These two subsets can mediate cell killing using mandatory TCR-induced signals and shared pathways, such as FAS/TRAIL and granule exocytosis pathways (eg, perforin/granzyme). These effector cells can also target tumor cells through antibody-dependent cellular cytotoxicity upon treatment with tumor-specific antibodies. (BTN: butyrophilin; PAg: phosphoantigen; TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)

1. Inter-individual conservation and high frequency in the peripheral blood of human adults;
2. Antigenic specificity directed against cell stress-associated molecules whose expression is frequently dysregulated in cancer cells;
3. Clinical-grade synthetic agonist molecules, such as aminobisphosphonates and PAg, that specifically induce activation, expansion, and sensitization of human tumor cells;
4. Easy handling and elevated in/ex vivo expansion index
5. Absence of alloreactivity (no MHC class I/ II restriction);
6. Capacity to reach and infiltrate tumors;

7. "Swiss army knife functions" such as direct and indirect cytotoxic activities against tumor cells, through the secretion of lytic molecules and cytokines.

**2.4 | Successes and pitfalls of  $V\gamma 9V\delta 2$  T cell-based cancer immunotherapies**

Active immunotherapies involve setting immune responses in cancer patients to fight tumor cells. In passive immunotherapies, immune molecules are given to patients who do not produce them on

their own (for a recent review on current  $\gamma\delta$  T cell-based ACT clinical trials, see Ref. 57).

### 2.4.1 | Active immunotherapies

Several strategies were developed to activate V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in vivo by administering specific clinical-grade agonist molecules, such as PAg, aminobisphosphonates, or anti-CD277 agonist antibody (EVICTION Trial: NCT04243499, ImCheck Therapeutics), together with pro-proliferating cytokines (eg, IL-2, IL-15).<sup>58</sup> Following initial encouraging studies, various clinical assays have been conducted in cancer patients (eg, renal cell carcinoma, bone metastases deriving from breast or prostate cancers), which demonstrated some therapeutic responses, such as stabilized diseases and even partial remissions for some patients.<sup>59-62</sup> Importantly, the majority of treated patients in these trials experienced mild side effects (ie, flu-like syndrome), likely induced by IL-2, thus highlighting the reduced toxicity and the safety of these strategies. Some studies, including assays in monkeys, also pointed out potential issues such as the progressive exhaustion of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (ie, tachyphylaxis), which could be imputed to altered immune status or inappropriate activation contexts.<sup>63</sup>

### 2.4.2 | Passive immunotherapies

Passive immunotherapies, which are based on ex vivo expansions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell from peripheral blood and cell transfer(s), have been tested in solid and liquid cancer indications (eg, renal carcinoma, hematological diseases) with a reduced toxicity but modest therapeutic efficacy.<sup>64</sup> It should be underlined that these studies used autologous V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. Alternatively, new clinical trials are using adoptive transfer of expanded allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, which are devoid of any alloreactive potential. This approach is tested in lung cancer patients (NCT03183232). Furthermore, a case report of a patient with a stage IV cholangiocarcinoma showing recurrent mediastinal lymph node metastasis after liver transplantation was published.<sup>65</sup> After receiving consecutive infusions of allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expanded from the peripheral blood of a healthy donor, this patient showed significant tumor regression without evident toxicity.

Possible reasons for the suboptimal anti-tumor efficacy of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-based ACT include the following:

- suboptimal therapeutic indication and injection routes (eg, cancer/stage, therapeutic window, systemic vs localized injections), which can induce anergy, cell death, weak activations, and/or an incorrect addressing of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells;
- reduced reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against fresh tumors, particularly in vivo due to a reduced expression of adhesion molecules or antigen components;
- strong immunomodulatory regulation exercised by cellular and/or molecular TME components (eg, stromal cells, cytokines).

Importantly, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell and the unique tumor cell detection system conferred by their TCR can be incorporated into existing ACT strategies. The expression of selected wildtype or engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR has been set up in conventional  $\alpha\beta$  T lymphocytes by using retroviral transduction approaches.<sup>66</sup> The clinical-grade production of these engineered effectors was recently validated and is currently being tested in patients with leukemia or multiple myeloma. The reverse strategy is also underway to determine the high therapeutic interest of arming  $\gamma\delta$  T cells with CAR.<sup>67-70</sup> Those new approaches could provide a novel way to safely use allogeneic CAR and target transformed cells with low antigen density, which may be ignored by standard CAR T cells.<sup>28</sup> Finally, natural or engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells can be used in combination with natural or engineered conventional T cells to improve the safety and efficacy of T cell-based ACT.<sup>21,22</sup>

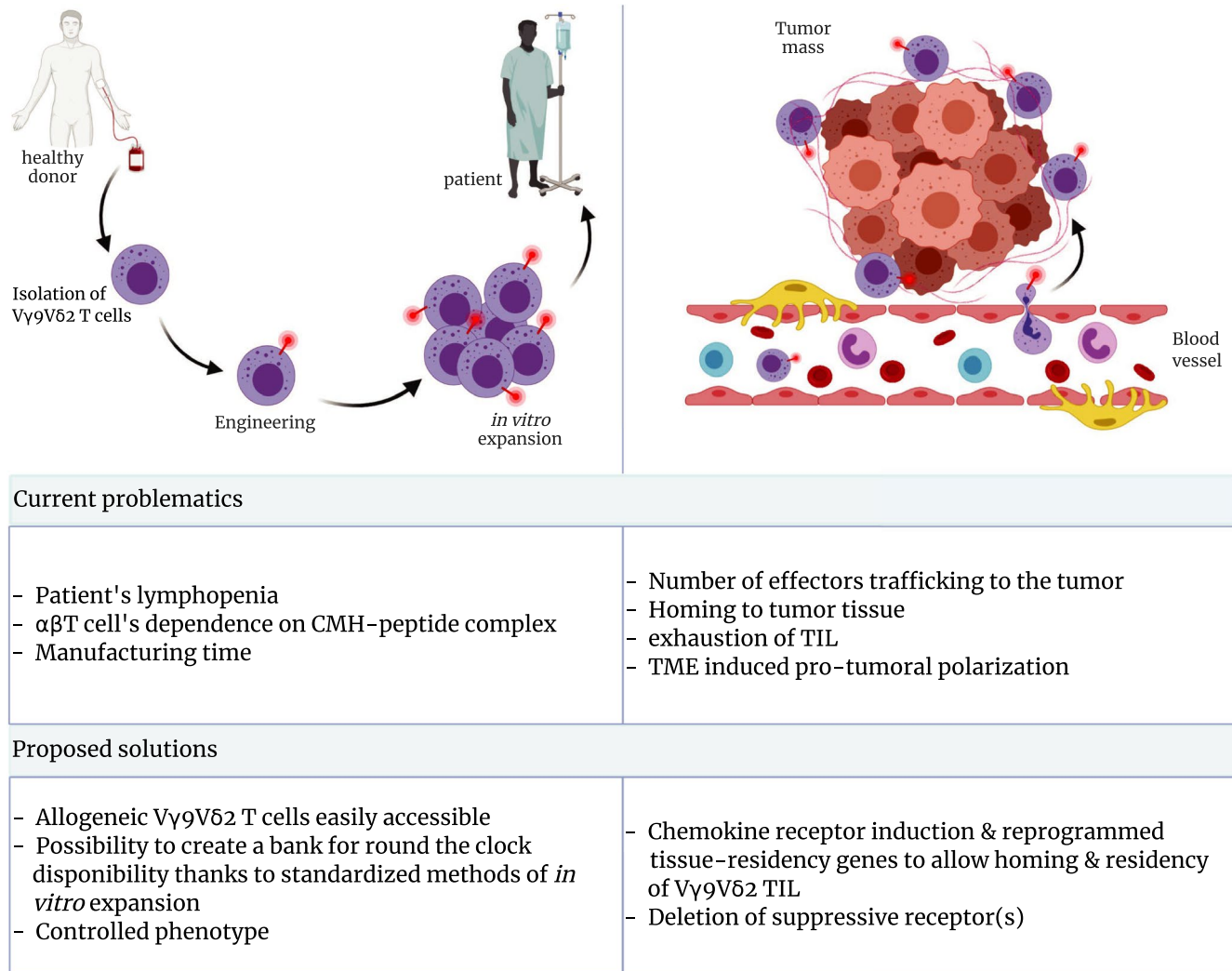
The implication of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in anti-tumor immune response is supported by analyses identifying infiltrating  $\gamma\delta$  T cells, which is now considered as a favorable prognosis marker for various cancers. Though promising, particularly in terms of feasibility and safety, the results of exploratory or early-phase clinical trials also stressed the urgent need of improving the efficacy of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell immunotherapies in cancer indications.<sup>52</sup> The achievement of this ambitious goal will require a deeper understanding of their activation and regulation processes in cancer patients.

## 3 | ENGINEERED T CELLS AGAINST SOLID TUMORS

Although the unique antigenic specificity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells overcomes major issues related to tumor recognition encountered by conventional T cells, their clinical efficacy against solid tumors remains limited by some immunological, logistical, and tumor-linked constraints (Figure 2). Numerous approaches are considered to solve these issues, such as the systemic administration of cytokines, antibodies, and pharmacological reagents that have been extensively discussed elsewhere.<sup>71</sup> Here, we focus on T cell engineering strategies that are considered or already in use in ACT based on conventional T cells, and could substantially improve V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell function against solid tumors.

### 3.1 | Improving proliferation and persistence of T cells by preconditioning approaches

One key determinant of the efficacy of ACT is the functional phenotype of the effectors used for ACT. This status depends on the starting material, as well as the manufacturing process of the T cell product to be administered. Central memory or stem cell memory T cells have enhanced therapeutic activity due to their increased proliferation potential and long-term persistence in vivo.<sup>72</sup> However, current FDA-approved methods for generating CAR T cells utilize either anti-CD3 and IL-2, or anti-CD3/CD28 beads, which can generate T cell effectors with an effector/exhausted



**FIGURE 2** Proposed solutions to improve current ACT in cancer immunotherapies. Several obstacles should be overcome to further improve cancer ACT, such as effector cell production, physical barriers to tumor infiltration, antigen expression heterogeneities, elevated levels of molecular and cellular immunosuppressive factors in the TME, and challenging toxicities. To solve those issues, we hereby propose the creation of banks of allogeneic human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, easily accessible from healthy donor blood and expansible *in vitro*. Those would be engineered and reprogrammed to facilitate their homing to the tumor site and become tissue-resident, hereby allowing them to penetrate the tumor and subsist long enough to deliver their anti-tumor functions

phenotype that show poor persistence *in vivo*, especially in solid tumors, and have limited potential to respond to checkpoint blockade.<sup>73</sup> Therefore, major efforts have been put into developing preconditioning milieu that would restore or preserve the central memory or stem cell memory phenotype of adoptively transferred T cells using cytokines (eg, IL-7, IL-15, IL-21),<sup>74-80</sup> or epigenetic modifiers.<sup>81,82</sup> Similar to  $\alpha\beta$  T cells, anti-tumor functions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells can be substantially enhanced by supplementing the conditioning milieu with cytokines such as IL-15, IL-21,<sup>83,84</sup> or vitamin C<sup>85</sup> (see Ref. 53 for review on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell expansion and preconditioning strategies).

Optimization of the preconditioning milieu used to manufacture the T cell products used for ACT should thus improve the efficacy of these treatments. Moreover, advances in identifying signals that drive T cell differentiation toward different functional phenotypes

should help design preconditioning milieu that guide the differentiation of T cells toward any desired functional phenotype.

### 3.2 | Addressing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to solid tumors

The clinical efficacy of ACT strategies relies on the efficient addressing of immune effectors to the tumor. In the case of liquid tumors, tumor-specific T cells are expected to rapidly meet circulating tumor cells following intravenous administration. However, most solid cancers arise within epithelial layers, and adoptively transferred anti-tumor T cells are largely excluded from these tissue compartments in the absence of inflammation. Lymphocyte recruitment and trafficking into solid tumors is a carefully orchestrated process that requires adhesion to the endothelium, trans-endothelial migration, infiltration

through extracellular matrix and stroma, and ultimately engraftment in tumor islets or reorganization in tertiary lymphoid structures.<sup>86</sup> In many cancers, alterations of this process result in reduced T cell trafficking. Immature and disorganized endothelial cells of the tumor vasculature often express low levels of adhesion and attraction molecules. Tumor-derived factors can also render local endothelial cells unresponsive to inflammatory cytokines that are essential to recruit immune effectors to tissues. Physical barriers such as the stiff tumor stroma further hinder the infiltration of T cells in the tumor.<sup>6,8,87</sup>

Some *in vivo* studies have shown that following adoptive transfer, allogeneic V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells can reach, infiltrate tumor sites, and display strong anti-tumor activities.<sup>88,89</sup> However, chemokine receptors that are essential for the recruitment of lymphocytes to tumors (eg, CXCR1-3)<sup>90</sup> are frequently not expressed by most peripheral blood lymphocytes, including V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells and most effectors used in ACT. Several strategies have been proposed to improve the addressing of adoptively transferred T cells to solid tumors. Engineering T cells with chemokine receptors and adhesion molecules (eg, CCR2,<sup>91,92</sup> CXCR1, and CXCR2<sup>93</sup>)<sup>7,8</sup> improves the addressing of adoptively transferred T cell to some tumors. However, different tumors express distinct sets of chemokines, which prevents a broad use of such strategies. T cells have also been engineered to target cancer-associated components that hinder T cell trafficking, using CAR designed to specifically target VEGFR2 that plays vital roles in tumor angiogenesis and growth<sup>94</sup> or the fibroblast activation protein that is expressed at the surface of cancer-associated stromal cells.<sup>95</sup> ACT using these effectors led to the destruction of the tumor vasculature and stroma by CAR T cells, facilitating tumor infiltration by immune cells. However, the low expression of the targeted molecules by healthy tissues can have serious adverse effects.<sup>96</sup> Alternatively, the direct delivery of T cells within the tumor showed some success,<sup>89,97-99</sup> but this approach cannot be used against metastatic diseases. Defective infiltration by adoptively transferred anti-tumor T cells is still a major issue that limits the efficacy of ACT against solid tumors, and that might not be solved by sole engineering of adoptively transferred T cells. However, strategies that promote chemokine expression by tumor cells can be combined with ACT to facilitate the infiltration of adoptively transferred T cells. In particular, chemotherapy drugs that increase expression of the chemokine CXCL9, CXCL10, and CXCL11 by tumors improve infiltration by T cells expressing their receptor CXCR3.<sup>100</sup> Oncolytic viruses, which specifically target cancer cells, can also be used to deliver chemokine locally within the tumor.<sup>101,102</sup> VEGFC therapy, which support lymphatic vessel expansion, can further expose tumors to the circulation and significantly improve lymphocyte trafficking and anti-tumor reactivities.<sup>103</sup>

### 3.3 | Counteracting the tumor microenvironment

Once adoptively transferred T cells have successfully infiltrated the tumors, they often encounter a hostile tumor microenvironment

(TME) that suppresses their functions (see Refs. 5,104-106 for reviews). Major advances in our understanding of the mechanisms employed by tumors to avoid detection and eradication by endogenous T cells and promote tumor growth led the development of new strategies to improve resistance of adoptively transferred T cells to the TME.

Tumor cells can express high levels of ligands for various immune checkpoint receptors (eg, PD-1, CTLA-4, LAG3, TIGIT, VISTA) whose expression is often induced on T cells by the TME. Activation of these receptors generally leads T cells into a state exhaustion, tolerance, or dysfunction.<sup>5,104-106</sup> Given the success of systemic administration of anti-PD1/PDL1 antibodies in restoring anti-tumor function of exhausted PD-1<sup>+</sup> conventional T cells in the clinic,<sup>107</sup> numerous strategies have been developed to block engagement of the PD-1/PD-L1 pathway in adoptively transferred T cells. T cells have been engineered to secrete blocking PD-1 scFv antibody within the tumor,<sup>108,109</sup> and express dominant negative PD-1 receptors that can act as decoy for PD-L1,<sup>110-112</sup> or chimeric switch receptors that combine the extracellular portion of PD-1 and the intracellular domain of CD28, so as to convert inhibitory signals into costimulatory ones.<sup>113-115</sup> Such strategies could potentially be used to inhibit any pathway that blunt the anti-tumor function of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in the TME including soluble molecules (eg, soluble MIC-A).<sup>116</sup> However, PD-1 expression by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells was found to have minimal impact on their anti-tumor function. Additionally, functional activity of anergic or exhausted PD-1<sup>+</sup> V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells identified in multiple myeloma and follicular lymphoma was not fully restored by PD-1 pathway blockade.<sup>117-120</sup>

Some cytokines that are critical for the activation, proliferation, and persistence of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (eg, IL-2, IL-15) are present in limited amounts within the TME. CAR T cells engineered to express the  $\gamma$ c cytokines IL-7, IL-15, or IL-21, which promote the generation of central memory or stem cell memory T cells,<sup>121</sup> showed improved expansion and persistence in solid tumors.<sup>122-124</sup> Furthermore, CAR T cells engineered to express IL-12 or IL-18, which promote T cell effector functions, demonstrated improved anti-tumor function against various solid tumors.<sup>125-129</sup> Importantly, although transgenic expression of one or several cytokines by adoptively transferred T cells has the potential to improve the anti-tumor function of both adoptively transferred T cells and endogenous effectors,<sup>130</sup> it might also have some adverse effect and participate in promoting tumor angiogenesis, metastasis, and immune escape (eg, IL-18<sup>131</sup>). Alternatively, several strategies have been considered to increase cytokine signaling without the participation of exogenous cytokines. T cells expressing a constitutively active IL-7R,<sup>132</sup> or a CAR wired directly to cytokine signaling pathways that provide signaling in an antigen-dependent manner<sup>133</sup> showed increased activation, proliferation, and persistence in several models of solid tumors.

Finally, the limited oxygen and nutrient supply available in the TME, together with the immunosuppressive tumor-derived metabolites, certainly represent the biggest challenge faced by adoptively transferred T cells in solid tumors.<sup>6,134</sup> Metabolic stress induced by



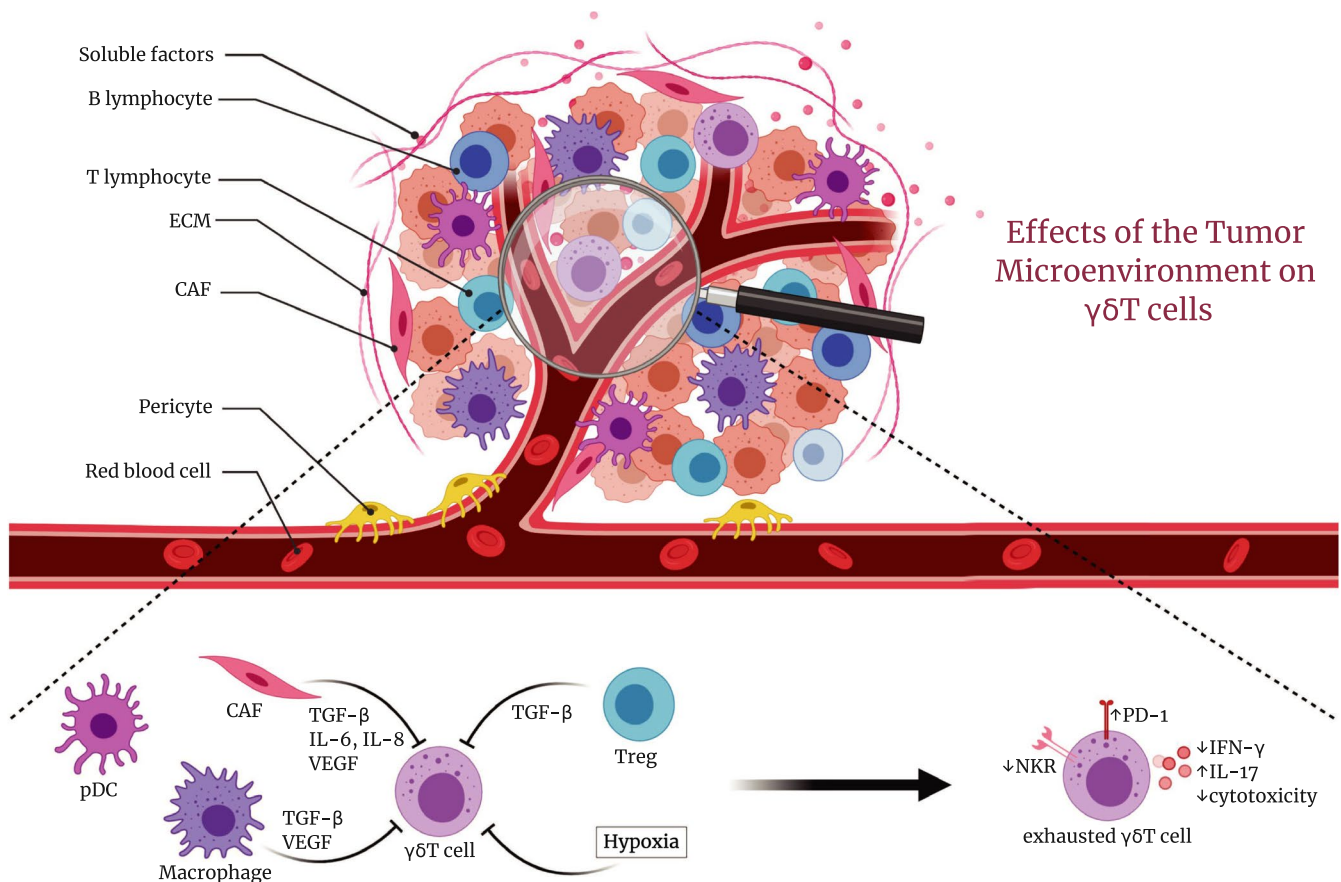
this environment often results in inhibition of anti-tumor T cell function, including  $\gamma\delta$  T cells (Figure 3).<sup>117,125,135-138</sup> Alternatively, it can promote their differentiation into effector profiles that suppress immune response (eg, T reg) or even promote tumor progression (eg, Th17).<sup>139</sup> Although V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expanded from peripheral blood display a relatively homogeneous cytotoxic pro-inflammatory Th1 profile,<sup>140</sup> other  $\gamma\delta$  T cell subsets can display Th2,<sup>141</sup> Th9,<sup>142</sup> Th17,<sup>143</sup> or Treg-like<sup>144</sup> functional profiles. In some pathologies, including breast and colorectal cancers, IL-17<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells have even been identified as major producers of IL-17.<sup>145-147</sup> It remains unclear whether or not these profiles originate from distinct  $\gamma\delta$  T lymphocyte subsets or whether one  $\gamma\delta$  T cells subset can adopt various effector profiles in response to environmental factors (eg, TME). Although the impact of the TME on adoptively transferred V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is not well defined, Treg-like V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells were proposed to participate in the immunosuppressive action of the TME either by cell-cell contact through immune checkpoint blockade via CTLA-4/CD86 and PD-1/PD-L1 interaction, or by releasing soluble molecules.<sup>148</sup> Furthermore, because V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells can adopt a Th17 effector profile upon culture

in the presence of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, and TGF- $\beta$ ,<sup>143,149</sup> it is conceivable that such process might occur in vivo. A better understanding of the mechanisms underlying differentiation toward one functional phenotype or another might help design strategies that counteract the negative effects induced on V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell function by the TME.

### 3.4 | Harnessing endogenous immune cells

Adoptively transferred T cells can also be engineered to help convert so-called "cold tumors" into "hot tumors" that are more immunogenic,<sup>2,150,151</sup> and harness the endogenous immune system in mounting an effective anti-tumor response. These strategies are particularly relevant for heterogeneous solid tumors that cannot be eradicated through sole recognition of a limited number of tumor antigens by adoptively transferred T cells.

The specific targeting and degradation of cancer-associated components that hinder cell trafficking by adoptively transferred T cells (eg, VEGFR2,<sup>94</sup> fibroblast activation protein<sup>95</sup>; see Section 3.2)



**FIGURE 3** TME components and their effects on  $\gamma\delta$  T cells. TME is organized in complex structures including various cancerous and non-cancerous cell types, such as epithelial cells, cancer cells, immune inflammatory and regulatory cells, endothelial cells, CAF, ECM, proteases and protease inhibitors, and growth factors, all of which being in a close interaction. The ECM supports and promotes the tumor development, immune evasion, and its spreading through matrix remodeling and angiogenesis increments (*up panel*). Several factors, expressed by different cell components, may contribute to the functional exhaustion of  $\gamma\delta$  T cells (*low panel*). Soluble factors (eg, cytokines) released by CAF, macrophages, dendritic cells, and Tregs coupled with a contact inhibition (ie, inhibitory NKR, PD-1), as well as hypoxic stress, have been identified as important exhaustion inducers (CAF: cancer-associated fibroblast; ECM: extracellular matrix; pDC: plasmacytoid dendritic cell; Treg: regulatory T lymphocyte)

facilitate tumor infiltration of both adoptively transferred T cells and endogenous immune cells. Alternatively, once infiltrated in the tumor, adoptively transferred T cells can be used for local delivery of molecules that degrade the extracellular matrix such as heparinase that degrade heparan sulfate proteoglycan, an indispensable component of the extracellular matrix.<sup>152</sup> Adoptively transferred T cells have also been engineered to produce chemoattractant molecules that promote tumor infiltration by endogenous tumor-specific T cells (eg, the CCR7 ligand CCL19,<sup>122</sup> or CCL5 and CXCL9<sup>153</sup>).

Finally, an important strategy to harness endogenous T cells is by promoting epitope spreading, a phenomenon in which a previously tolerated antigen becomes targeted by T cells.<sup>154</sup> In practice, lysis of some tumor cells by adoptively transferred T cells releases tumor-specific antigens that are processed and presented by APCs to endogenous naive T cells, thus inducing a secondary immune response against the tumor.<sup>155</sup>

The ability of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to promote DC maturation,<sup>156-158</sup> provide B cell help,<sup>159,160</sup> and function as alternative APC<sup>161</sup> suggests that they could naturally harness endogenous immune cells during anti-tumor response *in vivo*. This process could be enhanced by engineering adoptively transferred V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to secrete soluble mediators that recruit cDC1s to the tumor and promote their expansion (eg, CCL19, Flt3)<sup>122,162</sup> and maturation (eg, CD40 agonists).<sup>125,163,164</sup> cDC1 can subsequently present tumor antigens to endogenous naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and prime them for tumor recognition.<sup>165</sup> Furthermore, mature DCs are a source of cytokines and chemokine that promote T cell infiltration. Therefore, promoting DC recruitment into the tumor and their maturation indirectly enhance trafficking of endogenous tumor-specific T cells to the tumor site. Finally, secretion of molecules counteracting the TME by adoptively transferred V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (eg, cytokines, scFv; see Section 3.3) can also enhance the proliferation, persistence, and anti-tumor function of endogenous TIL. In particular, the secretion of IL-12 has the potential to stimulate innate immune cells against the tumor and make them resistant to inhibitory elements of the TME, including Tregs and myeloid-derived suppressor cells.<sup>166</sup>

Equipping T cells with various molecules using genetic engineering can successfully enhance both their direct and indirect anti-tumor functions. In particular, the expression of combinations of improved tumor-specific receptors (eg, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR) can increase the sensitivity and specificity of the tumor targeting by adoptively transferred T cells. Furthermore, their secretion of soluble molecules within the tumor microenvironment can counteract some of the mechanisms used by tumor cells to suppress immune cells, harness endogenous immune cells, and restrain tumor progression. However, important issues still impede the success of T cell-based ACT against solid tumors. In particular, the trafficking of adoptively transferred T cells to tumor tissues and their metabolic adaptation to the TME require complex cellular behaviors that cannot be imprinted by simple ectopic expression of natural or engineered structural proteins. Novel engineering strategies that harness recent technological advances based on CRISPR/Cas technology, and the increasing knowledge of the transcriptional mechanisms underlying T cell function and

dysfunction, should help circumvent the remaining challenges faced by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-based ACT against solid tumors in a close future.

## 4 | EMERGING AND FUTURE STRATEGIES IN GENETIC ENGINEERING

### 4.1 | New designs in genetic engineering

Strategies aiming at stably modifying anti-tumor effectors to improve their performances against cancers have been explored for decades. These approaches were initially based on the use of recombinant viral vectors that target transgenes to non-specific genomic sites. However, engineering recombinant viral vectors is a lengthy and costly process, and their random integration into the genome can produce insertional mutagenesis, overexpression of adjacent genes, and disruption of genes at the site of integration, potentially leading to oncogenic transformations. More recently, the discovery of the CRISPR/Cas9 system<sup>167</sup> enabled the development of a broad array of genome editing tools whose precision and efficacy are being continuously and rapidly optimized.<sup>168</sup> CRISPR/Cas technology notably allows specific genomic insertions and deletions in human T cells, thus offering new avenues to genetically engineer improved anti-tumor effectors.<sup>169,170</sup> Importantly, CRISPR/Cas-based technologies do not require the use of viral vectors.<sup>171</sup> This technology thus comes with a reduced cost and improved safety compared with virus-mediated approaches, and is quickly making its way into the clinic.<sup>172</sup>

CRISPR/Cas-based technologies allow the precise insertion of transgenes into given loci, thus avoiding the issues associated with the random integration of viral vectors. This approach can be used to engineer T cells equipped with a panel of natural and synthetic structural molecules selected to enhance their performance against tumors (see Section 3). One major improvement offered by the CRISPR/Cas technology to the engineering strategies is a refined control of expression of transgenes. Random integration by viral vectors or transposons previously led to variegated expression levels of transgenes that were often extraphysiological, and sometimes epigenetically silenced. The property of CRISPR/Cas to precisely insert transgenes into specific genomic loci can be used to place transgenes under the control of specific regulatory elements. This strategy was recently used to improve the functionality of CAR T cells by inserting the CAR transgene into the TCR- $\alpha$  constant locus, so as to place the CAR under transcriptional control of the endogenous TCR regulatory elements.<sup>170</sup> This manipulation resulted in a basal expression level of CAR close to a physiological level of TCR, as well as a dynamic regulation of CAR expression that mimicked the one of TCR during T cell activation. The CAR could thus be effectively internalized and re-expressed following exposure to antigen, similar to a TCR. Unlike conventionally generated CAR T cells that are chronically activated and undergo rapid exhaustion, this new generation of CAR T cells provided sustained anti-tumor function.<sup>170</sup> A similar design would

likely greatly improve the anti-tumor efficacy of CAR-expressing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells.<sup>67-70</sup> Progress in our understanding of the molecular mechanisms governing gene regulation will enable the identification of appropriate insertion loci, so as to obtain specific patterns of transgene expression.

CRISPR/Cas-based technologies also enable the permanent deletion of specific genomic loci. Such modification could improve the efficacy of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in allogeneic ACT by preventing expression of their HLA-I molecules. The HLA-independent antigenic reactivity of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells renders these effectors safe to use in allogeneic transplant without risking graft versus host disease. However, the presence of HLA-I proteins on the surface of the transplanted T cells, if mismatched with the host, can induce their rejection. HLA-I-deficient V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells could thus serve as "off-the-shelf" ready-to-use products for ACT. This strategy is currently being tested in a clinical trial using CAR T cells deficient for the gene encoding the  $\beta$ -2 microglobulin, which is required for MHC class I expression (NCT03166878). CRISPR-mediated gene deletion can also be used to ablate pathways used by tumors to inhibit T cell function. For example, CAR T cells deleted for the death receptor Fas were resistant to activation-induced cell death, which improved their anti-tumor function.<sup>173</sup> Furthermore, conventional T cells with deleted checkpoint molecules, including PD-1, CTLA-4, or LAG-3, showed increased functionality in ACT in certain cancer models.<sup>173-178</sup> Deletion of other immune checkpoints such as the adenosine A2 receptor, and TIM-3 also represents promising approaches for enhancing the potency of adoptively transferred T cells.<sup>179-181</sup> Importantly, some CRISPR/Cas9-derived approaches now enable the deletion of multiple genes in one shot.<sup>173</sup> One possible downside to these modifications is that they could lead to autoimmune responses, similar to anti-PD-1 and anti-PD-L1 treatments.<sup>182</sup> This issue is particularly important to consider for V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, given their recognition of ubiquitously expressed endogenous ligands. Expression of inhibitory molecules by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells is likely critical to keep in check their natural autoreactivity and maintain their accurate discrimination between malignant and healthy tissues. It might thus be relevant to include safeguard mechanisms in the design of engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (eg, suicide gene<sup>183</sup>), so as to constrain their response in case of deleterious autoimmune reaction.

Newly developed screening methods based on CRISPR technology considerably accelerated the discovery of new gene-encoded molecules, natural or synthetic, that have the potential to dramatically improve ACT-based immunotherapy against solid tumors in the future.<sup>184-187</sup> The use of CRISPR technology enables additions and deletions of multiple gene-encoded molecules to anti-tumor effectors, which could together improve trafficking to the tumor, tumor recognition, and anti-tumor effector functions, and overcome suppressive signals in the TME that lead to cell dysfunction.<sup>7</sup>

## 4.2 | Transcriptional reprogramming of T lymphocytes

Transcriptional programming enables the acquisition of complex cellular behaviors, as it allows the dynamic and coordinated expression

of hundreds or thousands of genes in response to various intrinsic or extrinsic stimuli. These mechanisms notably enable cells to maintain their primary functions while adapting their behavior in response to changes in their environment. The failure of anti-tumor effectors to adapt to the TME is currently one of the major obstacles of ACT against solid tumors. It notably leads to their dysfunction, which can suppress anti-tumor immune responses or promote tumor development.<sup>4</sup> A promising approach to circumvent this issue is to use transcriptional programming to engineer anti-tumor effectors that would adapt appropriately to the TME while maintaining efficient anti-tumor properties.

Transcriptional programming is a complex process involving many molecular players that successively impose layers of regulation to shape the epigenetic and transcriptional landscape of cells during development. Recent progress in our understanding of the molecular mechanisms of transcriptional programming underlying T cell differentiation led to the identification of key transcriptional controllers of T cell exhaustion.<sup>106</sup> Manipulating the expression of some of these factors could improve effector functions of anti-tumor effectors by preventing their TME-induced exhaustion. For example, deletion of the NR4 factors or sustained expression of c-Jun results in improved response of CAR TIL in preclinical mouse models bearing solid tumors.<sup>188,189</sup> Although manipulating these transcription factors is a promising strategy for the development of improved ACT, a better understanding of their molecular mechanism of action might help apprehend the consequence of such manipulations on the biology of anti-tumor effectors. In particular, exhaustion-resistant T cells could undergo undesirable TME-induced differentiation into Tregs or IL-17 producers, which would ultimately be deleterious for tumor suppression.

Another interesting strategy aims at counteracting the metabolic reprogramming of TIL induced by the TME and chronic activation, which is a major determinant that leads to their dysfunction.<sup>106,190</sup> Recent work found the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 subunit alpha (HIF-1 $\alpha$ ) contributes to the acquisition by tumor-infiltrating natural killer cells of a dysfunctional state similar to T cell exhaustion. Deletion or inhibition of HIF-1 $\alpha$  in mouse natural killer cells promoted their function against some solid tumors.<sup>191</sup> HIF-1 $\alpha$  protein, which is constitutively degraded under normoxia, is stabilized under hypoxic conditions such as in solid tumors. It then translocates to the nucleus where it notably regulates expression of genes involved in metabolic adaptation to hypoxia. Although manipulating HIF-1 $\alpha$  might improve anti-tumor function of T cells in solid tumors at short term, it could have deleterious effects in conditions of chronic hypoxia that are met in the TME. Alternatively, preventing the downregulation in T cells of ACADVL, an enzyme important to metabolize very long-chain fatty acids present in some TME, induced profound metabolic changes that enhanced the fitness of tumor-specific mouse T cells in the TME, and thus their anti-tumor function.<sup>192</sup> Metabolic reprogramming of tumor-specific T cells to enable their use of certain nutrients can thus help sustain their anti-tumor function in the harsh TME. Additionally, this strategy could enable their consumption of specific nutrients that would otherwise

promote tumor growth, such as free fatty acids that can promote Treg survival and accumulation.<sup>193</sup>

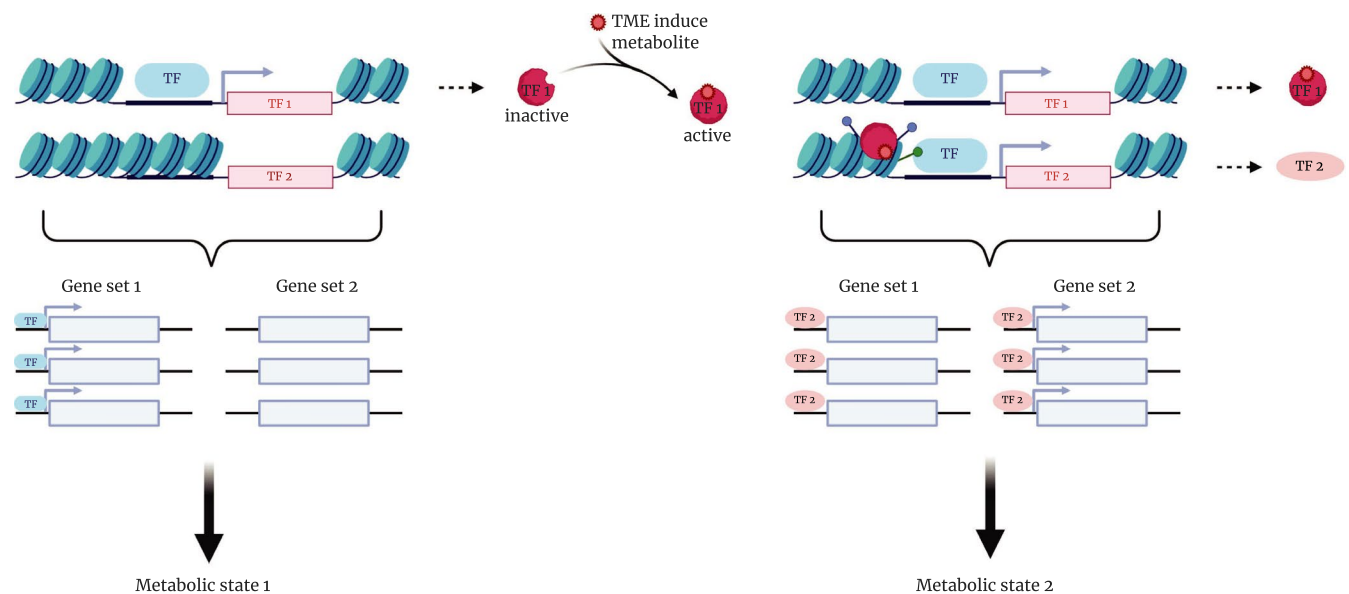
Harnessing the natural mechanisms enabling T cells to mount efficient and sustained responses against solid tumors using transcriptional reprogramming could also improve the function of anti-tumor effectors in ACT against solid tumors. T cells that naturally reside in tissues play important functions in local tumor immunosurveillance and immunity against solid tumors.<sup>194-197</sup> In particular, they naturally express sets of chemokine receptors and adhesion molecules that enable their infiltration, retention, and function within tissues and, in some extent, within solid tumors. Importantly, their metabolism is adapted to a low nutrient, low oxygen, but fatty acid-rich environment somewhat shared by tissues and solid tumors.<sup>198</sup> The transcriptional mechanisms that imprint these properties in circulating T cells are starting to be uncovered.<sup>199-202</sup> This new knowledge could help design new reprogramming strategies that would considerably improve the efficacy of engineered tumor-specific T cells against solid tumors.

Recent modifications to the CRISPR/Cas9 system have provided effective strategies to manipulate gene expression. These strategies are based on a mutated form of Cas9 that lacks endonuclease activity but retains the ability to precisely bind specific DNA sequences through sgRNA targeting (called dead Cas9 or dCas9).<sup>203</sup> dCas9 has been fused with numerous functional domains that can induce transcriptional or epigenetic changes.<sup>168</sup> Combinatorial engineering of dCas9 fusion proteins can further leverage the function of multiple effector domains,<sup>204,205</sup> and include effector modules that respond to various stimuli such as pharmacological agents<sup>206</sup> or environmental cues (eg,

metabolites, hypoxia). This last feature could notably enable specific adaptations of tumor-specific effectors to metabolic changes in the TME during anti-tumor immune response (Figure 4). This incredibly versatile technology enables the design of dynamic and tunable synthetic transcriptional controllers that can produce virtually any pattern of expression, and simultaneously repress and activate different genes.<sup>207</sup> CRISPR/Cas technology can be further multiplexed to simultaneously modulate the expression of many genes.<sup>208</sup> This technology should enable to write entirely new transcriptional programs by modifying the genetic, epigenetic, and transcriptional landscapes of cells<sup>209</sup> (Figure 4).

In the future, CRISPR/Cas technology could be used to hack pre-existing transcriptional networks to enable tumor-specific T cells to infiltrate tissues and tumors and adapt to their environments; integrate synthetic molecules, such as CAR, to natural transcriptional network to optimize their anti-tumor function; or write new transcriptional programs that use metabolite-responsive synthetic transcription factors to adapt to the TME (Figure 4).

Major advances in our understanding of the molecular mechanisms responsible for the exquisite discrimination by human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells of tumor cells from healthy ones, the transcriptional mechanisms that underlie T cell differentiation into functional or dysfunctional effectors in solid tumors, as well as the potential of CRISPR/Cas technologies in cellular engineering, hold great promises for the future of ACT therapies against solid tumors. These will enable the engineering of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells endowed with new complex behaviors optimized to efficiently fight solid tumors while adapting to the sophisticated mechanisms developed by tumor cells to evade the immune system.



**FIGURE 4** Example of synthetic transcriptional network that incorporates endogenous and engineered components to program a metabolic adaptation to environmental changes. Endogenous components are blue, engineered ones are red. Following environmental changes, a synthetic metabolite-responsive epigenetic modifier (red circle) opens specific areas of heterochromatin. These epigenetic changes allow an endogenous transcription factor (blue TF) to regulate expression of new gene targets. Among these, a newly expressed synthetic transcription factor (TF 2) simultaneously activates and represses expression of different genes (gene sets 1 and 2), which altogether induce a metabolic adaptation. (TF: transcription factor)

## 5 | CONCLUSION

Despite major recent advances, several issues remain regarding the biology and functions of human immune cell subsets, as well as their use in cancer immunotherapies. Various limiting factors, including the reduced trafficking of lymphocytes and the tolerogenic impact of the tumor environment, have been identified. Among promising effector cell candidates for ACT therapies, human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells represent an extremely attractive lymphocyte subset that contributes to the sensing and control of tumor development. Since their identification, these peculiar innate-like effectors have intrigued researchers for shared reasons of complexity and hardness. Initial studies highlighted them as gatekeepers with a natural memory nature, enabling them to react against infectious and tumoral threats. Accordingly, subsequent analyses showed them as prototypical anti-tumor effectors for designing efficient active or passive cell immunotherapies, taking advantage of their easy handling, reduced toxicity, conservation, and broad anti-tumor reactivity. Furthermore, new cell engineering tools that leverage the potential of CRISPR/Cas technology open astonishing opportunities to optimize anti-tumor effector functions of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells, and circumvent the obstacles encountered in fighting solid tumors. ACT strategies based on engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells should be further combined to complementary approaches aiming at increasing tumor immunogenicity, improving tumor infiltration, and counteracting the immunosuppressive effect of the TME. In particular, radiotherapy, chemotherapy, and systemic administration of immunomodulatory drugs such as monoclonal antibodies targeting checkpoint blockade, and novel approaches such as epigenetic drugs or oncogenic viruses can substantially enhance the efficiency of T cell-based ACT, by enhancing the anti-tumor function of both adoptively transferred T cells and endogenous T cells. These results should ultimately offer insights into improved therapies aiming at exploiting reprogrammed "super-effector V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells" to target cancer, control its progression, and enable efficient therapeutic responses.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to pay tribute to the memory of Wendy Havran who kindly invited us to submit this work. The authors also thank all members of the laboratory for helpful discussions. This work was supported by grants from INSERM, CNRS, Université de Nantes, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20170839118), Ligue Contre le Cancer AO GO2019 (Côtes d'Armor), Association pour la Recherche contre le Cancer (PJA 20191209404), and ImCheck Therapeutics. This work was realized in the context of the LabEx IGO program, supported by the National Research Agency Investissements d'Avenir. The figures were created using the BioRender software ([www.BioRender.com](http://www.BioRender.com)).

### CONFLICTS OF INTEREST

None.

### ORCID

Chirine Rafia  <https://orcid.org/0000-0003-3217-9722>

Christelle Harly  <https://orcid.org/0000-0002-8045-9166>

Emmanuel Scotet  <https://orcid.org/0000-0001-8010-9556>

## REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
- Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*. 2016;14:73.
- Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24(5):541-550.
- Guedan S, Ruella M, June CH. Emerging cellular therapies for cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:145-171.
- Rodriguez-Garcia A, Palazon A, Noguera-Ortega E, Powell DJ Jr, Guedan S. CAR-T cells hit the tumor microenvironment: strategies to overcome tumor escape. *Front Immunol*. 2020;11:1109.
- Tian Y, Li Y, Shao Y, Zhang Y. Gene modification strategies for next-generation CAR T cells against solid cancers. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):54.
- Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:128.
- Jackson HJ, Brentjens RJ. Overcoming antigen escape with CAR T-cell therapy. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1238-1240.
- Haen SP, Loffler MW, Rammensee HG, Brossart P. Towards new horizons: characterization, classification and implications of the tumour antigenic repertoire. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;1-16. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0387-x>
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-733.
- Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-2544.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-1517.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18(4):843-851.
- Richman SA, Nunez-Cruz S, Moghimi B, et al. High-affinity GD2-specific CAR T cells induce fatal encephalitis in a preclinical neuroblastoma model. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(1):36-46.
- Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2545-2554.
- Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 2016;127(20):2406-2410.
- Majzner RG, Mackall CL. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy. *Cancer Discov*. 2018;8(10):1219-1226.
- O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2017;9(399):eaaa0984.
- Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, et al. Transgenic expression of IL15 improves antitumor activity of IL13Ralpha2-CAR T cells but results in antigen loss variants. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(7):571-581.
- Feng KC, Guo YL, Liu Y, et al. Cocktail treatment with EGFR-specific and CD133-specific chimeric antigen receptor-modified T cells in a patient with advanced cholangiocarcinoma. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):4.
- Lulla PD, Tzannou I, Vasileiou S, et al. The safety and clinical effects of administering a multiantigen-targeted T cell

- therapy to patients with multiple myeloma. *Sci Transl Med*. 2020;12(554):eaaz3339.
23. Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. 2012;32(5):1059-1070.
  24. Lanitis E, Poussin M, Klattenhoff AW, et al. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(1):43-53.
  25. Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell*. 2016;164(4):770-779.
  26. Sukumaran S, Watanabe N, Bajgain P, et al. Enhancing the potency and specificity of engineered T cells for cancer treatment. *Cancer Discov*. 2018;8(8):972-987.
  27. Bielamowicz K, Fousek K, Byrd TT, et al. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2018;20(4):506-518.
  28. Han X, Wang Y, Wei J, Han W. Multi-antigen-targeted chimeric antigen receptor T cells for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):128.
  29. Chen L, Qiao D, Wang J, Tian G, Wang M. Cancer immunotherapy with lymphocytes genetically engineered with T cell receptors for solid cancers. *Immunol Lett*. 2019;216:51-62.
  30. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018;359(6382):1361-1365.
  31. Iyer RK, Bowles PA, Kim H, Dulgar-Tulloch A. Industrializing autologous adoptive immunotherapies: manufacturing advances and challenges. *Front Med*. 2018;5:150.
  32. Walseng E, Koksall H, Sektioglu IM, et al. A TCR-based chimeric antigen receptor. *Sci Rep*. 2017;7(1):10713.
  33. Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):132.
  34. Davenport AJ, Jenkins MR, Cross RS, et al. CAR-T cells inflict sequential killing of multiple tumor target cells. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(5):483-494.
  35. Walker AJ, Majzner RG, Zhang L, et al. Tumor antigen and receptor densities regulate efficacy of a chimeric antigen receptor targeting anaplastic lymphoma kinase. *Mol Ther*. 2017;25(9):2189-2201.
  36. Li W, Qiu S, Chen J, et al. Chimeric antigen receptor designed to prevent ubiquitination and downregulation showed durable antitumor efficacy. *Immunity*. 2020;53(2):456-470.e6.
  37. Gudipati V, Ryzdek J, Doel-Perez I, et al. Inefficient CAR-proximal signaling blunts antigen sensitivity. *Nat Immunol*. 2020;21(8):848-856.
  38. Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*. 2015;21(6):581-590.
  39. Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):449-459.
  40. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45-56.
  41. Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(15):1688-1696.
  42. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol*. 2006;24(13):e20-e22.
  43. Chien YH, Meyer C, Bonneville M. gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:121-155.
  44. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):88-100.
  45. Lefranc MP, Rabbitts TH. Genetic organization of the human T-cell receptor gamma and delta loci. *Res Immunol*. 1990;141(7):565-577.
  46. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003;197(2):163-168.
  47. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood*. 2012;120(11):2269-2279.
  48. Rigau M, Ostrowska S, Fulford TS, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by gammadelta T cells. *Science*. 2020;367(6478).
  49. Karunakaran MM, Willcox CR, Salim M, et al. Butyrophilin-2A1 directly binds germline-encoded regions of the Vgamma9Vdelta2 TCR and is essential for phosphoantigen sensing. *Immunity*. 2020;52(3):487-498.e486.
  50. Vyborova A, Beringer DX, Fasci D, et al. gamma9delta2T cell diversity and the receptor interface with tumor cells. *J Clin Investig*. 2020;30(9):4637-4651.
  51. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol*. 2005;175(8):5481-5488.
  52. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. gammadelta T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(7):392-404.
  53. Yazdanifar M, Barbarito G, Bertaina A, Airoidi I. gammadelta T cells: the ideal tool for cancer immunotherapy. *Cells*. 2020;9(5):1305.
  54. Chitadze G, Oberg HH, Wesch D, Kabelitz D. The ambiguous role of gammadelta T lymphocytes in antitumor immunity. *Trends Immunol*. 2017;38(9):668-678.
  55. Bonneville M, Fournie JJ. Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect*. 2005;7(3):503-509.
  56. Boutin L, Scotet E. Towards deciphering the hidden mechanisms that contribute to the antigenic activation process of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Front Immunol*. 2018;9:828.
  57. Sebestyén Z, Prinz I, Dechanet-Merville J, Silva-Santos B, Kuball J. Translating gammadelta (gammadelta) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat Rev Drug Discovery*. 2020;19(3):169-184.
  58. Fournie JJ, Sicard H, Poupot M, et al. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol*. 2013;10(1):35-41.
  59. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, et al. Targeting human gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Can Res*. 2007;67(15):7450-7457.
  60. Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):290-297.
  61. Bennouna J, Levy V, Sicard H, et al. Phase I study of bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, IPH 1101), a Vgamma9Vdelta2 T lymphocyte agonist in patients with solid tumors. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(10):1521-1530.
  62. Lang JM, Kaikobad MR, Wallace M, et al. Pilot trial of interleukin-2 and zoledronic acid to augment gammadelta T cells as treatment for patients with refractory renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(10):1447-1460.
  63. Sicard H, Ingoure S, Luciani B, et al. In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol*. 2005;175(8):5471-5480.

64. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(4):469-476.
65. Alnaggar M, Xu Y, Li J, et al. Allogenic Vgamma9Vdelta2 T cell as new potential immunotherapy drug for solid tumor: a case study for cholangiocarcinoma. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):36.
66. Straetemans T, Kierkels GJJ, Doorn R, et al. GMP-grade manufacturing of T cells engineered to express a defined gammadeltaTCR. *Front Immunol.* 2018;9:1062.
67. Rischer M, Pscherer S, Duwe S, Vormoor J, Jurgens H, Rossig C. Human gammadelta T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-tumour immunity. *Br J Haematol.* 2004;126(4):583-592.
68. Deniger DC, Switzer K, Mi T, et al. Bispecific T-cells expressing polyclonal repertoire of endogenous gammadelta T-cell receptors and introduced CD19-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther.* 2013;21(3):638-647.
69. Themeli M, Kloss CC, Ciriello G, et al. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 2013;31(10):928-933.
70. Rozenbaum M, Meir A, Aharon Y, et al. Gamma-delta CAR-T cells show CAR-directed and independent activity against leukemia. *Front Immunol.* 2020;11:1347.
71. Hoeres T, Smetak M, Pretschner D, Wilhelm M. Improving the efficiency of Vgamma9Vdelta2 T-cell immunotherapy in cancer. *Front Immunol.* 2018;9:800.
72. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(10):671-684.
73. Mardiana S, Solomon BJ, Darcy PK, Beavis PA. Supercharging adoptive T cell therapy to overcome solid tumor-induced immunosuppression. *Sci Transl Med.* 2019;11(495):eaaw2293.
74. Klebanoff CA, Finkelstein SE, Surman DR, et al. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(7):1969-1974.
75. Giuffrida L, Sek K, Henderson MA, et al. IL-15 preconditioning augments CAR T cell responses to checkpoint blockade for improved treatment of solid tumors. *Mol Ther.* 2020;S1525-0016(20)30369-5.
76. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood.* 2013;121(4):573-584.
77. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood.* 2014;123(24):3750-3759.
78. Zhou J, Jin L, Wang F, Zhang Y, Liu B, Zhao T. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells expanded with IL-7/IL-15 mediate superior antitumor effects. *Protein Cell.* 2019;10(10):764-769.
79. Gargett T, Brown MP. Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2. *Cytotherapy.* 2015;17(4):487-495.
80. Chen Y, Yu F, Jiang Y, et al. Adoptive transfer of interleukin-21-stimulated Human CD8+ T memory stem cells efficiently inhibits tumor growth. *J Immunother.* 2018;41(6):274-283.
81. Kagoya Y, Nakatsugawa M, Yamashita Y, et al. BET bromodomain inhibition enhances T cell persistence and function in adoptive immunotherapy models. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3479-3494.
82. Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, et al. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature.* 2018;558(7709):307-312.
83. Thedrez A, Harly C, Morice A, Salot S, Bonneville M, Scotet E. IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol.* 2009;182(6):3423-3431.
84. Eberl M, Engel R, Beck E, Jomaa H. Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol.* 2002;218(1-2):1-6.
85. Koukanou L, Xu Y, Peters C, et al. Vitamin C promotes the proliferation and effector functions of human gammadelta T cells. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(5):462-473.
86. Lin L, Hu X, Zhang H, Hu H. Tertiary lymphoid organs in cancer immunology: mechanisms and the new strategy for immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:1398.
87. Tahmasebi S, Elahi R, Esmaeilzadeh A. Solid tumors challenges and new insights of CAR T cell engineering. *Stem Cell Rev Rep.* 2019;15(5):619-636.
88. Santolaria T, Robard M, Leger A, Catros V, Bonneville M, Scotet E. Repeated systemic administrations of both aminobisphosphonates and human Vgamma9Vdelta2 T cells efficiently control tumor development in vivo. *J Immunol.* 2013;191(4):1993-2000.
89. Jarry U, Chauvin C, Joalland N, et al. Stereotaxic administrations of allogeneic human Vgamma9Vdelta2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors. *Oncoimmunology.* 2016;5(6):e1168554.
90. Do HTT, Lee CH, Cho J. Chemokines and their receptors: multifaceted roles in cancer progression and potential value as cancer prognostic markers. *Cancers.* 2020;12(2):287.
91. Moon EK, Carpenito C, Sun J, et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res.* 2011;17(14):4719-4730.
92. Craddock JA, Lu A, Bear A, et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother.* 2010;33(8):780-788.
93. Whilding LM, Halim L, Draper B, et al. CAR T-cells targeting the integrin alphavbeta6 and co-expressing the chemokine receptor CXCR2 demonstrate enhanced homing and efficacy against several solid malignancies. *Cancers.* 2019;11(5):674.
94. Chinnasamy D, Yu Z, Theoret MR, et al. Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3953-3968.
95. Wang LC, Lo A, Scholler J, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(2):154-166.
96. Tran E, Chinnasamy D, Yu Z, et al. Immune targeting of fibroblast activation protein triggers recognition of multipotent bone marrow stromal cells and cachexia. *J Exp Med.* 2013;210(6):1125-1135.
97. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med.* 2016;375(26):2561-2569.
98. Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena-Vargas J, et al. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci Transl Med.* 2014;6(261):261ra151.
99. Tchou J, Zhao Y, Levine BL, et al. Safety and efficacy of intratumoral injections of chimeric antigen receptor (CAR) T cells in metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(12):1152-1161.
100. Gao Q, Wang S, Chen X, et al. Cancer-cell-secreted CXCL11 promoted CD8(+) T cells infiltration through docetaxel-induced-release of HMGB1 in NSCLC. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):42.
101. Moon EK, Wang LS, Bekdache K, et al. Intra-tumoral delivery of CXCL11 via a vaccinia virus, but not by modified T cells, enhances the efficacy of adoptive T cell therapy and vaccines. *Oncoimmunology.* 2018;7(3):e1395997.
102. Shi T, Song X, Wang Y, Liu F, Wei J. Combining oncolytic viruses with cancer immunotherapy: establishing a new generation of cancer treatment. *Front Immunol.* 2020;11:683.

103. Song E, Mao T, Dong H, et al. VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. *Nature*. 2020;577(7792):689-694.
104. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, et al. Tumor-specific T Cell dysfunction is a dynamic antigen-driven differentiation program initiated early during tumorigenesis. *Immunity*. 2016;45(2):389-401.
105. Yang L, Li A, Lei Q, Zhang Y. Tumor-intrinsic signaling pathways: key roles in the regulation of the immunosuppressive tumor microenvironment. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):125.
106. Balkhi MY. Receptor signaling, transcriptional, and metabolic regulation of T cell exhaustion. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1747349.
107. Costa R, Gill N, Rademaker AW, et al. Systematic analysis of early phase clinical studies for patients with breast cancer: Inclusion of patients with brain metastasis. *Cancer Treat Rev*. 2017;55:10-15.
108. Rafiq S, Yeku OO, Jackson HJ, et al. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo. *Nat Biotechnol*. 2018;36(9):847-856.
109. Nakajima M, Sakoda Y, Adachi K, Nagano H, Tamada K. Improved survival of chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) and tumor-specific T cells caused by anti-programmed cell death protein 1 single-chain variable fragment-producing CAR-T cells. *Cancer Sci*. 2019;110(10):3079-3088.
110. Chen N, Morello A, Tano Z, Adusumilli PS. CAR T-cell intrinsic PD-1 checkpoint blockade: a two-in-one approach for solid tumor immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2017;6(2):e1273302.
111. Huang X, Yang Y. Driving an improved CAR for cancer immunotherapy. *J Clin Investig*. 2016;126(8):2795-2798.
112. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Investig*. 2016;126(8):3130-3144.
113. Liu X, Ranganathan R, Jiang S, et al. A chimeric switch-receptor targeting PD1 augments the efficacy of second-generation CAR T cells in advanced solid tumors. *Can Res*. 2016;76(6):1578-1590.
114. Kobold S, Grassmann S, Chaloupka M, et al. Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(8):146.
115. Rataj F, Kraus FBT, Chaloupka M, et al. PD-1-CD28 fusion protein enables CD4+ T cell help for adoptive T cell therapy in models of pancreatic cancer and non-hodgkin lymphoma. *Front Immunol*. 2018;9:1955.
116. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419(6908):734-738.
117. Castella B, Foglietta M, Sciancalepore P, et al. Anergic bone marrow Vgamma9Vdelta2 T cells as early and long-lasting markers of PD-1-targetable microenvironment-induced immune suppression in human myeloma. *Oncoimmunology*. 2015;4(11):e1047580.
118. Rossi C, Gravelle P, Decaup E, et al. Boosting gammadelta T cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by PD-1 blockade in follicular lymphoma. *Oncoimmunology*. 2019;8(3):1554175.
119. Hoeres T, Holzmann E, Smetak M, Birkmann J, Wilhelm M. PD-1 signaling modulates interferon-gamma production by Gamma Delta (gammadelta) T-Cells in response to leukemia. *Oncoimmunology*. 2019;8(3):1550618.
120. Iwasaki M, Tanaka Y, Kobayashi H, et al. Expression and function of PD-1 in human gammadelta T cells that recognize phosphoantigens. *Eur J Immunol*. 2011;41(2):345-355.
121. Lin JX, Leonard WJ. The common cytokine receptor gamma chain family of cytokines. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*. 2018;10(9):a028449.
122. Adachi K, Kano Y, Nagai T, Okuyama N, Sakoda Y, Tamada K. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol*. 2018;36(4):346-351.
123. Chen Y, Sun C, Landoni E, Metelitsa L, Dotti G, Savoldo B. Eradication of neuroblastoma by T cells redirected with an optimized GD2-specific chimeric antigen receptor and interleukin-15. *Clin Cancer Res*. 2019;25(9):2915-2924.
124. Batra SA, Rathi P, Guo L, et al. Glypican-3-specific CAR T cells co-expressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(3):309-320.
125. Avanzi MP, Yeku O, Li X, et al. Engineered tumor-targeted T cells mediate enhanced anti-tumor efficacy both directly and through activation of the endogenous immune system. *Cell Rep*. 2018;23(7):2130-2141.
126. Chinnasamy D, Yu Z, Kerker SP, et al. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1672-1683.
127. Chmielewski M, Abken H. CAR T cells releasing IL-18 convert to T-Bet(high) FoxO1(low) effectors that exhibit augmented activity against advanced solid tumors. *Cell Rep*. 2017;21(11):3205-3219.
128. Hu B, Ren J, Luo Y, et al. Augmentation of antitumor immunity by human and mouse CAR T cells secreting IL-18. *Cell Rep*. 2017;20(13):3025-3033.
129. Koneru M, Purdon TJ, Spriggs D, Koneru S, Brentjens RJ. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology*. 2015;4(3):e994446.
130. Waldmann TA. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018;10(12):a028472.
131. Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(5):329-335.
132. Shum T, Omer B, Tashiro H, et al. constitutive signaling from an engineered IL7 receptor promotes durable tumor elimination by tumor-redirected T cells. *Cancer Discov*. 2017;7(11):1238-1247.
133. Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*. 2018;24(3):352-359.
134. Li F, Simon MC. Cancer cells don't live alone: metabolic communication within tumor microenvironments. *Dev Cell*. 2020;54(2):183-195.
135. Capietto AH, Martinet L, Fournie JJ. How tumors might withstand gammadelta T-cell attack. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(14):2433-2442.
136. Kunzmann V, Kimmel B, Herrmann T, Einsele H, Wilhelm M. Inhibition of phosphoantigen-mediated gammadelta T-cell proliferation by CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology*. 2009;126(2):256-267.
137. Martinet L, Poupot R, Fournie JJ. Pitfalls on the roadmap to gammadelta T cell-based cancer immunotherapies. *Immunol Lett*. 2009;124(1):1-8.
138. Siemens DR, Hu N, Sheikhi AK, et al. Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide. *Can Res*. 2008;68(12):4746-4753.
139. Sureshbabu SK, Chaukar D, Chiplunkar SV. Hypoxia regulates the differentiation and anti-tumor effector functions of gammadelta T cells in oral cancer. *Clin Exp Immunol*. 2020;201(1):40-57.
140. Dunne MR, Mangan BA, Madrigal-Estebas L, Doherty DG. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:704941.
141. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol*. 2001;212(2):110-117.
142. Peters C, Hasler R, Wesch D, Kabelitz D. Human Vdelta2 T cells are a major source of interleukin-9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(44):12520-12525.
143. Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and



- IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol.* 2010;184(12):7268-7280.
144. Peters C, Kabelitz D, Wesch D. Regulatory functions of gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(12):2125-2135.
  145. Ma Y, Aymeric L, Locher C, et al. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med.* 2011;208(3):491-503.
  146. Wu P, Wu D, Ni C, et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity.* 2014;40(5):785-800.
  147. Hu B, Jin C, Zeng X, et al. gammadelta T cells and adipocyte IL-17RC control fat innervation and thermogenesis. *Nature.* 2020;578(7796):610-614.
  148. Peters C, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Phenotype and regulation of immunosuppressive Vdelta2-expressing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(10):1943-1960.
  149. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Blood.* 2011;118(1):129-138.
  150. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, et al. Cold tumors: a therapeutic challenge for immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:168.
  151. Duan Q, Zhang H, Zheng J, Zhang L. Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment. *Trends Cancer.* 2020;6(7):605-618.
  152. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirection T lymphocytes. *Nat Med.* 2015;21(5):524-529.
  153. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors. *Cancer Cell.* 2019;35(6):885-900e810.
  154. Brossart P. The role of antigen-spreading in the efficacy of immunotherapies. *Clin Cancer Res.* 2020;26(17):4442-4447.
  155. Corbiere V, Chapiro J, Stroobant V, et al. Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases. *Can Res.* 2011;71(4):1253-1262.
  156. Devilder MC, Maillat S, Bouyge-Moreau I, Donnadiou E, Bonneville M, Scotet E. Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol.* 2006;176(3):1386-1393.
  157. Van Acker HH, Anguille S, Van Tendeloo VF, Lion E. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2015;4(8):e1021538.
  158. Conti L, Casetti R, Cardone M, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol.* 2005;174(1):252-260.
  159. Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, et al. CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J Immunol.* 2006;177(8):5290-5295.
  160. Bansal RR, Mackay CR, Moser B, Eberl M. IL-21 enhances the potential of human gammadelta T cells to provide B-cell help. *Eur J Immunol.* 2012;42(1):110-119.
  161. Brandes M, Willmann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science.* 2005;309(5732):264-268.
  162. Lai J, Mardiana S, House IG, et al. Adoptive cellular therapy with T cells expressing the dendritic cell growth factor Flt3L drives epitope spreading and antitumor immunity. *Nat Immunol.* 2020;21(8):914-926.
  163. Curran KJ, Seinstra BA, Nikhamin Y, et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression. *Mol Ther.* 2015;23(4):769-778.
  164. Kuhn NF, Purdon TJ, van Leeuwen DG, et al. CD40 ligand-modified chimeric antigen receptor T cells enhance antitumor function by eliciting an endogenous antitumor response. *Cancer Cell.* 2019;35(3):473-488e476.
  165. Ferris ST, Durai V, Wu R, et al. cDC1 prime and are licensed by CD4(+) T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature.* 2020;584(7822):624-629.
  166. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood.* 2012;119(18):4133-4141.
  167. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-1712.
  168. Wang J, Zhang C, Feng B. The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: a customizable toolbox for molecular manipulations. *J Cell Mol Med.* 2020;24(6):3256-3270.
  169. Gwiazda KS, Grier AE, Sahni J, et al. High efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in primary human T-cells using mutant adenoviral E4orf6/E1b55k "Helper" proteins. *Mol Ther.* 2016;24(9):1570-1580.
  170. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 2017;543(7643):113-117.
  171. Roth TL, Puig-Saus C, Yu R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature.* 2018;559(7714):405-409.
  172. Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, Carney JP, Butler KS. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. *Biosci Rep.* 2020;40(4):BSR20200127.
  173. Ren J, Zhang X, Liu X, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget.* 2017;8(10):17002-17011.
  174. Su S, Hu B, Shao J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Sci Rep.* 2016;6:20070.
  175. Choi BD, Yu X, Castano AP, et al. CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):304.
  176. Dai X, Park JJ, Du Y, et al. One-step generation of modular CAR-T cells with AAV-Cpf1. *Nat Methods.* 2019;16(3):247-254.
  177. Zhang W, Shi L, Zhao Z, et al. Disruption of CTLA-4 expression on peripheral blood CD8 + T cell enhances anti-tumor efficacy in bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019;83(5):911-920.
  178. Zhang Y, Zhang X, Cheng C, et al. CRISPR-Cas9 mediated LAG-3 disruption in CAR-T cells. *Front Med.* 2017;11(4):554-562.
  179. Andrews LP, Yano H, Vignali DAA. Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups. *Nat Immunol.* 2019;20(11):1425-1434.
  180. Beavis PA, Henderson MA, Giuffrida L, et al. Targeting the adenosine 2A receptor enhances chimeric antigen receptor T cell efficacy. *J Clin Invest.* 2017;127(3):929-941.
  181. Ninomiya S, Narala N, Huye L, et al. Tumor indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs. *Blood.* 2015;125(25):3905-3916.
  182. Naidoo J, Page DB, Li BT, et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol.* 2015;26(12):2375-2391.
  183. Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol.* 2014;5:254.
  184. Dong MB, Wang G, Chow RD, et al. Systematic immunotherapy target discovery using genome-scale in vivo CRISPR screens in CD8 T cells. *Cell.* 2019;178(5):1189-1204e1123.
  185. Shifrut E, Carnevale J, Tobin V, et al. Genome-wide CRISPR screens in primary human T cells reveal key regulators of immune function. *Cell.* 2018;175(7):1958-1971e1915.
  186. Wei J, Long L, Zheng W, et al. Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy. *Nature.* 2019;576(7787):471-476.

187. Roth TL, Li PJ, Blaeschke F, et al. Pooled knockin targeting for genome engineering of cellular immunotherapies. *Cell*. 2020;181(3):728-744e721.
188. Chen J, Lopez-Moyado IF, Seo H, et al. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature*. 2019;567(7749):530-534.
189. Lynn RC, Weber EW, Sotillo E, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature*. 2019;576(7786):293-300.
190. Vardhana SA, Hwee MA, Berisa M. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation limits the self-renewal of T cells exposed to persistent antigen. *Nat Immunol*. 2020;21(9):1022-1033.
191. Ni J, Wang X, Stojanovic A, et al. Single-Cell RNA sequencing of tumor-infiltrating NK Cells Reveals That Inhibition Of Transcription Factor HIF-1alpha unleashes NK cell activity. *Immunity*. 2020;52(6):1075-1087e1078.
192. Manzo T, Prentice BM, Anderson KG, et al. Accumulation of long-chain fatty acids in the tumor microenvironment drives dysfunction in intrapancreatic CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2020;217(8):e20191920.
193. Kumagai S, Togashi Y, Sakai C, et al. An oncogenic alteration creates a microenvironment that promotes tumor progression by conferring a metabolic advantage to regulatory T cells. *Immunity*. 2020;53(1):187-203.e8.
194. Girardi M, Glusac E, Filler RB, et al. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRAlphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med*. 2003;198(5):747-755.
195. Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, et al. Cancer immunosurveillance by tissue-resident innate lymphoid cells and innate-like T cells. *Cell*. 2016;164(3):365-377.
196. Park SL, Buzzai A, Rautela J, et al. Tissue-resident memory CD8(+) T cells promote melanoma-immune equilibrium in skin. *Nature*. 2019;565(7739):366-371.
197. Park SL, Gebhardt T, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells in cancer immunosurveillance. *Trends Immunol*. 2019;40(8):735-747.
198. Pan Y, Tian T, Park CO, et al. Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. *Nature*. 2017;543(7644):252-256.
199. Mackay LK, Minnich M, Kragten NA, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science*. 2016;352(6284):459-463.
200. Milner JJ, Toma C, Yu B, et al. Runx3 programs CD8(+) T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature*. 2017;552(7684):253-257.
201. Miragaia RJ, Gomes T, Chomka A, et al. Single-cell transcriptomics of regulatory T cells reveals trajectories of tissue adaptation. *Immunity*. 2019;50(2):493-504e497.
202. Delacher M, Imbusch CD, Hotz-Wagenblatt A, et al. Precursors for nonlymphoid-tissue treg cells reside in secondary lymphoid organs and are programmed by the transcription factor BATF. *Immunity*. 2020;52(2):295-312e211.
203. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013;152(5):1173-1183.
204. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013;154(2):442-451.
205. Brezgin S, Kostyusheva A, Kostyushev D, Chulanov V. Dead Cas systems: types, principles, and applications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):6041.
206. Zhang J, Chen L, Zhang J, Wang Y. Drug inducible CRISPR/Cas systems. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1171-1177.
207. Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*. 2015;160(1-2):339-350.
208. Campa CC, Weisbach NR, Santinha AJ, Incarnato D, Platt RJ. Multiplexed genome engineering by Cas12a and CRISPR arrays encoded on single transcripts. *Nat Methods*. 2019;16(9):887-893.
209. Pandelakis M, Delgado E, Ebrahimkhani MR. CRISPR-based synthetic transcription factors in vivo: the future of therapeutic cellular programming. *Cell Syst*. 2020;10(1):1-14.

**How to cite this article:** Rafia C, Harly C, Scotet E. Beyond CAR T cells: Engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to fight solid tumors. *Immunol. Rev.* 2020;00:1-17. <https://doi.org/10.1111/imr.12920>

## Liste des publications

- **Rafia C.**, Harly C., et Scotet E. « Beyond CAR T Cells: Engineered V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells to Fight Solid Tumors ». *Immunological Reviews* 298, n° 1 (2020): 117-33. <https://doi.org/10.1111/imr.12920>.
- Cano C. E., Pasero C., De Gassart A., Kerneur C., Gabriac M., Fullana M., Granarolo E., Hoet R., Scotet E., **Rafia C.**, Hermann T., Imbert C., Grovel L., Vey N., Briantais A., le Floch AC., Olive D. « BTN2A1, an Immune Checkpoint Targeting V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Cytotoxicity against Malignant Cells ». *Cell Reports* 36, n° 2 (2021): 109359. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109359>.
- **Rafia C.**, Loizeau C., Renoult O., Harly C., Pecqueur C., Joalland N., Scotet E. « A dramatic impairment of the antitumor activity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell is induced by TGF- $\beta$  through combined phenotype, transcriptomic and metabolic changes ». *Submitted*

## Liste des communications

2019

- Congrès de la Société Française d'Immunologie (SFI), 12 – 14 novembre, Nantes  
Présentation orale

2021

- Webinaire pour le Club des Jeunes immunologies Français (FCYI), 26 janvier, virtuel  
Présentation orale, récompensée « top 3 speakers »
- Webinaire pour la SFI, 18 mars, virtuel  
Invitée pour une présentation orale
- Congrès Européen d'Immunologie (ECI), 1 – 4 septembre, virtuel  
Présentation d'un poster
- Conférence International des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , 5 – 8 novembre, virtuel  
Présentation orale
- Congrès de la SFI, 7 – 9 décembre, Paris  
Présentation orale

## Conclusion personnelle

Ces années de thèse ne peuvent se résumer à l'acquisition de nouvelles compétences techniques ou un certain nombre de publications. Cette expérience très intense et riche permet aussi de s'ouvrir à de nombreux autres aspects de la recherche.

J'ai notamment eu l'opportunité de confirmer mon intérêt pour le partage et la transmission du savoir. Avoir la possibilité de donner des cours à la faculté des sciences a été une expérience très enrichissante et m'a permis de confirmer mon attrait pour l'enseignement. Aussi, participer à l'encadrement de stagiaires et ainsi à leur épanouissement scientifique a été très enrichissant tant sur le plan pédagogique qu'humain.

Une autre expérience très enrichissante a été de pouvoir participer à plusieurs congrès mais aussi de mettre en place une collaboration avec un laboratoire étranger. Mis à part le fait de gagner progressivement en confiance lors de mes communications orales, il s'agit aussi de moments privilégiés de partages, de rencontres et d'apprentissage.

Réaliser une thèse peut être drainant mentalement, d'autant plus durant une pandémie. Cette période a été l'occasion de prise de conscience personnelle et de remise en question pour beaucoup de doctorants. Dans ces moments, nombreux sont ceux à avoir ressenti un sentiment d'isolement. C'est alors que participer à la création puis activement dans le bureau d'une association a été une occasion supplémentaire d'apprendre des autres et d'essayer de créer une communauté pour les doctorants en Biologie-Santé de Nantes. Cette association m'a permis d'organiser des événements en contactant des personnes auxquelles je n'aurais jamais osé envoyer un email avant. J'ai pris un grand plaisir à rencontrer les nombreuses personnes impliquées dans ce projet et voir cette association se mettre en place et continuer aujourd'hui à promouvoir toujours plus de partage – scientifique ou non – entre les doctorants.

**Titre :** Modalité d'activation antigénique des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 humains : rôle des butyrophilines BTN3A et BTN2A1

**Mots clés :** lymphocyte T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, synapse immunologique, immunologie moléculaire

**Résumé :** Les lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 humains exercent une immunosurveillance continue pour détecter et éliminer les cellules cibles transformées ou infectées. Cette population d'effecteurs particuliers est activée, de manière dépendante du TCR, par des antigènes phosphorylés non peptidiques dérivés du soi, et implique les butyrophilines BTN3A1/BTN2A1, mais pas les molécules du CMH. Bien que le résultat fonctionnel ne soit pas lié à la formation d'une synapse immunologique (SI) bien structurée, c'est la première étape que les cellules doivent franchir. Les SI sont des jonctions cellulaires spécialisées caractérisées par une apposition étroite de la membrane de la cellule immunitaire avec la membrane d'une autre cellule, une adhésion, une stabilité et une sécrétion dirigée. Ce phénomène a été découvert dans les années 70 et plus

récemment, une variété dans la structure des SI pour différents types d'interactions entre cellules immunitaires a été montrée, soulevant la question de la nature des IS formés pendant l'activation des lymphocytes T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. En combinant la reconstitution biochimique d'une SI à l'aide de bicouches lipidiques artificielles supportées par du verre et de la microscopie à haute résolution, nous avons pu visualiser et décrire cette synapse. Un intérêt tout particulier a été mis sur le rôle précis des butyrophilines BTN2A1, BTN3A1 et de ses isoformes. En ligne avec les études récentes des équipes de Willcox & Hermann, montrant BTN2A1 comme le ligand du TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, nos résultats proposent une vision plus fine de ce processus complexe d'activation antigénique, qui implique BTN2A1 & BTN3A1.

**Title:** Modality of antigenic activation of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes: role of butyrophilins BTN3A and BTN2A1

**Keywords :** V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes, immune synapse, molecular immunology

**Abstract:** Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes enforce a non-stop immunosurveillance to sense and eliminate transformed or infected target cells. This peculiar effector subset is activated, in a TCR-mediated manner, by Self-derived non-peptidic phosphorylated antigens, and involves BTN3A1/BTN2A1 butyrophilins, but not MHC molecules. Even if the functional outcome is uncoupled to the formation of a well-structured immunological synapse (IS); it is the first step the cells must take. IS are specialized cell-cell junctions characterized by close apposition of the immune cell membrane with the membrane of another cell, adhesion, stability and directed secretion. This phenomenon has been discovered in the 70s and more recently, a variety in the structure

of IS for different types of immune cell interactions have been shown, raising the question about the nature of the IS formed during the activation of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. Combining biochemical reconstitution of an IS using glass-supported lipid bilayers with high-resolution microscopy, we were able to visualize and describe this synapse. A particular focus was made on the precise role of the butyrophilins BTN2A1, BTN3A1 and isoforms. In line with the recent studies of Willcox & Hermann's teams, showing BTN2A1 as the ligand of the V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR, our findings propose a deeper view of this complex antigenic activation process, which implicates BTN2A1 & BTN3A1.