



HAL
open science

Étude de l'implication de la protéine RhoB lors de l'activation des lymphocytes T gamma9 delta2 dans un modèle de cancer du poumon

Chloé Laplagne

► **To cite this version:**

Chloé Laplagne. Étude de l'implication de la protéine RhoB lors de l'activation des lymphocytes T gamma9 delta2 dans un modèle de cancer du poumon. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02959076

HAL Id: dumas-02959076

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02959076>

Submitted on 6 Oct 2020

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.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020

Thèse n°88

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par LAPLAGNE, Chloé

Née le 26/09/1992 à LYON (69)

Le 11 Septembre 2020 à Toulouse (31)

**ETUDE DE L'IMPLICATION DE LA PROTEINE RHOB
LORS DE L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T γ 9 δ 2
DANS UN MODELE DE CANCER DU POUMON**

Sous la direction de :

Mary POUPOT

Membres du jury :

Mme MAMANI MATSUDA, Maria

M. FAVRE, Gilles

M. TREINER, Emmanuel

Mme. POUPOT, Mary

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

*A mes parents,
Pour votre amour et votre soutien*

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier le **Professeur Maria MAMANI MATSUDA**, qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également le **Professeur Gilles FAVRE** et le **Professeur Emmanuel TREINER**, qui ont accepté de juger ces travaux de thèse et de participer au jury.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, **Mary POUPOT**. Je te remercie pour m'avoir confié ce projet de thèse, m'avoir guidé et accompagné au cours de ces trois années. Je te remercie également pour avoir été à l'écoute, disponible et avoir su me rebooster lors de mes coups de mou !

Je remercie très sincèrement **Jean-Jacques FOURNIE** pour avoir accepté que j'intègre l'équipe 9 du CRCT il y a trois ans. Merci pour tes échanges et tes précieux commentaires en réunion pour faire avancer le projet. Ton accessibilité et ton écoute ont été très appréciables au quotidien.

Je souhaite également remercier particulièrement le **Professeur Camille LAURENT**, pour tes conseils en réunion d'équipe et ton soutien.

Je souhaite maintenant remercier très chaleureusement **tous les membres de la super équipe 9 du CRCT** (mais aussi la Tim-3, la Team diadème ou encore la Table 45 ...). Un grand merci pour votre soutien et votre écoute. Vous m'avez énormément apporté au quotidien ! Merci pour ces moments d'évasion en dehors du labo ; à nos quizz, nos barathons, nos joggings (promis je m'y remets ...) et le team bulding (on se souviendra encore longtemps d'Orlu plein le *** !).

Anne, pour tes précieux conseils scientifiques, mais aussi de lecture !

Chris, pour tes remarques constructives en réunion et pour m'avoir inculqué des réflexes écologiques !

Olivia, pour ton écoute, ton soutien et ton aide dans mes manip freestyles !

Sarah C, merci pour ta franchise et ton écoute.

Carla, j'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés pour les manip MALC/TGD. Merci pour ton aide. Bon courage pour la suite de ta thèse !

Don Marc, merci pour tes précieux conseils et ton écoute.

Fabien, merci pour tes conseils en microscopie, ton aide et ton écoute !

Julie (alias Dora l'exploratrice), merci pour tous ces voyages qui m'auront permis de m'évader

Remerciements

par procuration, pour ton sens de l'organisation hors pair et ton soutien. Garde cette motivation!

Marcin, thank you a lot for your support and for all our interesting discussions. I would like to wish you the best for the end of your PhD. And don't eat too much compote ;)

Pauline, merci pour ton écoute et ton aide.

Nicolas, merci pour ton soutien ! Bon courage pour la suite de ta thèse. Désolée, je ne résiste pas à l'idée de te mettre une dernière fois *Baby Shark* dans la tête 🎵.

Benoit (Monsieur Doodle), merci pour ta spontanéité et ta motivation hors pair très appréciable lors de ton année passée avec nous ! A ta prochaine soutenance !

Sarah M, merci pour ton implication pendant ton stage de M2, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je souhaite également remercier les **membres de l'équipe 3 du CRCT**, avec qui j'ai eu la chance de travailler sur ce projet.

Stéphanie, je te remercie sincèrement pour ton écoute, ton aide et ta disponibilité même dans les moments de rush, pour optimiser et terminer les manips SPLIT GFP avec nos lymphocytes. Tes échanges m'ont énormément appris.

Je souhaite également remercier **Olivier** pour ton implication dans la collaboration, via la réalisation des lignées RhoB KO.

Je souhaite aussi remercier particulièrement **Sarah Figarol**, pour la caractérisation de ces lignées. Bon courage pour la dernière ligne droite, je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite, sur le plan personnel et professionnel !

Une mention spéciale également pour **Delphine**, pour ton aide sur les PC9 et ta bonne humeur lorsque je te croisais dans les couloirs du second !

Je souhaite aussi remercier les **membres du plateau technologique du CRCT**, et particulièrement **Laetitia**, **Manon** et **Christèle**, pour vos précieux conseils pour guider mes manips.

Je souhaiterais maintenant remercier les **amis rencontrés lors de ces 5 belles années d'internat à Toulouse**.

A mes supers copines **Léa**, **Ines** et **Sarah B**, pour nos weekends « randos » et nos soirées sushis ! Merci pour votre soutien sans faille ! Ne changez rien et surtout, continuez de râler, c'est bon pour la santé !

Léa (Raton Râleur), je te souhaite de t'éclater lors de ton tour du monde, n'oublies pas de poster les photos Insta ... ! Et plus sérieusement je souhaite que tu t'épanouisses dans ta vie personnelle et professionnelle.

Remerciements

Ines (Princesse Nini), je te souhaite pleins de bonheur à Tarbes ! Merci pour ton soutien, ton humour et ta motivation !

Sarah B, bon courage pour la suite de ta vie professionnelle, et bien sûr d'être heureuse dans ta vie personnelle !

A la **team Presbytère** :

Alix, Félicien, Justine, Rémy, Eléonore, Guillaume, Sophie et **Florent**. Pour votre enthousiasme, votre spontanéité, votre amour du barbecue et tous nos Mégabus ! Chaud pour décliner le concept en weekend en montagne ?

Alix, je te remercie pour ton écoute et ton soutien !

Félicien, merci pour m'avoir fait partager ton goût de la « bonne musique ».

Mention spéciale à **Assistante Juju**, merci pour ton peps et ton soutien.

Eléonore, merci pour ton humour et ton écoute.

Aux « **anciens internes** », qui gardent quand même toute leur fraîcheur, pour m'avoir convertie aux parties de pétanques ... et pour nos soirées au Café de Toulouse !

Caro M, merci ton franc parlé, ton énergie contagieuse et ta joie de vivre.

Chloé, merci pour tes conseils musicaux (à quand le prochain concert d'ailleurs ?) et ton soutien.

Laura, Isabelle, et **Pierre**, merci pour votre soutien !

Mais aussi, un grand merci :

A toutes les autres belles rencontres de l'internet :

Marie B (Joyeux anniversaire !!!), **Pauline C, Mathilde S, Aude T, Nolwenn, Julien V, Panthéa, Jean M, Vincent, Marie C, Camille G, Charlotte RL, Pauline G, Charlotte R, Laure T, Iris, Emeline S, Jojo, Loïc, Thomas S.**

Aux autres internes IPR !

Maud, Lorraine & Marie, je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Je souhaiterais également remercier mes **amies de la promo du M2 Immunologie et Maladies Infectieuses** :

Emeline, Ar(rrr)antxa et **Marion**. Merci pour votre soutien et ces bons moments partagés ! Bon courage pour la fin de vos thèses ! Marion, on vient vite te voir à Paris ! Vive le Pays Basque et la Catalogne ... mais Lyon c'est quand même vachement mieux !

Je souhaiterais aussi remercier **mes copines de la faculté de pharmacie de Lyon**. Même si avec la distance nos retrouvailles se font plus rares, votre soutien et votre amitié a

Remerciements

énormément comptée dans la dernière ligne droite.

A **Christelle**, ma super binôme, tu es tout simplement géniale ! Je te souhaite le meilleur pour la suite avec Max et qu'on se revoit vite à Lyon.

A **Marie**, merci pour ta bonne humeur, ton grain de folie et ta motivation sans faille ! Je te souhaite pleins de bonheur avec Olivier, et dans ta vie professionnelle.

A **Caro S**, merci pour ton écoute ! Je vous souhaite pleins de bonheur tous les trois avec Julien et votre petit Hugo !

A **Camille L**, bon courage pour la fin de ta thèse ! Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite !

Mais aussi, à **Eléna**, pour ta spontanéité et ton écoute ; à **Pauline L**, et à **Violaine** pour votre soutien !

Je souhaiterais remercier **mes copines de lycée**, pour votre soutien et votre amitié.

A **Camille T**, pour ton franc parlé et ton écoute.

A **Hélène**, pour ton soutien et tes appels réguliers pendant le confinement.

A **Margaux**, pour ton grain de folie et ta motivation !

Je souhaite remercier chaleureusement **ma famille**, qui m'a apporté son soutien pendant ces 10 années d'études. Promis maintenant c'est fini !

Papa, je te remercie pour ton écoute et tes conseils. Depuis toute petite tu es pour moi un modèle de force, de justesse et de modestie indéfectible. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi avec **Maman**. Vois en ce travail toute ma reconnaissance et mon amour.

Mathilde, merci pour ton soutien et ces weekends d'évasion à Paris et ailleurs.

Mais aussi à mes **grands-mères**, pour votre amour. **Madou**, pour ta détermination, ton amour et tous ces bons souvenirs qui m'accompagnent encore tous les jours.

A mes tantes **Brigitte** et **Sylvie**, pour votre soutien et pour m'avoir transmis la vocation de travailler dans la santé.

A **Joelle**, **Michel**, **Philippe** et **Hervé** pour votre soutien.

A **MH**, pour tout ce que tu as fait pour nous, pour ton écoute et ton soutien.

A **Camille**, **Thomas**, **Lou**, **Solène** et **Auriane**, merci pour tout.

Rémi, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien sans faille.

Tu as su partager mes doutes et ma déception après les mauvaises journées, en trouvant toujours les mots justes pour me remotiver.

Merci d'avoir croisé ma route ce dimanche matin (avec ton sac poubelle ...) à Ranguel.

Merci pour tout ce bonheur que tu m'apportes au quotidien, pour ton amour.

Pour tout ce qu'on a déjà construit et pour notre futur, je t'aime

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	19
PARTIE I. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale et mécanismes de la réponse immunitaire.....	21
I.I. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale innée	21
I.I.A. Les cellules dendritiques	22
I.I.B. Les cellules NK	24
I.I.B.1. Les récepteurs de cellules NK.....	25
I.I.B.2. Les fonctions cytolytiques et anti-tumorales des cellules NK	28
I.II. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale adaptative	29
I.II.A. Les lymphocytes T CD4	31
I.II.B. Les lymphocytes T CD8	34
PARTIE II. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2	37
II.I. Développement et répertoire des LT V γ 9V δ 2	37
II.I.A. Développement.....	37
II.I.B. Répertoire	39
II.II. Fonctionnalités des LT V γ 9V δ 2	41
II.II.A. Pléiotropie fonctionnelle et plasticité cellulaire.....	41
II.II.B. Implication des LT $\gamma\delta$ dans l'immunité tumorale	41
II.III. Sous-populations de LT V γ 9V δ 2	49
II.IV. Réactivité des LT V γ 9V δ 2	50
II.IV.A. Antigènes reconnus par les LT V γ 9V δ 2	50
II.IV.A.1. Phosphoantigènes	51
II.IV.A.2. Les alkylamines et aminobiphosphonates.....	53
II.IV.B. Reconnaissance des phosphoantigènes par le TCR V γ 9V δ 2	55
II.IV.C. Partenaires impliqués au cours de la reconnaissance des PAgS par les LT V γ 9V δ 2	55
II.IV.C.1. Les butyrophilines.....	56
II.IV.C.2. F1-ATP synthase, Apo A1 et ABCA1	60
II.IV.C.3. RhoB	62
II.IV.C.4. La Périplakine.....	63
II.IV.D. Récepteurs complémentaires à la réactivité des LT V γ 9V δ 2	64
II.IV.D.1. Les NKRs	64
II.IV.D.2. Les Toll-like receptors.....	65
II.IV.D.3. Les récepteurs aux cytokines	65
II.IV.D.4. Les molécules d'adhésion.....	66
II.V. Applications cliniques des LT V γ 9V δ 2.....	67

Table des matières

II.V.A. Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle	68
II.V.B. Nouvelles stratégies d'immunothérapies à base de LT $\gamma\delta$	72
PARTIE III. LA PROTEINE RhoB	79
III.I. Généralités sur la famille des petites GTPases Rho	79
III.I.A. Structure	80
III.I.B. Cycle d'activation/inactivation des petites GTPases Rho	80
III.I. C. Régulateurs des GTPases Rho.....	81
III.II. La protéine RhoB.....	82
III.II.A. Structure de RhoB.....	82
III.II.B. Régulation de RhoB	83
III.II.C. Techniques d'étude de RhoB dans les cellules	85
III.II.D. Fonctionnalités de RhoB dans les cancers.....	87
III.II.E. Fonctionnalités de RhoB dans l'immunité.....	90
DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	93
RESULTATS	97
I. Contexte et objectifs du projet	99
II. Publication scientifique	101
III. Conclusion	136
DISCUSSION.....	139
BIBLIOGRAPHIE.....	145
SERMENT DE GALIEN.....	167

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Devenir des DC dans les nœuds lymphatiques drainant.....	22
Figure 2 : Principales DC humaines reconnaissant différents TLRs.....	23
Figure 3 : Principales caractéristiques du processing de l'élément dangereux par les DC	24
Figure 4 : Les récepteurs exprimés par les cellules NK	25
Figure 5 : Présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II.....	32
Figure 6 : Présentation des différents sous-types de LT CD4 ⁺	33
Figure 7 : Présentation antigénique par les molécules de CMH de classe I.....	34
Figure 8 : Stades de développement des LT $\gamma\delta$ et LT $\alpha\beta$	38
Figure 9 : Vagues de développement des LT $\gamma\delta$ chez l'homme.....	38
Figure 10 : Organisation des loci des gènes du TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ humain	39
Figure 11 : Classification des LT $\gamma\delta$ suivant leurs fonctions tumorales	41
Figure 12 : Potentiel cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cellules cancéreuses.....	45
Figure 13 : Structures chimiques des principaux PAgS naturels et synthétiques.....	51
Figure 14 : Voies de biosynthèse du Mévalonate et du DOXP.....	52
Figure 15 : Structures chimiques des principaux ABP	54
Figure 16 : Structures schématiques des 3 isoformes des BTN3A.	56
Figure 17: Modèles théoriques de l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains	57
Figure 18 : Modèle d'interaction proposé de la BTN2A1 dans l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains	59
Figure 19 : Mécanismes impliqués dans le relargage de l'IPP par les DC traitées au zolédronate	61
Figure 20 : Modèle d'interaction proposé de RhoB dans l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains	62
Figure 21: Les nouveaux concepts de thérapies sélectives applicables aux LT $\gamma\delta$	73
Figure 22 : Arbre phylogénétique de la famille des petites GTPases Rho.....	79
Figure 23 : Cycle d'activation/inactivation des protéines Rho.	80
Figure 24 : Structure schématique de la protéine RhoB.....	82
Figure 25 : Adaptation du système Split-GFP pour le monitoring des petites RhoGTPases ..	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des réponses immunitaires innées et adaptatives. .21	
Tableau 2 : Structures des antigènes TUBag51	
Tableau 3 : Essais cliniques utilisant les LT V γ 9V δ 2 terminés.....68	
Tableau 4: Résumé du rôle bivalent de la protéine RhoB dans différents cancers.....87	

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCA-1	ATP-binding cassette transporter A1
ABP	Aminobiphosphonate
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
BrHPP	Bromohydrine pyrophosphate
BSA	bovine serum albumin
BTK	Bruton Tyrosine Kinase
BTN	Butyrophiline
BTN2A1	butyrophiline 2 isoforme A1
BTN3A1	butyrophiline 3 isoforme A1
CAR T cells	Chimeric antigen receptors expressing T cell
CD	Cluster de différenciation
c-HDMAPP	(E)-5-hydroxy-4-methylpent-3-enyl pyrophosphate
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Corps multivésiculaires
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CRCT	Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
CTLA-4	Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques-4
CXC	chémokine (récepteur ou ligand)
DAMP	Motif moléculaire associé aux signaux de danger
DC	Cellules dendritiques
DN	Double négatif
DOT	Delta one T cells
DOXP	1-désoxy--xylulose-5-phosphate
DR4-5	Récepteurs de mort 4/5
EGFR	Epithelial growth factor (EGF) receptor
FasL	Ligand de Fas
Fc	Fragment constant des immunoglobulines (Ig)
FcR	Récepteur au fragment constant (Fc)
FPP	Farnésyl diphosphate
FPPS	Farnésyl diphosphate synthase

Liste des abréviations

GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein
HCMV	Human cytomegalovirus
HDMAPP	(E)-Hydroxydiméthylallyl pyrophosphate
HMB-PP	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-CoA
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
ICOS	Inducible T cell costimulator
IDO	Indoléamine 2,3 dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine
ILT2	Immunoglobulin-like transcript 2
ILC	Cellules lymphoïdes innées
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
KIR	Récepteur apparenté aux Ig des cellules tueuses
Knock-down (KO)	Diminution forcée de l'expression d'un gène
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LB	Lymphocyte B
LFA-1/3	Lymphocyte function associated antigen 1/3
LT	Lymphocyte T
LPS	Lipopolysaccharide
MICA/B	MHC class I polypeptide-related sequence A/B
MVA	Mévalonate
NK	Natural Killer
NKG2	Natural Killer cell lectin-like receptor 2
NKR	Récepteurs caractéristiques des cellules NK
PAg	Phosphoantigène
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	Phosphate buffer saline
PD-1	Récepteur de mort programmée-1
PD-L1	Ligand du récepteur de mort programmée-1
PFA	Para-formaldéhyde
PRR	Récepteurs reconnaissant les motifs (de danger)

Liste des abréviations

RAG	Gène activateur de la recombinaison
RTX	Rituximab
siRNA	Petits acides ribonucléiques interférents
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	Sérum de veau foetal
TAP	Transporter associated with antigen processing
T _{CM}	Lymphocyte T central mémoire
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TEG	T cells engineered with defined $\gamma\delta$ TCR
T _{EM}	Lymphocyte T effecteur mémoire
T _{EMRA}	Lymphocyte T effecteur avec différenciation terminale
Tfh	Follicular B-helper T cells
TGF- β	Transforming growth factor β
Th	T helper
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TILs	Lymphocytes infiltrants les tumeurs
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-like receptors
T _N	Lymphocytes T naïf
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAIL	Ligand inducteur d'apoptose apparenté au TNF
Tregs	T régulateurs
ULBPs	UL16 binding proteins
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VISTA	V-domain Ig suppressor of T cell activation

PREAMBULE

L'utilisation de l'immunothérapie dans les cancers est en pleine expansion depuis plusieurs dizaines d'années. Cette explosion est en partie due à la découverte majeure de points de contrôles immunitaires appelés *immune checkpoint receptors* et donc au développement d'anticorps monoclonaux bloquant ces points de contrôles. Les thérapies ciblant les molécules *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) et *programmed cell death protein-1* (PD-1) ont démontré des réponses objectives dans les mélanomes, les cancers du rein et du poumon. Cependant certains patients atteints de ces pathologies restent réfractaires à ces thérapies. De nombreux acteurs du système immunitaire ont été identifiés comme participant à l'immunité anti-tumorale, notamment les lymphocytes.

Historiquement, mon équipe d'accueil s'est particulièrement intéressée à l'implication des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la réponse immunitaire anti-tumorale et a été l'une des pionnières dans la conduction d'essais thérapeutiques utilisant cette approche. Au cours de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les cancers, notamment via l'implication d'une Rho GTPase appelée RhoB et identifiée par nos collaborateurs comme pouvant participer à l'activation de ces lymphocytes par les phosphoantigènes.

Ce manuscrit, clôturant mes études de pharmacie et mes travaux de thèse doctorale, est composé d'une introduction comportant trois grandes parties. La première partie de l'introduction décrit les principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale et les mécanismes de la réponse immunitaire. La seconde partie présente les caractéristiques des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et leur place dans l'immunité anti-tumorale. La troisième partie décrit les caractéristiques de la petite Rho GTPase RhoB, ses fonctions biologiques et les méthodes d'étude de cette protéine. La suite du manuscrit comporte les résultats obtenus au cours de ma thèse doctorale, qui présentent le rôle de RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2, sous forme d'un article scientifique publié. Enfin, une partie discussion conclue le manuscrit afin de commenter les résultats obtenus lors de ces travaux.

INTRODUCTION

PARTIE I. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale et mécanismes de la réponse immunitaire

Le système immunitaire comprend un ensemble de cellules et de tissus assurant l'immunité de l'organisme, afin de le protéger contre des agressions microbiennes ou tumorales. On oppose classiquement l'immunité innée et l'immunité adaptative, impliquant chacune des acteurs différents et présentant des caractéristiques propres (Tableau 1). A la frontière de ces deux volets, on retrouve les lymphocytes T (LT) non conventionnels, dont les lymphocytes T $\gamma\delta$, qui possèdent des caractéristiques communes à l'immunité innée et adaptative.

		Immunité innée	Immunité adaptative
Chronologie	Primo-infection	Réponse rapide Première barrière contre les pathogènes	Seconde ligne de défense (temps de latence \pm 7 jours)
	Infections répétées	Identique à la réponse primaire	Mémoire immunitaire -> temps de latence quasi nul
Spécificité		Réponse non spécifique	Réponse spécifique (Ig et TCR)
Motifs moléculaires reconnus		Invariables et communs à de nombreux pathogènes	Propres à l'agent infectieux
Effecteurs cellulaires et moléculaires			

Tableau 1 : Principales caractéristiques des réponses immunitaires innées et adaptatives.

Le chapitre suivant présente succinctement les principaux effecteurs impliqués dans l'immunité anti-tumorale innée et adaptative, ainsi que les différentes étapes aboutissant à la réponse immunitaire. Les LT $\gamma\delta$, qui font l'objet de cette étude, seront plus longuement détaillés dans la partie II de l'introduction de ce manuscrit.

I.I. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale innée

L'immunité innée se caractérise par une mobilisation rapide de divers acteurs cellulaires et constitue une première ligne de défense pour le système immunitaire (Tableau 1). Ses modes d'action sont invariables et non adaptables. Les cellules de l'immunité innée interviennent rapidement dans la réponse immunitaire et de façon non spécifique contre les cellules tumorales, reconnues comme anormales pour l'organisme, sans engendrer de

mémoire immunologique. Il existe trois principaux types de cellules immunitaires sentinelles de l'immunité innée : les macrophages résidents, les mastocytes et les cellules dendritiques (DC) immatures, qui sont toutes qualifiées de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) grâce à leur capacité de présentation antigénique. D'autres cellules immunitaires impliquées dans l'immunité innée anti-tumorale sont dites circulantes : les *Natural Killers* (cellules NK), les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les *innate lymphoid cells*. Dans ce manuscrit, nous décrivons uniquement un type de CPA : les DC et un type de cellules circulantes : les cellules NK qui participent à l'immunité innée.

I.I.A. Les cellules dendritiques

Les DC, découvertes par Paul Langerhans puis caractérisées par Steinman en 1973, sont des cellules rares présentant des dendrites. Comme les autres CPA, elles vont capturer, transporter, processor et présenter les antigènes aux cellules T ⁽¹⁾. Il s'agit d'une population hétérogène ayant une origine myéloïde ou lymphoïde, dont le marqueur caractéristique est DC-SIGN. Elles sont présentes dans les tissus sous un état immature et dans les organes lymphoïdes secondaires sous un état mature. A l'état immature, les DC vont être de véritables sentinelles puisqu'elles vont en permanence échantillonner l'environnement antigénique des tissus périphériques (Figure 1).

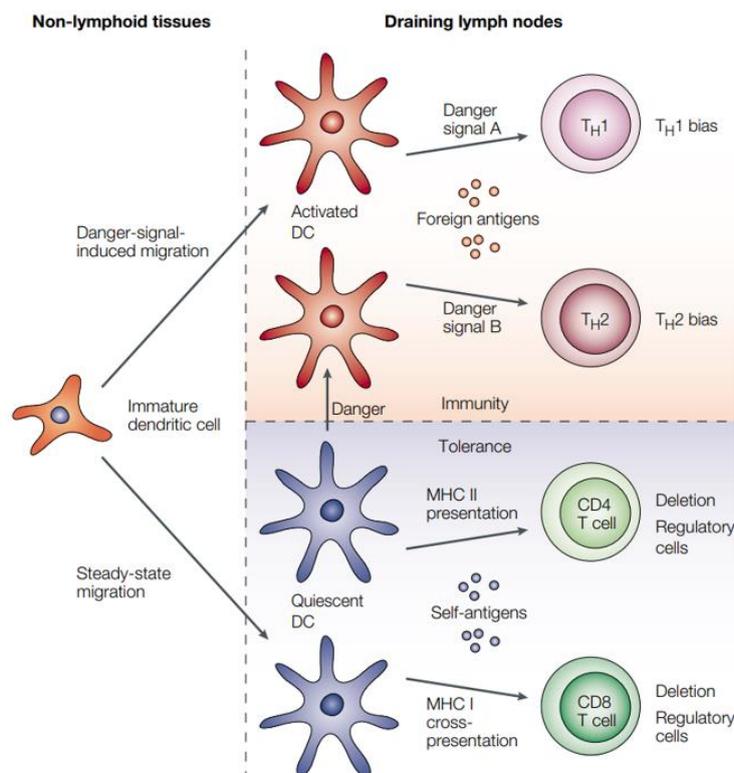


Figure 1 : Devenir des DC dans les nœuds lymphatiques drainant. ⁽²⁾

Introduction – Partie I

Comme indiqué sur ce schéma, les DC vont diriger les différents types de réponses des lymphocytes T dans l'organisme. En effet, elles participent à la sélection négative dans le thymus, à la mise en place de la tolérance périphérique ou encore à l'initiation de la réponse effectrice et mémoire des lymphocytes T. Si l'antigène chargé par la DC est un antigène du soi, elle va migrer sous forme quiescente dans les organes lymphoïdes secondaires pour maintenir la tolérance périphérique. Les dommages tissulaires et l'inflammation provoqués par un cancer vont en revanche activer les DC et entraîner l'augmentation de leur migration dans le tissu lymphoïde, dans lequel ils signalent aux lymphocytes T la présence d'un antigène étranger amorçant une réponse immunitaire. En effet, les DC reconnaissent des signaux de danger appelés PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*) exprimés par les pathogènes et les cellules cancéreuses via leurs récepteurs PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*). Parmi les PRRs, les plus connus sont les TLRs (Toll-Like receptors) dont il existe différents sous-types (Figure 2).

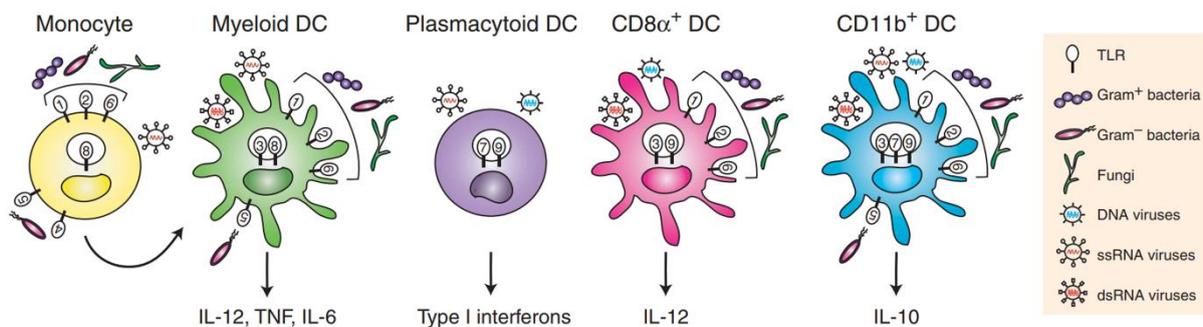


Figure 2 : Principales DC humaines reconnaissant différents TLRs. ⁽³⁾

Ce schéma représente les différents types de DC humaines, exprimant différents TLR à leur surface, leur permettant de détecter des motifs moléculaires de danger provenant par exemple d'agents pathogènes. Lorsque les PRRs sont activés sur les DC, ces dernières vont endocytter l'élément dangereux puis subir une phase de maturation entraînant des modifications phénotypiques, fonctionnelles et morphologiques. En effet, elles perdent l'expression des récepteurs d'endocytose et des récepteurs aux chimiokines périphériques : CCR1, CCR2 et CCR5. Parallèlement, elles acquièrent le récepteur d'adressage ganglionnaire CCR7, leur permettant de quitter la zone inflammatoire pour aller jusqu'aux ganglions via les vaisseaux lymphatiques. Dans les ganglions, les DC apprêtent et présentent les antigènes étrangers, tels que les antigènes tumoraux, aux lymphocytes T circulants à l'aide de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I (pour les lymphocytes T CD8⁺) ou de classe II (pour les lymphocytes T CD4⁺). Elles augmentent également leur expression de molécules comme CD80/CD86 (ligands de la molécule co-activatrice CD28) ou CD40

(récepteur du CD40L), permettant de fournir les signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation efficace des lymphocytes T. Ce mécanisme est résumé dans la Figure 3 ci-dessous.

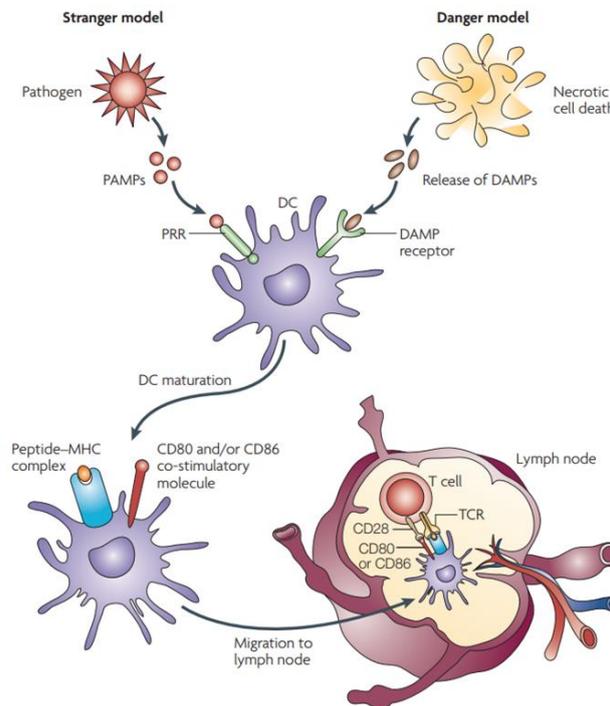


Figure 3 : Principales caractéristiques du processing de l'élément dangereux par les DC. ⁽⁴⁾

De plus, elles sécrètent des cytokines comme l'interleukine-12 (IL-12), l'IL-4 ou l'interféron γ (IFN- γ) et des chimiokines en grande quantité qui vont aider à la polarisation et à l'activation des lymphocytes T naïfs et des cellules NK ⁽⁵⁾.

I.I.B. Les cellules NK

Les cellules NK font parties du groupe cellulaire hétérogène des *innate lymphoid cells* (ILC), qui dérivent de progéniteurs lymphoïdes communs dans la moelle osseuse. Il existe cinq groupes majeurs d'ILCs, définis suivant le type de cytokines produites et les facteurs de transcription requis pour leur développement : les cellules NK, les ILCs du groupe 1 à 3 (ILC1s, ILC2s et ILC3s) et les cellules lymphoïdes induites par les tissus (LTi). Les cellules NK et les ILC1s sécrètent l'IFN- γ et expriment T-bet, en plus d'EOMES pour les cellules NK uniquement. Les ILC2s expriment GATA3 et sécrètent l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Les ILC3s expriment ROR γ t et sécrètent l'IL-22 et/ou l'IL-17A ⁽⁶⁾. On peut considérer que les ILC1s, ILC2s et ILC3s sont les parallèles des sous-types de lymphocytes T *Helper* (T_{H1}, T_{H2} et T_{H17}) (voir partie I.II) et produisent des cytokines qui façonnent les réponses de l'immunité innée et adaptative. Les cellules NK, caractérisées par le phénotype CD3⁻ CD56⁺, ont été découvertes dans les années

1970 et ont fait l'objet de nombreuses études démontrant leur effet cytotoxique sur les cellules tumorales. De plus, les cellules NK partagent de multiples caractéristiques communes aux lymphocytes T $\gamma\delta$, population cellulaire figurant au cœur de mes travaux de thèse. Ainsi, nous allons détailler ci-dessous les différents récepteurs de cellules NK, communs aux lymphocytes T $\gamma\delta$.

I.I.B.1. Les récepteurs de cellules NK

L'état d'activation des cellules NK est contrôlé par la combinaison de récepteurs exprimés à la surface des cellules NK présentés dans la Figure 4 ci-dessous.

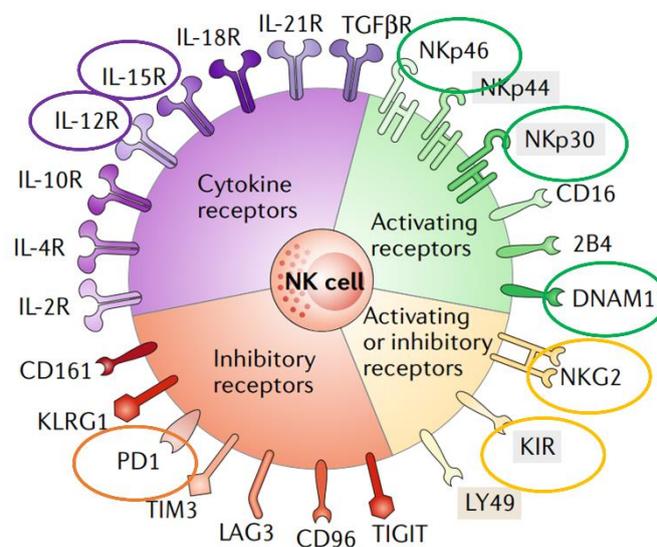


Figure 4 : Les récepteurs exprimés par les cellules NK (Adapté de ⁽⁷⁾).

Comme indiqué sur cette figure, il existe quatre grandes familles de récepteurs : activateurs (en vert), inhibiteurs (en rouge), les récepteurs aux cytokines (en violet) et ceux dont l'activité peut être bivalente (activateur ou inhibiteur, en jaune). Ces différents récepteurs vont permettre aux cellules NK d'exercer une activité anti-tumorale.

Récepteurs NK bivalents (activateurs ou inhibiteurs)

Parmi ce sous-type, les récepteurs les mieux caractérisés sont le NKG2 (présents chez l'homme et la souris) et les *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR, présents uniquement chez l'homme). Ils reconnaissent les molécules de CMH de classe I non classiques (famille NKG2) ou classiques (familles KIR).

Parmi les différentes formes de NKG2, nous pouvons en retenir deux : NKG2D, activateur et NKG2A, inhibiteur.

NKG2D (ou CD314) est un récepteur activateur des cellules NK qui va reconnaître des ligands permettant la survie, la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines ⁽⁸⁾. Chez l'homme, huit ligands de NKG2D ont été identifiés : MIC-A et MIC-B (*Major histocompatibility complex class I chain-related protein A et B*) et six protéines de liaisons UL16 ⁽⁹⁻¹¹⁾. Les stratégies thérapeutiques utilisant NKG2D sont efficaces dans les stades précoces de la croissance tumorale. Cependant, différents cancers vont développer des mécanismes échappant au contrôle de NKG2D via le relargage de ligands solubles (sNKG2D-L) à la surface de la tumeur, induisant l'internalisation de NKG2D et affectant les fonctions effectrices des cellules NK. En effet, un taux élevé de ligands solubles de NKG2D dans le sérum d'une souris atteinte d'un cancer est corrélé à une croissance plus importante de la masse tumorale ⁽¹²⁾.

NKG2A est un récepteur inhibiteur fortement impliqué dans la réactivité des cellules NK avec les autres cellules immunitaires de l'environnement tumoral. Ce récepteur appartient à la famille des lectines C, comme CD94 et NKG2C. Ces protéines sont groupées sous forme d'hétérodimères formant des récepteurs activateurs (CD94/NKG2C) ou inhibiteurs (CD94/NKG2A) qui ont pour ligand la molécule de CMH I non classique HLA-E, pouvant être exprimée à la surface de diverses cellules infectées ou cancéreuses. NKG2A participe au dialogue entre les cellules NK et les lymphocytes T infiltrant des tumeurs solides comme par exemple les cancers du sein ⁽¹³⁾. De plus, la fréquence des cellules NKG2A^{pos} au sein de la masse tumorale est associée à la sécrétion d'IL-15 ⁽¹⁴⁾ et de TGF- β ⁽¹⁵⁾ dans les cancers.

Les cellules NK expriment à leur surface des KIR qui vont réguler leur activation et ainsi la tolérance immunitaire. L'impact clinique des KIRs sur les réponses anti-tumorales médiées par les cellules NK a été initialement démontré chez des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) traités par transplantation de cellules souches hématopoïétiques ⁽¹⁶⁾. Il existe des anticorps monoclonaux dirigés contre les KIRs. Ces derniers ont démontré un effet dans les LAM et les myélomes multiples (MM) sans pour autant présenter d'effets indésirables auto-immuns ou de toxicités sévères ^(17,18).

Récepteurs NK activateurs

Parmi les récepteurs activateurs des cellules NK, nous pouvons citer NKp30, NKp46 et DNAM-1 (CD226) qui sont particulièrement importants dans le dialogue de la cellule NK avec l'environnement.

Par exemple, NKp30 (ou CD337 ou NCR3) est une protéine transmembranaire de type I exprimée à la surface des cellules NK mais également des lymphocytes T $\gamma\delta$ et des ILCs. NKp30 est impliqué dans la cytotoxicité des cellules NK sur différentes lignées tumorales ou infectées par un virus ^(19,20). Différents ligands de NKp30 ont été identifiés, dont B7-H6 qui fait l'objet d'un intérêt particulier, puisqu'il est sélectivement exprimé à la surface de certaines cellules cancéreuses et absent sur les cellules saines ⁽²¹⁾. En effet, la forme soluble de B7-H6 est capable d'inhiber la liaison des anticorps anti-NKp30 au NKp30, limitant ainsi l'activation des cellules NK et leur cytotoxicité ⁽²²⁾. De plus, NKp46 est impliqué dans la reconnaissance et la mort de différentes tumeurs et cellules infectées par les cellules NK ⁽²³⁾. De plus, il participe au cross-talk entre les cellules NK et d'autres effecteurs de l'immunité innée, comme les neutrophiles et les éosinophiles ^(24,25).

DNAM-1 (ou CD226) est une glycoprotéine de surface liant CD112 (connue sous le nom de Nectin-2) et CD115 (connue sous le nom de Necl5). DNAM-1 est une molécule d'adhésion impliquée dans les mécanismes de cytotoxicité des cellules NK et des lymphocytes T ^(26,27). Ainsi, cette molécule a émergée comme un pivot régulant les fonctions anti-tumorales des cellules NK, grâce à une action conjointe de CD226 avec TIGIT et CD96 ⁽²⁸⁾. Néanmoins, tel que pour NKG2D, les cellules tumorales développent des mécanismes de résistance à DNAM-1.

De plus, les cellules NK expriment le CD16, leur permettant de réaliser de l'ADCC (*Antibody-Dependant Cell-Mediated Cytotoxicity*), phénomène qui sera détaillé dans la partie II.II.B. de l'introduction.

Récepteurs NK inhibiteurs

Parmi les récepteurs inhibiteurs des cellules NK, nous pouvons citer le CD161, KLRG1 et les récepteurs « immune checkpoints » comme *Programmed cell Death 1* (PD-1) ou encore *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4* (CTLA-4).

Le récepteur PD-1 est exprimé à la surface des cellules T mais également des cellules NK et son engagement avec ses ligands respectifs PDL-1 et PDL-2 va induire une forte inhibition des fonctions anti-tumorales de la cellule, permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'immunosurveillance médiée par les cellules T ⁽²⁹⁾. Il a été récemment montré que PD-1 est présent à la surface des cellules NK du sang périphérique chez des patients HCMV⁺ ⁽³⁰⁾. *In vitro*, les cellules NK PD-1⁺ de ces patients étaient associées à une forte baisse de l'activité anti-tumorale contre les cellules tumorales PD-1⁺ (en matière de cytotoxicité, de

prolifération et de production cytokinique). Ce phénomène était en partie réversible suite à l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant cet axe PD-1/PDL-1 afin de bloquer cette interaction.

Récepteurs NK de cytokines

Les cellules NK expriment à leur surface des récepteurs de cytokines qui sont importantes pour leur fonction, comme par exemple le récepteur à l'IL-12 ou à l'IL-15. En effet, les CPA activées sécrètent de l'IL-12, qui va notamment stimuler la croissance et l'activation des cellules NK, leur permettant d'exercer leur action cytotoxique sur les cellules tumorales ⁽³¹⁾. De plus, l'IL-15 est importante dans la survie, la prolifération et le maintien des capacités cytotoxiques des cellules NK ⁽³²⁾.

A côté de l'expression de ces récepteurs décrits ci-dessus, les cellules NK peuvent également produire un champ de cytokines et chemokines pouvant réguler les réponses immunitaires. Par exemple, les NK relargent le *CC-chemokine ligand 5* (CCL5), le *XC-chemokine ligand 1* (XCL1) et XCL2 ; ce qui va entraîner le recrutement des DC dans les tumeurs solides qui sera corrélé à une augmentation de la survie globale des patients ⁽³³⁾.

Ainsi, grâce à l'expression de ces récepteurs, les cellules NK vont jouer un rôle essentiel dans la conduction de l'immunité innée anti-tumorale.

I.I.B.2. Les fonctions cytolytiques et anti-tumorales des cellules NK

Contrairement aux autres cellules immunitaires qui vont acquérir progressivement leur activité cytolytique, les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent l'intérêt majeur d'être déjà « prêtes à tuer ». Les cellules NK matures peuvent être définies comme des lymphocytes très granuleux. Ces granules contiennent à la fois des perforines (protéines perturbant l'intégrité membranaire) et des granzymes (famille d'enzymes protéolytiques), responsables de la cytotoxicité des cellules NK ⁽³⁴⁾. Lorsque les cellules NK interagissent avec leurs cellules cibles, une synapse immunologique va se former, permettant l'exocytose de ces granules pour conduire à la lyse spécifique de la cellule cible ⁽³⁵⁾. De plus, les cellules NK sont capables de tuer les cellules tumorales en utilisant des molécules de la famille des *tumor necrosis factor* (TNF). Les cellules NK expriment à la fois du TNF soluble et membranaire, et l'activation des cellules NK va induire l'expression de ligands de mort, comme le ligand FAS (FASLG ou TNFSF6) et le *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) à la surface des cellules NK ⁽³⁶⁾. Après liaison de ces ligands, les récepteurs de mort exprimés à la surface des cellules cibles

(comme par exemple FAS) peuvent activer la cascade enzymatique des caspases permettant leur apoptose ⁽³⁷⁾. Ainsi, les cellules NK présentent des fonctions cytolytiques leur permettant d'exercer une fonction anti-tumorale directe.

De plus, les cellules NK peuvent exercer des fonctions anti-tumorales indirectes car elles régulent les cellules T via la modulation des cellules présentatrices d'antigènes décrites dans la partie précédente de ce chapitre (partie I.I.A.). Par exemple, un cross talk entre les cellules NK et les DC peut mener à l'engagement de la protéine *natural killer cell p30* (NKp30 ou NCR3), permettant la production d'IFN- γ par les cellules NK entraînant l'activation des DC. De plus, la manipulation des cellules NK dans les cancers permet d'initier des réponses immunitaires protectrices et durables à différents niveaux, impliquant plusieurs types cellulaires comme par exemple les lymphocytes T. Par exemple, il a été montré que le blocage du *checkpoint receptor T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) prévient l'exhaustion des cellules NK et permet l'obtention d'une réponse immunitaire T spécifique de la tumeur dépendante des cellules NK ⁽³⁸⁾.

L'implication des cellules NK dans l'immunité anti-tumorale a été démontrée dans des modèles de cancers solides mais aussi hématologiques. En effet, différentes études réalisées sur un grand nombre de patients ont montrées la valeur pronostique d'une cytotoxicité périphérique médiée par les cellules NK chez des patients atteints de cancers solides ⁽³⁹⁾. Cependant, la cytotoxicité médiée par les cellules NK n'est pas toujours corrélée à une forte expression de récepteurs activateurs sur ces cellules. En effet, une équipe a montré que les cellules NK infiltrées dans les tumeurs de patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) exprimant différents marqueurs d'activation (NKp44, CD69 ou encore HLA-DR) présentaient un potentiel cytotoxique altéré ⁽⁴⁰⁾. Cette faible cytotoxicité peut en partie s'expliquer par la présence des cellules NK dans le stroma et non en contact direct avec les cellules tumorales observée dans des biopsies des patients atteints de NSCLC de cette étude.

La réponse immunitaire innée permet une détection rapide des cellules anormales afin de les éliminer avant qu'elles ne provoquent des dégâts importants. Cependant les cellules tumorales développent des mécanismes spécialisés pour échapper à la détection par l'immunité innée ou bloquer son arsenal de mécanismes destructeurs.

I.II. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale adaptative

Lorsque les mécanismes délétères ne sont pas bloqués par les cellules de l'immunité innée, les cellules de l'immunité adaptative (ou acquise) rentrent en jeu afin de court-circuiter

ces mécanismes d'évasion grâce à un système de reconnaissance très adaptable. Ainsi, la protection fournie par le système immunitaire adaptatif est essentielle à la survie puisque des enfants nés présentant des déficits immunitaires adaptatifs doivent recevoir des greffes de moelle osseuse afin d'assurer leur survie. L'immunité adaptative dépend des propriétés très spécialisées des lymphocytes et de leurs produits, et se distingue de l'immunité innée par trois aspects (voir Tableau 1). Premièrement, plutôt que d'avoir un répertoire défini de récepteurs reconnaissant des molécules conservées chez les micro-organismes, les lymphocytes ont un seul type de récepteur mais avec un répertoire quasi-illimité de variants qui peuvent reconnaître virtuellement n'importe quelle molécule, appelée « antigène ». La seconde caractéristique qui différencie l'immunité acquise de l'immunité innée est le délai d'apparition de la réponse immunitaire. En effet, les réponses immunitaires adaptatives ne s'amorcent que quelques jours après une infection à cause de la nécessaire expansion clonale des rares cellules qui reconnaissent initialement les antigènes qui les stimulent. La troisième spécificité de l'immunité acquise est la mémoire immunitaire, grâce à laquelle la réponse adaptative qui met des jours à se développer lors d'une première rencontre avec un pathogène, sera presque immédiatement effective en cas d'infection ultérieure par le même micro-organisme. Cette propriété est la base persistante de l'immunité et de l'efficacité de la vaccination.

Les molécules du CMH qui présentent les antigènes peuvent être de deux classes : CMH I ou CMH II. Les peptides qui se lient aux molécules CMH des deux classes sont générés par des systèmes enzymatiques distincts et opérants dans des compartiments cellulaires différents. Les cavités de liaison des peptides des deux classes de molécules ont des propriétés distinctes, spécifiquement adaptées à la capture de peptides d'origines variées et dans des environnements très différents. En effet, les peptides qui se lient aux molécules CMH de classe I sont produits par des protéases du cytosol et du réticulum endoplasmique (RE) qui génèrent des produits de dégradation de taille uniforme. En revanche, les peptides qui lient les molécules CMH de classe II sont les produits d'une série de protéases du compartiment endo-lysosomal, dans lequel les produits ultimes de la dégradation des protéines sont les acides aminés qui les constituent, et la cavité ouverte des molécules CMH de classe II est adaptée à la capture de produits intermédiaires de cette dégradation. De plus, ces différences se reflètent sur la façon dont les peptides sont attachés dans les cavités.

Les cellules de l'immunité adaptative regroupent les lymphocytes T $\alpha\beta$ (LT CD4 et CD8) et les lymphocytes B. Elles répondent plus spécifiquement à un antigène donné par rapport aux cellules de l'immunité innée car elles sont entièrement dirigées contre une cible particulière. Dans ce chapitre, nous ne détaillerons que les lymphocytes T $\alpha\beta$.

La reconnaissance antigénique constitue le premier signal nécessaire mais insuffisant à l'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$. Le second signal indispensable à cette activation est l'expression de molécules de co-stimulation à la surface du lymphocyte T $\alpha\beta$, dont l'absence entraînera son entrée en phase d'anergie. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ sont activés suite à la reconnaissance par leur *T-Cell Receptor* (TCR) d'un antigène spécifique présenté par une CPA via les molécules de CMH dont la classe diffère suivant s'il s'agit d'un LT CD4 ou LT CD8. Les lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs circulent dans le sang et la lymphe jusqu'à ce qu'ils rencontrent un antigène, accompagné de molécules co-stimulatrices B7, qu'ils reconnaissent à la surface d'une DC dans un tissu lymphoïde secondaire. Cela stimule la prolifération et l'acquisition de fonctions effectrices par les cellules naïves. Les cellules T CD8 migrent dans les tissus pour y exercer leur action cytotoxique ; les cellules T CD4 peuvent migrer dans les follicules lymphatiques pour activer les cellules B ou se disperser dans les tissus périphériques pour coordonner ensuite l'action d'autres cellules.

I.II.A. Les lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4, aussi appelés *lymphocytes T Helper*, reconnaissent des antigènes présentés par les molécules de CMH de classe II. Le LT CD4 va également interagir avec la molécule de CMH de classe II afin de stabiliser la synapse immunologique permettant d'augmenter le temps de l'interaction entre le LT CD4 et la CPA, ce qui va ainsi potentialiser son activation. De plus, le LT CD4 activé va upréguler l'expression du CD40L à sa surface, qui va interagir avec le CD40 présent à la surface des CPA, ce qui provoque une augmentation de l'expression de CD80/CD86 sur ces dernières ⁽⁴¹⁾ (voir partie I.I. de l'introduction). A la suite de cette activation, les LT CD4 vont subir une phase d'expansion clonale et de maturation au cours de laquelle ils acquièrent leurs fonctions effectrices.

Les molécules de CMH de classe II vont présenter l'antigène aux LT CD4⁺ suivant le schéma présenté dans la Figure 5 ci-contre.

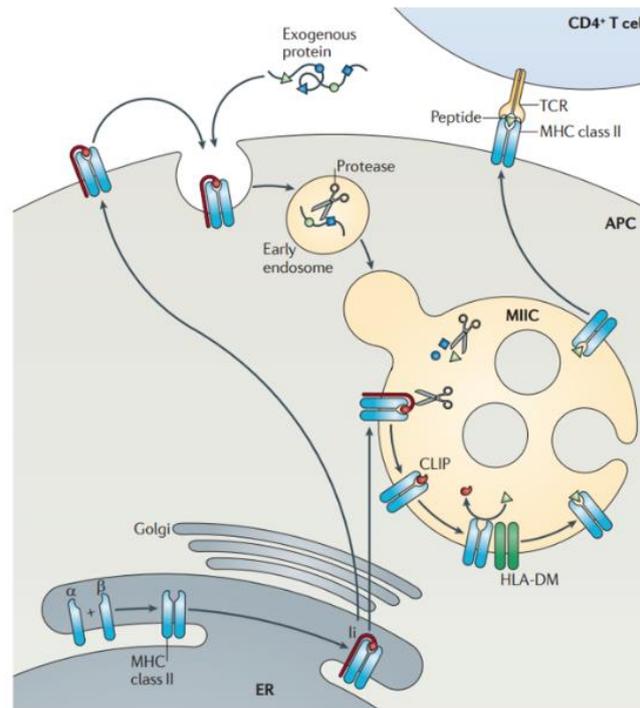


Figure 5 : Présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II. ⁽⁴²⁾

Dès qu'elles sont synthétisées dans le RE, les chaînes α et β d'une molécule CMH de classe II se dimérise et s'associent avec la chaperonne calnexine. La calnexine est rapidement déplacée par la chaîne invariante (chaîne I ou Ii) qui stabilise le dimère et bloque la cavité de liaison des peptides, l'empêchant de lier des protéines non repliées dans le RE. En fait, la chaîne I et le dimère $\alpha\beta$ forment des complexes nonamériques contenant trois trimères de dimère CMH et de chaîne I, mais pour simplifier, un seul trimère est montré sur ce schéma. Une fois qu'elle a traversé l'appareil de Golgi, la molécule de classe II est dirigée vers le système endo-lysosomique par la chaîne invariante ; la chaîne I est alors dégradée, ne laissant qu'un fragment CLIP lié à la cavité de liaison des peptides. Ce fragment CLIP est expulsé quand la molécule CMH de classe II est prise en charge par une autre chaperonne, appelée DM et apparentée à la classe II, qui la stabilise jusqu'à ce que la cavité soit occupée par un peptide qui se lie avec une affinité suffisante pour permettre à la molécule CMH de classe II de se séparer de DM et de poursuivre sa route vers la surface cellulaire.

Les DC vont participer à la régulation de la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II. Dans les DC immatures, l'antigène est internalisé et pénètre dans le système endo-lysosomique où il est retenu sous une forme relativement intacte. Les molécules CMH de classe II qui entrent dans les endosomes tardifs y sont aussi retenues, avec une chaîne invariante qui protège encore leur cavité de liaison des peptides. L'expression en surface des molécules CMH de classe II des cellules dendritiques immatures est également

Introduction – Partie I

régulée par une rapide internalisation suivie d'une dégradation. Quand les DC sont activées par une infection, le pH de l'endosome diminue, les enzymes lysosomiques sont activées et dégradent l'antigène internalisé et la chaîne invariante. Puis, CLIP va être relargué, un peptide sera ensuite chargé sur la molécule CMH de classe II, correspondant à un processus chaperonné par DM, et le complexe peptide-CMH migrera jusqu'à la surface cellulaire. L'expression des molécules CMH et de certaines protéases endosomiques sera aussi augmentée.

Suivant leurs fonctions effectrices spécifiques, les LT CD4 peuvent se diviser en plusieurs sous-populations. En effet, le LT CD4 naïf va se « polariser » sous contrôle strict d'un facteur de transcription caractéristique d'une sous population donnée. L'expression de ce facteur de transcription est elle-même régulée en fonction de différents facteurs, parmi lesquels l'environnement cytokinique au moment de l'activation du lymphocyte T CD4, qui joue un rôle prépondérant. Ainsi, les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent se différencier en différents sous-types présentés dans la Figure 6 ci-dessous.

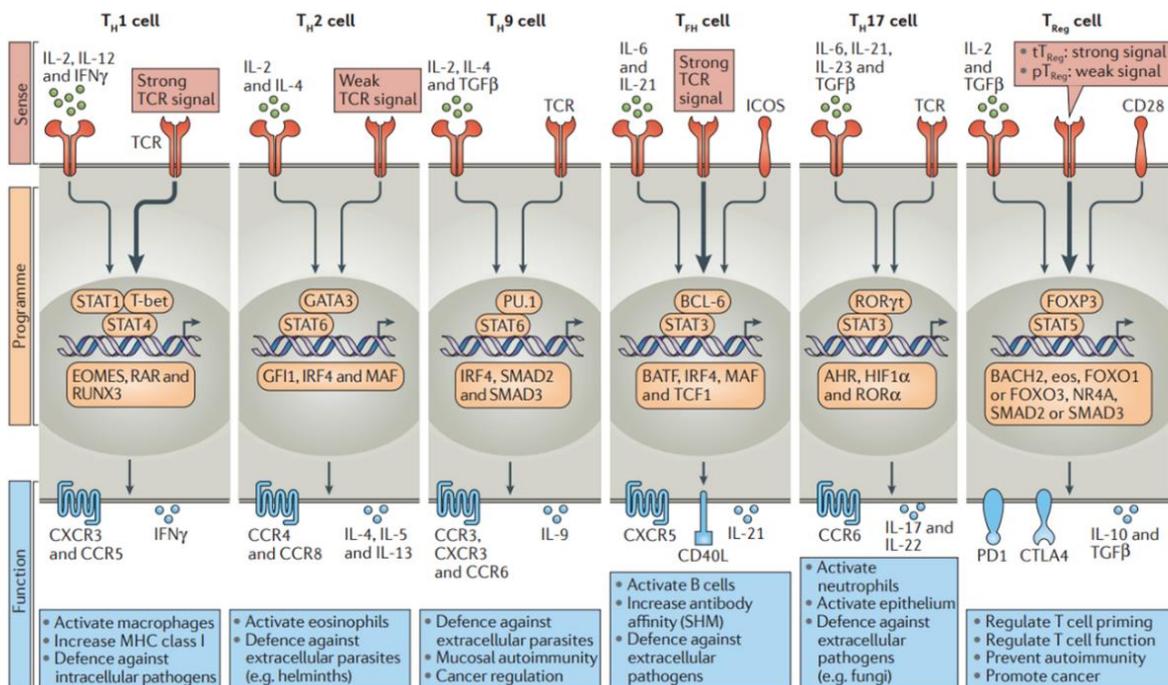


Figure 6 : Présentation des différents sous-types de LT CD4⁺. (43)

Parmi ces sous-populations, les lymphocytes T CD4 Th1 et Treg sont très impliqués dans les réponses anti-tumorales. Par exemple, les lymphocytes T CD4 naïfs se polarisent en Th1 sous l'influence de l'IL-12 et de l'IFN- γ et expriment le facteur de transcription Tbet. Ces LT sécrètent principalement de l'IFN- γ et du TNF- α et participent à l'activation des lymphocytes

T CD8 et des macrophages, pour exercer une réponse anti-tumorale dite de type Th1. Par ailleurs, les lymphocytes T CD4 T régulateurs (Treg) expriment le facteur de transcription Foxp3. Ces LT auront une action pro-tumorale via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , et l'expression de récepteurs inhibiteurs à leur surface.

I.II.B. Les lymphocytes T CD8

Dans l'immunité anti-tumorale, les lymphocytes T CD8 sont essentiels dans la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses. Pour cela, les lymphocytes T CD8 naïfs doivent rencontrer leur antigène spécifique présenté par les molécules du CMH de classe I, soit par les cellules cancéreuses, soit par les CPA du système immunitaire. Cette activation leur permet d'acquérir leurs fonctions de lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Cette dernière n'est pas absolument nécessaire à leur activation, mais elle renforce grandement leurs fonctionnalités ⁽⁴³⁾. De plus, cette interaction avec les lymphocytes T CD4 est nécessaire à l'établissement de la mémoire des CTLs ^(44,45). Les molécules de CMH de classe I vont présenter l'antigène aux LT CD8⁺ suivant le schéma présenté dans la Figure 7 ci-dessous.

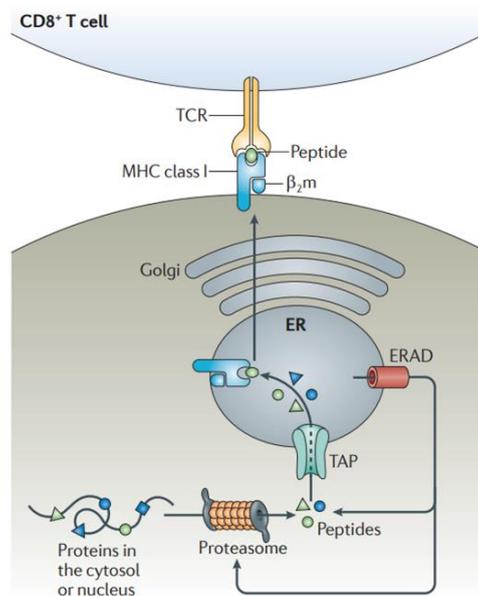


Figure 7 : Présentation antigénique par les molécules de CMH de classe I. ⁽⁴²⁾

La chaîne α de la molécule de CMH de classe I est synthétisée sur le RE puis insérée dans sa membrane, avec les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ positionnés dans la lumière. Avant de former un complexe stable avec la $\beta 2$ -microglobuline et le peptide, la chaîne α s'associe d'abord avec la protéine chaperonne Bip puis avec la protéine chaperonne membranaire calnexine. Les protéines cytosoliques sont dégradées en peptides dans le protéasome et

parfois aussi par des aminopeptidases cytosoliques. Les peptides transportés dans la lumière du RE par le *transporter associated with antigen processing* (TAP) peuvent y subir une protéolyse supplémentaire par ERAP1. Le complexe initial de la chaîne α du CMH de classe I avec la calnexine est remplacé par un complexe plus grand contenant les chaperonnes calréticuline et ERp57 et une chaperonne spécialisée, la tapasine, qui associe la molécule CMH de classe I au transporteur TAP. Ce deuxième complexe se dissocie quand un complexe stable, formé par la chaîne α du CMH de classe I, la β 2-microglobuline et le peptide, est relargué pour migrer à travers l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire. La séquence d'évènements montrés sur ce schéma correspond à la voie d'apprêtement humaine.

Les molécules de classe I peuvent également réaliser une présentation croisée de peptides dérivés de protéines internalisées. Les peptides dérivés d'antigènes exogènes internalisés par les DC immatures sont transportés à la surface des cellules matures sur des molécules CMH de classe II et de classe I. Ils arrivent aux molécules CMH de classe I par des mécanismes qui ne sont encore que partiellement compris mais qui font intervenir la dégradation par le protéasome suivie du transport par TAP dans le RE, ou, dans certains cas peut-être, le recyclage des molécules CMH de classe I depuis la surface cellulaire par voie endocytaire. Les DC peuvent donc présenter l'antigène provenant de la même origine à la fois aux cellules T CD4 et CD8 ; on parlera alors de sensibilisation croisée.

Comme les cellules NK vues dans la partie I.I.B. de cette introduction, les lymphocytes T CD8⁺ sont des cellules cytotoxiques grâce à deux principaux mécanismes d'induction de mort : l'exocytose de granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes et l'activation des voies des réceptrices de mort via FasL et TRAIL, leur conférant une action cytolytique anti-tumorale ⁽⁴¹⁾. Ces propriétés sont également partagées par une autre classe de lymphocytes, les lymphocytes T $\gamma\delta$, qui ont fait l'objet de cette étude et qui vont être détaillés dans le chapitre suivant.

PARTIE II. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T dits non conventionnels, par opposition à leurs homologues conventionnels appelés lymphocytes T $\alpha\beta$ (voir partie I.II. de l'introduction). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent un TCR particulier composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ ^(46,47). Ces derniers forment un pont entre l'immunité innée et adaptative puisqu'ils partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes aux cellules NK et aux lymphocytes T $\alpha\beta$ (voir partie I de l'introduction du manuscrit et Tableau 1). En effet, les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent à leur surface de nombreux récepteurs communs avec les cellules NK leur conférant une activité cytotoxique comparable à celle que possèdent ces cellules de l'immunité innée. De plus, comme les lymphocytes T $\alpha\beta$, les lymphocytes T $\gamma\delta$ expriment un TCR leur permettant la reconnaissance d'un antigène grâce à un mécanisme de signalisation. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont moins abondants que les lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le sang périphérique, mais ils sont prédominants dans les tissus comme la peau, l'intestin et l'appareil reproducteur. De plus, ils ont montré un rôle critique, notamment dans l'induction de réponses immunitaires lors d'infection, de dommages tissulaires et de cancers, indiquant leur potentiel dans de diverses applications ⁽⁴⁸⁾. Leur vaste capacité de reconnaissance antigénique et leur très grande diversité fonctionnelle en font des acteurs essentiels dans les réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-tumorales. Dans cette seconde partie de l'introduction de ce manuscrit, nous allons tout d'abord détailler le développement, le répertoire, les fonctionnalités et les propriétés anti-tumorales des LT $\gamma\delta$. Nous verrons par la suite les différents sous-types de LT V γ 9V δ 2, leur réactivité ainsi que les applications cliniques des LT V γ 9V δ 2.

II.I. Développement et répertoire des LT V γ 9V δ 2

II.I.A. Développement

Le développement des cellules T $\gamma\delta$ débute par vagues programmées successives de cellules exprimant des segments géniques V spécifiques ^(49,50). Les premiers stades de développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ sont communs avec les lymphocytes T $\alpha\beta$. En effet, ces deux types cellulaires ont un précurseur bipotent dans la moelle osseuse qui n'exprime ni TCR, ni CD4, ni CD8 ; on parle de stade double négatif (DN) immature. Le précurseur DN2 va ensuite évoluer et passer par différents stades intermédiaires suivant les modifications d'expression de ses molécules de surface telles que le CD117, CD44, CD25 et le CD24. Des expériences menées chez la souris ont permis de déterminer que la divergence des lignages

entre les LT $\alpha\beta$ et les LT $\gamma\delta$ se produit au stade DN3a (double négatif 3a) (Figure 8).

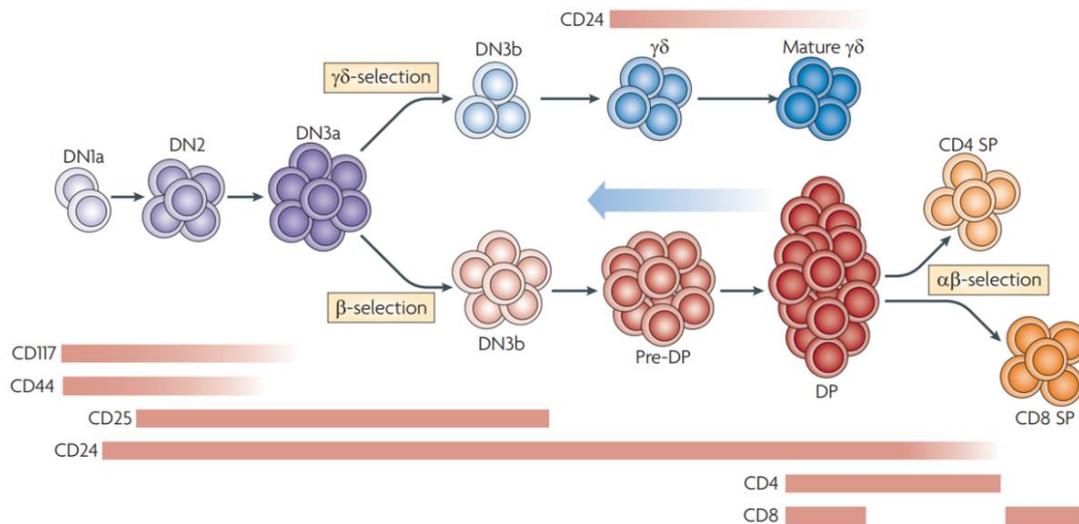


Figure 8 : Stades de développement des LT $\gamma\delta$ et LT $\alpha\beta$. ⁽⁵¹⁾

Au cours de la vie fœtale, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont les premiers lymphocytes à se développer. On les détecte tout d'abord dans le foie et l'intestin entre les 7^{ème} et 11^{ème} semaines, puis dans le thymus par des vagues successives à partir de la 10^{ème} semaine (Figure 9).

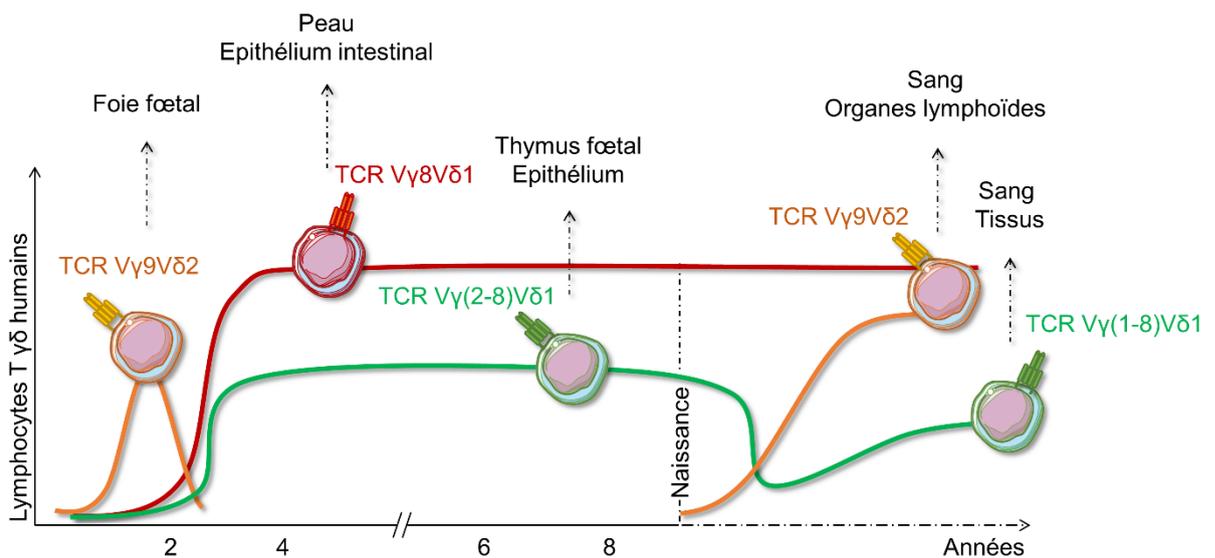


Figure 9 : Vagues de développement des LT $\gamma\delta$ chez l'homme (adapté de ⁽⁵⁰⁾).

Les LT $\gamma\delta$ colonisent ensuite un organe particulier où ils restent tout au long de la vie ⁽⁵²⁾. Cette sous population de lymphocytes T représente entre 0,5 et 20% des cellules CD3⁺ humains du sang périphérique et des tissus lymphoïdes ^(53–55). Cependant, la génération des lymphocytes T $V\delta 1^+$ augmente tardivement pendant la gestation, et ces derniers représentent la majorité du répertoire $\gamma\delta$ dans le sang de cordon et dans le thymus pédiatrique. Après la naissance, l'expansion du nombre de LT $V\gamma 9V\delta 2$ se poursuit au cours de l'exposition de l'individu aux micro-organismes pour devenir majoritaire au sein du répertoire $\gamma\delta$ du sang périphérique ⁽⁵⁶⁾. En effet, l'expansion numérique des LT $V\gamma 9V\delta 2$ est concomitante avec leur phénotype mature. De plus, différentes infections vont stimuler leur expansion et des jumeaux auront différents profils de LT $V\gamma 9V\delta 2$.

II.I.B Répertoire

Tout comme pour le TCR $\alpha\beta$, les gènes codant pour les chaînes γ et δ vont subir des mécanismes de recombinaisons somatiques aléatoires de différents segments aboutissant à la diversité du TCR $\gamma\delta$ via la production de milliards de récepteurs spécifiques d'antigènes. Cette recombinaison est réalisée par des enzymes appelées recombinases VDJ codées par les gènes RAG (*recombination activating gene*) 1 et RAG2. Ces enzymes s'associent entre elles pour reconnaître les séquences RSS (*recombination signal sequences*) et induire le clivage de l'ADN aux sites RSS. Cette coupure ne concerne qu'un seul brin d'ADN et permet la génération de gènes fonctionnels à partir de segments V (Variable), D (Diversité), J (Jonctionnel) et C (Constant). Le gène codant pour la chaîne γ est constitué d'un segment V et d'un segment J tandis que celui codant pour la chaîne δ se compose des segments V, D et J (Figure 10). Le segment C sera ensuite ajouté à ces deux gènes au moment de l'épissage post-transcriptionnel ⁽⁵²⁾.

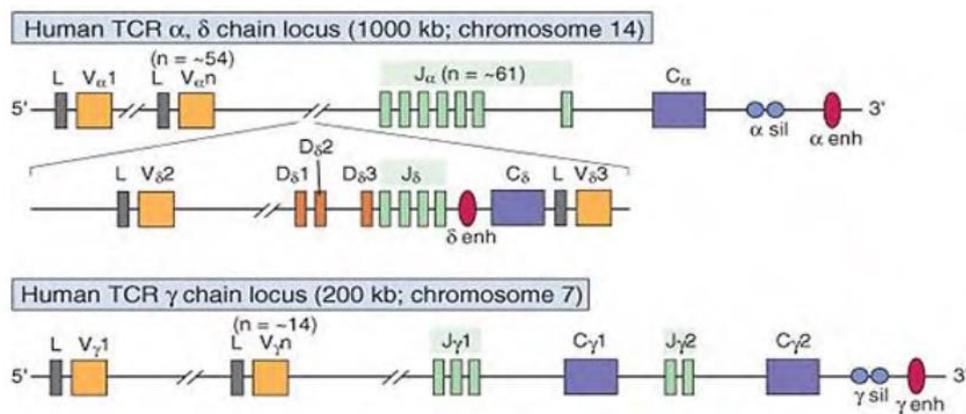


Figure 10 : Organisation des loci des gènes du TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ humain. ⁽⁵⁷⁾

Dans les cellules T $\alpha\beta$, les chaînes TCR β s'associent tout d'abord à la chaîne pré-TCR α pour former un récepteur qui sert à sélectionner les cellules pour la maturation. En revanche, dans les cellules T $\gamma\delta$, la détermination et la différenciation sont dirigées par l'expression d'un hétérodimère $\gamma\delta$ définitif, sans étape intermédiaire. Chez la souris et chez l'homme, les gènes TCR δ se situent entre les gènes $V\alpha$ et $J\alpha$ dans le locus TCR α . Bien que les réarrangements $V\alpha$ productifs impliquent généralement la délétion des gènes TCR δ , cela n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules T $\gamma\delta$ parce que les réarrangements $V\alpha$ se produisent tard dans la différenciation thymique des cellules T, tandis que les réarrangements géniques $V\beta$, $V\gamma$ et $V\delta$ ont lieu plus tôt, avant que ces délétions ne soient produites.

Les LT $\gamma\delta$ possèdent moins de gènes V que les LT $\alpha\beta$ et les possibilités de combinaisons des gènes V sont encore réduites du fait des conditions d'appariement entre les chaînes γ et δ ⁽⁵⁸⁾. Ainsi la diversité du répertoire $\gamma\delta$ serait donc en théorie plus faible, mais elle est en partie compensée par une diversité fonctionnelle élevée liée à une grande variabilité de la boucle CD3R (*complementarity determining region 3*) de la chaîne δ conduisant à un nombre théorique de TCR 100 fois plus élevé que pour les LT $\alpha\beta$ ⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. Il y a une corrélation entre le potentiel de formation de cellules T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$ et le nombre de segments géniques disponibles. La souris et l'homme ont relativement peu de segments $V\gamma$ et $V\delta$ (7 $V\gamma$ couramment exprimés chez la souris, dont 4 forment une famille ; 6 $V\gamma$ chez l'homme, dont 5 forment une famille ; 16 $V\delta$ environ chez la souris, 8 à 10 chez l'homme), tandis que le mouton, la vache et le poulet ont beaucoup plus de gènes TCR $\gamma\delta$ que les gènes $\alpha\beta$ et ont un plus grand nombre de cellules T $\gamma\delta$. Le développement des cellules T $\gamma\delta$ dépend de signaux de l'IL-7 et de la chaîne IL-7R α .

Ainsi, chaque réarrangement préférentiel au niveau des gènes codant les chaînes du TCR constitue une sous-population aux caractéristiques fonctionnelles particulières, puisque chacune va peupler spécifiquement un ou des organes, et vont servir de base à la classification des différentes sous-populations des LT $\gamma\delta$. Chez l'homme, on peut distinguer 4 sous-populations principales déterminées suivant l'expression de leur chaîne δ : les $V\delta 1$, $V\delta 2$, $V\delta 3$ et $V\delta 5$ ⁽⁶²⁾. En fonction de la chaîne γ associée, les LT $\gamma\delta$ n'auront pas la même localisation : par exemple au sein du groupe des LT $V\delta 1$, les LT $V\delta 1V\gamma 5$ seront majoritairement retrouvés dans la peau alors que les LT $V\delta 1V\gamma 6$ non.

II.II. Fonctionnalités des LT V γ 9V δ 2

II.II.A. Pléiotropie fonctionnelle et plasticité cellulaire

Les différents réarrangements préférentiels au niveau des gènes codants pour les chaînes du TCR vont catégoriser les lymphocytes en différentes sous-populations présentant des caractéristiques fonctionnelles propres, notamment en fonction de leur localisation ⁽⁵²⁾. Au-delà de la composante géographique, la fonctionnalité des LT $\gamma\delta$ est également déterminée par la réactivité antigénique et l'environnement. Les lymphocytes, et donc les LT $\gamma\delta$, sont des cellules dites « plastiques » c'est-à-dire adaptables en fonction d'un contexte donné, par exemple un signal de danger, afin de produire une réponse immunitaire adéquate. Il a été rapporté que les LT V γ 9V δ 2 peuvent être polarisés en cellules $\gamma\delta$ T17 (produisant uniquement de l'IL-17), en cellules $\gamma\delta$ T1/T17 (produisant à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- γ), en cellules $\gamma\delta$ T1 (produisant à la fois de l'IFN- γ et du *Tumor Necrosis Factor* TNF- α) et en cellules $\gamma\delta$ T2 (produisant de l'IL-4) via différentes cytokines requises pour l'initiation et la maintenance de la polarisation ⁽⁶³⁾. Ainsi, les LT $\gamma\delta$ vont pouvoir exercer leurs fonctionnalités dans deux cas de figure, infectieux ou tumoral, suivant l'environnement. Puisque notre équipe est spécialisée dans le domaine de l'immuno-oncologie, nous nous intéresserons particulièrement aux fonctionnalités des LT $\gamma\delta$ appliquées aux tumeurs.

II.II.B. Implication des LT $\gamma\delta$ dans l'immunité tumorale

Il est possible de classer les différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$ en fonction de leur activité pro- ou anti-tumorale (Figure 11).

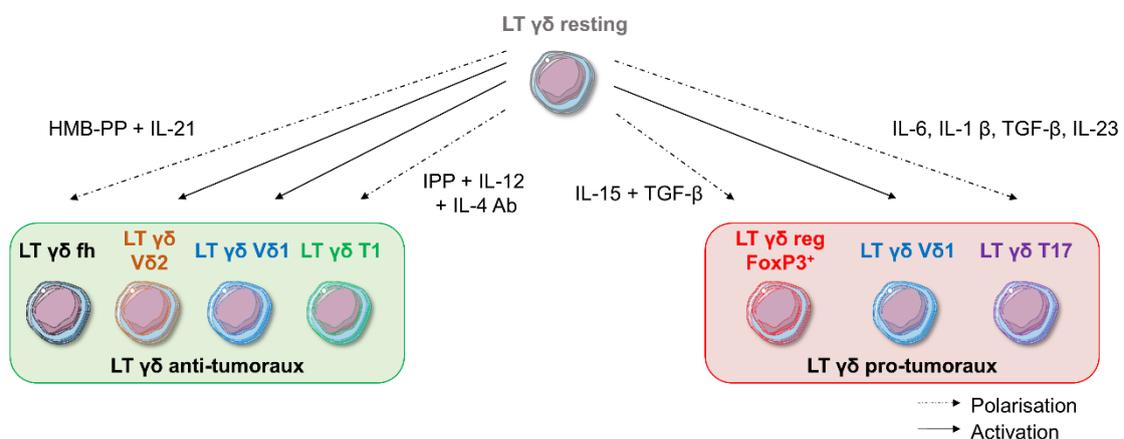


Figure 11 : Classification des LT $\gamma\delta$ suivant leurs fonctions tumorales (adapté de ⁽⁶²⁾).

D'après cette figure, les LT $\gamma\delta$ resting vont pouvoir être activés en un sous-type de LT $\gamma\delta$ anti-tumoral (c'est le cas des LT V γ 9V δ 2 et LT $\gamma\delta$ V δ 1), qui peut être également pro-tumoral dans certains cas (LT $\gamma\delta$ V δ 1). De plus, les LT $\gamma\delta$ resting vont pouvoir se polariser en deux sous-types de LT $\gamma\delta$ anti-tumoraux (LT $\gamma\delta$ fh et LT $\gamma\delta$ T1) ou pro-tumoraux (LT $\gamma\delta$ régulateurs ou LT $\gamma\delta$ T17) en fonction de l'environnement cytokinique. Ainsi, les différents sous-types de LT $\gamma\delta$ auront des fonctions variées au sein de la tumeur et un même sous-type pourra avoir des fonctions différentes suite au phénomène de polarisation. Afin d'illustrer la plasticité des LT $\gamma\delta$ et leurs fonctions dans l'immunité tumorale, nous présenterons d'abord les effets pro-tumoraux des LT $\gamma\delta$ V δ 1, des LT $\gamma\delta$ régulateurs et des LT $\gamma\delta$ T17 dans les tumeurs. Le rôle majeur des LT $\gamma\delta$ dans l'élimination des tumeurs, et notamment des LT V δ 1 et des LT V γ 9V δ 2, sera ensuite présenté.

Effets pro-tumoraux des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 1

Les LT $\gamma\delta$ V δ 1 correspondent à un sous-groupe de LT $\gamma\delta$ exerçant une activité tumorale bivalente, à la fois pro- et anti-tumorale. Ainsi, ils ont été récemment identifiés comme ayant une activité pro-tumorale puisqu'ils vont moduler le système immunitaire et le micro-environnement tumoral (MET), mais aussi promouvoir l'invasion tumorale et l'apparition de métastases. En effet, les LT $\gamma\delta$ V δ 1 sont impliqués dans l'inflammation induite par la progression tumorale, qui dépend de la production de l'IL-17A⁽⁶⁴⁾. Une autre étude a montré que les LT $\gamma\delta$ V δ 1 pouvaient sécréter de façon importante le TGF- β , induisant une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) permettant au cancer d'échapper à l'immuno-détection favorisant l'installation de métastases et l'invasion tumorale⁽⁶⁵⁾. Un déséquilibre entre les proportions de LT $\gamma\delta$ V δ 1 et V δ 2 (avec une augmentation du ratio V δ 1/V δ 2) va contribuer au développement tumoral^(66–68) et est médié par l'IL-4. En effet, cette cytokine va inhiber l'activation des LT $\gamma\delta$ V δ 1 naïfs de façon TCR-STAT6 dépendante, ce qui va promouvoir la croissance des LT $\gamma\delta$ V δ 1 activés et donc upréguler le nombre des LT $\gamma\delta$ V δ 1. Ces LT $\gamma\delta$ V δ 1 vont sécréter de l'IL-10 entraînant une inhibition des LT $\gamma\delta$ V δ 2⁽⁶⁹⁾. En présence d'IL-4, les LT $\gamma\delta$ V δ 1 sécrètent significativement moins d'IFN- γ , plus d'IL-10 et expriment moins de NKG2D en comparaison avec les LT $\gamma\delta$ V δ 2. Chez l'homme, il a été également montré que les LT $\gamma\delta$ V δ 1 infiltrant des tumeurs du sein peuvent inhiber la maturation des DC et leur fonctions présentatrices d'antigènes ainsi que freiner l'activation des LT $\alpha\beta$ naïfs et leur différenciation en cellules T effectrices (CD4⁺ et CD8⁺) via la voie de signalisation du TLR 8⁽⁷⁰⁾.

Effets pro-tumoraux des lymphocytes T $\gamma\delta$ régulateurs

Comme pour les LT $\alpha\beta$ conventionnels, il existe des LT $\gamma\delta$ dits régulateurs qui possèdent une fonction immunosuppressive, et sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD25⁺ et FOXP3⁺ (*Forkhead box P3*), suite à la stimulation *in vitro* par l'IL-15 et le TGF- β (*Tumor Growth Factor*)⁽⁷¹⁾. Ces LT $\gamma\delta$ régulateurs ont une fonction similaire aux LT $\alpha\beta$ régulateurs, en supprimant la prolifération des PBMCs stimulés par des billes anti-CD3/CD28. De plus, les LT $\gamma\delta$ régulateurs sont également impliqués dans l'action immunosuppressive du MET. En effet, dans les cancers du sein, les LT $\gamma\delta$ régulateurs (exprimant la chaîne V δ 1) sont attirés par les cellules tumorales et vont sécréter la chémokine IP-10⁽⁷²⁾. Dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique ductal, il a été montré que les LT $\gamma\delta$ expriment fortement le PDL-1 et favorisent l'angiogenèse pancréatique en restreignant l'activation des LT $\alpha\beta$ ⁽⁷³⁾. De plus, les LT $\gamma\delta$ régulateurs peuvent engendrer l'arrêt du cycle cellulaire des cellules T effectrices en induisant la senescence des cellules T. Enfin, les LT $\gamma\delta$ régulateurs vont aussi induire la senescence des DC, entraînent une modification de leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles⁽⁷⁴⁾.

Effets pro-tumoraux des lymphocytes T $\gamma\delta$ 17

Il existe des cytokines pro-inflammatoires appartenant à la famille de l'IL-17 (IL-17A à IL-17F), retrouvées dans l'organisme au cours de différents contextes. Parmi ces cytokines, l'IL-17A est la plus étudiée et peut être produite par une classe de LT CD4⁺ dits LT Th17 IL-17⁺⁽⁷⁵⁾. D'autres cellules immunitaires, dont les LT $\gamma\delta$, peuvent produire de l'IL-17A, on parle alors de LT $\gamma\delta$ 17 (ou T17). Les LT $\gamma\delta$ 17 jouent un rôle dans la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse dans les cancers de la vésicule biliaire et ovarien par exemple^(76,77). Les LT $\gamma\delta$ 17 représentent la source principale d'IL-17, cytokine jouant un rôle délétère dans les cancers. Dans les cancers de la vésicule biliaire, les LT $\gamma\delta$ 17 migrent au niveau du site tumoral en utilisant l'axe CXCL9-CXCR3. L'IL-17, sécrétée par les LT $\gamma\delta$ 17, induit la production de différents facteurs favorisant l'angiogenèse, dont le *vascular endothelial growth factor* (VEGF). La présence des LT $\gamma\delta$ 17 a été associée à une faible survie des patients atteints de ces cancers⁽⁷⁶⁾. Après exposition à l'IL-6 et le TGF- β , les LT $\gamma\delta$ CCR6^{neg} infiltrant la tumeur vont se polariser en LT $\gamma\delta$ 17. De plus, les souris déficientes en IL-17 ont montré une diminution de l'angiogenèse entraînant une plus faible progression tumorale, laissant suggérer le rôle majeur des LT $\gamma\delta$ 17 dans la croissance tumorale. Les LT $\gamma\delta$ 17 est une des populations cellulaires recrutant le plus de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs), connues pour faciliter la progression tumorale, notamment des cancers du sein et colorectal⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾. Les LT $\gamma\delta$ peuvent réguler la tolérance immunitaire en favorisant l'infiltration des MDSCs dans la tumeur,

entraînant une exhaustion des LT CD8⁺ médiée par les MDSCs ⁽⁸¹⁾. Les LT $\gamma\delta$ 17 de la peau jouent également un rôle critique dans l'inflammation. Ainsi leur coopération avec les MDSCs va mettre à défaut la surveillance immunitaire au profil de la progression tumorale et permettre la croissance et l'avancée des cellules malignes ^(82,83). Dans un modèle de cancer ovarien murin, les LT $\gamma\delta$ V γ 6⁺ CD27⁻ sécrétant de l'IL-17 vont permettre aux macrophages péritonéaux de rester sur le site tumoral pour exercer leur action d'uprégulation de différents médiateurs pro-tumoraux et pro-angiogéniques ⁽⁸⁴⁾. De plus, les LT $\gamma\delta$ peuvent impacter les fonctions des neutrophiles dans les cancers du sein. En effet, une étude montre que l'IL-1 β et l'IL-17 sécrétés par les LT $\gamma\delta$ 17 va stimuler l'expansion et la polarisation des neutrophiles. Ces neutrophiles induits par la tumeur acquièrent la capacité de supprimer les LT cytotoxiques ce qui facilite l'installation des métastases ⁽⁸⁵⁾. De plus ces neutrophiles ont été retrouvés comme capables de supprimer les LT V γ 9V δ 2 périphériques ^(86,87). Les neutrophiles vont donc empêcher l'action des LT V γ 9V δ 2, en synergie avec l'action des LT $\gamma\delta$ 17, pour favoriser un MET immunosuppresseur.

Ainsi les LT $\gamma\delta$ peuvent favoriser l'installation, l'accumulation et les fonctions de différentes cellules immunosuppressives, entraînant par la suite une conversion de l'inflammation induite par la tumeur en immunosuppression et à terme une progression de l'angiogenèse tumorale. Cependant, certains LT $\gamma\delta$ comme les LT $\gamma\delta$ V δ 1 et les LT V γ 9V δ 2, sont pourvus d'effets anti-tumoraux.

Effets anti-tumoraux des lymphocytes T $\gamma\delta$

L'émergence de l'importance des LT $\gamma\delta$ dans le développement tumoral a été établit grâce à une étude majeure mettant en évidence une forte susceptibilité de développement de carcinomes cutanés squameux après exposition à des agents mutagènes dans des souris déficientes en LT $\gamma\delta$ ⁽⁸⁸⁾. Depuis, de nombreuses études *in vivo* ont confirmé l'effet protecteur des LT $\gamma\delta$, notamment dans des modèles de transplantation et de cancers spontanés ⁽⁸⁹⁾. De plus, des études ont rapporté l'importance de la production de l'IL-17 par les LT $\gamma\delta$ qui pourrait agir en synergie avec les molécules de chimiothérapies inductrices de mort cellulaire ⁽⁹⁰⁾. L'expansion de TILs (et notamment les LT $\gamma\delta$) a été observée dans des lésions tumorales précoces de modèles murins de cancers du sein (MMTV-PyMT) et de la prostate (Tramp) ⁽⁹¹⁾. Bien que la corrélation entre le niveau de TILs $\gamma\delta$ V δ 1 et le résultat clinique varie suivant le type tumoral, le rôle des LT $\gamma\delta$ dans l'immuno-surveillance tumorale est important. Par exemple, les TILs $\gamma\delta$ V δ 1 sont associés à un bon pronostic chez des patients atteints de mélanomes ⁽⁹²⁾. A l'aide d'un modèle murin métastatique de colon, une étude a montré que l'injection systémique de LT $\gamma\delta$ V δ 1 activés au préalable inhibait la croissance des cellules

tumorales mais aussi l'émergence de foyers tumoraux secondaires au niveau du poumon et du foie ⁽⁹³⁾. L'identification des sous-types cellulaires par utilisation de l'algorithme CIBERSORT (estimation des différents sous-types à partir des transcrits connus) a permis la publication d'une analyse majeure des signatures transcriptomiques des différents sous-types immunitaires réalisée sur 18 000 tumeurs. Cette cartographie du paysage immunologique des différents TILs a montré que les LT $\gamma\delta$ sont les cellules immunitaires qui sont associées au meilleur pronostic clinique, en comparaison avec les autres sous-types immunitaires, ce qui a participé à l'engouement pour les LT $\gamma\delta$ ⁽⁹⁴⁾. Une étude plus récente a réanalysé la signature génique des LT V γ 9V δ 2 afin d'améliorer la distinction entre ce sous-type cellulaire et d'autres cellules comme les LT $\alpha\beta$ ou les cellules NK ⁽⁹⁵⁾. Cette étude a mis en évidence que l'abondance des TILs LT V γ 9V δ 2 n'est pas corrélée avec celle des LT $\alpha\beta$ ni à la charge mutationnelle des tumeurs. Ces résultats montrent la singularité des LT $\gamma\delta$ qui ne sont pas redondants avec les LT $\alpha\beta$, et leur intérêt d'utilisation dans des tumeurs présentant une faible charge mutationnelle. Des études récentes utilisant des nouvelles technologies sur cellules uniques vont permettre d'apporter des nouvelles connaissances dans la biologie des TILs ⁽⁹⁶⁾. Des niveaux élevés de LT $\gamma\delta$ circulants sont également associés à un risque réduit de cancer, à une amélioration de la survie sans progression à 5 ans et de la survie globale après transplantation de moelle osseuse chez des patients atteints de leucémies aiguës ⁽⁹⁷⁾.

- Effets anti-tumoraux directs des LT $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$, et notamment les LT V γ 9V δ 2, peuvent exercer leurs fonctions anti-tumorales de façon directe suivant les caractéristiques présentées dans la Figure 12.

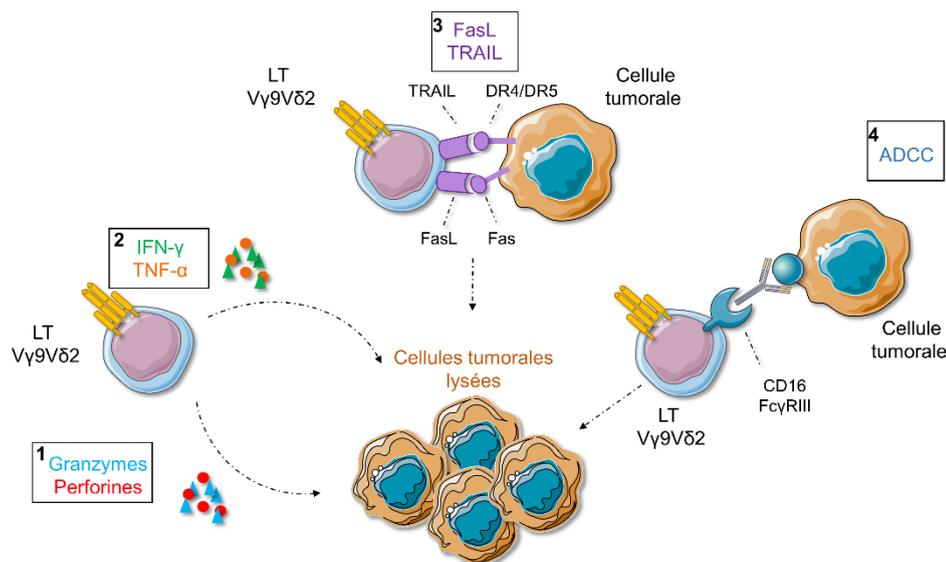


Figure 12 : Potentiel cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cellules cancéreuses (adapté de ⁽⁶²⁾).

D'après la Figure 12, les LT V γ 9V δ 2 présentent un potentiel cytolytique suivant quatre aspects :

La voie des perforines et granzymes

Comme les cellules NK, les LT V γ 9V δ 2 sécrètent des granules lytiques contenant des granzymes A, B ou M ; de la perforine et de la granulysine afin de lyser les cellules tumorales après migration au niveau du site tumoral ^(63,98,99). Alors que l'expression de ces molécules est nulle aux stades T_N et T_{CM}, elle est maximale dans les LT V γ 9V δ 2 matures (stade T_{EMRA}) ^(100,101). Comme détaillé dans la partie I.I. de l'introduction, la perforine forme des pores dans la membrane de la cellule cible, elle pourrait donc induire seule la lyse de la cellule tumorale. Cependant, l'action lytique est potentialisée par les actions combinées de la perforine avec les granzymes, qui peuvent s'introduire par les pores membranaires formés par la perforine et induire la mort de la cellule cible en activant les caspases ou via des voies caspase-dépendantes ⁽³⁴⁾. En effet, l'inhibition de cette voie dans les LT $\gamma\delta$ entraîne une diminution de la capacité de lyse des cellules tumorales du sein *in vitro* ⁽¹⁰²⁾. Dans les cancers du rein, les LT $\gamma\delta$ présentent un potentiel de lyse sélective des cellules cancéreuses primaires autologues, qui ne sera pas dirigé contre les cellules rénales saines de l'hôte. Afin de suivre la dégranulation de la perforine et des granzymes, les études utilisent couramment le marqueur *lysosome-associated membrane protein* (LAMP) 1/CD107a qui permet la libération de ces granules ⁽³⁵⁾.

La production importante de cytokines pro-inflammatoires

Les LT $\gamma\delta$ peuvent produire de grandes quantités d'IFN- γ et de TNF- α ^(103,104). Ces deux cytokines inhibent la croissance tumorale via différents mécanismes, notamment l'induction d'une immunité anti-tumorale et l'inhibition de l'angiogénèse cancéreuse ⁽¹⁰⁵⁾. La sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les LT $\gamma\delta$ est favorisée par différents stimuli, notamment les agonistes du TCR, les ligands de NKG2D et certaines cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-18 ⁽¹⁰⁶⁾.

Les ligands TRAIL et FasL

Les ligands des récepteurs de mort comme FasL (CD95L) et TRAIL sont retrouvés à la surface des LT V γ 9V δ 2 et se lient respectivement aux récepteurs Fas (CD95) et DR4/DR5 (*Death Receptor 4/5*) exprimés sur les cellules cancéreuses. Cette interaction va induire l'AICD (*Activated-Induced Cell Death*) de la cellule cible, c'est-à-dire sa mort par activation de la voie des caspases ou de la voie de la mort cellulaire mitochondriale ⁽⁶³⁾. Le blocage de TRAIL

entraîne une diminution de l'activité cytotoxique induite par les LT $\gamma\delta$ ⁽¹⁰⁷⁾. A l'inverse, l'uprégulation de Fas dans des cellules d'ostéosarcomes entraîne une susceptibilité de ces cellules à la lyse par les LT $\gamma\delta$ ⁽¹⁰⁸⁾.

Les mécanismes d'ADCC

Les LT $\gamma\delta$, et notamment les LT V γ 9V δ 2, expriment le récepteur CD16 (ou Fc γ R III) leur permettant de réaliser de l'ADCC (*Antibody-Dependant Cell-Mediated Cytotoxicity*). En se liant à la région Fc des IgG, le CD16 constitue alors un autre moyen de reconnaissance des cellules cibles par les LT $\gamma\delta$. De plus, CD16 peut être uprégulé à la surface des LT $\gamma\delta$ suivant le contexte biologique et sa liaison à sa cible peut entraîner une cytotoxicité ou une autre fonction effectrice (comme par exemple la sécrétion de l'IFN- γ) ^(109,110). Enfin, lors de l'activation du LT V γ 9V δ 2 via le TCR, le CD16 joue un rôle de co-stimulateur qui conduit à une augmentation de la production de TNF- α et de la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 ⁽¹¹¹⁾. Ce mécanisme est mis à profit par différents anticorps thérapeutiques, comme par exemple le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la molécule de surface CD20. En effet, cet anticorps utilisé dans le traitement de certains lymphomes, reconnaît le CD20 exprimé à la surface des cellules B anormales du lymphome. Comme les autres IgG, cet anticorps possède un fragment Fc qui sera alors reconnu par le CD16 exprimé sur les LT $\gamma\delta$, leur permettant de réaliser l'ADCC sur les cellules du lymphome.

- Effets anti-tumoraux indirects des LT $\gamma\delta$

A côté des effets anti-tumoraux directs des LT $\gamma\delta$, ces cellules peuvent également exercer des effets anti-tumoraux indirects, suite à l'interaction avec des cellules B, des DC, des LT $\alpha\beta$ et des cellules NK. Par exemple, dans des souris non immunisées, la sécrétion d'anticorps par les LB est impactée par les LT $\gamma\delta$. En effet, une étude a démontré que l'ablation sélective des sous-groupes de LT $\gamma\delta$ V γ 4 et V γ 6 affectait fortement le niveau sérologique en anticorps dans des souris non immunisées ⁽¹¹²⁾. Cela démontre que les LT $\gamma\delta$ sont capables de moduler les LB et leur production en anticorps. Une autre étude a observé une polarisation des LT $\gamma\delta$ en un sous-groupe présentant des caractéristiques typiques des *follicular B-helper T cells* (Tfh) après co-culture avec de l'IL-21 et de l'HMB-PP, indiquant qu'ils sont capables d'aider les LB dans la production d'anticorps, tout comme les Tfh ⁽¹¹³⁾. En effet, l'HMB-PP va upréguler le récepteur à l'IL-21, qui en retour va jouer un rôle de co-stimulateur via l'expression de la chemokine CXCL13 pour attirer les lymphocytes B et apporter un support aux LT V γ 9V δ 2.

Les LT $\gamma\delta$ peuvent aussi agir comme des CPA pour le priming des LT $\alpha\beta$. Cette caractéristique de CPA a été pour la première fois reportée en 2005 ⁽¹¹⁴⁾. Après stimulation, le niveau d'expression des molécules présentatrices d'antigènes est augmenté sur les LT $\gamma\delta$, notamment ceux du récepteur activateur leucocytaire (CD69), de la molécule présentatrice d'antigène (HLA-DR) et de molécules de co-stimulation et d'adhésion (CD80, CD86, CD54 et CD40). A la différence des LT $\alpha\beta$, puisque les LT $\gamma\delta$ sont aussi des CPA, ils vont pouvoir upréguler le CD36, un récepteur scavenger impliqué dans la capture des cellules apoptotiques par les DC immatures et les macrophages. Suite à un fort niveau d'expression de CD36, les LT $\gamma\delta$ vont capturer les débris des cellules cancéreuses du foie tuées par ces effecteurs puis vont induire une réponse immunitaire CD8⁺ spécifique de l'antigène tumoral grâce à leur action de CPA ⁽¹¹⁵⁾. Enfin, une étude a montré la capacité des LT V γ 9V δ 2 activés à induire la prolifération de cellules T $\alpha\beta$ CD4⁺ naïves et promouvoir leur différenciation en CTL ⁽¹¹⁶⁾.

Les LT $\gamma\delta$ peuvent également cibler la maturation des DC. En retour, les DC peuvent également induire l'activation et la prolifération des LT $\gamma\delta$, permettant ensuite à ces cellules d'exercer leurs fonctions cytotoxiques et immunomodulatrices ⁽¹¹⁷⁾, ce qui démontre que chacun de ces deux types cellulaires peut agir individuellement pour éliminer les cellules cancéreuses mais que leur action concomitante est synergique ⁽¹¹⁸⁾. Une étude a démontré que les LT V γ 9V δ 2 pouvaient accélérer la maturation des DC. Ce processus s'appuie sur l'expression de TNF- α ainsi que de signaux favorisant le contact cellulaire ⁽¹¹⁹⁾. Dans une autre étude, Conti et ses collaborateurs a également montré que l'activation des DC par les LT $\gamma\delta$ était presque entièrement médié par l'IFN- γ et le TNF- α , et nécessitait également le CD86 et le contact cellulaire entre la DC et les LT $\gamma\delta$ ⁽¹²⁰⁾. En contrepartie, les DC immatures, et dans une moindre mesure les DC matures (DCm), vont permettre de potentialiser la sécrétion de TNF- α par les LT V γ 9V δ 2 ⁽¹²¹⁾.

Enfin, les LT $\gamma\delta$ vont favoriser la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules tumorales via l'engagement du récepteur CD137 ⁽¹²²⁾. Ainsi, cette étude a montré que l'expansion *in vitro* des LT $\gamma\delta$ améliore les capacités cytotoxiques des cellules NK sur des cellules tumorales de cancers NK-résistants. En effet, la cytolyse des cellules tumorales par les cellules NK était ici facilitée par la co-stimulation entre le CD137 exprimé à la surface des cellules NK et son ligand (le CD137L) exprimé sur les LT $\gamma\delta$.

A la suite du manuscrit, nous étudierons exclusivement les LT V γ 9V δ 2, sous-groupe de LT $\gamma\delta$ faisant l'objet de notre étude.

II.III. Sous-populations de LT V γ 9V δ 2

Au sein des LT V γ 9V δ 2, il est possible de définir quatre sous-populations cellulaires suivant l'expression des marqueurs CD27 et CD45RA, utilisés également pour différencier les sous-populations de LT conventionnels. Ces quatre sous-populations, T_N, T_{CM}, T_{EM} et T_{EMRA}, expriment consécutivement ces marqueurs de surface, ce qui correspondra à différents stades de maturation, différentes localisations et différentes fonctions effectrices.

Les cellules naïves (T_N) ont un phénotype CD27⁺, CD45RA⁺ et expriment fortement les récepteurs CCR7 et CD62L ⁽¹⁰⁰⁾. Ces lymphocytes sont localisés essentiellement au niveau des ganglions lymphatiques. Les T_N sont hautement prolifératives mais ne possèdent pas de fonction effectrice.

Les cellules centrales mémoires (T_{CM}) ont un phénotype CD27⁺, CD45RA⁻ et sont issues de la maturation des cellules T_N après stimulation antigénique ^(100,123). Comme les cellules T_N, on les retrouve dans les ganglions lymphatiques, mais également dans le sang de façon importante. Ces cellules expriment faiblement CCR7 et fortement CD62L. Elles vont aussi exprimer de nouveaux récepteurs aux chimiokines, CCR5 et CXCR3, leur permettant de migrer au niveau du site inflammatoire. De plus, elles acquièrent le marqueur de phénotype mémoire CD45RO ⁽¹⁰⁰⁾. Comme les cellules T_N, elles sont prolifératives en réponse à une stimulation. De plus, on peut les différencier en deux sous-populations, suivant l'expression du marqueur CXCR5. Les cellules CXCR5⁺ vont exprimer des molécules co-stimulatrices, comme le CD40L et ICOS (*Inductible T-cell COStimulator*) ; produire de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-10 et aider à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Les T_{CM} CXCR5⁻ seront CD40L⁻, ICOS⁻, ne sécrètent pas de cytokines et n'interagissent pas avec les lymphocytes B ⁽¹²⁴⁾.

Les cellules de type effecteur mémoire (T_{EM}) sont CD27⁻ et CD45RA⁻ et expriment fortement les récepteurs aux chimiokines pro-inflammatoires CXCR3, CCR2, CCR5 et également CD45RO. De plus, les T_{EM} expriment faiblement le récepteur aux immunoglobulines G (IgG) Fc γ RIIIA (CD16A) et les NKRs ⁽¹⁰¹⁾. On peut les retrouver dans le sang périphérique mais principalement au niveau des sites inflammatoires. Contrairement aux T_{CM}, les T_{EM} sont beaucoup moins prolifératives. De plus, elles seront fortement cytotoxiques (grâce à une importante production des cytokines IFN- γ et TNF- α ⁽¹⁰⁰⁾) mais seront faiblement cytolytiques (à cause d'une faible production de perforine).

Les LT V γ 9V δ 2 effecteurs mémoires terminaux (T_{EMRA}) sont CD27⁻ et CD45RA⁺. Ces cellules se situent essentiellement au niveau des sites inflammatoires ⁽¹⁰⁰⁾. Les cellules T_{EMRA} expriment le récepteur CD45RO mais contrairement aux T_{CM}, elles expriment peu de récepteurs aux chimiokines et beaucoup de CD16 ainsi que de NKRs. Expriment de fortes quantités de perforine, les T_{EMRA} présentent une activité cytotoxique importante envers certaines bactéries et cellules tumorales. De plus, elles produisent des cytokines pro-inflammatoires mais en quantités plus faibles que les T_{EM} ⁽¹⁰¹⁾.

Les LT V γ 9V δ 2 pourraient passer successivement entre les quatre sous-populations suivant cette séquence, basée sur l'enchaînement de l'état de leur maturation ⁽¹⁰⁰⁾ :

T_N → T_{CM} → T_{EM} → T_{EMRA}.

II.IV. Réactivité des LT V γ 9V δ 2

Les LT V γ 9V δ 2 sont considérés comme des senseurs du stress cellulaire car ils peuvent s'activer dans différents contextes, notamment lors d'une infection ou d'une inflammation liée à une lésion tumorale. Leur activation antigénique est dépendante de la reconnaissance et de l'engagement du TCR vis-à-vis d'un antigène présenté à la surface des cellules cibles. Au niveau de ces cellules cibles, différents partenaires ont été identifiés comme indispensables à cette activation. Enfin, la réactivité des LT V γ 9V δ 2 peut également être modulée par certains récepteurs exprimés à leur surface, qui seront détaillés en fin de chapitre.

II.IV.A. Antigènes reconnus par les LT V γ 9V δ 2

Dans les années 1990, les premiers antigènes spécifiques des LT V γ 9V δ 2 ont été mis en évidence suite à l'étude d'extraits de *Mycobacterium tuberculosis* qui s'avéraient capables d'activer des LT V γ 9V δ 2 *in vitro*. Cela a conduit à l'identification de petites molécules non peptidiques phosphorylées indispensables à leur fonction activatrice ^(125,126). Ces carbohydrates de faibles poids moléculaires (<3KDa) contenant un groupement pyrophosphate ont alors été nommées phosphoantigènes (PAGs) ⁽¹²⁷⁾.

II.IV.A.1. Phosphoantigènes

Nature des phosphoantigènes

Les premières études réalisées sur les extraits de *Mycobacterium tuberculosis* ont permis d'isoler par des analyses structurales quatre antigènes non peptidiques phosphorylés dénommés tuberculosis antigens TUBag 1-4 ⁽¹²⁵⁾ et décrits dans la Tableau 2 ci-dessous.

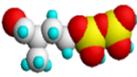
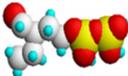
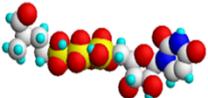
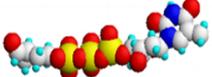
Phosphoantigènes	Aperçu tridimensionnel	Bioactivité
TUBag1 : X-P-P X : 3-formyl-1-butyl		5-10 nM
TUBag2 : Y-P-P Y : 3-formyl-1-pentyl		nd
TUBag3 : X-P-P-P-uridine		1-10 nM
TUBag3 : X-P-P-P-thymidine		10-20 nM

Tableau 2 : Structures des antigènes TUBag (adapté de ⁽¹²⁸⁾, P en jaune, O en rouge, C en blanc, N en bleu foncé, H en cyan).

Parallèlement, une autre équipe a identifié d'autres PAg naturels (isopentényl-pyrophosphate, diméthylallyl-pyrophosphate) ou synthétiques (alkyl phosphates) et a confirmé la nécessité du groupement phosphate, commun dans la structure ⁽¹²⁹⁾ (Figure 13).

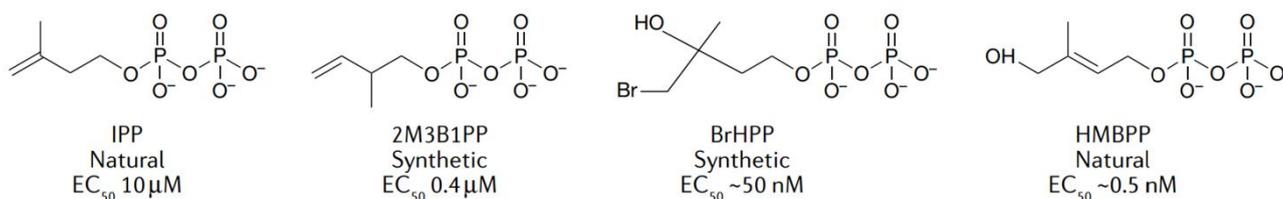


Figure 13 : Structures chimiques des principaux PAg naturels et synthétiques. ⁽¹³⁰⁾

Le PAg naturel qui a la plus forte réactivité décrite correspond au (E)-Hydroxydiméthylallyl pyrophosphate (HDMAPP), puisque sa capacité d'activation des LT V γ 9V δ 2 est 1000 fois supérieure à celle de l'IPP ⁽¹³¹⁾. Grâce à la connaissance de la structure chimique des PAg naturels, des PAg synthétiques ont été produits, présentant des bioactivités très variables ⁽¹³²⁾. Par exemple, la forme synthétique de l'HDMAPP correspond au c-HDMAPP (ou Picostim), qui présente la même bioactivité que le PAg naturel mais une structure légèrement différente (un atome d'oxygène est remplacé par un atome de carbone au niveau de la chaîne de liaison carbonique) ⁽¹³³⁾. De plus, le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP) (ou Phosphotim) est connu comme étant un très bon activateur synthétique des LT V γ 9V δ 2. Il est utilisé en expérimentation et dans les essais thérapeutiques d'immunothérapies basés sur les LT V γ 9V δ 2 ^(131,134).

Biosynthèse des phosphoantigènes

Les PAg naturels qui présentent la plus forte bioactivité sont des intermédiaires de synthèse de la voie métabolique des isoprénoïdes (Figure 14).

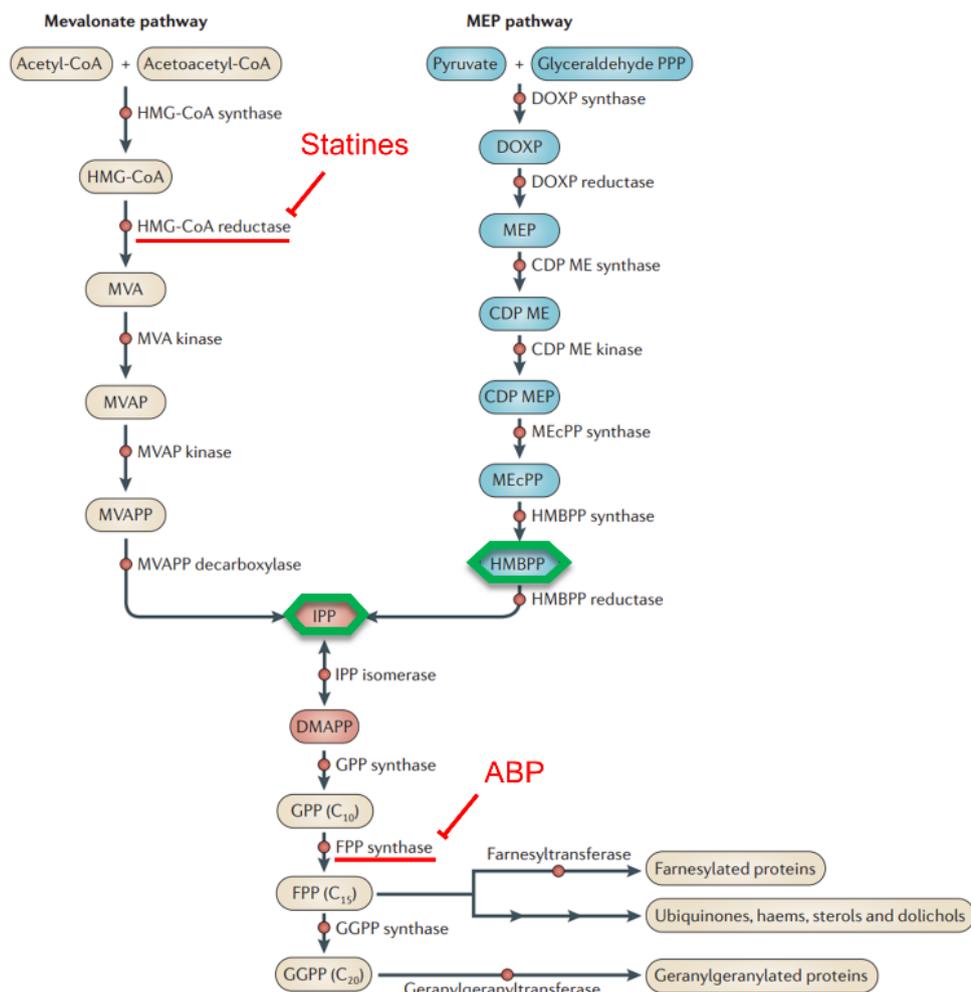


Figure 14 : Voies de biosynthèse du Mévalonate et du DOXP (adapté de ⁽¹³⁵⁾).

Il existe deux voies de synthèse de ces molécules : la voie de Rohmer (appelée également voie du DOXP (deoxyxylulose-5-phosphate)) et la voie du mévalonate, qui est ubiquitaire chez les eucaryotes ⁽¹³⁶⁾. Ces deux voies métaboliques différentes permettraient aux LT Vγ9Vδ2 de repérer les cellules infectées parmi les cellules saines grâce à leur production importante des PAgS IPP et HDMAPP, deux métabolites finaux communs à ces voies métaboliques (losanges verts sur la Figure 14) ⁽¹³⁷⁾. De nombreuses espèces du vivant utilisent ces voies métaboliques pour réaliser des processus biologiques nécessitant de l'énergie, notamment du cholestérol. Cette large utilisation pourrait expliquer l'implication des LT Vγ9Vδ2 dans la réponse immunitaire contre des pathologies infectieuses variées. Par ailleurs, la voie du mévalonate est ubiquitaire et peut être surexprimée dans certains types de cellules cancéreuses, pouvant expliquer en partie l'activation possible des LT Vγ9Vδ2 sont activés en présence de cellules cancéreuses ⁽¹³⁸⁾.

II.IV.A.2. Les alkylamines et aminobiphosphonates

Outre les PAgS, des molécules de la famille des alkylamines, comme par exemple l'isobutylamine qui est naturellement sécrété par des bactéries commensales et donc présent notamment dans le sang périphérique, peuvent induire la production d'IL-2 et la prolifération des LT Vγ9Vδ2 entraînant leur activation spécifique ^(139,140).

Une famille de molécules correspondant aux ABP, composés d'origine naturelle ou synthétique, sont connus depuis longtemps comme des inhibiteurs de la résorption osseuse et sont indiqués chez des patients atteints d'ostéoporose ou de métastases osseuses ⁽¹⁴¹⁾. D'après la Figure 14, ces composés sont capables d'inhiber une enzyme intervenant dans la voie métabolique de biosynthèse du cholestérol entraînant par la suite une modification de la concentration intracellulaire en IPP pouvant moduler l'activation des LT Vγ9Vδ2 ⁽¹⁴²⁾. L'enzyme inhibée par les ABP correspond à la farnesyl diphosphate synthase (FPPS), responsable de la transformation de l'IPP en farnesyl diphosphate (FPP) (traits rouges sur la Figure 14) ^(135,143). Cette inhibition va bloquer la synthèse de FPP ce qui entraîne une accumulation de l'IPP endogène pouvant induire de manière indirecte l'activation des LT Vγ9Vδ2. Au-delà de cette propriété, les ABP partagent une similitude structurale avec les PAgS (Figure 15).

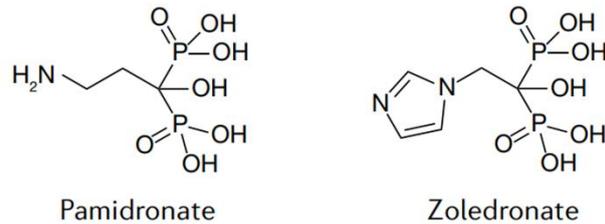


Figure 15 : Structures chimiques des principaux ABP. ⁽¹³⁰⁾

D'après une étude, les ABP (zolédronate, alendronate et pamidronate) sont capables d'induire une prolifération significative des LT V γ 9V δ 2 au sein des PBMCs de donneurs sains, strictement dépendante de l'IL-2 ⁽¹⁴⁴⁾. Les ABP conduisent à une activation efficace des LT V γ 9V δ 2 puisqu'ils entraînent une augmentation de l'expression du CD69 (marqueur d'activation apparaissant précocement à la surface des lymphocytes) et du CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2). Parmi les ABP, les plus utilisés en recherche et en clinique sont le zolédronate et le pamidronate et leur capacité d'activation indirecte des LT V γ 9V δ 2 se produit à une concentration inférieure à celle des alkylamines.

De plus, il existe une famille de composés pharmacologiques correspondant aux statines, dont le chef de file est la Mévastatine, qui vont inhiber la HMG-CoA réductase et donc bloquer la voie du mévalonate plus en amont que les ABP (traits rouges sur la Figure 14). Certaines molécules de la famille des statines correspondent au traitement de référence pour des pathologies métaboliques. Ainsi, une étude a montré que le traitement par la Mévastatine empêchait l'activation des LT V γ 9V δ 2 induite par le zolédronate ⁽¹³⁸⁾. En effet, les statines bloquent l'accumulation d'IPP endogène, inhibant l'activation des LT V γ 9V δ 2 induite par un ABP ou une alkylamine ⁽¹⁴³⁾.

Les LT V γ 9V δ 2 seraient aussi capables de répondre à des superantigènes comme la SEA (Staphylococcal Enterotoxin A) ^(145,146) ou la TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1*) ⁽¹⁴⁷⁾. Dans cette étude réalisée sur des PBMCs humains, la TSST-1 peut induire une augmentation significative de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2, associée à une diminution de l'IL-10, après priming des LT $\gamma\delta$ par l'IPP, en comparaison au groupe contrôle sans priming. De plus, la déplétion des LT $\gamma\delta$ dans les PBMCs humains supprime cet effet, montrant l'importance des LT $\gamma\delta$ dans la réponse à la TSST-1. Cependant, il n'y a pas eu de nouvelle étude publiée à ce jour concernant la réponse des LT V γ 9V δ 2 aux superantigènes.

II.IV.B. Reconnaissance des phosphoantigènes par le TCR V γ 9V δ 2

Il est clairement établi que l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS est dépendante de leur TCR. En effet, le blocage du TCR ou du CD3 permet d'inhiber la réactivité des LT V γ 9V δ 2 ^(125,138,129) tandis que la transfection d'un TCR V γ 9V δ 2 dans la lignée Jurkat (LT $\alpha\beta$ leucémique n'exprimant pas de TCR) la rend capable de reconnaître aussi bien des PAgS que des cellules sensibilisées par des ABP ⁽¹⁴⁸⁾.

Cependant et malgré de nombreuses études réalisées dans ce domaine, les mécanismes d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS ne sont pas complètement élucidés. L'hypothèse d'une interaction directe entre le TCR V γ 9V δ 2 et le PAg, sans intervention d'un partenaire moléculaire, a été rapidement réfutée par la nécessité de contacts cellulaires pour activer les LT V γ 9V δ 2 ^(127,149).

En comparaison de l'activation des LT $\alpha\beta$ conventionnels (voir partie I.II. de l'introduction de ce manuscrit), de nombreuses molécules du CMH classiques et non classiques ont été testées comme molécules de présentation des PAgS. Ces études ont montré que l'activation des LT V γ 9V δ 2 ne requiert pas l'intervention des molécules du CMH de classe I et II, ni du transporteur TAP ^(127,149,150). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les LT V γ 9V δ 2 seraient capables de reconnaître des PAgS sans présentation ni restriction par les molécules du CMH a émergé. Elle est soutenue par certaines observations expérimentales puisque des LT V γ 9V δ 2 exposés à des PAgS en absence de toute autre cellule accessoire peuvent s'activer, sécréter du TNF- α et avoir une activité cytotoxique ^(149,151).

Ainsi, nous venons de voir que l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS est dépendante de son TCR. Néanmoins, l'implication du TCR est nécessaire mais insuffisante pour permettre cette activation. Puisque la reconnaissance des PAgS est indépendante des molécules du CMH, de nombreuses études ont porté sur l'identification de partenaires potentiels, notamment des molécules de co-stimulation, qui seraient impliqués dans la présentation des PAgS aux LT V γ 9V δ 2.

II.IV.C. Partenaires impliqués au cours de la reconnaissance des PAgS par les LT V γ 9V δ 2

Ces différents partenaires identifiés sont présents sur la cible, notamment tumorale ou CPA, avec laquelle interagit le LT V γ 9V δ 2.

II.IV.C.1. Les butyrophilines

Afin d'identifier un premier partenaire de la présentation des PAg aux LT V γ 9V δ 2 permettant leur activation, plusieurs études se sont concentrées sur la famille de protéines correspondant aux butyrophilines (BTN). Ces glycoprotéines de type I font partie de la superfamille des immunoglobulines, sont ubiquitaires et présentent de grandes similarités de structure avec la famille des protéines B7, des molécules ayant une action co-stimulatrice. En effet, les domaines extracellulaires IgV et IgC (domaine de type immunoglobuline variable et constant) sont très similaires entre les familles des BTN et des B7, laissant suggérer une fonction immunomodulatrice de cette famille de protéines B7-like ⁽¹⁵²⁾. Ainsi, cette famille présente des candidats particulièrement intéressants pour identifier de nouveaux partenaires à l'activation des LT V γ 9V δ 2.

Une étude sur la caractérisation des BTN a permis la génération de différents anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules de la sous-famille BTN3A/CD277 ⁽¹⁵³⁾. En testant la réactivité de ces anticorps, une équipe a mis en évidence que l'anticorps monoclonal 20.1 activait les LT V γ 9V δ 2 via leur TCR en induisant leur sécrétion de cytokines et leurs fonctions cytotoxiques, reproduisant ainsi l'action des PAg. De plus, l'anticorps dirigé contre le clone 20.1 peut aussi augmenter la lyse tumorale de lignées cancéreuses pourtant résistantes à l'activité cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 et traitées au préalable par cet anticorps. Le ciblage du clone 103.2 va quant à lui inhiber cette activation ^(154,155).

La sous-famille BTN3A (ou CD277) présente trois isoformes : BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3 ⁽⁶¹⁾ décrits dans la Figure 16 ci-dessous.

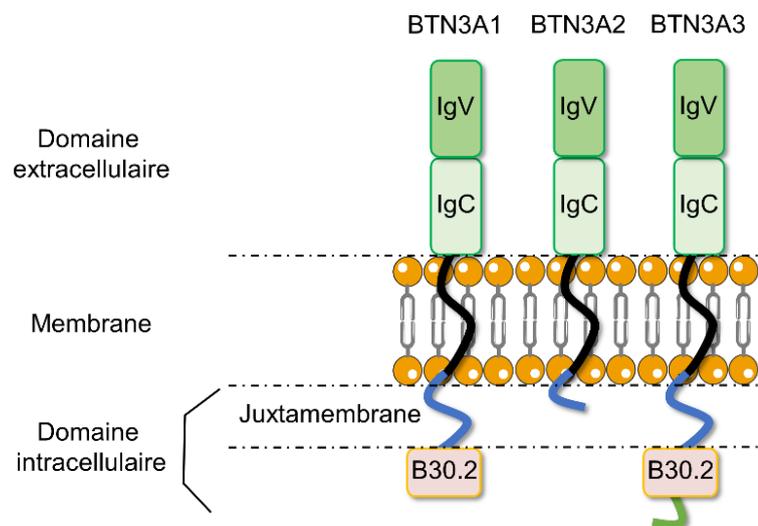


Figure 16 : Structures schématisées des 3 isoformes des BTN3A.

D'après la Figure 16, elles sont toutes composées de deux domaines extracellulaires de type IgV et IgC qui présentent une très forte homologie de structure (>95%). Cependant, leur domaine transmembranaire et intracellulaire présente une grande diversité ⁽¹⁵⁶⁾. En effet, seules les isoformes A1 et A3 possèdent un domaine intracellulaire de type B30.2, celui de l'isoforme A2 étant tronqué, il ne comporte pas de domaine intracellulaire. Or, le domaine intracellulaire de type B30.2 est très important pour la transduction du signal ⁽¹⁵²⁾. L'anticorps dirigé contre le clone 20.1 peut reconnaître ces trois isoformes, mais l'activation des LT V γ 9V δ 2 grâce au domaine intracellulaire B30.2 ne peut se faire qu'avec l'isoforme BTN3A1. En effet, le domaine intracellulaire de type B30.2 présent au niveau de l'isoforme BTN3A3 diffère légèrement de celui de la BTN3A1, ce qui ne lui confère pas les propriétés activatrices de LT V γ 9V δ 2.

Au cours de ces dernières années, l'implication de la BTN3A1 dans la réactivité des LT V γ 9V δ 2 a été clairement démontrée ^(155,157,158) mais les mécanismes moléculaires permettant l'activation des LT V γ 9V δ 2 via l'interaction entre la BTN3A1 et les PAg restent encore en partie inexpliqués. Ainsi deux modèles principaux d'interaction pourraient être proposés, repris dans la Figure 17 ⁽⁶¹⁾.

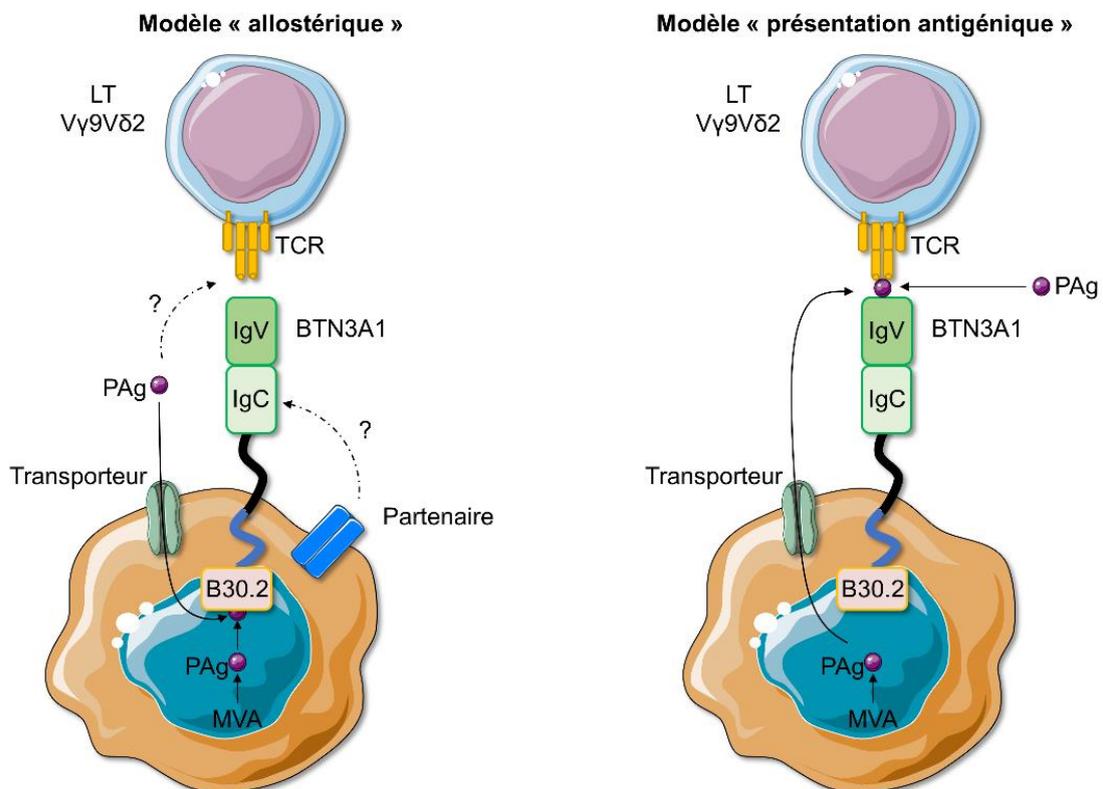


Figure 17: Modèles théoriques de l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains (adapté de ⁽⁶¹⁾).

Le premier est un modèle « allostérique » basé sur l'interaction des PAgS (endogènes ou internalisés) avec le domaine intracellulaire B30.2 de la BTN3A1, qui induirait des modifications alors perçues par les LT V γ 9V δ 2 et permettrait leur activation (partie gauche de la Figure 17). Ces modifications allostériques peuvent être des changements de conformation, des variations de la topographie membranaire et/ou le recrutement/exclusion de partenaires moléculaires ⁽¹⁵⁵⁾.

Le second est un modèle de « présentation antigénique » basé sur l'interaction des PAgS (extrudés ou exogènes) avec le domaine extracellulaire IgV de la BTN3A1 formant ainsi un complexe antigénique reconnu par les LT V γ 9V δ 2 et menant à leur activation ⁽¹⁵⁷⁾ (partie droite de la Figure 17). Dans le cas des PAgS endogènes, ce modèle nécessite l'implication d'un transporteur membranaire. Cependant ce modèle est controversé puisqu'il n'y a pas de preuve d'une interaction directe entre le TCR γ 9V δ 2 et la BTN3A1 ^(130,157,159).

Une étude a montré que la transfection de la BTN3A1 dans des cellules murines ne permet pas l'activation des LT V γ 9V δ 2 en présence de PAgS ⁽¹⁶⁰⁾. Ainsi, la protéine BTN3A1 est nécessaire mais insuffisante à l'activation des LT V γ 9V δ 2 et d'autres partenaires protéiques potentiellement impliqués dans ce mécanisme continuent d'être investigués. Des équipes ont cherché à approfondir les connaissances dans la séquence d'activation des LT V γ 9V δ 2 ⁽¹⁵⁹⁾. Grâce à la technique de spectrométrie RMN, cette étude a montré que le domaine intracellulaire B30.2 de la BTN3A1 subit un changement conformationnel lors de sa liaison avec le PAg, puisque la fixation du PAg dans sa poche de liaison va modifier la conformation préexistante du domaine intracellulaire B30.2. De plus, les domaines extracellulaires de la BTN3A1 adoptent au repos une conformation en V et si cette conformation est bloquée artificiellement, l'activation des LT V γ 9V δ 2 suite à l'arrivée des PAgS sera diminuée. Ces résultats sont en faveur d'un changement de conformation de la BTN3A1 qui serait un événement clé dans la détection des PAgS précédant l'activation des LT V γ 9V δ 2.

Grâce à une cartographie du génome, une étude particulièrement récente (publiée en février 2020) a identifié la BTN2A1 comme nouvel acteur dans la détection du PAg par les LT V γ 9V δ 2 ⁽¹⁶¹⁾. Après identification, les chercheurs ont regardé si cette molécule liait directement le TCR V γ 9V δ 2 et si son action pouvait être conjointe avec celle connue de la BTN3A1. Ces travaux montrent que les LT V γ 9V δ 2 ne peuvent pas s'activer par des PAgS bactériens ou de mammifères en l'absence de la BTN2A1 et que l'expression de la BTN2A1 est requise pour la lyse tumorale médiée par les LT V γ 9V δ 2. De plus, la perte de la BTN2A1 ne peut pas être compensée par la BTN3A1 ou d'autres butyrophilines. La BTN2A1 peut se lier directement au TCR V γ 9V δ 2 et s'associer avec la BTN3A1 à la surface des cellules cibles. Le domaine

transmembranaire et/ou intracellulaire de la BTN2A1 joue également un rôle important. De plus, l'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ médiée par les PAg nécessite la co-expression à la fois de la BTN3A1 mais également de la BTN2A1, permettant ensemble la reconnaissance du PAg et l'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$. La liaison de la BTN2A1 se situe au niveau du domaine $V\gamma 9$ du TCR du lymphocyte. Il existe un second domaine de liaison critique sur le TCR qui incorpore $V\delta 2$. La perturbation de ces sites de liaison supprime la capacité des LT $V\gamma 9V\delta 2$ à répondre aux PAg. Ces résultats ont conduit à la proposition du modèle d'interaction présenté dans la Figure 18.

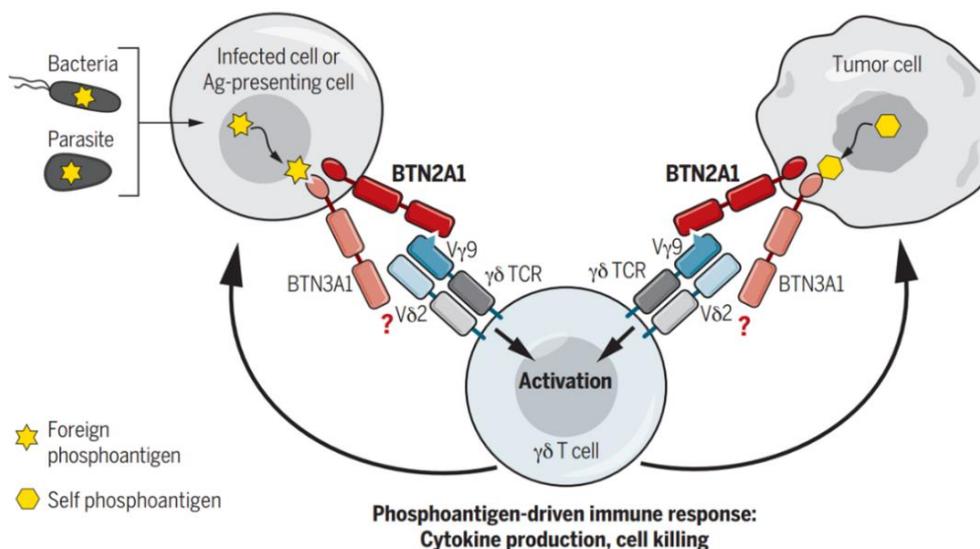


Figure 18 : Modèle d'interaction proposé de la BTN2A1 dans l'activation antigénique des LT $V\gamma 9V\delta 2$ humains. ⁽¹⁶¹⁾

Ces travaux ont été confortés par une nouvelle étude sortie un mois après, ayant identifié, par une technique d'hybrides de radiation, la BTN2A1 comme co-facteur critique de la BTN3A1 pour la reconnaissance du TCR $V\gamma 9V\delta 2$ en présence de PAg ⁽¹⁶²⁾. Cette étude démontre que la reconnaissance antigénique des LT $V\gamma 9V\delta 2$ est complètement différente de celle retrouvée pour les autres cellules immunitaires. Ils ont proposé un modèle dans lequel la BTN3A1 et la BTN2A1 se lient toutes deux au TCR $V\gamma 9V\delta 2$ en réponse au PAg. La liaison du PAg pourrait entraîner un remodelage et/ou un changement de conformation de la molécule BTN pour former un complexe BTN2A1/BTN3A1 stimulant. La détection du PAg aurait lieu grâce à un modèle de ligands composites dans lequel le TCR $V\gamma 9V\delta 2$ interagit directement avec la BTN2A1 et un ligand supplémentaire reconnu d'une façon dépendante du CD3R.

Ainsi la BTN3A1 et BTN2A1 vont interagir avec le TCR afin de permettre l'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ par les PAg, mais la séquence temporelle qui régit ces trois acteurs reste inconnue. Une étude publiée en juin 2020 a permis d'établir plus finement l'intervention de ces

trois paramètres et a proposé ainsi un nouveau modèle séquentiel de reconnaissance antigénique des LT V γ 9V δ 2⁽¹⁶³⁾. Dans ce modèle, le TCR V γ 9V δ 2 est uniquement critique lors de l'initiation du contact entre le LT V γ 9V δ 2 et sa cible pour former un conjugué, via la liaison de la BTN2A1 au niveau de la chaîne γ 9 du TCR. Cette liaison permet de délivrer le premier signal de l'activation du lymphocyte T et de maintenir la forte densité nécessaire au bon déroulement d'une synapse immunologique. Secondairement, la région CDR3 de la chaîne δ 2 du TCR se lie à un autre partenaire présent sur la cible qui reste inconnu, permettant également de moduler le premier contact entre le TCR V γ 9V δ 2 et la cible. Ces deux étapes ne dépendent pas des PAg. Ainsi la liaison du TCR V γ 9V δ 2 à sa cible peut se dérouler en l'absence de la BTN3A1. Cependant, la BTN3A1 va délivrer le second signal, qui agit comme un ligand de co-stimulation nécessaire afin de permettre la stabilisation du contact entre les deux conjugués et le maintien de la synapse. Après contact entre la cible et le LT V γ 9V δ 2, la BTN3A1 est recrutée au niveau de la synapse immunologique puis la partie extracellulaire change de conformation pour permettre la liaison du récepteur. Cette étape est dépendante du PAg mais pas de la présence du TCR V γ 9V δ 2.

Pour résumer, le modèle proposé dans cette étude implique deux récepteurs : le TCR V γ 9V δ 2 et le récepteur de la BTN3A1 qui reste à déterminer. De plus, le modèle implique trois ligands : la BTN2A1 qui se lie au niveau de la chaîne V γ 9 du TCR, la BTN3A1 qui se lie au niveau d'un récepteur restant à déterminer et un ligand inconnu qui se lie à la chaîne V δ 2 du TCR V γ 9V δ 2. Ainsi des travaux supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier les autres récepteurs et ligands impliqués dans le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg.

L'action de ces butyrophilines est cruciale mais insuffisante pour permettre cette activation. De plus, les BTN sont régulées par différents adaptateurs qui participent à l'activation des LT V γ 9V δ 2. Par conséquent, d'autres études ont cherché à identifier de nouveaux partenaires à ce mécanisme.

II.IV.C.2. F1-ATP synthase, Apo A1 et ABCA1

Parmi les candidats étudiés, la F1-ATP synthase, exprimée à la surface des cellules tumorales lysées par les LT V γ 9V δ 2, pourrait s'associer à l'apolipoprotéine A1 pour former un complexe de présentation des PAg à la surface des cellules cibles⁽¹⁶⁴⁾. De plus, l'Apppl, un dérivé adénylé de l'IPP, pourrait se lier de manière stable à la F1-ATPase et promouvoir l'agrégation du TCR, la sécrétion d'IFN- γ et la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2⁽¹⁶⁵⁾. Pris ensemble, ces résultats tendent à penser que la F1-ATPase, associée à l'Apo A1, pourrait jouer un rôle de présentation antigénique des PAg. Cependant, aucune expérience de co-

immunoprécipitation entre la F1-ATPase et le TCR V γ 9V δ 2 n'a pu être réalisée à ce jour et le rôle de la F1-ATPase en tant que molécule présentatrice des PAgS n'est pas formellement démontré.

Plus récemment, une équipe a mis en évidence un nouveau partenaire participant à la reconnaissance des PAgS endogènes avec le domaine extracellulaire IgV de la BTN3A1, formant un complexe antigénique reconnu par les LT V γ 9V δ 2 ⁽¹⁶⁶⁾. Cette étude montre que l'accumulation de l'IPP entraîne la translocation nucléaire de LXR α , permettant ensuite la transcription des gènes *Abca1* et *apoA-1* puis l'augmentation de l'expression d'ABCA1 et d'*apoA-1* à la surface de la DC. Ce partenaire nouvellement identifié correspond à un transporteur membranaire permettant la sortie des PAgS endogènes vers le milieu extracellulaire, appelé ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). Ce dernier agit en collaboration avec l'apolipoprotéine A1 et la BTN3A1 pour permettre l'activation des LT V γ 9V δ 2 comme indiqué dans le modèle d'action proposé dans cette étude (Figure 19).

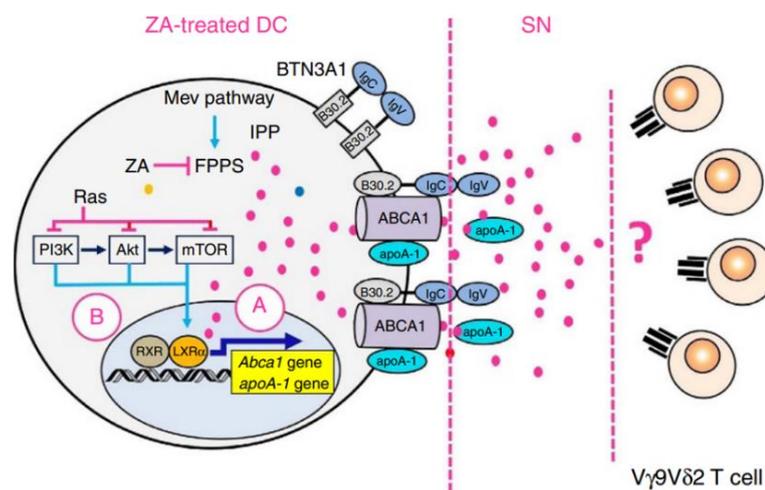


Figure 19 : Mécanismes impliqués dans le relargage de l'IPP par les DC traitées au zolédronate. ⁽¹⁶⁶⁾

Une étude plus récente a également identifié des membres de la famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC) (ABCG2 et ABCG1), comme étant impliqués dans la sécrétion de cytokines par les LT V γ 9V δ 2 suite au traitement par HMB-PP ⁽¹⁶⁷⁾. Ils ont également confirmé l'implication du transporteur ABCA-1.

Ainsi ces différents travaux participent à la compréhension des mécanismes permettant l'apprêtement des PAgS au TCR afin d'entraîner l'activation des LT V γ 9V δ 2. Cependant, d'autres études ont permis d'identifier de nouveaux partenaires intracellulaires régulant cette activation présents au niveau de la cible tumorale.

II.IV.C.3. RhoB

Le mode opératoire des PAgS endogènes et exogènes n'étant pas encore parfaitement décrit, des études ont ciblé leurs recherches dans l'identification de partenaires intracellulaires régulant l'activation des LT V γ 9V δ 2. Ainsi, une étude a mis en évidence l'implication de RhoB, petite protéine G impliquée notamment dans l'organisation des filaments d'actine et le transport vésiculaire, dans les mécanismes d'activation des LT V γ 9V δ 2 ⁽¹⁶⁸⁾. Cette équipe a proposé le modèle d'interaction décrit dans la Figure 20.

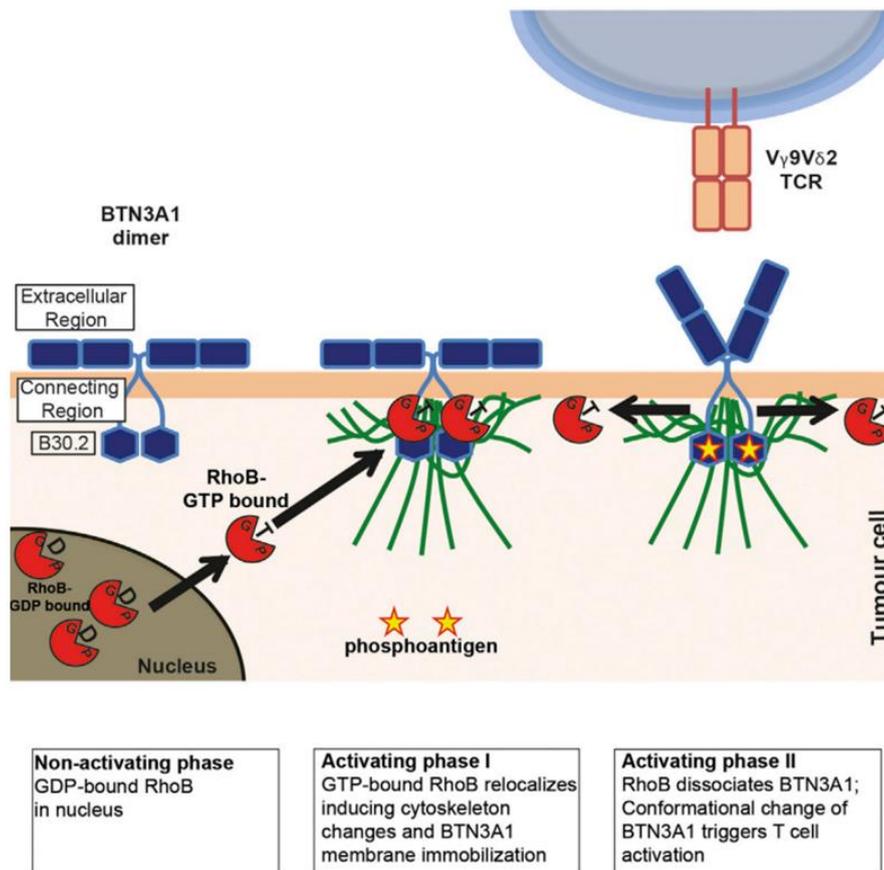


Figure 20 : Modèle d'interaction proposé de RhoB dans l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains. ⁽¹⁶⁸⁾

Au repos, il n'y a pas d'accumulation de PAgS et dans ce cas RhoB est sous forme inactive dans le noyau de la cellule tumorale, c'est-à-dire lié à une molécule GDP. Suite à l'accumulation de PAgS, RhoB va s'activer, sera lié à une molécule GTP et va changer de localisation. En effet, il sera dans le cytoplasme et pourra se fixer au niveau du domaine intracellulaire B30.2 de la BTN3A1. Grâce à son action sur le cytosquelette, RhoB va entraîner une redistribution spatiale de la BTN3A1 et ainsi permettre la fixation du PAg au niveau du domaine intracellulaire B30.2. Puis RhoB actif lié au GTP va se dissocier permettant un changement de conformation de la partie extracellulaire de la BTN3A1 conduisant à l'activation

des LT V γ 9V δ 2. Les expériences ont été réalisées sur des modèles de cancers hématologiques et ont testés l'implication de RhoB en réponse aux PAgS endogènes (suite au traitement par ABP) et exogènes (IPP).

L'étude récente de Vyborova et al. confirme l'importance de RhoB dans la coordination du signal de co-stimulation délivré par la BTN3A1 ⁽¹⁶³⁾. En effet, la capacité de la cellule cible à utiliser les stocks de réserve intracellulaire de la BTN3A1 dépend probablement de sa capacité à activer RhoB. Lorsque la protéine RhoB est activée, elle pourra alors exercer son rôle sur la mobilité membranaire pour permettre la modification de la conformation de la BTN3A1.

A ce jour il existe peu d'articles scientifiques dans la littérature relatant de l'implication de RhoB dans le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2 et rien n'est connu concernant les cancers solides. Puisque l'implication de RhoB dans ce mécanisme correspond à l'objet d'étude de mes travaux de thèse de pharmacie, la partie III. de l'introduction sera dédiée à cette protéine. Les résultats obtenus au cours de ma thèse concernant l'implication de RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS sont présentés dans la partie « Résultats » de ce manuscrit. Comme la protéine RhoB est nécessaire mais insuffisante pour permettre l'activation des LT V γ 9V δ 2, des études ont cherché à identifier d'autres partenaires impliqués dans le remodelage du cytosquelette.

II.IV.C.4. La Périplakine

Une étude a identifié la Périplakine, un membre de la famille des protéines adaptatrices du cytosquelette, comme étant impliqué dans le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2 ⁽¹⁶⁹⁾. La Périplakine interagirait avec un motif di-leucine localisé près de la queue cytoplasmique du domaine B30.2 de la BTN3A1, sans interagir avec la BTN3A2 ni BTN3A3 car ils ne contiennent pas ce motif. Ces travaux ont montré une activation possible des LT V γ 9V δ 2 après restauration de la BTN3A1 dans des lignées cellulaires *knock out* (KO) pour la BTN3A1, mais qui restait impossible dans le variant déficient en motif dileucine permettant la fixation de la Périplakine (le variant BTN3A1 Δ exon5). Ces travaux ont testé la réactivité des LT V γ 9V δ 2 au PAg endogènes (via l'utilisation du zolédronate) et exogènes via le HMB-PP. A ce jour, il n'y a pas d'autres travaux montrant l'implication de la Périplakine dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS.

Ainsi la réactivité des LT V γ 9V δ 2 est régulée par différents partenaires permettant la présentation des PAgS au TCR V γ 9V δ 2. Ces différents partenaires sont présents au niveau

de la cible tumorale. Cependant, l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS est également contrôlée par d'autres récepteurs complémentaires, présents directement sur les lymphocytes.

II.IV.D. Récepteurs complémentaires à la réactivité des LT V γ 9V δ 2

En effet, la réactivité des LT V γ 9V δ 2 est régulée par différents récepteurs modulateurs.

II.IV.D.1. Les NKRs

Comme les cellules NK, les LT V γ 9V δ 2 expriment de nombreux récepteurs de cellules NK (NKR), activateurs ou inhibiteurs ⁽¹⁷⁰⁾. Ces récepteurs ont été détaillés dans la partie I.I.B.1. de l'introduction de ce manuscrit.

Les LT V γ 9V δ 2 peuvent notamment exprimer le récepteur activateur NKG2D, apportant un signal important de co-stimulation puisque son activation entraîne une amplification de la production cytokinique, la prolifération et la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 ^(171,172). Une étude a montré que le récepteurs NKG2D et ses ligands étaient impliqués dans les effets anti-tumoraux des LT V γ 9V δ 2 contre le mélanome et d'autres cancers épithéliaux ⁽¹⁷³⁾. L'expression des ligands de NKG2D à la surface tumorale pourrait être corrélée à la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 contre des blastes de LAM traités par ABP ⁽¹⁷⁴⁾. D'autres expériences ont montré que le blocage de ce récepteur via un anticorps bloquant va fournir un signal de co-stimulation important dans la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 dirigée contre des cellules cibles cancéreuses exprimant MICA/B et ULPBs ^(134,175).

Parmi les NKR inhibiteurs exprimés par les LT V γ 9V δ 2, on peut citer des molécules de la famille des lectines C (NKG2A, NKG2C et CD94) ⁽¹⁷⁶⁾. Leur expression est corrélée à une diminution de l'expression du TCR V γ 9V δ 2 ⁽¹⁷⁷⁾. Lors d'une activation des LT V γ 9V δ 2 par un PAg, tous les récepteurs CD94/NKG2A intracytoplasmiques vont être externalisés à la surface ⁽¹⁷⁸⁾. Le complexe CD94/NKG2A va alors s'activer et conduire à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α), ainsi qu'à l'inhibition de la prolifération et de la cytotoxicité dirigée contre des cellules cibles accumulant des PAgS ⁽¹⁷⁶⁾. Un autre récepteur inhibiteur des cellules NK exprimé par les LT V γ 9V δ 2 est l'ILT2 (immunoglobulin-like transcript 2). Ce récepteur interagit avec la molécule du CMH I non classique HLA-G, exprimée à la surface de cellules tumorales de mélanomes, de carcinomes rénaux, de tumeurs hématopoïétiques et de cancers ovariens. L'interaction HLA-G/ILT2 produit un signal inhibiteur pour la prolifération et la production d'IFN- γ des LT V γ 9V δ 2 activés par un PAg ⁽¹⁷⁹⁾. Ces ligands de ces NKR inhibiteurs sont des molécules du CMH I, dont l'expression à la surface

des cellules tumorales fluctue, permettant ainsi d'améliorer la détection d'une cellule modifiée par rapport à une cellule saine par les LT V γ 9V δ 2.

Afin de respecter une balance immunitaire raisonnable, la réponse des LT V γ 9V δ 2 est extrêmement bien régulée grâce à la compétition des signaux inhibiteurs délivrés par les récepteurs inhibiteurs avec ceux activateurs ⁽¹⁸⁰⁾.

II.IV.D.2. Les Toll-like receptors

Comme pour les LT $\alpha\beta$ conventionnels, les TLRs exprimés à la surface des LT V γ 9V δ 2 vont également influencer leur activation (voir partie I.II. de l'introduction). Par exemple, lorsque les LT V γ 9V δ 2 expriment le TLR 3, la production d'IFN- γ sera augmentée ⁽¹⁸¹⁾. De plus, la stimulation du TLR 2 exprimé sur les LT V γ 9V δ 2 entraîne leur activation via la sécrétion d'IFN- γ et l'expression de CD107a ⁽¹⁸²⁾. Une étude récente a montré que les agonistes du TLR 8 vont activer les monocytes au sein des PBMCs, entraînant une production d'IFN- γ par les LT V γ 9V δ 2 mais pas leur prolifération en présence de PAg ou de zolédronate ⁽¹⁸³⁾. Dans cette étude les agonistes du TLR 7 ont également été testé mais ils n'entraînent pas cet effet. Contrairement aux NKRs, les TLRs sont uniquement des co-stimulateurs puisqu'ils n'activent pas indépendamment du TCR $\gamma\delta$ les LT V γ 9V δ 2 ⁽¹⁸⁴⁾.

II.IV.D.3. Les récepteurs aux cytokines

Les cytokines de l'environnement vont également participer à la régulation de l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg par une immunomodulation du microenvironnement tumoral. Les cytokines de la famille γ_c , regroupant 6 cytokines différentes dont l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et IL-21, ont été bien étudiées. Ces cytokines vont toutes influencer les réponses des LT V γ 9V δ 2 aux PAg mais n'auront pas le même effet. Parmi celles-ci, l'IL-2 est la plus étudiée. Elle agit comme un facteur de croissance des LT, augmente la cytotoxicité des cellules NK et favorise la production des Ig par les LB. De plus, l'IL-2 induit la prolifération et la survie des cellules T activées ⁽¹⁸⁵⁾. En présence d'IL-2, les LT V γ 9V δ 2 activés suite au traitement de PBMCs par un PAg ou un ABP vont proliférer et devenir matures ⁽¹⁸⁶⁾. L'IL-7 et l'IL-15 peuvent également contrôler l'homéostasie des LT V γ 9V δ 2 ⁽¹⁸⁷⁾. Enfin, l'IL-21 va pouvoir agir en synergie avec les autres cytokines γ_c pour permettre la prolifération des LT lors de la réponse anti-tumorale ⁽¹⁸⁸⁾. Cependant, l'IL-21 peut aussi conduire à l'émergence des LT V γ 9V δ 2 régulateurs dans le cas d'une surexpression du récepteur CD73 ⁽¹⁸⁹⁾.

D'autres cytokines, comme l'IL-33, ne font pas partie de la famille γ_c . Cette cytokine est capable d'induire *in vitro* la prolifération des LT V γ 9V δ 2 activés par un PAg, leur production en cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α) et leur cytotoxicité anti-tumorale ⁽¹⁹⁰⁾. Une étude complémentaire a permis de confirmer l'effet prolifératif de l'IL-33 *in vivo* en combinaison avec un PAg et montrer que l'expansion des LT V γ 9V δ 2 peut prévenir la croissance tumorale dans un modèle murin de lymphome ⁽¹⁹¹⁾.

Ainsi les cytokines influencent grandement l'activation et les réponses des LT V γ 9V δ 2, ce qui peut constituer un frein dans le succès des immunothérapies à base de LT V γ 9V δ 2 (voir partie II.V. de cette introduction).

II.IV.D.4. Les molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion sont importantes dans l'installation et la stabilisation d'une synapse immunologique entre une cellule immunitaire effectrice et sa cible ⁽¹⁹²⁾. Ainsi les molécules d'adhésion sont présentes au sein de la synapse, colocalisant avec le complexe TCR/CD3. Le contact entre le LT V γ 9V δ 2 et sa cible est nécessaire pour permettre leur activation par les PAg. Ainsi, les LT V γ 9V δ 2 vont exprimer différentes molécules d'adhésion dont le binôme pourra être exprimé sur les cellules tumorales, on parle de couple (ou complexe) récepteur/ligand, comme par exemple LFA-1/ICAM-1, CD2/LFA-3 et CD6/CD166.

Le récepteur LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen 1*) est fortement exprimé à la surface des LT V γ 9V δ 2. Dans une étude *in vitro* sur le myélome multiple, la capacité de reconnaissance et de cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 contre les lignées tumorales RPMI8226 et U266 prétraitées par un PAg (ici le zoledronate ou la Mévastatine) est dépendante de l'expression d'ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*) ⁽¹⁹³⁾. En effet, le blocage d'ICAM-1 à la surface des lignées tumorales par un anticorps va diminuer la cytolysse de ces cibles. De plus, l'expression induite d'ICAM-1 par transfection dans la lignée AMO-1, augmente significativement la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 alors que la lignée parentale ne répondait pas à ces effecteurs. Une autre étude a montré que le blocage de LFA-1 par un anticorps bloquant à la surface des LT V γ 9V δ 2 va inhiber la cytotoxicité des effecteurs envers la cible tumorale Daudi, sans modifier la prolifération ni le relargage des cytokines ⁽¹⁹⁴⁾.

Le récepteur CD2, appartenant à la superfamille des Ig, est notamment exprimé à la surface des cellules NK et des LT V γ 9V δ 2. L'utilisation d'anticorps bloquant CD2 et LFA-3 n'a pas d'effet sur l'activité lytique des LT V γ 9V δ 2 mais inhibe fortement le relargage du TNF- α et la prolifération ⁽¹⁹⁴⁾. Cependant l'intervention du complexe CD2/LFA-3 n'est pas indispensable

puisque l'effet inhibiteur des anticorps bloquants est réversible suite à l'ajout de la cytokine proliférative IL-2.

L'activation des LT V γ 9V δ 2 est également favorisée par l'expression de la molécule d'adhésion CD166 (ou ALCAM), une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des Ig, dont le récepteur exprimé à la surface des LT V γ 9V δ 2 correspond au CD6. Une étude a montré que l'expression induite du CD166 suite à la transfection d'une lignée CD166⁻ augmente fortement la capacité d'activation des LT V γ 9V δ 2 par la lignée traitée par le pamidronate, en augmentant la sécrétion de l'IFN- γ et la prolifération ⁽¹⁹⁵⁾. A l'inverse, la downrégulation de l'expression du CD166 sur une lignée tumorale CD166⁺ va diminuer significativement l'activation des LT V γ 9V δ 2 par la lignée traitée par le PAg. Ainsi le complexe CD6/CD166 est recruté au centre de la synapse immunologique établie entre un LT V γ 9V δ 2 et sa cible tumorale.

Ainsi, cette partie du manuscrit démontre que de nombreux facteurs vont influencer la capacité d'activation des LT V γ 9V δ 2. Tous ces paramètres seront importants à prendre en compte pour permettre une efficacité des thérapies immunitaires utilisant les LT V γ 9V δ 2.

II.V. Applications cliniques des LT V γ 9V δ 2

Les cancers peuvent être traités par différentes thérapies conventionnelles, comme la chirurgie, la chimiothérapie ou encore la radiothérapie, utilisées seules ou en combinaison. Ces thérapies conventionnelles présentent des limites dans certains cas de figure : tumeurs inopérables, efficacité limitée ou encore effets indésirables importants. Ainsi, ces freins ont poussé au développement de nouvelles thérapies dont certaines visent à utiliser le système immunitaire pour booster l'activité anti-tumorale, on parle alors de l'immunothérapie anti-cancéreuse. Cette thérapie sera particulièrement intéressante dans les tumeurs où les thérapies conventionnelles ont échoué : tumeurs chimiorésistantes, maladie résiduelle après le traitement ou sites métastatiques difficiles d'accès. L'immunothérapie anticancéreuse a progressivement été développée et testée dans différentes applications. A ce jour, elle est couramment retrouvée dans les lignes de traitement de certains cancers et est par exemple devenue le traitement de référence des mélanomes métastatiques, permettant l'obtention de résultats très encourageant dans cette pathologie au pronostic très sombre ⁽¹⁹⁶⁾.

Parmi les cellules immunitaires éligibles à l'immunothérapie anti-cancéreuse, les LT V γ 9V δ 2 représentent des candidats intéressants. En effet, comme décrit dans la partie II.II.B. du manuscrit, ils sont fortement impliqués dans la réponse anti-tumorale (très cytotoxiques,

capables d'infiltrer la tumeur), présentent une reconnaissance antigénique qui est indépendante des molécules du CMH et ont une forte capacité d'expansion grâce aux PAgS et aux cytokines prolifératives ^(137,175,197,198). Les premières thérapies utilisant les LT Vγ9Vδ2 ont été réalisées dans les années 2000 et correspondent à l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle.

II.V.A. Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle

L'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle utilisant les LT Vγ9Vδ2 peut être divisée en deux catégories : l'immunothérapie active et l'immunothérapie passive, reposant toutes deux sur le recrutement des LT Vγ9Vδ2 par un PAg ou après traitement par un ABP. Ces deux catégories de l'immunothérapie anti-cancéreuse utilisant les LT Vγ9Vδ2 ont été appliquées à différents types de cancers hématologiques et solides, dont majoritairement le carcinome rénal ^(199,200). Le Tableau 3 ci-dessous présente quelques études cliniques terminées utilisant les LT Vγ9Vδ2 et leurs résultats cliniques. Ces études seront détaillées par la suite.

Etudes	Maladies	Activateurs	Nombre de sujets inclus	Réponse objective	Réponse complète
Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle active					
Wilhem 2003 ⁽²⁰³⁾	LNH MM	Pamidronate + IL-2	19	3/19	0/19
Dieli F 2003 ⁽¹⁰⁰⁾	Prostate	Zolédronate +/- IL-2	18	3/18	0/18
Bennouna 2010 ⁽²⁰⁴⁾	Cancers du rein, colon et sein	BrHPP	28	0/28	0/28
Bregeon D 2012 ⁽²⁰⁵⁾	LF	BrHPP + Rituximab	45	19/45	11/45
Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle passive autologue					
Kobayashi 2007 ⁽²⁰⁶⁾	Cancer du rein	2M3B1PP + IL-2	7	3/7	0/7
Cui 2014 ⁽²⁰⁷⁾	Cancer hépatique	ARF + cytokines +/- Zolédronate	32	Non reporté	Non reporté

Tableau 3 : Essais cliniques utilisant les LT Vγ9Vδ2 terminés (adapté de ⁽¹³⁰⁾, (LNH : lymphome non Hodgkinien, MM : myélome multiple, LF : lymphome folliculaire, 2M3B1PP : 2-méthyl-3-butenyl-1-pyrophosphate, ARF : ablation par radiofréquence).

Immunothérapie anti-cancéreuse active

L'immunothérapie anti-cancéreuse est dite active lorsqu'elle repose sur l'activation *in vivo* des LT V γ 9V δ 2 via l'administration systémique d'activateurs spécifiques, les phosphoantigènes ou des ABP au patient ^(201,202) (partie verte du Tableau 3). La première étude démontrant l'intérêt thérapeutique des LT V γ 9V δ 2 a été menée chez des patients atteints de lymphome non-Hodgkinien ou de myélome multiple ⁽²⁰³⁾. Dans cette étude, les patients ont reçu une injection de pamidronate par voie intraveineuse suivie de doses croissantes d'IL-2. L'association du pamidronate avec l'IL-2 à faible dose a été bien tolérée par les patients et a conduit à une prolifération des LT V γ 9V δ 2 *in vivo*, voire à une rémission partielle du cancer chez certains patients. La seconde étude a permis de confirmer que l'activation des LT V γ 9V δ 2 *in vivo* était associée à une production de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ , entraînant le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale chez des patients atteints de cancers de la prostate traités par injection intraveineuse de zolédronate associée ou non à des injections de faibles doses d'IL-2 ⁽¹⁹⁹⁾. D'autres études cliniques ont suivi, appliquées à des cancers solides (rein, colon et sein) ou hématologiques (lymphomes folliculaires) ^(204,205). Dans ces études, les patients étaient traités par un PAg de synthèse, le BrHPP (Phosphotim, Innate Pharma), en administration intraveineuse à doses croissantes de BrHPP, seules ou associées à des faibles doses d'IL-2 ⁽²⁰⁴⁾. Dans le cas de l'étude sur les lymphomes folliculaires, le BrHPP était testé en combinaison avec l'anticorps monoclonal anti-CD20 appelé Rituximab (voir partie II.II.B. du manuscrit). La réponse clinique de ces différentes études est globalement assez décevante mais des réponses thérapeutiques partielles ont été observées (par exemple la réponse objective de l'étude de Dieli était de 3/18) ainsi que des réponses complètes (24%) chez les patients atteints de lymphomes folliculaires.

Immunothérapie anti-cancéreuse passive

L'immunothérapie anti-cancéreuse est dite passive lorsque l'expansion des LT $\gamma\delta$ est réalisée *ex-vivo* à partir de PBMCs en utilisant des phosphoantigènes ou des ABP, suivie de l'administration des LT V γ 9V δ 2 cultivés au patient, on parle de transfert adoptif. L'expansion *ex-vivo* des LT $\gamma\delta$ était généralement réalisée à partir des propres cellules du patient (autologue, partie bleue du Tableau 3) mais il existe quelques études avec une expansion hétérologue (PBMCs d'un donneur sain, non présentées dans le Tableau 3). La première étude testant le transfert adoptif autologue de LT $\gamma\delta$ a été réalisée chez des patients atteints de carcinome rénal ⁽²⁰⁶⁾. Dans cette étude, l'expansion des LT $\gamma\delta$ du patient a été réalisée grâce au PAg 2M3B1PP (2-méthyl-3-butenyl-1-pyrophosphate) puis ces LT $\gamma\delta$ ont été

administrés au patient par des injections multiples, combinées à de faibles doses d'IL-2. Les résultats ont montré une réponse objective moyenne via un ralentissement de la croissance tumorale (3/7) mais aucune réponse complète. Une autre étude clinique, réalisée sur des patients atteints de cancers du foie (carcinome hépatocellulaire), combine la technique de traitement d'ablation par radiofréquence (ARF) avec un transfert adoptif autologue de LT $\gamma\delta$ ⁽²⁰⁷⁾. Les 30 patients retenus dans le bras combinaison ont reçu 3 à 6 injections intraveineuses de LT $\gamma\delta$ amplifiés *ex-vivo* au préalable par le zolédronate. Les résultats ont montré une survie sans progression supérieure dans le bras combinaison, par rapport au bras ARF seul. Les meilleurs pronostics ont été rapportés chez les patients ayant reçu 6 injections de LT $\gamma\delta$ amplifiés. Cette étude n'a pas rapporté d'importants effets secondaires à cette combinaison, suggérant la possibilité de développer d'autres études associant l'immunothérapie anticancéreuse utilisant les LT $\gamma\delta$ avec une thérapie conventionnelle.

Tolérance de l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle

Quel que soit le type d'immunothérapie anticancéreuse conventionnelle utilisant des LT V γ 9V δ 2, elles présentent une sécurité d'utilisation satisfaisante mais des résultats d'efficacité assez décevants. Les essais thérapeutiques pionniers ont définis les conditions pour une utilisation sans risque des phosphoantigènes et des ABP afin d'induire les LT V γ 9V δ 2 chez les patients. L'effet indésirable le plus fréquent correspond à l'apparition d'un syndrome pseudo-grippal sans expansion de LT V γ 9V δ 2, généralement provoqué après administration de faibles doses de stimuli. La plupart des effets indésirables sont de grade 1-2 (avec de la fièvre, fatigue, augmentation des transaminases hépatiques et une éosinophilie) ⁽⁸⁷⁾. Les effets indésirables sévères, de grade 3 et 4, ayant été reportés sont caractérisés par une thrombose, une hyperglycémie, une hypocalcémie, des douleurs de la mâchoire et musculosquelettiques, une gastrite, un infarctus du myocarde et une toxicité rénale ⁽²⁰¹⁾.

Limites de l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle

Alors que la sécurité de l'utilisation des LT V γ 9V δ 2 a été démontrée et que les paramètres pharmacodynamiques des PAg administrés chez l'homme sont bien connus, l'efficacité de cette thérapie reste limitée puisque la moyenne de réponse est de 21% associée à un taux moyen de bénéfice clinique de 57%. Cette efficacité modeste pourrait être liée à l'anergie des LT V γ 9V δ 2 activés, associée à une diminution du nombre de LT V γ 9V δ 2 du sang périphérique après administration des stimulants (PAg et N-bis) ^(201,208).

En effet, l'anergie des LT V γ 9V δ 2 et la diminution du nombre de LT V γ 9V δ 2 du sang périphérique après administration des activateurs représentent des problèmes qualitatifs et quantitatifs pour l'immunothérapie conventionnelle à base de LT V γ 9V δ 2. Concernant le problème qualitatif, la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 peut être affectée par le MET suppresseur et le stade tumoral, pouvant tous deux limiter les fonctions anti-tumorales des LT V γ 9V δ 2. Par exemple, dans les carcinomes pancréatiques, les capacités cytotoxiques des LT V γ 9V δ 2 sont diminuées par des faibles niveaux des facteurs solubles MICA/B dans le MET ⁽²⁰⁸⁾. Concernant le problème quantitatif, la polarisation des LT $\gamma\delta$ va entraîner une baisse du nombre de LT V γ 9V δ 2 anti-tumoraux, via des cytokines telles que l'IL-23, l'IL-15 et le TGF β qui sont présentes dans le MET. Par exemple, dans les cancers squameux de la peau, on retrouve significativement plus de LT $\gamma\delta$ 17 chez des patients atteints par des stades avancés de cette maladie (stades II et IV), par rapport aux patients atteints par des stades plus précoces (stades I et II). A l'inverse, les fréquences de LT V γ 9V δ 2 sont plus importantes chez les patients atteints par les stades précoces (stade I et II), mais diminuent de façon significative chez les patients atteints de stades plus avancés (stades III et IV) ⁽²⁰⁹⁾. Ainsi, une hypothèse a été que la polarisation des LT $\gamma\delta$ limite l'efficacité de l'immunothérapie conventionnelle utilisant les LT $\gamma\delta$ en influençant la balance entre les LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux et anti-tumoraux. Puisque que les LT $\gamma\delta$ V δ 1 ont un rôle controversé dans l'immunité anti-tumorale, il serait important d'éliminer au préalable les sous-groupes de LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux avant le transfert adoptif au patient. De plus, l'expansion *in vivo* rend possible la prolifération de certains sous-groupes pro-tumoraux, donc cette expansion devrait se faire en évitant d'être dans un MET immunosuppresseur puisque cela augmenterait la probabilité de polarisation des LT $\gamma\delta$ en sous-groupes pro-tumoraux. Pour éviter ce phénomène, une équipe a suggéré la mise en œuvre de ces stratégies thérapeutiques à un stade TNM précoce de la maladie pour éviter que le MET soit déjà immunosuppresseur chez le patient. Moduler cette polarisation pourrait ainsi améliorer l'efficacité au long terme de ces thérapies.

Les LT $\gamma\delta$ sont capables de changer leur fonction immunitaire en réponse à une stimulation cytokinique, puisque des LT $\gamma\delta$ anti-tumoraux peuvent devenir pro-tumoraux après stimulation par différentes cytokines du MET. Au vue de l'importance de la balance cytokinique tumorale, il est envisageable de modifier artificiellement cette balance afin de favoriser la reprogrammation des LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux en anti-tumoraux. Ainsi, mesurer les taux de cytokines immunosuppressives (comme par exemple l'IL-23, l'IL-1 β , l'IL-15, l'IL-17, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-36 γ ou le TGF β) pourrait permettre de prédire le statut immunitaire du patient avant de débiter l'immunothérapie à base de LT $\gamma\delta$. Par exemple, l'IL-36 γ va promouvoir la production de l'IFN- γ par les cellules T CD8⁺, les cellules NK et les LT $\gamma\delta$, ce qui va transformer le MET, favoriser l'élimination tumorale et exercer des puissants effets anti-tumoraux ⁽²¹⁰⁾.

De plus, il est probable que le statut immunitaire de l'hôte peut également impacter l'efficacité de l'immunothérapie par transfert adoptif de LT $\gamma\delta$ mais à ce jour trop peu d'études ont évalué ce paramètre chez le patient avant le lancement du traitement. En effet, on peut imaginer que la composition du MET, l'action des immune checkpoints ou encore les niveaux de cytokines du patient impacteront sa thérapie. Dans un contexte d'immunothérapie par LT $\gamma\delta$, les immune checkpoints tels que PD1, les cytokines immunosuppressives telles que l'IL-17 et l'IL-4, ainsi que des cellules immunitaires telles que les neutrophiles sont tous impliqués dans les réponses immunitaires cytotoxiques des LT $\gamma\delta$. Par conséquent, l'évaluation du statut immunitaire des patients avant de débiter l'immunothérapie par LT $\gamma\delta$ pourrait diminuer la faible efficacité attendue de ces traitements et apporter une solution thérapeutique au patient. Ainsi, avant d'élargir les applications de ces thérapies il faudrait réussir à changer le MET suppresseur en environnement normal et pouvoir attirer d'autres cellules effectrices en support.

II.V.B. Nouvelles stratégies d'immunothérapies à base de LT $\gamma\delta$

La compréhension des mécanismes moléculaires indispensables à l'activation des LT $\gamma\delta$ et l'étude de leurs récepteurs nécessaires à leur action anti-tumorale a été essentiel pour éviter la tolérance lymphocytaire et la délétion des LT $\gamma\delta$ naturels chez des patients atteints de cancers à stades avancés ^(148,211–213). Des stratégies alternatives à l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle sont actuellement en cours de développement, visant par exemple à recruter de façon sélective des LT $\gamma\delta$ résidents par des molécules bispécifiques combinant un anti-TCR $\gamma\delta$ avec un anti-EGFR, ciblant le récepteur à l'*Epidermal Growth Factor*, afin de lier les LT $\gamma\delta$ à l'EGFR exprimé par les cellules tumorales ⁽²¹⁴⁾. Ce concept pourrait être plus efficace que les molécules bispécifiques classiques liant les cellules exprimant le CD3 à l'aide d'un anti-CD3 (incluant ainsi les LT $\gamma\delta$ et les LT $\alpha\beta$) car la distribution intra-tumorale de TILs n'est pas toujours égale entre les LT $\gamma\delta$ et les LT $\alpha\beta$ ⁽⁹⁴⁾. Chez des patients atteints de glioblastomes, l'injection topique (sur la peau) de LT $\gamma\delta$ génétiquement modifiés pour être chimiorésistants a été testée après administration du traitement standard ⁽²¹⁵⁾. Ainsi, l'injection des LT $\gamma\delta$ permet de rétablir le pool de TILs $\gamma\delta$ supprimé par la chimiothérapie standard sans concession de dose pour le patient. Une observation faite à partir de l'Ibrutinib, un inhibiteur de la *Bruton tyrosine kinase* (BTK) couramment prescrit dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques, conforte la potentielle efficacité des LT $\gamma\delta$ endogènes. En effet, l'Ibrutinib peut partiellement reverser la tolérance des LT V γ 9V δ 2 de patients atteints cultivés *in vitro* ⁽²¹⁶⁾. De plus, la plupart des inhibiteurs de checkpoint développés en clinique vont également affecter le répertoire de LT $\gamma\delta$ anti-tumoraux. En effet, les patients traités avec l'inhibiteur de CTLA-4 nommé Ipilimumab vont avoir une plus forte

proportion de LT V γ 9V δ 2 endogènes par rapport aux patients non traités par cet anticorps thérapeutique, ce qui montre que le succès de cette thérapie n'est pas seulement lié au répertoire anti-tumoral de LT $\alpha\beta$ conventionnel ⁽⁶⁸⁾. De façon surprenante, cette étude présente des effets différents entre les répertoires $\delta 2^+$ et $\delta 2^-$ avec une augmentation de la proportion pour les $\delta 2^+$ et une diminution pour les $\delta 2^-$ montrant ainsi des mécanismes de régulation divergents entre ces deux sous-types.

Dans le cadre des nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant les LT $\gamma\delta$, trois concepts de thérapies sélectives sont intéressants à présenter et sont repris dans la Figure 21 ci-dessous.

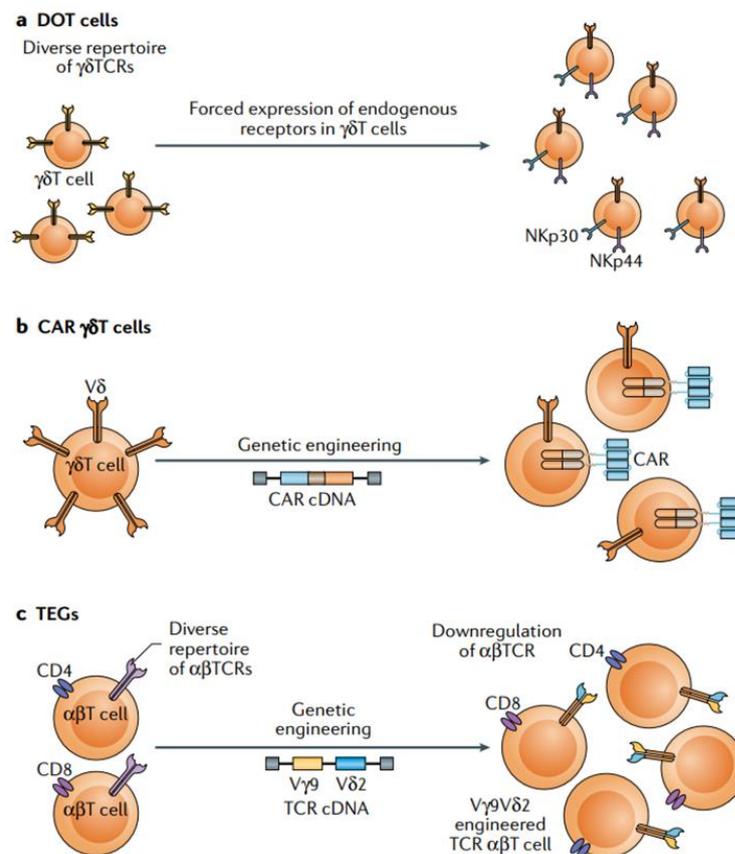


Figure 21: Les nouveaux concepts de thérapies sélectives applicables aux LT $\gamma\delta$. ⁽¹³⁰⁾

Delta one T cells (DOT)

Ces cellules correspondent à des LT $\gamma\delta$ enrichies en $\delta 1$ suite à des conditions de culture particulières et expriment plus de 60% de $\delta 1$. L'étude pionnière de ce concept a décrit un protocole permettant l'expansion et la différenciation de cellules $\delta 1^+$ cytotoxiques à partir de PBMCs de donneurs sains ou de patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques,

comprenant notamment trois semaines de stimulation par des agonistes du TCR et des cytokines (comme l'IL-4 et l'IL-15) ⁽²¹⁷⁾. Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de ces cellules $\delta 1^+$ ainsi obtenues ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*. Les LT $\delta 1^+$ obtenus sont cytotoxiques via l'expression *de novo* des récepteurs cytotoxiques NKp30 et NKp44, et ont une expression de NKG2D et DNAM1 uprégulée. Lorsqu'ils sont transférés *in vivo*, les DOTs peuvent infiltrer les tumeurs et les organes périphériques de façon persistante. Ainsi, les DOTs injectés vont proliférer *in vivo* et seront capables de produire de l'IFN- γ et du TNF- α sans produire pour autant de l'IL-17. Dans des modèles de xéno greffes, cette étude a montré que les DOTs sont capables d'inhiber la croissance tumorale et de prévenir la dissémination des cellules tumorales. Cependant, une des limites de cette technique est la possible et progressive downrégulation naturelle des récepteurs cytotoxiques après infusion chez le patient.

Chimeric antigen receptors expressing T cell (CAR-T) $\gamma\delta$

Afin de maîtriser les limites des DOTs, des LT $\gamma\delta$ ont été modifiés génétiquement afin de forcer l'expression de récepteurs d'antigènes chimériques (CAR) réactifs contre les tumeurs ^(218,219). A la différence des DOTs, les cellules utilisées dans ce concept sont des LT V γ 9V δ 2 porteurs du TCR transgénique, en raison de leur forte abondance dans le sang périphérique et la facilité d'accès pour la conception *in vitro*. Cette technique permet la persistance à long terme des récepteurs nouvellement introduits génétiquement sans downrégulation. Les CAR T conventionnels ont été développés plus précocement que les CAR T $\gamma\delta$ et sont en cours d'utilisation dans des essais cliniques. Cette thérapie innovante est toutefois freinée par un effet indésirable critique correspondant au risque de syndrome de relargage cytokinique (ou appelé également orage cytokinique), qui peut être sévère et mortel pour le patient s'il n'est pas pris en charge immédiatement ou limité grâce à l'injection préalable du Tocilizumab (anticorps monoclonal anti-IL-6). Un des avantages que pourraient présenter les CAR T $\gamma\delta$ serait que ce risque est moindre pour cette population cellulaire, notamment en comparaison aux cellules NK ⁽²²⁰⁾. Cependant, les cellules NK et les LT $\gamma\delta$ sont étroitement contrôlés par les récepteurs cytotoxiques naturels et les KIRs et doivent être éduqués au fil du temps ⁽²²¹⁾. A ce jour, cette stratégie est majoritairement développée pour traiter des cancers hématologiques car les récepteurs transgéniques nouvellement introduits sont souvent spécifiques de ces tumeurs, comme par exemple le CD19, mais il y a encore peu de développement pour des récepteurs exprimés par des cancers solides ⁽²²²⁾.

T cells engineered with defined $\gamma\delta$ TCR (TEGs)

Ce concept exploite les capacités de réactivité tumorale des TCR $\gamma\delta$, pouvant être isolés à partir de cellules $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2⁺ ou V γ 9V δ 2⁻. Dans cette construction, le porteur du TCR modifié est un LT $\alpha\beta$ et les chercheurs peuvent ainsi créer des LT *helpers* et/ou effecteurs afin d'induire la réponse immunitaire la plus durable possible. Ainsi, ce concept combine le ciblage tumoral réalisé par le TCR $\gamma\delta$ avec les capacités importantes de prolifération et de mémoire des LT $\alpha\beta$ conventionnels. Cette technique permet de forcer l'expression des TCR $\gamma\delta$ sur les LT $\alpha\beta$ grâce à des transductions ce qui empêchera l'expression endogène des TCR $\alpha\beta$, permettant ainsi de s'affranchir des problèmes classiques d'allo-compatibilité dus à la reconnaissance dépendante des molécules du CMH du TCR $\alpha\beta$. Ce concept permet également d'éradiquer la fréquente diminution des LT $\gamma\delta$ chez les patients atteints par des stades avancés de la maladie, peu prolifératifs ou après polarisation en LT $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 entraînant ainsi une tolérance des cellules cancéreuses ⁽⁸⁴⁾. Ce concept de nouvelle génération de CAR T cells, appelé TEGs, correspond à une découverte majeure dans ce domaine ^(148,211,223,224). Contrairement aux CAR T cells, l'antigène n'est pas un antigène spécifique de la tumeur mais les PAg, dont on a vu précédemment qu'ils étaient exprimés dans les cancers. Ainsi, l'utilisation des TEGs est beaucoup plus large que celle des CAR T cells et permettrait de s'appliquer à des tumeurs solides et hématologiques ^(211,225). Par exemple, il a été montré que les TEGs peuvent cibler les cellules souches leucémiques et éliminer un myélome multiple primaire ^(168,226). De plus, une fois que le TCR V γ 9V δ 2 est exprimé sur le LT $\alpha\beta$, le signal activateur délivré par le TCR $\gamma\delta$ est moins sensible à l'inhibition par les KIRs car ils sont moins fréquents à la surface de ces LT conventionnels. Si les LT CD4⁺ et CD8⁺ sont reprogrammés avec un TCR V γ 9V δ 2, ils acquièrent tous deux des propriétés cytotoxiques, mais les TEGs CD4⁺ ont également la capacité de maturation en CPA professionnelle, comme les DC ⁽²¹¹⁾. La maturation des DC est médiée par les TEGs CD4⁺ qui détectent via le TCR modifié l'augmentation des niveaux de PAg dans des DC immatures traitées par des ABP ⁽¹⁴⁸⁾. Cette propriété favorise la diffusion du TEG et sa rencontre avec des antigènes classiques associés aux tumeurs. Les TEGs exprimant un TCR V γ 9V δ 2 de haute affinité sont en cours d'utilisation dans une phase I d'un essai clinique chez des patients réfractaires ou en rechutes d'une leucémie aigüe myéloïde ou d'un myélome multiple ⁽²²⁷⁾. Cette stratégie thérapeutique représente l'une des nombreuses possibilités de développement dérivant des LT $\gamma\delta$ et de leurs récepteurs ⁽²²⁴⁾.

Un des paramètres important à appréhender sera l'éventuelle cross-réactivité de ces thérapies avec les tissus sains dans un contexte probable d'inflammation afin d'éviter le phénomène d'*off-target*, qui a notamment été observé lors du développement des thérapies

de LT $\alpha\beta$ modifiés ⁽²²⁸⁾. Pour les thérapies à base de TCR V γ 9V δ 2 des recherches continuent pour déterminer des biomarqueurs de susceptibilité, tels que des polymorphismes ou la relocalisation de RhoB du noyau vers la membrane plasmique. L'analyse d'échantillons de biopsies liquides afin de déterminer ces critères de relocalisation de RhoB pourrait faire partie des critères d'inclusion pour les patients.

Perspectives pour l'immunothérapie à base de LT $\gamma\delta$

Ainsi les immunothérapies anti-cancéreuses utilisant des LT $\gamma\delta$ montrent des résultats encourageants mais des progrès restent nécessaires. Même si à ce jour les résultats cliniques ne sont pas encore connus, il est probable que les nouvelles stratégies thérapeutiques améliorent l'efficacité de ces traitements. Il est aussi possible de tester l'efficacité de ces nouvelles stratégies en association avec d'autres thérapies. Par exemple, la combinaison de ces nouvelles stratégies thérapeutiques avec des chimiothérapies ou d'autres immunothérapies pourrait permettre de contrecarrer le MET immunosuppresseur présent dans les tumeurs. En effet, une association avec des inhibiteurs d'immunes checkpoints pourrait améliorer l'activité anti-tumorale des lymphocytes utilisés dans ces thérapies. L'interaction entre PD-1 exprimé sur les LT $\alpha\beta$ et son ligand PD-L1 sur les LT $\gamma\delta$ va limiter l'activation des effecteurs T $\alpha\beta$. Ainsi le blocage de cette interaction par l'utilisation d'un inhibiteur de PD-1 va favoriser l'activation des LT $\alpha\beta$. De plus, une étude réalisée à partir de patients atteints de lymphomes folliculaires a montré une abondante proportion de TILs $\gamma\delta$ exprimant PD1 ⁽²²⁹⁾. Ces LT $\gamma\delta$ PD1⁺ présentent une capacité diminuée d'ADCC par rapport aux PD1⁻, qui pourrait être restaurée après blocage de ce récepteur par un traitement inhibiteur de checkpoint (anti-PD1). Ces stratégies ont également été envisagées pour d'autres récepteurs ou ligands d'immunes checkpoints tels que CTLA-4, IDO, VISTA, Galectin-9, LAG-3 et TIM-3 ^(230–232).

Enfin, l'association des LT $\gamma\delta$ avec d'autres cellules T cytotoxiques (tel que les LT $\alpha\beta$ ou les cellules NK) pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la thérapie grâce à une double action synergique : la reconnaissance non restreinte au CMH des LT $\gamma\delta$ avec la réponse adaptative et/ou cytotoxique des cellules T spécifique de la tumeur. On dénombre actuellement une augmentation d'études combinant des immunothérapies ciblant différentes cellules du système immunitaire ^(233,234).

Ainsi les LT V γ 9V δ 2 correspondent à une population de cellules immunitaires fortement cytotoxiques présentant un potentiel thérapeutique très intéressant dans les cancers. Cependant, dans le but d'améliorer l'efficacité des thérapies utilisant ces cellules, des études supplémentaires sont nécessaires afin de compléter les connaissances sur leur mécanisme

d'activation.

L'étude des mécanismes d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes a permis la mise en évidence d'un nouveau partenaire, la petite GTPase RhoB, intervenant dans la modification de la conformation de la BTN3A1 (voir partie II.IV.C.3.). Puisque l'investigation de ce mécanisme correspond à mes travaux de thèse de pharmacie, la dernière partie de l'introduction de ce manuscrit est consacrée à cette protéine.

PARTIE III. LA PROTEINE RhoB

Au cours de l'évolution, les cellules eucaryotes ont développé des outils cellulaires afin d'exécuter des processus biologiques complexes à faible coût énergétique, notamment via la conservation du module GTPase. La famille des petites Rho GTPase regroupe des molécules de signalisation ayant différentes fonctions régulatrices notamment sur la morphologie tissulaire et la fonction cellulaire.

III.I. Généralités sur la famille des petites GTPases Rho

Les petites GTPases Rho appartiennent à la superfamille des protéines Ras et présentent 30 à 50% d'homologie entre l'ensemble de leurs séquences primaires ⁽²³⁵⁾. D'après la Figure 22 ci-dessous, la famille des petites GTPase Rho regroupe 20 membres qui peuvent être divisés en cinq sous familles : « Rho-like » (comprenant RhoA, RhoB et RhoC) ; « Rac-like » (comprenant Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG) ; « Cdc42-like » (Cdc42, RhoQ et RhoJ) ; « RND » (Rnd1, Rnd2 et Rnd3) et « RhoBTB » (comprenant RhoBTB1 et RhoBTB2) ⁽²³⁶⁾.

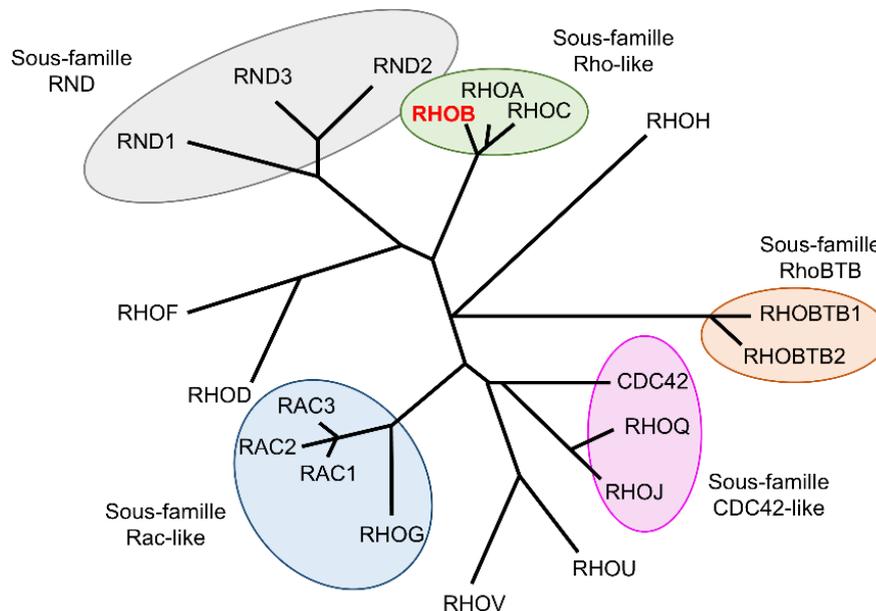


Figure 22 : Arbre phylogénétique de la famille des petites GTPases Rho (adapté de ⁽²³⁶⁾).

III.I.A. Structure

Les protéines Rho présentent 40 à 95% d'homologie entre elles ⁽²³⁵⁾. Leur structure est composée d'une séquence caractéristique de liaison au GDP et au GTP leur permettant de réaliser un cycle entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Ces protéines présentent différentes modifications post-traductionnelles dont la plus étudiée est l'isoprénnylation protéique. L'étude de la structure des protéines Rho a permis de mettre en évidence deux régions essentielles : le domaine catalytique, contenant notamment le site de liaison aux nucléotides et la région hypervariable, au niveau de laquelle se font des modifications post-traductionnelles telle que la prénylation ou la palmitoylation ^(237,238).

III.I.B. Cycle d'activation/inactivation des petites GTPases Rho

Les protéines de la famille des petites GTPases Rho possèdent deux formes interchangeables : une forme GDP (Guanosine Di-phosphate) inactive et une forme GTP (Guanosine Tri-phosphate) active ⁽²³⁹⁾. La Figure 23 présente le cycle d'activation/inactivation des protéines Rho.

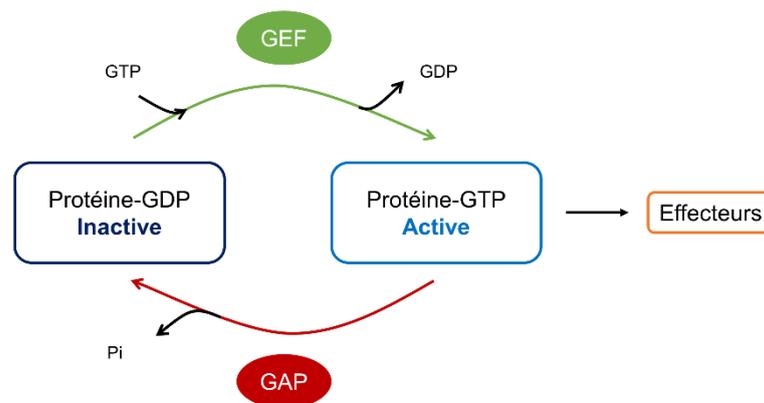


Figure 23 : Cycle d'activation/inactivation des protéines Rho.

D'après la Figure 23, le GTP se lie à la protéine après dissociation de la GDP, entraînant un changement de conformation du site de liaison aux effecteurs permettant l'interaction avec les protéines effectrices. La forme GTP est convertie en GDP par l'action de l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine, permettant ainsi la dissociation de la protéine effectrice. Les protéines Rho liées au GTP vont interagir avec leurs effecteurs en aval afin d'induire des réponses cellulaires.

III.I. C. Régulateurs des GTPases Rho

Le cycle d'activation des GTPases Rho est régulé par trois types de protéines : les GEFs, les GAPs et les GDIs.

Les GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) déclenchent l'échange du GDP par du GTP permettant l'obtention de la forme active de la protéine liée au GTP (en vert sur la Figure 23). La régulation des GEFs se fait par la présence de séquences inhibitrices au sein de la protéine, par des interactions protéine-protéine et par la localisation subcellulaire.

Les GAPs (*GTPase Activating Protein*) stimulent l'activité GTPasique intrinsèque entraînant le retour à la forme inactive via leur passage sous forme GDP (en rouge sur la Figure 23). Ainsi, les protéines Rho-GAP permettent l'inactivation des RhoGTPases via leur passage sous forme GDP correspondant à leur état inactif.

Les GDIs (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) interagissent avec la forme inactive en masquant le prényl ce qui va maintenir la protéine sous sa forme inactive. Ainsi, les protéines RhoGDI sont capables d'extraire la RhoGTPase liée au GDP des membranes en se liant à son extrémité C-terminale, masquant ainsi le lipide isoprénique hydrophobe et maintenant la GTPase sous sa forme inactive soluble dans le cytoplasme ⁽²⁴⁰⁾. A ce jour, trois isoformes de RhoGDI ont été décrites : RhoGDI-1, RhoGDI-2 et RhoGDI-3 ^(241,242). Ces trois isoformes de RhoGDI présentent une homologie de séquence relativement importante. L'activation d'une GTPase par l'action d'une GEF nécessite la dissociation du complexe RhoGDI-GTPaseRho.

Parmi les protéines de la Rho GTPase, la protéine RhoB est hautement similaire à RhoA et RhoC mais a des fonctions cellulaires distinctes. Puisque l'objectif de mes travaux de thèse était l'étude de l'implication de la RhoGTPase RhoB dans les mécanismes d'activation des LT Vγ9Vδ2 par les PAgS, la suite de cette partie sera uniquement dédiée à cette protéine.

III.II. La protéine RhoB

III.II.A. Structure de RhoB

La plupart des acides aminés divergents entre RhoB et le couple RhoA/RhoC sont situés près de l'extrémité C-terminale, connue pour être une région hypervariable. La Figure 24 ci-dessous représente de façon schématique la structure de la protéine RhoB.

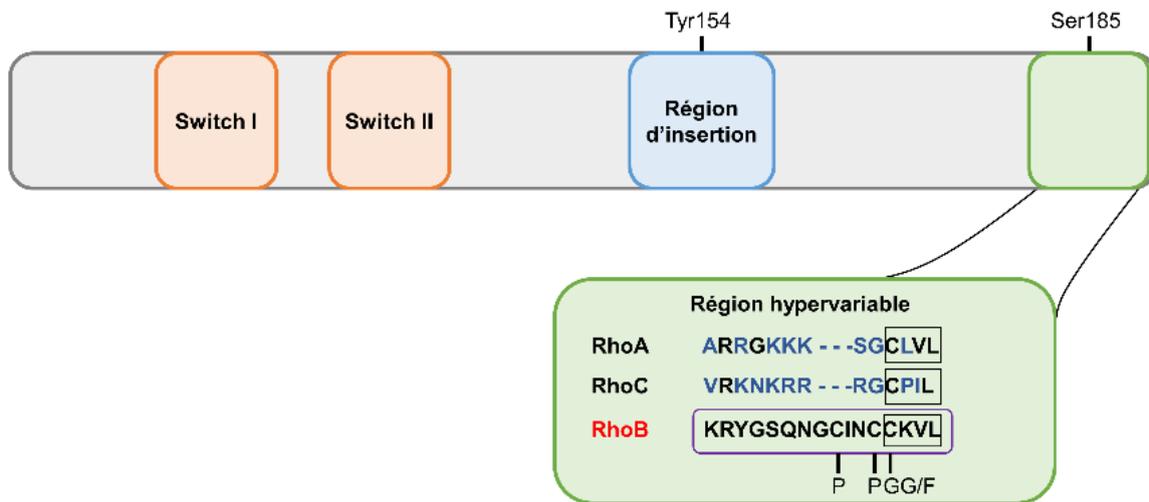


Figure 24 : Structure schématique de la protéine RhoB (adapté de ⁽²⁴³⁾).

Le rectangle vert zoomé correspond à la région hypervariable des protéines RhoA, RhoC et RhoB. Le rectangle violet correspond à la séquence d'acides aminés de la protéine RhoB. Les acides aminés bleus sont différents entre la séquence de RhoB et celle du couple RhoA/RhoC. Enfin, le rectangle noir en fin de chaque séquence correspond à la boîte CAAX (C=Cystéine, A=Acide aminé aliphatique, X=autre acide aminé). En comparaison avec la séquence du couple RhoA/RhoC, la région hypervariable de RhoB contient principalement des résidus polaires. La proportion entre les résidus polaires et basiques va impacter la capacité de fixation des protéines effectrices et régulatrices dans la région hypervariable ⁽²⁴⁴⁾.

III.II.B. Régulation de RhoB

Différents processus vont pouvoir réguler la GTPase RhoB, comme les modifications post-traductionnelles sur la protéine, sa localisation ou encore son expression.

Modifications post-traductionnelles de RhoB

La protéine RhoB se différencie de RhoA et RhoC au niveau de la boîte CAAX C-terminale dans laquelle la Cystéine est modifiée par les lipides isoprénoïdes. En effet, la protéine RhoB peut être modifiée à la fois par des isoprénoïdes farnesyl et geranyl-geranyl (GG/F sur la Figure 24), alors que RhoA et RhoC peuvent être uniquement geranylgeranylés^(238,245). Il est possible d'inhiber ces isoprénoïdes en utilisant des inhibiteurs de farnésylation comme la *farnesyltransferase inhibitor* (FTI) ou de géranylgéranylation comme le *geranylgeranyltransferase inhibitor* (GGTI). Contrairement à RhoA et RhoC, RhoB ne présente pas de domaine polybasique mais elle peut être palmitoylée en position Cys189 et 192, juste en amont de la cystéine prénylée⁽²³⁸⁾. La prénylation semble indispensable à la localisation cellulaire correcte et la conduction de la plupart des fonctions des trois protéines RhoGTPases^(246,247).

Localisation cellulaire de la protéine RhoB

Les diverses modifications lipidiques possibles sur RhoB présentées précédemment vont affecter sa localisation cellulaire, qui sera différente de celles de RhoA et RhoC. En effet, RhoA et RhoC sont essentiellement localisées au niveau de la membrane plasmique et du cytoplasme. En revanche, la protéine RhoB a été jusqu'alors décrite au niveau des endosomes, des corps multivésiculaires (CMV), de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi et du noyau^(248–251). La forme isoprénylée de RhoB va modifier sa localisation. De ce fait, la forme farnésylée de la protéine RhoB entraîne une localisation majoritairement membranaire, alors que la forme géranylgéranylée entraîne une localisation endosomale de RhoB⁽²⁵²⁾.

Le système endosomal est un réseau complexe jouant un rôle important dans le tri de molécules incorporées dans les cellules. Il peut être divisé en deux voies, chacune caractérisée par des structures bien particulières. La première voie est celle des endosomes précoces, caractérisée par les endosomes de tri et les endosomes de recyclage. La seconde voie est celle des endosomes tardifs, définie par les CMV. Par la suite, les endosomes tardifs

formeront un endo-lysosome après fusion avec un lysosome primaire provenant du réseau trans-golgien. Cette structure lysosomale nouvellement formée sera finalement dégradée dans les lysosomes.

Ainsi, en fonction de sa localisation endosomale, RhoB aura un devenir distinct. La protéine RhoB est essentiellement localisée au niveau des endosomes précoces et du compartiment pré-lysosomal ⁽²⁴⁸⁾. Cependant, la protéine RhoB présente une demi-vie courte, d'environ 30 minutes, car elle peut être rapidement dégradée via la voie endo-lysosomale ^(241,253). Sa dégradation peut être retardée par l'inhibition de l'isoprénnylation. Par conséquent, l'altération de la dynamique lipidique des endosomes tardifs entraîne une accumulation de RhoB dans les CMV ⁽²⁵⁴⁾.

La localisation endosomale de RhoB peut être influencée par d'autres facteurs. Par exemple, une étude a récemment identifié une autre petite GTPase *ADP-ribosylation factor 6* (Arf6) comme pouvant s'associer avec RhoB sous forme de complexe, afin de réguler sa localisation et sa stabilité ⁽²⁵⁵⁾. En effet, la déplétion d'Arf6 entraîne une perte de RhoB au niveau des membranes endosomales, conduisant à l'élimination de RhoB via la voie endo-lysosomale.

Expression de la protéine RhoB

Comme toutes les Rho GTPases, l'activité de RhoB est régulée par la charge du GTP/GDP via les protéines GEF et GAP (voir partie III.I.B. de ce manuscrit). La plupart des GEFs et des GAPs testées ont une action *in vitro* sur RhoA, RhoB et RhoC mais il existe des différences. Par exemple, la GEF3 (RhoGEF XPLM/ARH) se lie à RhoA et RhoB mais pas à RhoC ⁽²⁵⁶⁾. De plus la protéine chaperonne SmgGDS se lie aux régions C-terminales polybasiques de RhoA et RhoC mais pas RhoB ⁽²⁵⁷⁾. Parmi les trois Rho GDIs, c'est uniquement la Rho GDI-3 qui pourra se lier à RhoB ⁽²⁵⁸⁾. En revanche, Rho GDI-1 se liera à RhoA et RhoC mais pas à RhoB.

Les niveaux de RhoB sont profondément régulés en réponse à divers stimuli. Par exemple, RhoB peut être ciblé par les ubiquitines ligases Smurf1 et le complexe Cullin2-RBX1 entraînant sa dégradation dans le protéasome ^(259,260). RhoA et RhoC peuvent également être ubiquitinylés mais leurs dégradations seront beaucoup plus lentes que celle de RhoB. Ainsi, la protéine RhoB est normalement présente à faible niveau dans les cellules à l'état basal, mais peut être rapidement et transitoirement uprégulée par différents stimuli tels que les radiations UV, les facteurs de croissance, les cytokines et lors du cycle cellulaire ⁽²⁶¹⁾. Par

exemple, le stress génotoxique va rapidement activer RhoB, probablement médié par les GEFs nucléaires Ect2 et Net1 ⁽²⁶²⁾.

De plus, l'ARN messenger de RhoB peut être régulé par différents micro-ARNs (miR) dans les lignées cancéreuses et les cellules endothéliales. Par exemple, la prolifération, la migration et l'invasion sont régulées par le miR21 dans les cellules de cancer colorectal ⁽²⁶³⁾ et par le miR19a dans les cancers pancréatiques ⁽²⁶⁴⁾ à la fois *in vitro* et *in vivo* suite au ciblage de RhoB. De plus, RhoB est également régulé par phosphorylation. A la différence de RhoA et RhoC, RhoB est phosphorylé et inhibé par la caséine kinase 1 (CK1) sur la sérine 185 ⁽²⁶⁵⁾. Enfin, RhoB peut également être phosphorylé sur les résidus tyrosine mais la pertinence fonctionnelle n'est pas encore clarifiée ⁽²⁶⁶⁾.

Ainsi, la protéine RhoB est finement régulée et a suscité un grand intérêt en recherche. Différents travaux sur la protéine ont été publiés, utilisant différentes techniques d'étude.

III.II.C. Techniques d'étude de RhoB dans les cellules

Parmi les différentes techniques permettant d'étudier les protéines dans les cellules, certaines peuvent être appliquées à RhoB et ont été utilisées au cours de mes travaux de thèse. Ainsi, les techniques utilisées seront brièvement décrites dans le paragraphe suivant.

Modulation de l'activité de RhoB

Dans les années 2000, les protéines Rho ont été identifiées comme étant les protéines eucaryotes cibles de nombreuses toxines bactériennes. Ainsi ces toxines bloquent les fonctions des Rho. Par exemple, la toxine C3 exoenzyme isolée à partir de *Clostridium botulinum* inhibe spécifiquement les protéines RhoA, RhoB et RhoC par ADP-ribosylation de l'asparagine 41 au niveau du domaine de liaison de l'effecteur de la GTPase, modification post-traductionnelle qui ajoute une unité ADP-ribose ⁽²⁶⁷⁾. Ces différentes toxines permettent d'étudier les conséquences de la perturbation de l'activation ou de l'inhibition de ces protéines Rho. Cependant, cet inhibiteur est faiblement perméable ce qui limite sa pénétration cellulaire et donc son utilisation *in vivo*.

Quantification des protéines RhoB activées : utilisation du système Split-GFP

Afin de monitorer l'activation des petites GTPases, les stratégies consistent en général à évaluer la liaison de la forme active des petites GTPases (liée au GTP) avec un domaine spécifique de liaison aux GTPases présent sur des protéines effectrices immobilisées sur des billes ^(268,269). Cependant cette méthode présente des limites car la liaison des GTPases au GTP est extrêmement labile et dynamique. De plus l'activation des petites GTPases étant étroitement régulée par la localisation subcellulaire des régulateurs et des effecteurs des GTPases, de nouvelles approches permettant d'observer en temps réel ces phénomènes ont dû être développées ⁽²⁷⁰⁾. Ainsi, le système tripartite split-GFP (triSFP) a été développé et validé dans les années 2000 afin de monitorer les interactions protéines-protéines dans les cellules vivantes ⁽²⁷¹⁻²⁷³⁾. Par la suite, ce système a été adapté pour la détection de l'interaction entre une GTPase et son effecteur ⁽²⁷⁴⁾. Dans ce système, la molécule GFP est séparée en trois parties liées à des acteurs indispensables pour l'activation des GTPases : la proie, l'appât et le détecteur. Ainsi la recombinaison du système suite à l'engagement de ces différents acteurs va entraîner la complémentation de la molécule de GFP et donc l'émission de sa fluorescence (Figure 25).

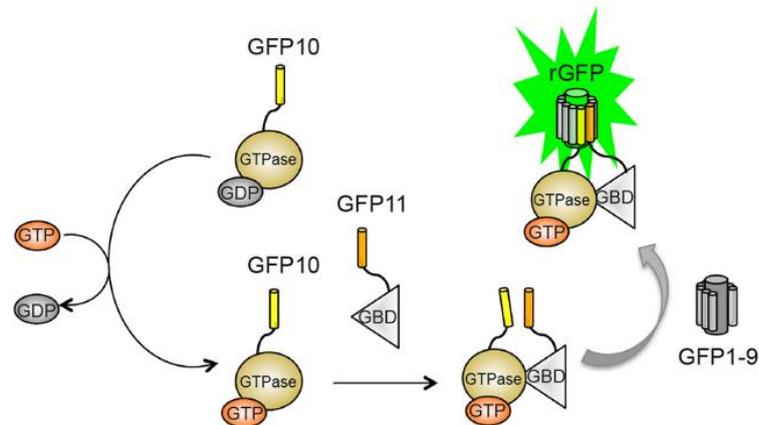


Figure 25 : Adaptation du système Split-GFP pour le monitoring des petites RhoGTPases. ⁽²⁷⁴⁾

D'après la Figure 25, la GTPase est fusionnée avec la partie C-terminale du brin β -10 de la GFP (GFP10 sur la Figure 25). Le domaine de liaison de l'effecteur (GBD) est quant à lui lié à l'extrémité N-terminale du brin β -11 de la GFP (GFP11 sur la Figure 25). Lorsque la GTPase est activée (donc liée au GTP), elle va interagir avec son domaine effecteur entraînant une proximité entre le GFP10 et le GFP11. Après ajout du détecteur GFP1-9 qui correspond à la troisième partie de la GFP, il va pouvoir se compléter avec la GFP10 et la GFP11 pour reconstituer la protéine entièrement la protéine GFP et émettre la fluorescence verte : on parle

de GFP recombinante (rGFP).

La protéine RhoB présente certaines caractéristiques biochimiques et biologiques qui la distingue de ses homologues RhoA et RhoC, ce qui pourrait expliquer certaines de ses fonctions spécifiques dans divers processus cellulaires ⁽²⁷⁵⁾. La protéine RhoB présente de nombreuses fonctions, notamment au cours du développement ou lors de l'inflammation et de la vasculogénèse. De plus, RhoB est impliqué dans le développement tumoral et quelques travaux ont montré son impact sur l'immunité. Puisque mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de l'implication de RhoB dans les mécanismes d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS dans les cancers, nous ne développerons que ces deux dernières fonctions dans la suite de ce manuscrit.

III.II.D. Fonctionnalités de RhoB dans les cancers

Au départ, la protéine RhoB a été décrite pour sa contribution dans la transformation cellulaire induite par l'oncogène Ras ⁽²⁷⁶⁾. Mais par la suite, cette équipe a montré un rôle anti-tumoral de RhoB puisque que la forme g ϵ ranyl-g ϵ ranylée de la protéine était nécessaire pour obtenir l'inhibition de la croissance cellulaire médiée par les FTI ⁽²⁷⁷⁾. D'autres études ont suivies confortant le potentiel rôle suppresseur de tumeurs de la protéine RhoB, notamment via l'inhibition de la prolifération, de l'invasion et des métastases tumorales ainsi que l'amélioration de la survie ^(278,279). Ainsi la protéine RhoB exerce un rôle bivalent dans les cancers. Le Tableau 4 présente certaines études reportant ces actions contradictoires suivant le type tumoral.

Tumeurs	RhoB : oncogène	RhoB : suppresseur de tumeur
Cerveau	<i>Ma Y Neuro Oncol 2015</i> <i>Ader I Oncogene 2003</i>	<u><i>Forget MA Clin Exp Metastasis 2002</i></u>
Sein	<i>Fritz G Int J Cancer 1999</i> <u><i>Médale-Giamarchi C Breast Cancer Res 2013</i></u> <i>Kazerounian S Cancer Res 2013</i>	<i>Kazerounian S Cancer Res 2013</i>
Col de l'utérus	<i>Ader I Oncogene 2002</i>	<u><i>Kim DM Int J Cancer 2009</i></u>
Rein	<i>Hutchison N Cell Signal 2009</i>	<u><i>Chen W Plos One 2016</i></u>
Poumon	<u><i>Luis-Ravelo D Mol Oncol 2014</i></u> ⁽²⁸⁰⁾ <u><i>Calvayrac O EMBO Mol Med 2017</i></u> ⁽²⁸¹⁾	<u><i>Sato N Int J Cancer 2007</i></u> ⁽²⁸²⁾ <u><i>Mazieres J Clin Cancer Res 2004</i></u> ⁽²⁸³⁾ <u><i>Calvayrac O Clin Cancer Res 2014</i></u> ⁽²⁸⁴⁾
Lymphome	<u><i>Bhavsar PJ Oncogene 2013</i></u>	<i>Ferreira AC J Leukoc Biol 2016</i>
Peau	<u><i>Delmas A Oncotarget 2015</i></u> <u><i>Meyer N J Investiq Dermatol 2014</i></u>	<i>Jiang K Mol Cell Biol 2004</i> <i>Liu AX Mol Cell Biol 2001</i> <i>Meyer N J Investiq Dermatol 2014</i>

Tableau 4: Résumé du rôle bivalent de la protéine RhoB dans différents cancers (adapté de ⁽²⁴³⁾).

Les études présentées dans le Tableau 4 incluent dans certains cas des expériences *in vivo* (*italique*) et/ou des données de patients (souligné). Puisque les expériences menées dans mes travaux de thèse se sont appuyées sur un modèle *in vitro* d'adénocarcinome pulmonaire, quelques études portant sur les cancers du poumon seront décrites ci-dessous afin d'illustrer le rôle dual de la protéine RhoB dans les tumeurs. Les études sélectionnées comportent des expériences *in vitro*, *in vivo* et cliniques.

Rôle pro-tumoral de la protéine RhoB

La protéine RhoB peut contribuer à la tumorigénèse dans certains modèles de cancers, via notamment la stimulation de la prolifération, l'angiogénèse, l'invasion et la migration.

Dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire, une étude a montré que le gène codant pour la protéine RhoB présente une activité pro-métastatique ⁽²⁸⁰⁾. Grâce à des expériences fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* qui sur-exprimaient ou diminuaient l'expression génique, cette étude démontre que RhoB va promouvoir à la fois les stades précoces et tardifs des métastases dans ces cancers pulmonaires. En effet, l'injection systémique de cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 RhoB *knockdown* dans des souris a montré une diminution significative des métastases osseuses. Des analyses cliniques ont montré une forte association entre des hauts niveaux d'expression de RhoB et une faible survie associée chez des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires. Par conséquent, de hauts niveaux d'expression de RhoB chez ces patients vont promouvoir la progression tumorale, la chimio-résistance et contribuer à l'augmentation de la survie cellulaire après traitement par rayons γ .

Une autre étude plus récente a également décrit le potentiel rôle pro-tumoral de RhoB dans les cancers pulmonaires ⁽²⁸¹⁾. L'analyse d'échantillons de patients mutés EGFR a révélé qu'une faible expression de RhoB était corrélée à une bonne réponse au traitement par EGFR-*tyrosine kinase inhibitors* (EGFR-TKI). En effet, la survie sans progression était de 15.3 mois lorsque l'expression de RhoB était faible, contre 5.6 mois lorsque RhoB est fortement exprimé chez ces patients. D'autres analyses complémentaires, *in vitro* sur un panel de lignées cellulaires tumorales de poumon et *in vivo* sur des souris transgéniques EGFR^{L858R}, ont confirmé qu'une meilleure réponse aux EGFR-TKI était obtenue lors d'un faible niveau d'expression de la protéine RhoB.

Rôle suppresseur de tumeurs de la protéine RhoB

La perte de l'expression de RhoB est fréquemment observée dans les cancers du poumon et a été corrélée à de mauvais résultats cliniques ^(282,283).

Grâce à deux analyses indépendantes d'immuno-marquages de tissus pulmonaires sains ou de différents stades tumoraux, il a été montré que l'expression de la protéine RhoB était très significativement diminuée dans les tissus malins par rapport aux tissus normaux ⁽²⁸³⁾. La perte d'expression de RhoB a été observée dans 96% des tumeurs invasives. De plus, l'expression de RhoB a été diminuée de 86% dans les tumeurs faiblement différenciées par rapport aux tissus sains, suggérant que ce phénomène apparaît rapidement dans le processus tumoral. La perte de l'expression de RhoB est significativement corrélée avec le stade tumoral et l'index de prolifération via notamment le marqueur de prolifération Ki-67. *In vitro*, l'expression induite de RhoB dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549 diminue la prolifération cellulaire. *In vivo*, l'induction de RhoB diminue la croissance tumorale dans des souris nues xénogreffées.

Une étude plus récente s'est intéressée à l'utilisation de l'expression de RhoB comme marqueur pronostic dans les NSCLC ⁽²⁸⁴⁾. Dans cette étude multicentrique, l'expression de RhoB a été analysée par RT-qPCR et immunohistochimie sur des échantillons de patients malades, montrant que la perte de l'expression de RhoB était à nouveau significativement associée à une mauvaise survie globale et une faible survie sans progression. De plus, la perte de l'expression de RhoB est plus forte dans les stades tumoraux plus avancés et plus agressifs (stade IV). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* grâce à des souris transgéniques EGFR(L858R)/RhoB^{+/+}. Cette étude suggère ainsi que RhoB représente un marqueur pronostic important dans les NSCLC et serait critique dans la progression vers un phénotype agressif de cancers.

Ainsi, la protéine RhoB contribue à la dynamique tumorale de multiples façons et présente un rôle dual tantôt pro-tumoral tantôt suppresseur de tumeurs. Ces différentes études montrent l'importance de cette protéine et confortent l'intérêt d'approfondir l'analyse de ses fonctions et de sa régulation.

III.II.E. Fonctionnalités de RhoB dans l'immunité

La protéine RhoB est exprimée de façon différentielle par les cellules immunitaires. Par exemple, elle est fortement exprimée par les cellules B mais est exprimée de façon intermédiaire par les lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺) et les cellules NK ⁽²⁸⁵⁾. Cependant, la plupart des travaux portant sur l'impact de RhoB dans l'immunité concernent les macrophages et les DC, et peu sur les lymphocytes. En effet, une étude a rapporté une augmentation de l'expression de RhoB dans les macrophages suite au traitement par des agonistes de TLR comme le lipopolysaccharide ⁽²⁸⁶⁾. De plus, le silencing de RhoB diminue les capacités de sécrétion des cytokines IL-6, TNF- α et IL-1 β par les macrophages stimulés avec des ligands de TLRs. Enfin, cette étude a montré une interaction de RhoB avec la chaîne α du CMH de classe II au niveau des endosomes des macrophages. Une autre étude a rapporté également une augmentation de l'expression de RhoB dans des DC traitées au LPS ⁽²⁸⁷⁾. De plus, cette étude a montré que l'inactivation de RhoB dans les DC va diminuer leur capacité à activer les lymphocytes T CD4.

La plupart des études de l'impact des RhoGTPases sur les lymphocytes portent sur Rac1 (implication dans la sélection thymique, l'activation lymphocytaire et la présentation antigénique) et RhoA (implication dans la cytotoxicité). Néanmoins, des souris transgéniques pour la C3-transférase (voir partie III.II.C.) présentent une baisse de la thymopoïèse liée à une forte diminution des sous types DN2 et DN3 suite à une augmentation de leur apoptose ^(288,289). Outre le développement des cellules T, les RhoGTPases influencent également l'activation, la différenciation et la migration des lymphocytes T, ainsi que les fonctions des effecteurs T. Là encore, peu de ces travaux incluent RhoB. Nous pouvons toutefois citer une étude qui a investigué le rôle de RhoB dans le crawling des lymphocytes ⁽²⁹⁰⁾. Dans ces travaux, l'inhibition de RhoB induite par la C3 transférase induisait une baisse de l'invasion des lymphocytes. De plus, une autre étude a montré que la diminution de RhoA dans les thymocytes induite par la C3 transférase limitait leur capacité d'adhésion et par conséquent leur migration, notamment via les β 1 intégrines ⁽²⁹¹⁾. Cependant les observations des trois études citées dans ce paragraphe ont été obtenues suite à l'utilisation de la C3 transférase, dont nous avons vu précédemment qu'elle inhibait RhoB mais aussi RhoA et RhoC. Par conséquent, ces résultats sont à modérer puisque l'inhibition de RhoB n'était pas spécifique.

Ainsi la protéine RhoB exerce des fonctions diverses dans l'organisme et participe notamment à la régulation de la réponse immunitaire. Cependant, le rôle de RhoB dans la régulation lymphocytaire reste peu étudié. Par exemple, peu de travaux portent sur l'implication de RhoB dans l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes

^(167,168). Les résultats de notre étude présentés dans le paragraphe suivant s'inscrivent dans cette thématique et permettent une meilleure compréhension de la régulation du mécanisme d'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par la protéine RhoB.

DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

L'équilibre entre la tolérance et l'immunité peut être perturbé par l'apparition de certaines maladies comme les cancers. Au cours du processus tumoral, les différents acteurs du système immunitaire sont mobilisés au niveau du site tumoral pour exercer leur fonction pro- et/ou anti-tumorale. Parmi l'arsenal de cellules immunitaires disponibles dans ce système, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 représentent un groupe particulièrement intéressant.

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 disposent de capacités cytotoxiques comparables aux cellules de l'immunité innée comme les cellules NK. Grâce au système granzyme/perforine, à la grande production de cytokines pro-inflammatoires, à l'expression des ligands de Fas et TRAIL ainsi que l'expression du CD16, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont un fort potentiel cytolytique.

Au cours de l'introduction de ce manuscrit, nous avons détaillé les différents acteurs nécessaires à l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes, comme par exemple les BTN2A1 et BTN3A1. Parmi ces intervenants, une étude a identifié la petite GTPase RhoB comme pouvant participer l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 ⁽¹⁶⁸⁾. Cependant, peu de travaux ont investigué le rôle de RhoB dans ce mécanisme, notamment dans les cancers solides. Grâce à une collaboration avec une autre équipe du centre de recherches, spécialisée dans les petites GTPases, l'objectif de ces travaux de thèse a été de caractériser davantage l'implication de RhoB dans les mécanismes d'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes dans un modèle *in vitro* de cancer pulmonaire.

Ce travail, s'intégrant dans mes travaux de thèse doctorale, a abouti à la publication d'un article scientifique dans *Frontiers in Immunology* qui synthétise les différents résultats obtenus dans ce projet ⁽²⁹²⁾.

RESULTATS

L'activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes peut être altérée par un réacheminement de RhoB dans les cancers du poumon

I. Contexte et objectifs du projet

Le projet a été initié en 2016 après la publication de l'article « *RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by Vγ9Vδ2 T Cell Receptor* » par le Dr Zsolt Sebestyen dans le journal *Cell Report* ⁽¹⁶⁸⁾. Pour rappel, cette étude a montré que RhoB pouvait interagir avec le phosphoantigène endogène dans la cellule cible afin d'induire une modification de la conformation de la BTN3A1 et permettre l'activation du TCR Vγ9Vδ2.

Le projet de recherche repose sur une collaboration étroite avec l'équipe 3 de notre centre de recherches, dirigée par le Pr. Gilles Favre. Les travaux de cette équipe visent à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les dérégulations observées lors d'un cancer, notamment dans les voies de signalisation de survie et de prolifération cellulaire, ainsi que de progression tumorale. De plus, l'équipe est spécialiste de l'implication des RHOGTPases dans les cancers du poumon et les mélanomes. Cette collaboration a permis de nous fournir des lignées cellulaires NSCLC *Wild Type* (WT, ou dites sauvages) ou RhoB *Knock-Out* (KO) établies par le Dr. Olivier Calvayrac et Sarah Figarol, ce qui a représenté un outil précieux pour réaliser nos expériences. De plus, l'expertise de l'équipe dans les biotechnologies de pointes basées sur les interactions protéine-protéine-GFP grâce au Dr Stéphanie Cabantous nous a permis d'utiliser le système Split-GFP dans nos expériences.

Ce projet de recherche avait pour but, à partir de la publication de Sebestyen, de préciser l'implication de la protéine RhoB dans l'activation des LT Vγ9Vδ2 par les phosphoantigènes endogènes et exogènes. De plus, il permettait d'étudier le rôle de RhoB dans ce mécanisme à partir d'un modèle tumoral de cancer solide, ce qui était inédit puisque les travaux précédents portaient sur des cancers hématologiques. Le modèle d'étude retenu dans nos travaux concerne un modèle de NSCLC, cancer dans lequel il a été montré que les LT Vγ9Vδ2 ré-infusés chez des patients malades présentaient un effet tumoral potentiel ^(293,294). Dans ce projet nous avons utilisé un modèle d'activation classique des LT Vγ9Vδ2, c'est-à-dire hétérologue entre les lymphocytes et des cibles tumorales sécrétrices de phosphoantigènes. Nous avons donc analysé le rôle de RhoB dans les réponses à deux types de lignées NSCLC, les lignées PC9 et A549, représentatives des deux mutations les plus fréquentes retrouvées dans ces cancers : respectivement EGFR et KRAS. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'une publication dans *Frontiers in Immunology* présentée dans la suite de ce manuscrit ⁽²⁹²⁾.

II. Publication scientifique

V γ 9V δ 2 T cells activation through phosphoantigens can be impaired by a RHOB rerouting in lung cancer

Chloé Laplagne^{1,2,3}, Sarah Meddour^{1,2,3}, Sarah Figarol^{1,2,3}, Marie Michelas^{1,2,3}, Olivier Calvayrac^{1,2,3}, Gilles Favre^{1,2,3,4}, Camille Laurent^{1,2,3,4}, Jean-Jacques Fournié^{1,2,3}, Stéphanie Cabantous^{1,2,3} and Mary Poupot^{1,2,3,*}

1. Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Inserm UMR1037, 31037 Toulouse, France
2. Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31400 Toulouse, France
3. ERL 5294 CNRS, 31037 Toulouse, France
4. IUCT-O, 31000 Toulouse

* Correspondance: mary.poupot@inserm.fr

Keywords: RHOB, V γ 9V δ 2 T cells, phosphoantigen, endosomes, split-GFP, TCR activation.

Running title: Lung cancer cells and $\gamma\delta$ T activation

Word count: 5240

DOI: 10.3389/fimmu.2020.01396

Acknowledgments

This work was funded by INSERM, CNRS, the University Hospital of Bordeaux and Toulouse III University. We acknowledge Imcheck Therapeutics for giving us the 103.2 antibody. We acknowledge the Technologic Platform of the CRCT.

We are grateful to our healthcare professionals for their boundless investment during the COVID-19 crisis.

INTRODUCTION

Gamma delta ($\gamma\delta$) T lymphocytes expressing the T cell receptor (TCR) V γ 9V δ 2 are a prominent $\gamma\delta$ T cell subset in human peripheral blood representing 1 to 3% of blood mononuclear cells. Upon activation with non-peptide phosphoantigens (PAGs), these V γ 9V δ 2 T cells proliferate, produce chemokines and cytokines, and mediate cell cytotoxicity against a large spectrum of tumor cells (1). These molecules are metabolites from the methyl erythritol phosphate pathway in microbial pathogens (2) and from the eukaryotic mevalonate pathway in tumor cells which are thus spontaneously recognized and killed by V γ 9V δ 2 T cells (3,4). In humans, treatment with aminobisphosphonates such as zoledronate can exacerbate V γ 9V δ 2 T cell reactivity through the upregulation of the endogenous biosynthesis of PAGs in mammalian cells (5). This PAGs activation was clearly shown to be TCR-dependent. However, as V γ 9V δ 2 T cells express different activator and inhibitor receptors such as immune checkpoint inhibitors and natural killer (NK) receptors, their reactivity can also be exacerbated or curbed by ligands expressed by target cells (6,7). Thus, even overproduction of endogenous PAGs might reflect the metabolic biases of cancer cells, and presumably occurs in most if not all types of tumors, some of which are resistant to V γ 9V δ 2 T killing. Accordingly, tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells have been detected in several solid and hematopoietic malignancies but are not always correlated with a good prognosis (8,9). However, these cells remain very attractive candidates for cancer immunotherapies regarding a tumor regression associated with their significant amplification in the blood for some clinical trials based on PAG treatment or adoptive transfers of V γ 9V δ 2 T cells (10–12). In patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), administration of zoledronate was correlated with an increase of V γ 9V δ 2 T cells in blood and a higher overall survival (13). A phase I clinical study showed the safety and potential anti-tumor effect of reinfused ex-vivo expanded V γ 9V δ 2 T cells in patients with advanced NSCLC refractory to or intolerant to current conventional treatment (14). These partial responses and the inevitable relapse with classical treatments make NSCLC incurable pathologies for which many mechanisms of acquired resistance have been elucidated, but the recurrent immune-resistance remains obscure.

RHOB is a known tumor suppressor in lung cancer, and its downregulation, frequently observed in aggressive tumors (15), is associated with decreased overall survival (16). More recently, RHOB has also been shown to confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in NSCLC (17), suggesting different roles of this GTPase depending on the oncogenic and/or therapeutic context. Interestingly, RHOB was recently shown to mediate endogenous PAG recognition by the V γ 9V δ 2TCR (18). RHOB interaction with endogenous PAG in the target cell could induce a modification of the conformation of the membrane butyrophilin BTN3A1 which

then activates the V γ 9V δ 2TCR (19).

Here, we investigated the role of RHOB in the response to PAg-mediated $\gamma\delta$ T cell activation in two NSCLC cell lines with the most represented oncogenic mutations KRAS and EGFR. After showing that A549 was well recognized and killed by V γ 9V δ 2 T cells compared to PC9, we found different patterns of surface molecule expression for these two NSCLC cell lines. However, the resistance of PC9 to V γ 9V δ 2 T cell killing could be due to a rerouting of RHOB in late / degradation compartments that may prevent its function with BTN3A1 at the plasma membrane in PC9 cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Antibodies for flow cytometry analysis: BV310 anti-CD3, FITC anti-TCRV γ 9V δ 2, PE or PeCy5 anti-CD107a, PeCy7 anti-IFN γ , PE anti-TIM3, PE anti-Galectin9, PeCy7 anti-PD1, APC anti-PDL1, PeCy5 anti-CD80, PE anti-CD80, PeCy5 anti-HLAABC, AF647 anti-CD31, PeCy7 anti-CD38, FITC anti-CD226, FITC anti-CD112, FITC anti-CD155, PE anti-LFA1 and isotype controls (BD Biosciences, Pont de Claix, France); BV421 anti-CD69 and isotype control (Miltenyi Biotech, Paris, France); PE anti-HLAE (eBiosciences); PE anti-ULPB2,5,6 (R&D Systems, Minneapolis, USA); APC anti-MICA/B (Biolegend, St-Quentin-en-Yvelines, France); PE anti-ICAM1 and PE anti-ICAM3 (Immunotech, Marseille, France); PE anti-LFA3 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Blocking antibodies: anti-BTN3A1 1h at 10 μ g/mL (103.2 clone, kindly gifted by ImCheck Therapeutics, Marseille, France), anti- $\gamma\delta$ TCR 1h at 0.5mg/mL (B1 clone, Biolegend,), anti-ICAM1 (W-CAM-1 clone, Thermofisher, Villebon sur Yvette, France) and anti-CD31 1h at 10 μ g/mL (HEC7 clone, Thermofisher, Villebon sur Yvette, France). The exoenzyme C3 transferase was used as RHO inhibitor I overnight at 2 μ g/mL (Cytoskeleton, Inc. Denver, USA).

Flow cytometry analysis

Cells were labeled with 5 μ g/ml antibodies or isotype controls for 20 minutes at 4°C and analyzed on an LSRII cytometer (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Data were analyzed using BD FACSDiva software, FlowJo software or FlowLogic software.

V γ 9V δ 2 T cell cultures

Primary V γ 9V δ 2 T cell cultures were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Toulouse,

Résultats

France). Briefly, PBMC were stimulated with BrHPP (3 μ M) and rhIL-2 (300 IU/ml) in complete RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Hy1, ThermoScientific, USA), 100 g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin and 1 mM sodium-pyruvate (Cambrex Biosciences, Rockland, ME, USA) for 14 days. Purity of the V γ 9V δ 2 T cells was > 95% as determined by flow cytometry using an anti-TCRV γ 9V δ 2 mAb.

Lung cancer cell lines

The human NSCLC cell lines A549, H1299, H827 and PC9 were previously obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and were maintained at 37°C in a humidified chamber containing 5% CO₂.

For the RHOB KO A549 and PC9, the TALEN sequences targeting RHOB were designed by CELLECTIS (Paris, France), and inserted into two plasmids comprising CMV and T7 promoters. Triple transfection of the two TALEN-encoding plasmids with a Puromycin selection cassette upstream RHOB gene was performed using the JetPrime® transfection agent (Polyplus transfection) according to the manufacturer's recommendations. Puromycin selection was performed for 48 hours after transfection and the pool of surviving clones was subcloned by limit dilution in 96 well plates. For each subclone, RHOB DNA levels and RHOB protein expression were analyzed by PCR and Western Blot.

Cytotoxicity assay

Lung cancer cell lines were treated at 70% of confluence with BrHPP (1 μ M, 4h, Innate Pharma, Marseille, France) or Zoledronic acid monohydrate (Zometa, 5 μ M, overnight, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). After washing, treated cancer cells were co-cultured in 96-wells plates with overnight IL-2-deprived V γ 9V δ 2 T cells (E:T ratio 1:1) in complete medium with anti-CD107a mAb or IgG1 control (5 μ g/ml). Brefeldin A (10 μ g/ml, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was added at 2 hours of co-culture. After 4 hours of co-culture cells were washed, stained and analyzed by flow cytometry. When mentioned, contact between $\gamma\delta$ T cells and target cells was prevented thanks to a Transwell® system (Corning). For intracellular IFN- γ expression, cells were fixed with PBS 2% paraformaldehyde and permeabilized with PBS containing 5% FCS and 1% saponin (Sigma-Aldrich) prior to staining for 30 min with the specified mAb for flow cytometry analysis.

Trogocytosis analysis

Lung cancer cells were stained with the lipophilic green-emitting dye PKH67 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, PKH67-positive cells were co-cultured for 4 hours in complete culture medium with PKH67-negative V γ 9V δ 2 T cells

Résultats

in 96-well U-bottom culture plates at a cell ratio of 1:1. After gentle centrifugation (110 g for 1 min) and co-cultures for 3 min or 4h at 37°C, cells were washed with 0.5 mM PBS/EDTA. Trogocytosis was measured as the acquisition of PKH67 fluorescence, which was characterized via the increase of the mean fluorescence intensity (mfi) of PKH67 by a flow cytometry.

Monitoring RHOB activity with a split-GFP reporter system

To evaluate the effect of PAg, A549 and PC9 cell lines were engineered to express the tripartite split-GFP biosensor system previously developed to monitor RHOB activity in single cells (20). To generate the split-GFP reporter cell line, sequential transductions were performed with lentiviruses encoding for GFP1-9, the detector fragment of the split-GFP system and the chimeric construct that coexpress both RHOB fused to the strand 10 of trisfGFP (GFP10-RHOB) and the RHO-binding domain of Rhotekin (RBD) fused to strand 11 of trisfGFP (RBD-GFP11) in A549-rtTA or PC9-rtTA cells. After recovery, cells were induced with 0.25 µg/mL doxycycline for 24 h and sorted by FACS based on GFP fluorescence. To improve the GFP fluorescence signal upon split-GFP complementation, a GFP nanobody (21) was expressed from a lentiviral expression vector on optimized cell lines.

For both fluorescence quantifications of RHOB activity and analysis of RHOB localization, reporter cells were grown on µ-Slide 8-well ibiTreat chambered coverslips (Ibidi, Biovalley). Cells were seeded at a density of 15,000 cells/well for PC9 and 35,000 cells/well for A549 for 24h. Split-GFP reporter expression was induced for 24h with 0.25 µg/ml Doxycycline in RPMI culture medium supplemented with 2% serum (PC9) and 10% serum (A549), and subsequently treated with PAg for 16 h with Zoledronic acid monohydrate or 4h of BrHPP. To stop the experiment, cells were fixed with 4% PFA, PBS then stained with a cytoplasmic cell mask, HCS CellMask™ Blue Stain (ThermoFisher Scientific) according to the supplier's instructions. Quantitative image acquisition was performed using an Operetta high-content imaging system (Perkin Elmer) with a 20x objective lens in the 488/525 nm (GFP) and 360/405 nm (cell mask) channels. Analysis was performed with Harmony® software on an average of 1500 cells/well. The number of objects and the sum of cell area was determined from the cell mask staining. The percentage of GFP cells was calculated as: $\text{percentage GFP cells} = (\text{number of GFP-positive cells} / \text{number of all objects}) \times 100$, where GFP-positive cells are defined by cells following this criteria: mean of fluorescence intensity (MFI) of the object > mean of MFI in the control wells without doxycycline. GFP intensity sum/cell area was defined as the $(\text{GFP intensity sum of GFP+ cells}) / (\text{HCS intensity sum of GFP+ cells})$.

For confocal analysis, cells were fixed with 3.7% PFA and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS buffer. Blocking was performed with 8% BSA, PBS for 30 min before adding primary antibodies. Anti-GFP10 polyclonal antibody (20) was used at 1:1000 dilution for 1h,

followed by secondary antibody Alexa fluor 594 conjugate anti rabbit IgG (Life technologies) for 40 min. For labeling endosomes, the following primary antibodies were used: Rab7 ((D95F2) XP 9367, Cell signaling) 1:50, LAMP1 (H5G11) sc-18821, Santa Cruz Biotechnology 1:50. After overnight incubation, secondary antibodies were added Alexa fluor 594 conjugate anti rabbit IgG (Life technologies) and Alexa fluor 647 conjugate anti mouse IgG (Life technologies). Microscopy images were acquired using LSM 780 or LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, Germany) confocal laser scanning microscopes using a 488 Argon laser with a 490-553 nm emission filter (GFP) Alexa 594 and DAPI labeling were acquired with Argon laser (543 nm) and 405 UV diode lasers respectively using 20x and 63x/1.4 oil immersion objectives. Image analysis was performed with ImageJ[®] software.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. For comparison of two series of normally distributed variables, we used paired and one-tailed Student's t tests with $\alpha = 0.05$ for statistical significance. Statistical analysis were performed with Prism software.

RESULTS

Differential activation of V γ 9V δ 2 T cells by different PAg-treated NSCLC cell lines

To analyze the role of RHOB in V γ 9V δ 2 T cell reactivity against NSCLC, we first screened the basal reactivity of V γ 9V δ 2 T cells against four cell lines with different mutation statuses: A549 (KRAS mutant), H1299 (HRAS mutant), PC9 and H827 (EGFR mutant). The expression of CD107a and IFN- γ by V γ 9V δ 2 T cells after co-cultures with the different tumor cell lines was measured by flow cytometry. Compared to the Daudi control target cells, which induced CD107a and IFN- γ expression by V γ 9V δ 2 T cells, no basal reactivity was detected with the four NSCLC cell lines (Figure 1A and 1B black dots). However, incubation of these cell lines with zoledronate (red dots) or with an exogenous synthetic PAg, BrHPP (blue dots), induced a high increase of the percentage of IFN- γ and CD107a positive V γ 9V δ 2 T cells in co-culture with A549, H827 and H1299 but not with PC9 (Figure 1B). We then checked that this reactivity was due to an immunological synapse following a contact between V γ 9V δ 2 T cells and NSCLC target cells and not to PAg excreted in the co-culture medium. V γ 9V δ 2 T cells were thus incubated for four hours with A549 or PC9, previously treated with PAg, and separated by a Transwell (TW) membrane or with their conditioned medium. As shown in figure 1C, no CD107a expression was detected in V γ 9V δ 2 T cells in the TW condition or in the conditioned medium condition (CM) (Figure 1C for a representative experiment and

supplementary figure 1 for pooled experiments). Trogocytosis was also evaluated to confirm the contact dependent reactivity of V γ 9V δ 2 T cells against A549. Trogocytosis is the transfer of membrane patches following the establishment of an immunological synapse between a T lymphocyte and a target cell. The membrane transfer was measured by the increase of green (PKH67) fluorescence expressed by the V γ 9V δ 2 T following contact with the A549 cell line previously stained with the PKH67 fluorescent probe stably inserted into the plasma membrane. V γ 9V δ 2 T cells expressed PKH67 fluorescence after four hours of contact with PAg-treated PKH67+A549 compared to 5 min of contact (Figure 1D for a representative experiment and supplementary figure 2 for pooled experiments). CD107a and IFN- γ expression by V γ 9V δ 2 T cells, and their trogocytosis in reaction to A549 were correlated with the death of A549 (Figure 1E and supplementary figure 3A). On the contrary, PC9, even treated by phosphoantigens was relatively resistant to V γ 9V δ 2 T cell killing (Figure 1F and supplementary figure 3B).

V γ 9V δ 2 T cells can thus be highly activated to kill A549 but not PC9, when previously treated with phosphoantigens.

Expression of different patterns of surface ligands and adhesion molecules on A549 and PC9

The immunological synapse between V γ 9V δ 2 T cells and tumor cells involves different surface molecules such as activator and inhibitor ligands/receptors, and adhesion molecules. Expression of these molecules at the surface of A549, PC9 and the V γ 9V δ 2 T cells was performed by flow cytometry analysis. With regard to the adhesion molecule pattern, LFA-1, LFA-3 and CD155 were expressed at the same level by A549 and PC9 whilst ICAM-3, CD112, CD31 and the costimulatory ligands CD80/CD86 were not expressed (Figure 2A and supplemental figure 4A). However, PC9 expressed high levels of the adhesion molecule ICAM-1 compared to A549, and A549 expressed high level of CD38 compared to PC9. The corresponding receptors were checked at the surface of V γ 9V δ 2 T cells which thus expressed LFA-1, ICAM-1, ICAM-3, CD2, LFA-3, CD226, CD38 and CD31 (Figure 2B). Considering the activator and inhibitor ligands, A549 expressed less ULBPs and PDL1 than PC9 but more HLA-A,B,C whereas MICA/B and galectin-9 were not expressed neither by A549 nor by PC9 (Figure 2A), V γ 9V δ 2 T cells expressed the corresponding receptors NKG2A, NKG2D, PD1 and Tim-3 (Figure 2B). The level of expression of all these ligands/receptors on A549 and PC9 were not statistically affected by PAg treatment (Supplementary figure 4B). We then investigated which surface molecules were involved in V γ 9V δ 2 T cell activation using blocking antibodies. We

showed that blocking the LFA-3/CD2 axis decreased IFN- γ expression by V γ 9V δ 2 T cells in contact with A549 pretreated either with zoledronate or with BrHPP whilst blocking ICAM-1/LFA-1 or CD31/CD38 had no effect (Figure 2C). On the contrary, the weak V γ 9V δ 2 T cell activation by PC9 was decreased at the level of the ICAM-1/LFA-1 axis, whilst blocking of LFA-3/CD2 and of CD31/CD38 had no effect (Figure 2D). Moreover, neither the blocking of NKG2D nor PD1 had an impact on V γ 9V δ 2 T cell activation by A549 or PC9.

Finally, A549 and PC9 displayed different patterns of surface ligands and adhesion molecules and involved different surface molecules in PAg-dependent activation of V γ 9V δ 2 T cells. However, these differences cannot be sufficient to explain the different activation of V γ 9V δ 2 T cells by PC9 compared to A549. Indeed, PC9 expresses a high proportion of the inhibitory PDL1 and a high amount of ICAM-1 and ULBPs which are supposed to favor a productive immunological synapse. Conversely, A549 expresses CD38 but also expresses the inhibitory ligand HLA-A,B,C and a weak amount of ULBPs.

As the difference in surface markers of the two NSCLC cell lines did not explain the difference in V γ 9V δ 2 T cells activation, we decided to explore inside the cells.

RHOB deletion in PAg-treated A549 cell lines decreases V γ 9V δ 2 T cell activation

BTN3A1 was previously shown to be involved in V γ 9V δ 2 T cell TCR-dependent activation. BTN3A1 may interact with the V γ 9V δ 2 TCR upon association with RHOB activated by its interaction with endogenous phosphoantigens (18). Thus, we investigated the role of RHOB in V γ 9V δ 2 T cell activation by these NSCLC cell lines. Firstly, A549 and PC9 cell lines were shown to express BTN3A1 at the transcriptomic and protein level (Figure 3A and 3B). Interestingly, PAg treatment of these cell lines had no impact on their BTN3A1 expression. We then determined whether V γ 9V δ 2 T cell activation by zoledronate- or BrHPP-treated NSCLC cell lines was BTN3A1-dependent using a blocking antibody (103.2 clone). The percentage of V γ 9V δ 2 T cells expressing IFN- γ , CD107a and CD69 following contact with BrHPP- or zoledronate-treated A549 was highly decreased by the presence of anti-BTN3A1 during the co-culture (Figure 3C for a representative experiment and 3D for pooled experiments). BTN3A1 blocking also abrogated the weak activation of V γ 9V δ 2 T cells by the PC9 cell line (Figure 3E for a representative experiment and 3F for pooled experiments).

Thus, the high activation of V γ 9V δ 2 T cells by PAg-treated A549 and the weak activation by PAg-treated PC9 are totally dependent on BTN3A1.

As RHOB has been implicated in the regulation of the immune response through BTN3A1 modulation (18), we studied the implication of this GTPase in V γ 9V δ 2 T cell activation by NSCLC cell lines. RHOB was knocked out in the A549 and PC9 cell lines by the TALEN gene silencing method (Supplementary figure 5). We then assessed the effect of this knockdown (KO) on V γ 9V δ 2 T cell activation by measuring IFN- γ and CD107a expression, and trogocytosis after co-culture with the PAg-treated RHOB KO A549 or the PAg-treated RHOB KO PC9. IFN- γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells was lower in the co-culture with A549 RHOB KO treated either by zoledronate or BrHPP compared to the co-culture with PAg-treated A549 wild type (WT) (Figure 4A for a representative experiment and 4D for pooled experiments). Trogocytosis of A549 by V γ 9V δ 2 T cells was also reduced when RHOB was knocked down which was correlated with reduced death of A549 RHOB KO compared to A549 WT (Figure 4C and 4D). Furthermore, we used a RHO GTPase inhibitor, the exoenzyme C3 transferase (CT04) that specifically inhibits RHOA, B, C. We showed that inhibition of RHO GTPases abrogated CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture with A549 previously treated with zoledronate or BrHPP (Figure 4D for a representative experiment and 4E for pooled experiments).

Moreover, the weak activation of V γ 9V δ 2 T cells by PAg-treated PC9 was also dependent on RHOB (Supplementary figure 6).

Rerouting of RHOB in endosomal clusters could impair the PAg-dependent V γ 9V δ 2 T activation in PC9 cells

We then postulated that the PAg-treatment of tumor cell lines and/or their co-culture with V γ 9V δ 2 T cells could have an impact on RHOB activity using a fluorescent reporter based on the tripartite split-GFP system (22) which monitors the binding of activated RHOB to RBD, one of its effector domains (20). A549 and PC9 cells were engineered to stably express RHOB GTPase fused to strand 10 of trisfGFP (GFP10-RhoB) and the Rho-binding domain of Rhotekin (RBD) fused to strand 11 (RBD-11). The GFP1-9 detector fragment allows detection of the RHOB-GTP and RBD interaction (Figure 5A). Reporter cell lines were pre-treated with zoledronate (5 μ M, overnight) or BrHPP (1 μ M, 4h) and co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells. Treatment of A549 with these PAg induced and increased the number of fluorescent cells and their fluorescence intensity only in the presence of V γ 9V δ 2 T cells indicating a significant increase of RHOB activity in this tumor cell line (Figure 5B, representative images and Figure 5C quantification). Conversely, in PC9 cells, RHOB activity was not modulated by PAg treatment and slightly modulated in co-culture with V γ 9V δ 2 T cells, suggesting a different

RHOB regulation mechanism in this cell line (Figure 5B and 5C). To take a closer look at RHOB function, we performed confocal imaging in untreated and PAg-treated conditions, in the presence or not of V γ 9V δ 2 T cells and we analyzed the distribution of active RHOB (Figure 5D, membrane localization full bars and endosomal localization hatched bars). Surprisingly, active RHOB was significantly twice as abundant in the endosomal compartment of A549 cells compared to PC9 cells (Figure 5D, quantification). High resolution microscopy allowed us to analyze endosomal organization in PC9. Untreated reporter PC9 showed faint plasma membrane localization of RHOB/RBD complexes. Interestingly, treatment with zoledronate or BrHPP induced an accumulation of large endosomal clusters (Figure 5E, representative images). Quantification of the number of these structures indicated an increase of activated RHOB located in endosomal clusters in PAg-treated PC9 co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells (Figure 5F). These endosomal clusters were reported randomly in PC9 cells co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells independently of the treatment. Interestingly, these endosomal structures did not appear in the PAg-treated A549 co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells (Supplementary figure 7), suggesting that this endosomal reorganization was not due to the treatment with P-Ag mevalonate inhibitors.

To identify the nature of these structures, we analyzed the localization of activated RHOB with different endosomal markers. Representative images and plot profile analysis on confocal stacks indicated a colocalization partly with late endosomal marker Rab7 and to a lesser extent with the LAMP1 lysosomal marker only after PAg-treated PC9 were co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells independently of the treatment (Figure 6). These results indicate that in PC9 cells, endosomal RHOB is located in the late endosomal and on route to the lysosomal compartment.

Discussion

The anti-tumor effect of V γ 9V δ 2 T cells depends on the phosphoantigens expressed by tumor cells but also on certain activator ligands (MICA/B and ULBPs) and adhesion molecules, essential to stabilize the immunological synapse. As PAg is not expressed by all tumor cells, treatment with exogenous PAg such as BrHPP or with aminobisphosphonates which induce endogenous PAg production such as isopentenylpyrophosphate (IPP), is required to activate the anti-tumor functions of V γ 9V δ 2 T cells. However, V γ 9V δ 2 T cell activation can also be lowered by inhibitory signals that can be expressed by the tumor microenvironment and in particular by tumor cells. In this study, none of the NSCLC cell lines were able to spontaneously activate V γ 9V δ 2 T cells. However, pre-treatment with BrHPP or

Résultats

zoledronate sensitized some of them to V γ 9V δ 2 T cell killing. Indeed, amongst them, A549 was able to strongly activate IFN γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells whereas PC9 induced a weak activation of these lymphocytes. Interestingly, these two cell lines express RHOB but wear different mutation, KRAS for A549 and EGFR for PC9. However, nothing was described concerning some phenotypic specificities which could explain the different sensitivity of these cells towards V γ 9V δ 2 T killers.

Surprisingly, exploring their surface molecule pattern, we showed that these two NSCLC cell lines could differentially express NKG2D ligands, immune checkpoint ligands and adhesion molecules. PC9 highly expressed ICAM-1, ULBPs and PDL1 whereas A549 highly expressed CD38 and HLA-A,B,C, the two cell lines expressed LFA-1, LFA-3 and CD155 but not ICAM-3, CD112, MICA/B, HLA-E or galectin-9. The presence of ULBPs ligands could partially explain the reactivity of V γ 9V δ 2 T cells against NSCLC cell lines. However, blocking NKG2D expressed at the surface of V γ 9V δ 2 T did not decrease their activation which is thus only induced here by PAg and not by other activator ligands. Furthermore, we showed that blocking of ICAM-3/LFA-3 decreased the cytolytic activity of V γ 9V δ 2 T against A549 and blocking of ICAM-1/LFA-1 decreased this activity against PC9. For these two cell lines, stabilization of the immunological synapse around TCR/BTN3A1 is thus coordinated by two different adhesion systems. If LFA-1 engagement by ICAM-1 is sufficient to activate iNKT cells (23) in this model of lung cancer / V γ 9V δ 2 T, interactions of adhesion molecules are not sufficient to induce an activating signaling in V γ 9V δ 2 T cells. However, according to the literature, these interactions are necessary when their inhibition highly decreases V γ 9V δ 2 T activation (9,24). But this does not explain the difference between A549 and PC9. First, we thought that the high expression of PDL1 by PC9 could explain the inhibition of V γ 9V δ 2 T activation. However, PD1 blocking did not induce an increase in CD107a or IFN γ expression by V γ 9V δ 2 T cells. As surface inhibitor markers were not at the origin of the weak activation of V γ 9V δ 2 T cells, we focused on RHOB inside the cells.

According to the literature (18) and thanks to NSCLC cell lines with a RHOB KO, we showed that RHOB was involved in the V γ 9V δ 2 T activation through endogenous PAg induced by a zoledronate treatment but also through exogenous PAg such as BrHPP. The non-reactivity of V γ 9V δ 2 T cells with the conditioned medium of BrHPP pre-treated tumor cells or in co-culture with these cells separated by a porous membrane (Transwell), demonstrated that BrHPP was able to penetrate inside the tumor cell and to activate membrane BTN3A1 shown to be essential for this activation (19). RHOB is thus also involved in the activation of V γ 9V δ 2 T cells through the exogenous PAg, BrHPP. Interestingly, the ICAM-1 signaling cascade is also highly dependent on RHO proteins, as ICAM-1 crosslinking induces actin reorganization

Résultats

which involves RHOB proteins (25). PC9 expresses a high amount of ICAM-1 which is involved in the immunological synapse with V γ 9V δ 2 T but does not efficiently activate the latter.

To explain the weak reactivity of V γ 9V δ 2 T cells against PAg-pretreated PC9, we examined RHOB activity and its localization. The similar reactivity of V γ 9V δ 2 T cells against A549 and PC9 pulsed with the 20.1 BTN3A1 agonist (Supplemental figure 8) supports the important role of RHOB in the PAg-induced response in this model. Our results show that active RHOB is localized in endosomes and at the plasma membrane of both A549 and PC9 cell lines. This is in agreement with previous reports of GFP-RHOB fusions in human epithelial cells (26). Our results indicate that active RHOB is increased in PAg-treated A549 cells co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells, whereas only a slight increase of active RHOB is observed in PC9 cells co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells independently of PAg treatment. It is important to note that the activation of RhoB in co-culture of A549 and V γ 9V δ 2 T is mainly dependent on the treatment by the PAg (Figure 5C). It has been previously established that treatment with PAg induces an increase of active RHOB that will modify the conformation of the BTN3A1 at the plasma membrane, which allows the activation of V γ 9V δ 2 T cells (18). The fact that the presence of V γ 9V δ 2 T cells further increases RHOB activity suggests that RHOB may be activated by exogenous stress signals and cytokines that would come from activated V γ 9V δ 2 T cells. Indeed, in other contexts involving immune cells, RHOB has been shown to be upregulated by environmental stress, cytokines and LPS, and regulating this latter signaling (27–29). Our hypothesis would be that signals secreted by activated V γ 9V δ 2 T cells would contribute to RHOB activation in a cooperative manner with PAg. These results corroborate with the V γ 9V δ 2 T cell activation observed with A549 or -PC9 treated with PAg (Figure 1, supplemental figure 1). Altogether this indicates that the reactivity of these cell lines is strongly linked to RHOB function. In terms of subcellular localization, both cell lines contain active RHOB at the plasma membrane, with a stronger distribution in PC9 cells. A higher proportion of active RHOB is present in the endosomal compartment in A549 compared to PC9, however they differ strongly in terms of endosomal distribution. Whereas in A549, endosomal RHOB is diffusely distributed, in PC9 endosomal active RHOB was found in large clusters that colocalized with late Rab7 endosomal and LAMP-1 lysosomal markers. It is known that V γ 9V δ 2 T cell activation occurs at the plasma membrane through the involvement of BTN3A1 that is addressed by RHOB vesicles from the endosomes to the plasma membrane (18). In our model, PAg treatment of PC9 cells is not sufficient to trigger an increase in RHOB activation but requires the contact with V γ 9V δ 2 T cells, as untreated conditions in the presence of V γ 9V δ 2 T cells did not induce a significant increase in RHOB activity. One hypothesis of the weaker activation of RHOB in PC9 cells is that beyond the mode of recognition with T cells, the organization of endosomal RHOB-mediated signaling is not efficient for addressing

important signaling molecules such as BTN3A1 at the plasma membrane. It was reported that RHOB interacts with the intracellular domain of BTN3A1 at the plasma membrane (18). BTN3A1 was shown as essential to V γ 9V δ 2 T cell recognition but not sufficient for this process as its homologous BTN2A1, the phosphoantigens being also essential. Actually, it was recently described that BTN2A1 synergized with BTN3A1 in sensitizing PAg-exposed cells for V γ 9V δ 2 TCR-mediated responses, these two butyrophilins being key ligands that bind possibly two different domains of this TCR (30,31). As for BTN3A1, the level of expression of BTN2A1 mRNA in PC9 is very close to that in A549 (Supplemental figure 9). Thus, we can expect that these two cell lines express a similar level of BTN2A1 at their membrane, the BTN3A1 expression being equivalent (Figure 3B). Therefore, the weak activation of the V γ 9V δ 2 T cell by the PC9 cell line should not be due to the lack of BTN2A1. RHOB has not yet been shown to be associated to the intracellular B30.2 domain of the BTN2A1. Actually, it could be interesting to know if RHOB, as for BTN3A1, can be involved in the modification of the conformation of the BTN2A1. The organization of endosomal RHOB could then have an impact also on the BTN2A1. Further investigations should be pursued to evaluate whether such a mechanism is preserved in PC9. This endosomal signaling could be favored due to the genetic background of these cells, i.e. as they express an activated EGFR mutant whose expression may modify intracellular RHOB mediated trafficking. Indeed, RHOB is known to prolong endosomal signaling of EGFR following its internalization (32). RHOB is a short-lived protein that is rapidly degraded through the endo-lysosomal pathway (33) and its degradation is delayed by inhibition of its isoprenylation. Treatment with PAg, while necessary for the activation of V γ 9V δ 2 T cells, contributes to a rerouting of RHOB in late /degradation compartments that may accelerate its degradation and prevent its function in endocytic trafficking to the plasma membrane in PC9 cells.

This study demonstrates for the first time that V γ 9V δ 2 T cell activation by PAg-treated tumor cells can be variable depending on several factors such as oncogenic mutation, RHOB activity, and surface markers. Our results indicate that this response is strongly influenced by RHOB function. Therefore, the regulation of endocytic traffic by RHOB in the tumor cell could be decisive for the immune response and may explain the resistance of some tumor cells that nevertheless highly express RHOB.

Authorship Contributions

CL, SM, MM and SF performed the experiments. SF and OC performed the KO cell lines. SC, OC, JJF, GF and CL participated to the discussion of the results. MP and SC designed experiments and wrote the manuscript. MP supervised the study.

Conflicts of Interest Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zöller M. Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* (2004) 173:6767–6776. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6767
2. Poupot M, Fournié J-J. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett* (2004) 95:129–138. doi:10.1016/j.imlet.2004.06.013
3. 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) 197:163–168. doi:10.1084/jem.20021500
4. Hebbeler AM, Cairo C, Cummings JS, Pauza CD. Individual Vgamma2-Jgamma1.2+ T cells respond to both isopentenyl pyrophosphate and Daudi cell stimulation: generating tumor effectors with low molecular weight phosphoantigens. *Cancer Immunol Immunother CII* (2007) 56:819–829. doi:10.1007/s00262-006-0235-6
5. Roelofs AJ, Jauhainen M, Mönkkönen H, Rogers MJ, Mönkkönen J, Thompson K. Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol* (2009) 144:245–250. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07435.x
6. Rossi C, Gravelle P, Decaup E, Bordenave J, Poupot M, Tosolini M, Franchini D-M, Laurent C, Morin R, Lagarde J-M, et al. Boosting $\gamma\delta$ T cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by PD-1 blockade in follicular lymphoma. *Oncoimmunology* (2019) 8:1554175. doi:10.1080/2162402X.2018.1554175
7. Girard P, Charles J, Cluzel C, Degeorges E, Manches O, Plumas J, De Fraipont F, Leccia M-T, Mouret S, Chaperot L, et al. The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. *Oncoimmunology* (2019) 8:1601483. doi:10.1080/2162402X.2019.1601483
8. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96:6879–6884. doi:10.1073/pnas.96.12.6879

9. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier J-F, Scotet E, Bonneville M, Jotereau F. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol Baltim Md 1950* (2005) 175:5481–5488. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5481
10. Fournié J-J, Sicard H, Poupot M, Bezombes C, Blanc A, Romagné F, Ysebaert L, Laurent G. What lessons can be learned from $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol* (2013) 10:35–41. doi:10.1038/cmi.2012.39
11. Casetti R, Perretta G, Taglioni A, Mattei M, Colizzi V, Dieli F, D'Offizi G, Malkovsky M, Poccia F. Drug-induced expansion and differentiation of V gamma 9V delta 2 T cells in vivo: the role of exogenous IL-2. *J Immunol Baltim Md 1950* (2005) 175:1593–1598. doi:10.4049/jimmunol.175.3.1593
12. Sicard H, Ingoure S, Luciani B, Serraz C, Fournié J-J, Bonneville M, Tiollier J, Romagné F. In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol Baltim Md 1950* (2005) 175:5471–5480. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5471
13. Izumi H, Yamasaki A, Takeda K, Kodani M, Touge H, Tanaka N, Yanai M, Ueda Y, Sakamoto T, Nishii-Ito S, et al. Acute-phase reaction induced by zoledronate and its effect on prognosis of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth* (2018) 122:200–205. doi:10.1016/j.lungcan.2018.06.022
14. Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J. $\gamma\delta$ T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* (2014) 3:23–33. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.01
15. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, Pradines A, Sebti S, Favre G. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2004) 10:2742–2750. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0149
16. Calvayrac O, Pradines A, Raymond-Letron I, Rouquette I, Bousquet E, Lauwers-Cances V, Filleron T, Cadranel J, Beau-Faller M, Casanova A, et al. RhoB determines tumor aggressiveness in a murine EGFRL858R-induced adenocarcinoma model and is a potential prognostic biomarker for Lepidic lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2014) 20:6541–6550. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0506

17. Calvayrac O, Mazières J, Figarol S, Marty-Detraves C, Raymond-Letron I, Bousquet E, Farella M, Clermont-Taranchon E, Milia J, Rouquette I, et al. The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Mol Med* (2017) 9:238–250. doi:10.15252/emmm.201606646
18. Sebestyen Z, Scheper W, Vyborova A, Gu S, Rychnavska Z, Schiffler M, Cleven A, Chéneau C, van Noorden M, Peigné C-M, et al. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by V γ 9V δ 2 T Cell Receptor. *Cell Rep* (2016) 15:1973–1985. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.081
19. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné C-M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, Li J, Kuball J, Adams EJ, Netzer S, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood* (2012) 120:2269–2279. doi:10.1182/blood-2012-05-430470
20. Koraïchi F, Gence R, Bouchenot C, Grosjean S, Lajoie-Mazenc I, Favre G, Cabantous S. High-content tripartite split-GFP cell-based assays to screen for modulators of small GTPase activation. *J Cell Sci* (2018) 131: doi:10.1242/jcs.210419
21. Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics MCP* (2008) 7:282–289. doi:10.1074/mcp.M700342-MCP200
22. Cabantous S, Nguyen HB, Pedelacq J-D, Koraïchi F, Chaudhary A, Ganguly K, Lockard MA, Favre G, Terwilliger TC, Waldo GS. A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci Rep* (2013) 3:2854. doi:10.1038/srep02854
23. Sharma A, Lawry SM, Klein BS, Wang X, Sherer NM, Zumwalde NA, Gumperz JE. LFA-1 Ligation by High-Density ICAM-1 Is Sufficient To Activate IFN- γ Release by Innate T Lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* (2018) 201:2452–2461. doi:10.4049/jimmunol.1800537
24. Liu Z, Guo B, Lopez RD. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 or ICAM-2 is critical in determining sensitivity of pancreatic cancer cells to cytolysis by human gammadelta-T cells: implications in the design of gammadelta-T-cell-based immunotherapies for pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* (2009) 24:900–911. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05668.x

25. Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol Baltim Md* 1950 (2000) 165:3375–3383. doi:10.4049/jimmunol.165.6.3375
26. Wherlock M, Gampel A, Futter C, Mellor H. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J Cell Sci* (2004) 117:3221–3231. doi:10.1242/jcs.01193
27. Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, Akira S, Iwamatsu A, Koga H, Murakami M, et al. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J* (2006) 25:4108–4119. doi:10.1038/sj.emboj.7601286
28. Ocana-Morgner C, Wahren C, Jessberger R. SWAP-70 regulates RhoA/RhoB-dependent MHCII surface localization in dendritic cells. *Blood* (2009) 113:1474–1482. doi:10.1182/blood-2008-04-152587
29. Liu S, Huang L, Lin Z, Hu Y, Chen R, Wang L, Shan Y. RhoB induces the production of proinflammatory cytokines in TLR-triggered macrophages. *Mol Immunol* (2017) 87:200–206. doi:10.1016/j.molimm.2017.04.015
30. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, McWilliam HEG, Hudson C, Tutuka C, Wheatley AK, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells. *Science* (2020) 367: doi:10.1126/science.aay5516
31. Karunakaran MM, Willcox CR, Salim M, Paletta D, Fichtner AS, Noll A, Starick L, Nöhren A, Begley CR, Berwick KA, et al. Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity* (2020) 52:487–498.e6. doi:10.1016/j.immuni.2020.02.014
32. Gampel A, Parker PJ, Mellor H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol CB* (1999) 9:955–958. doi:10.1016/s0960-9822(99)80422-9
33. Pérez-Sala D, Boya P, Ramos I, Herrera M, Stamatakis K. The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS One* (2009) 4:e8117. doi:10.1371/journal.pone.0008117

Figure Legend:

Figure 1: PAg-treated NSCLC cell lines activate V γ 9V δ 2 T cells in a contact dependent manner.

Flow cytometry analysis of the IFN- γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture for 4h with four different NSCLC cell lines without pretreatment (A) or with zoledronate (red dots) or BrHPP (blue dots) pretreatment (B, n > 4 independent experiments), with Transwell system or tumor cell lines conditioned medium in case of A549 and PC9 as target (C). Flow cytometry analysis of the trogocytosis of the PKH67+ PAg-treated A549 cell line by the V γ 9V δ 2 T cells after 5 min or 4h of co-culture, ie PKH67 expression by the V γ 9V δ 2 T cells (D). Measure by flow cytometry of the 7-AAD positive PAg-treated-A549 (E) or -PC9 (F) after co-culture with V γ 9V δ 2 T cells for 4h.

Figure 2: V γ 9V δ 2 T cells activation by PAg-treated-A549 or -PC9 is dependent on different adhesion molecules.

Flow cytometry analysis of the expression of surface markers (black) by PC9 and A549 cell lines (A) or by the V γ 9V δ 2 T cells (B) compared to the respective isotypic control (grey). CD107a expression by the V γ 9V δ 2 T cells after 4h of co-culture with zoledronate-treated A549 (C, red) or BrHPP-treated A549 (C, blue) or with zoledronate-treated PC9 (D, red) or BrHPP-treated PC9 (D, blue) in the presence of different blocking antibodies normalized to the control condition (CTL) without blocking antibody.

Figure 3: PAg-treated A549/PC9 cell lines activating V γ 9V δ 2 T cells is BTN3A1 dependent.

A. mRNA expression of the BTN3A1 by A549 and PC9 cell lines among cancer cell lines in the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). B. Flow cytometry analysis of the BTN3A1 expression by A549 and PC9 pre-treated or not (black) by zoledronate (red) or BrHPP (blue) and compared to the isotypic control (grey). C-F. Flow cytometry analysis of the IFN- γ , CD107a and CD69 expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture for 4h with A549 (C and D: six independent experiments) or PC9 (E and F: six

independent experiments) without pretreatment (black) or with zoledronate (red) or BrHPP (blue) pretreatment.

Figure 4: Decrease of the V γ 9V δ 2 T cells activation by A549 with RHOB knock down.

Flow cytometry analysis of the IFN- γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture for 4h with A549 wild type (WT) or knock down for RHOB (KO) with zoledronate (red) or BrHPP (blue) pretreatment (A: one representative experiment, B: n > 10 independent experiments). C. Flow cytometry analysis of the trogocytosis of the PKH67+ PAg-pretreated-A549 cell line WT or KO by the V γ 9V δ 2 T cells (ratio of the V γ 9V δ 2 T cells expressing PKH67 4h / 5 min). D. Flow cytometry analysis of the 7AAD expression by the WT or KO A549 cell line PAg-treated (zoledronate: red, BrHPP: blue) or not (black) in co-culture for 4h with the V γ 9V δ 2 T cells. E. CD107a expression by the V γ 9V δ 2 T cells analyzed by flow cytometry after 4h of contact with PAg-pretreated A549 in the presence or not of the CT04 inhibitor (D: one representative experiment, E: n > 4 independent experiments).

Figure 5: Membrane localization of RHOB favored in A549 cells in contact with V γ 9V δ 2 T cells.

A. A549 and PC9 cells were engineered to stably express RHOB GTPase and monitor active RHOB using a split GFP system. Induction by Doxycycline of the tripartite split-GFP system in A549 and PC9, with or without (UT) pretreatment with zoledronate (zol) or BrHPP, and co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells. Active RHOB (green fluorescence) was visualized by confocal microscopy (B) and quantified by Operetta (C: zoledronate: red; BrHPP: blue). D. Percentage of endosomal (hatched bars) or membrane (full bars) active RHOB quantified by confocal microscopy in A549 and PC9 cell lines PAg-treated (zoledronate: red, BrHPP: blue) or not (black) co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells. E,F. Confocal microscopy of total (red) and active (green) RHOB in PC9 cell line after PAg-treatment (zoledronate: red, BrHPP: blue) or not (black) and co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells (E: representative images; F: % of PC9 presenting endosomal clusters based on 3 independent experiments among 30 cells).

Figure 6: Rerouting of RHOB in endosomal clusters in PAg-treated PC9 cells in contact with V γ 9V δ 2 T cells.

Co-localization analysis by confocal microscopy of active RHOB (green), Rab7 (red) for late endosome/MVB marker and LAMP-1 (pink) as lysosomal marker, in PC9 cells pre-treated or not (UT) with zoledronate (zol) or BrHPP, and co-cultured (lower) or not (upper) with V γ 9V δ 2 T cells (representative image, crop on the key zone and plot profile analysis beside).

Figure 1

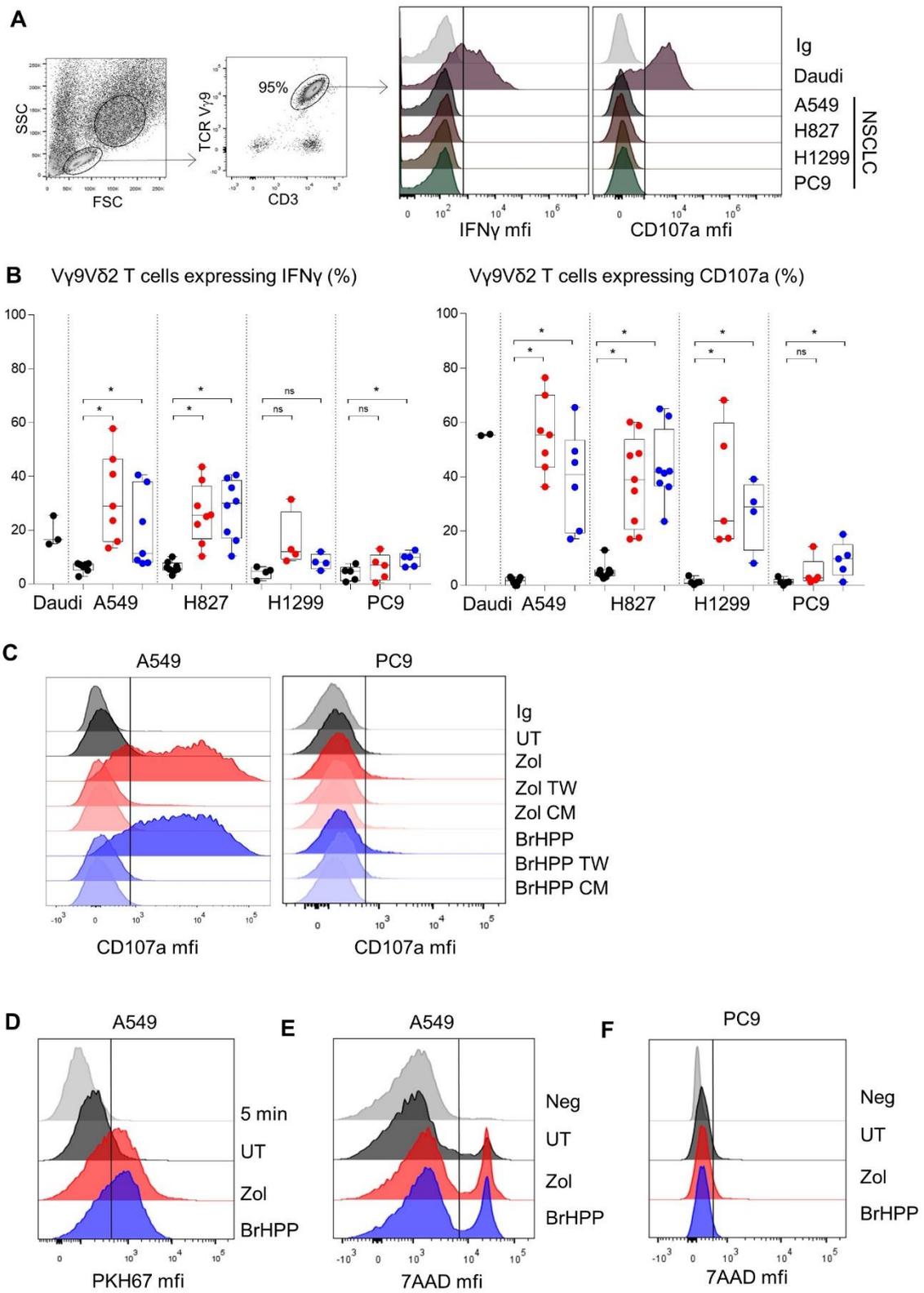


Figure 2

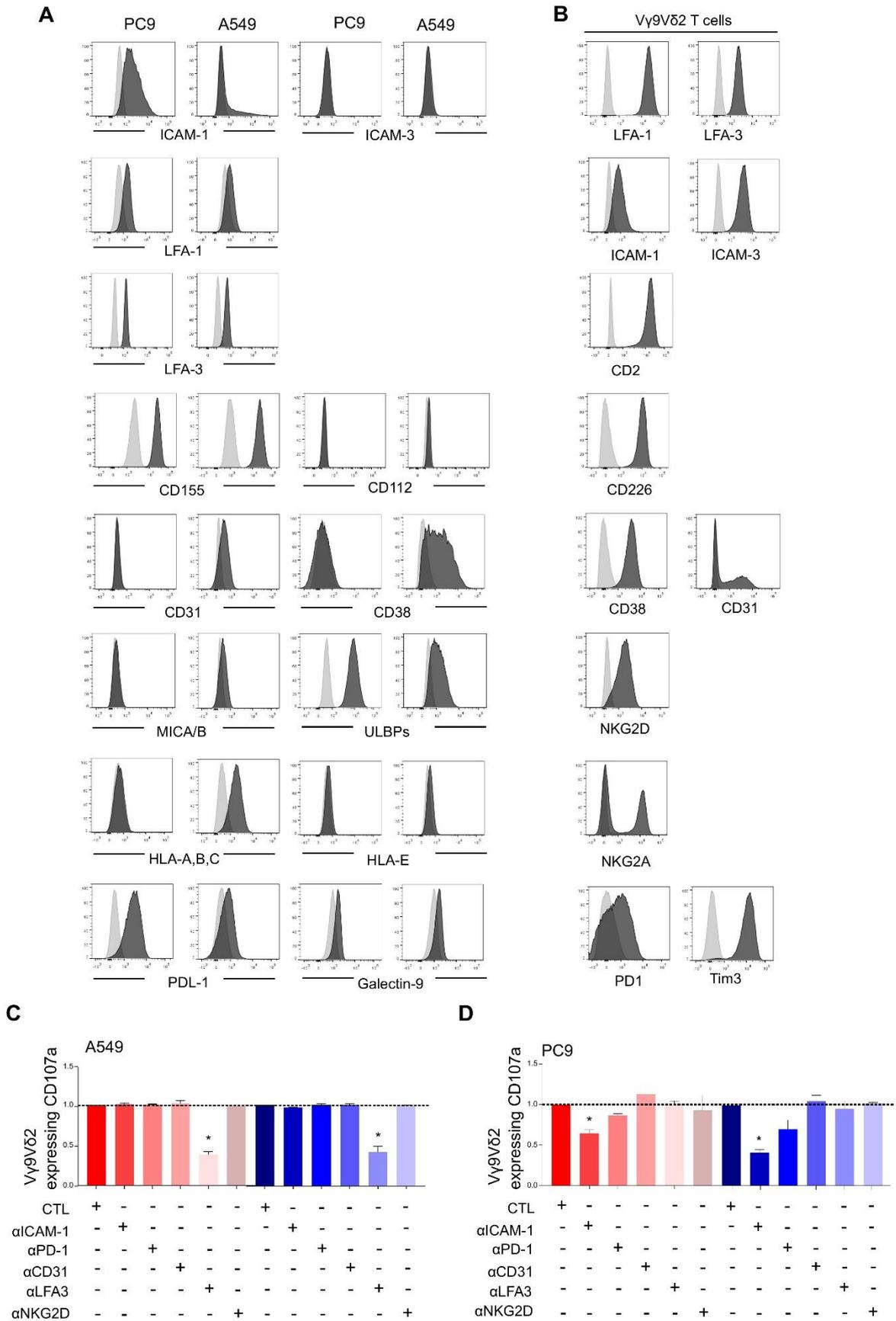


Figure 3

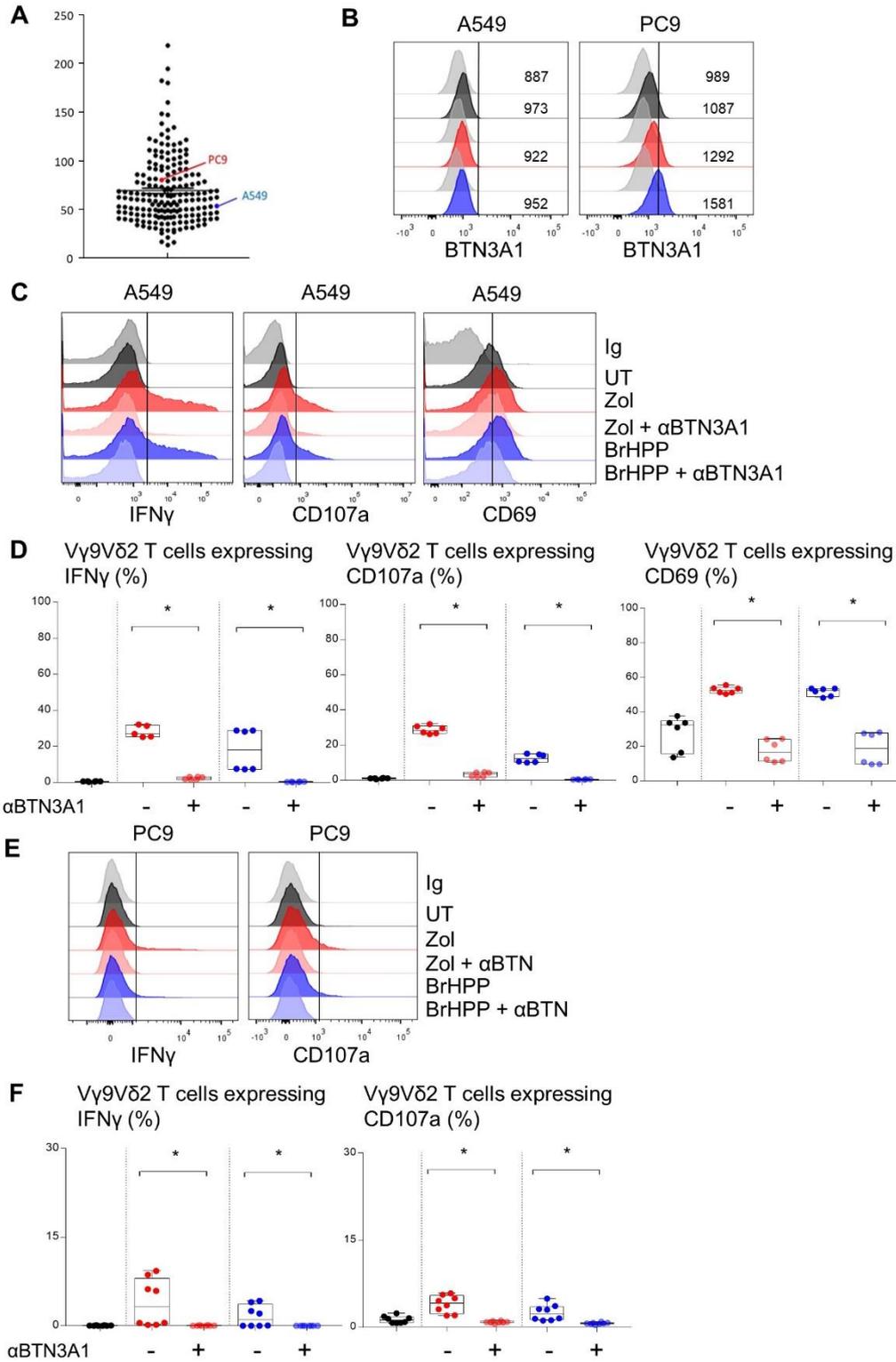


Figure 4

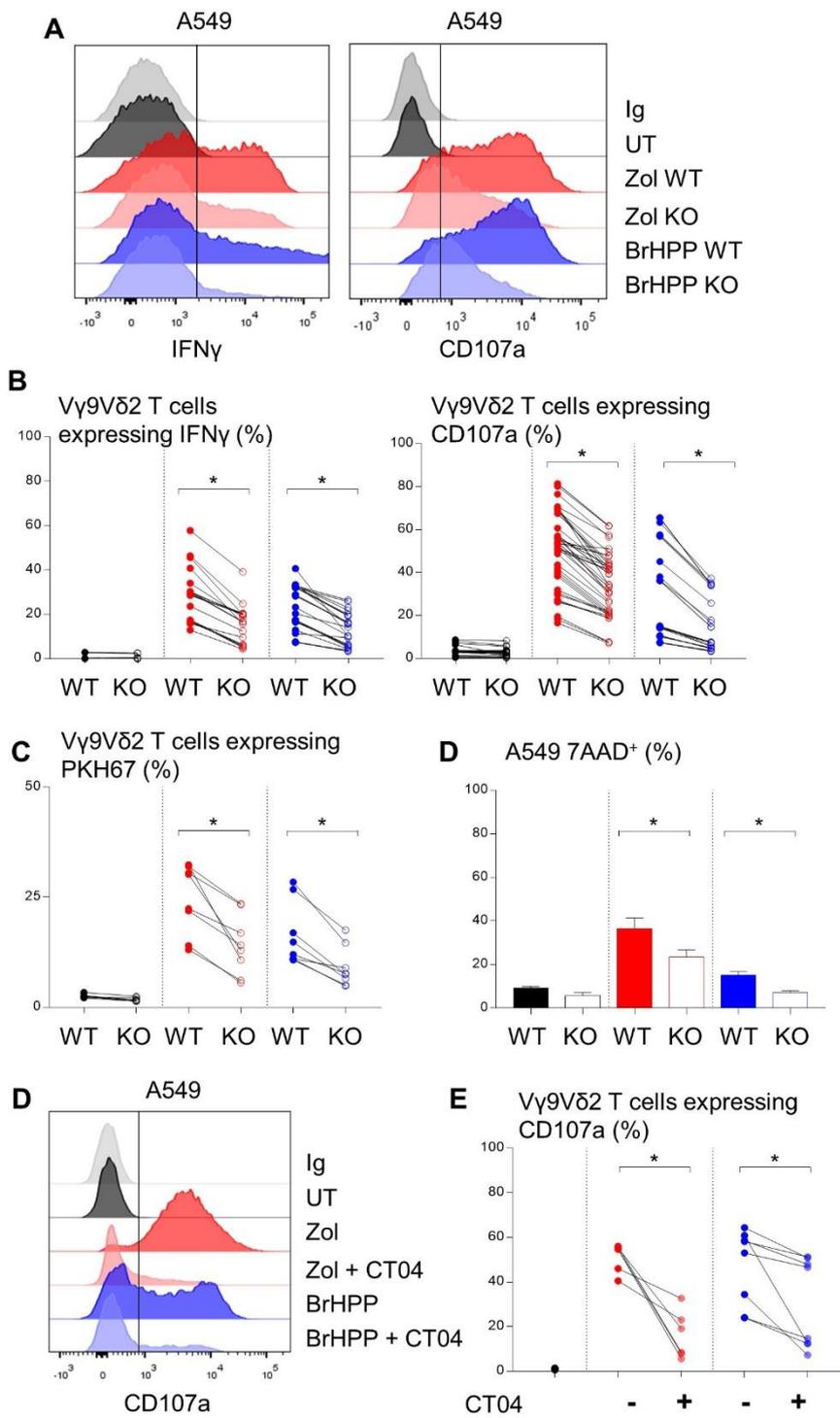


Figure 5

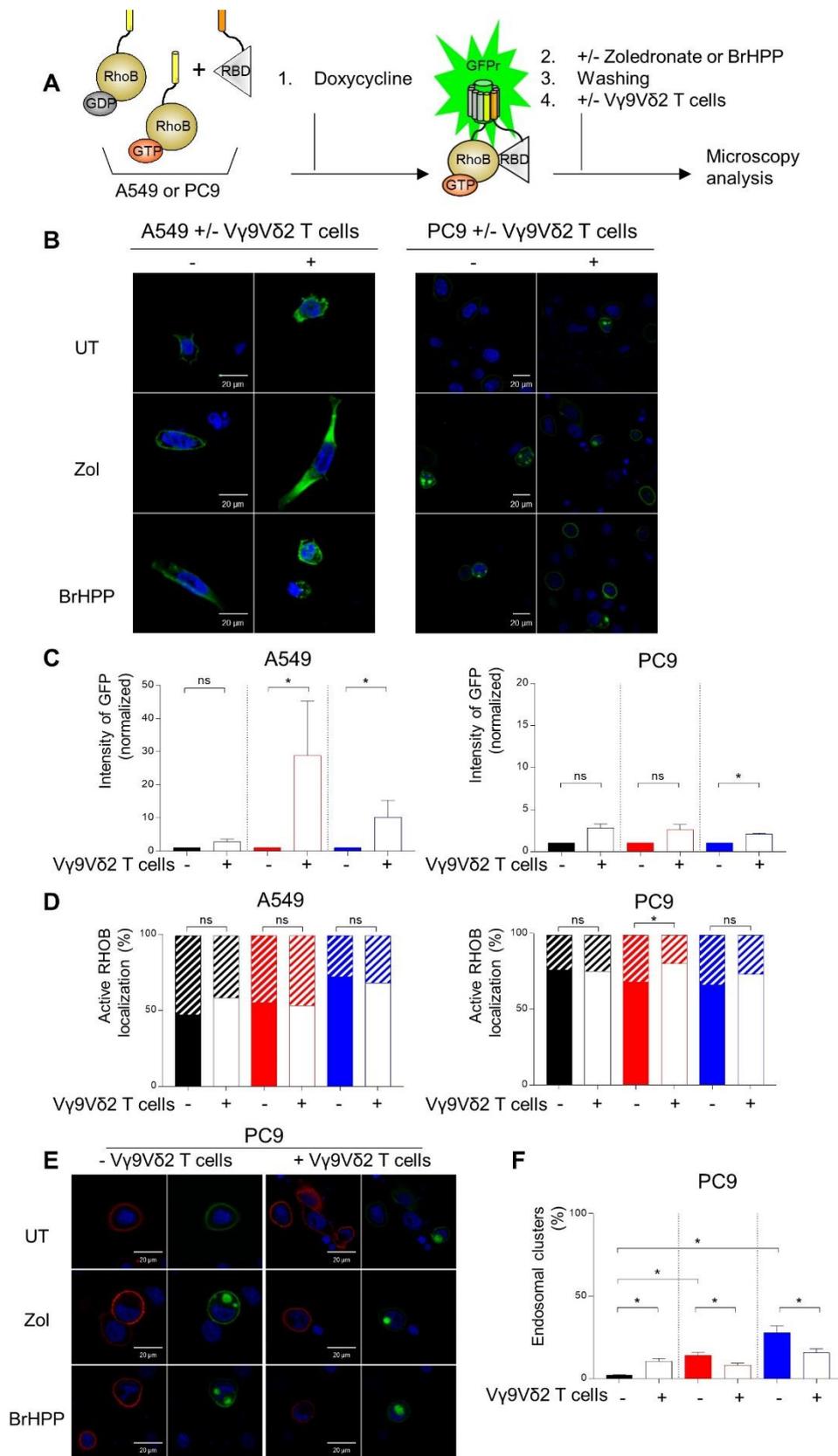
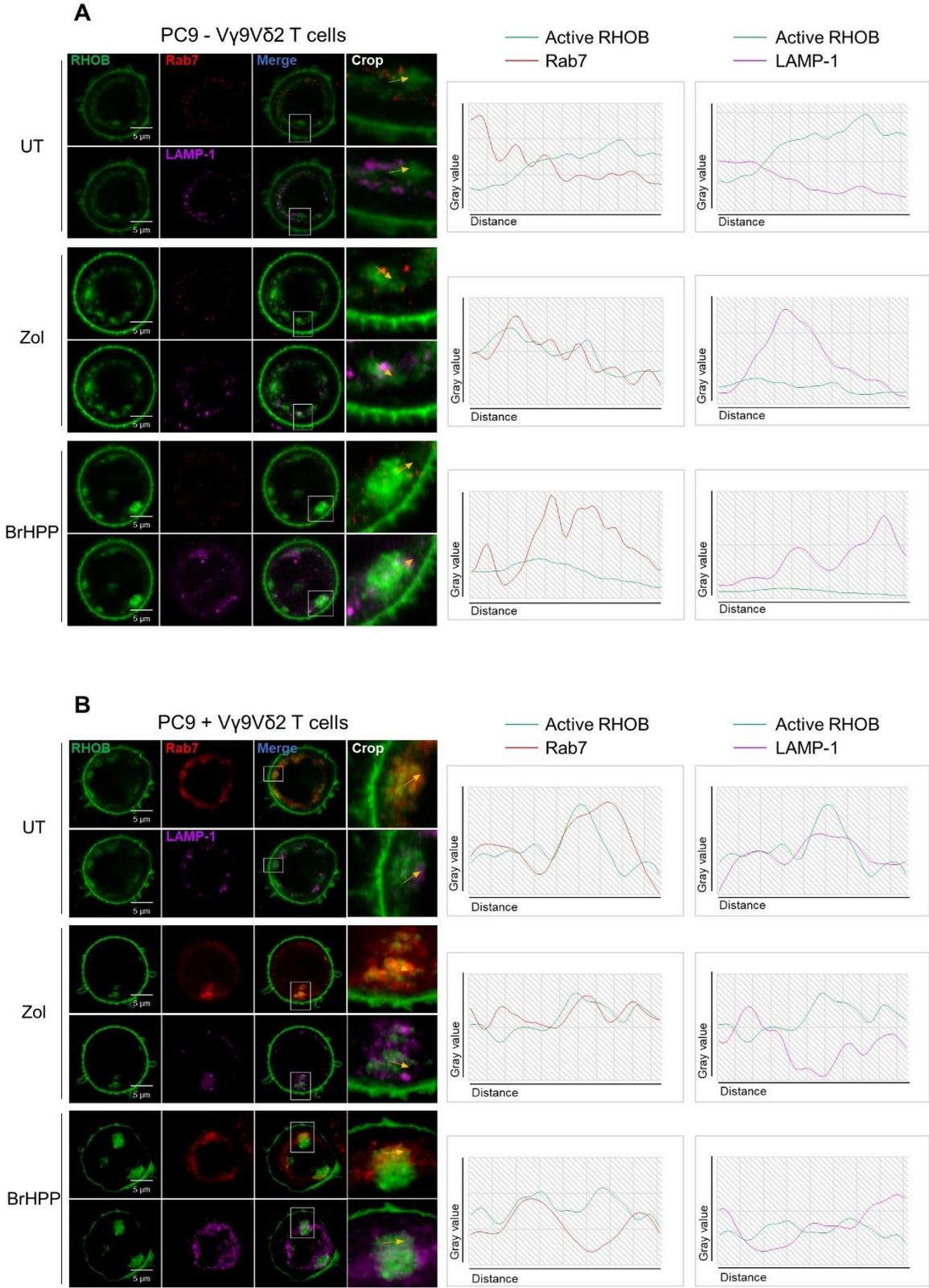
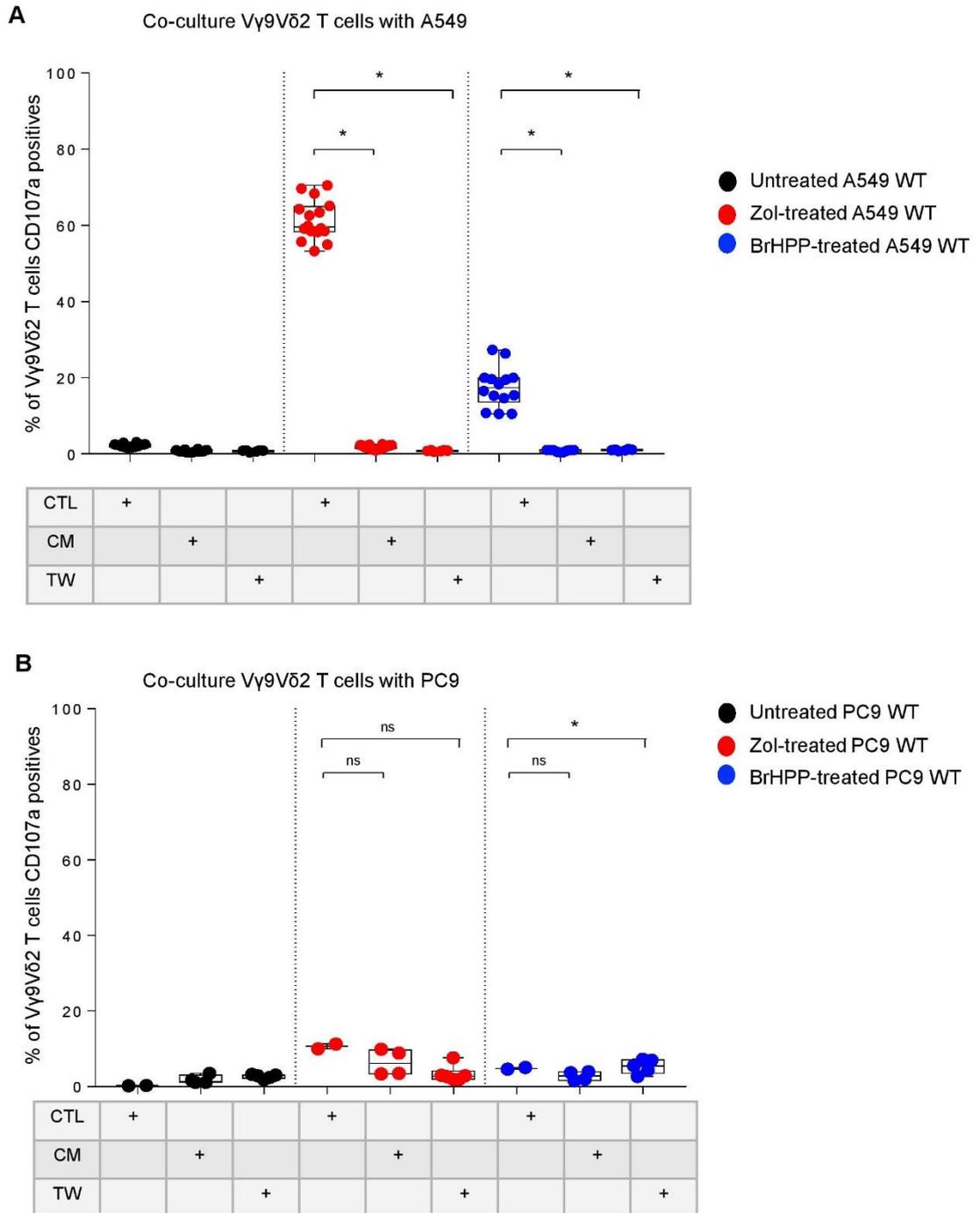


Figure 6



Supplemental figures

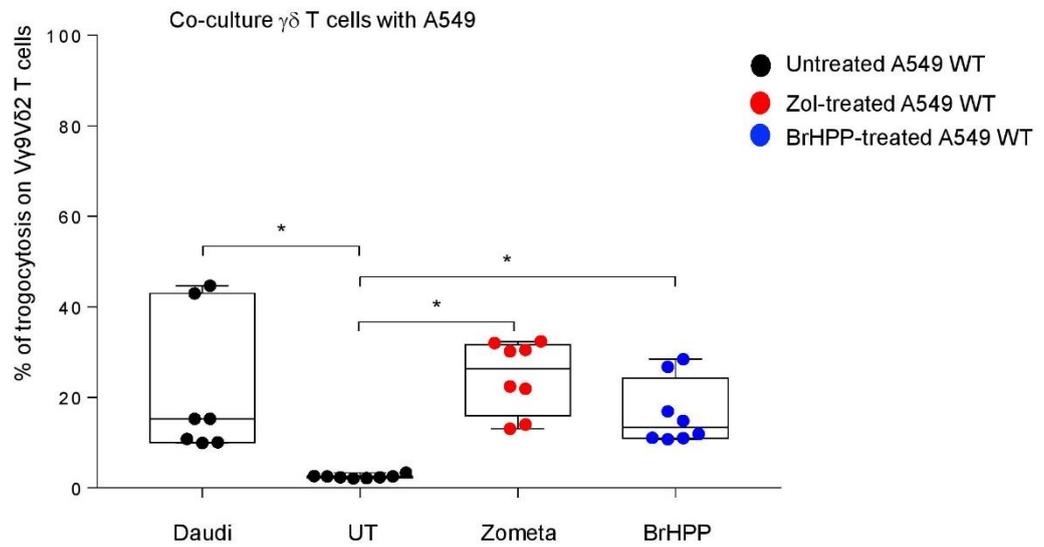
Figure S1



Percentage of V γ 9V δ 2 T cells expressing CD107a, analyzed by flow cytometry after 4h of contact with PAg-pretreated A549 (A) or PC9 (B) in the presence of a Transwell system (TW) or not (CTL) or in the presence of the conditioned medium of these PAg-treated cells lines (CM) (n > 4 independent experiments).

Supplemental figures

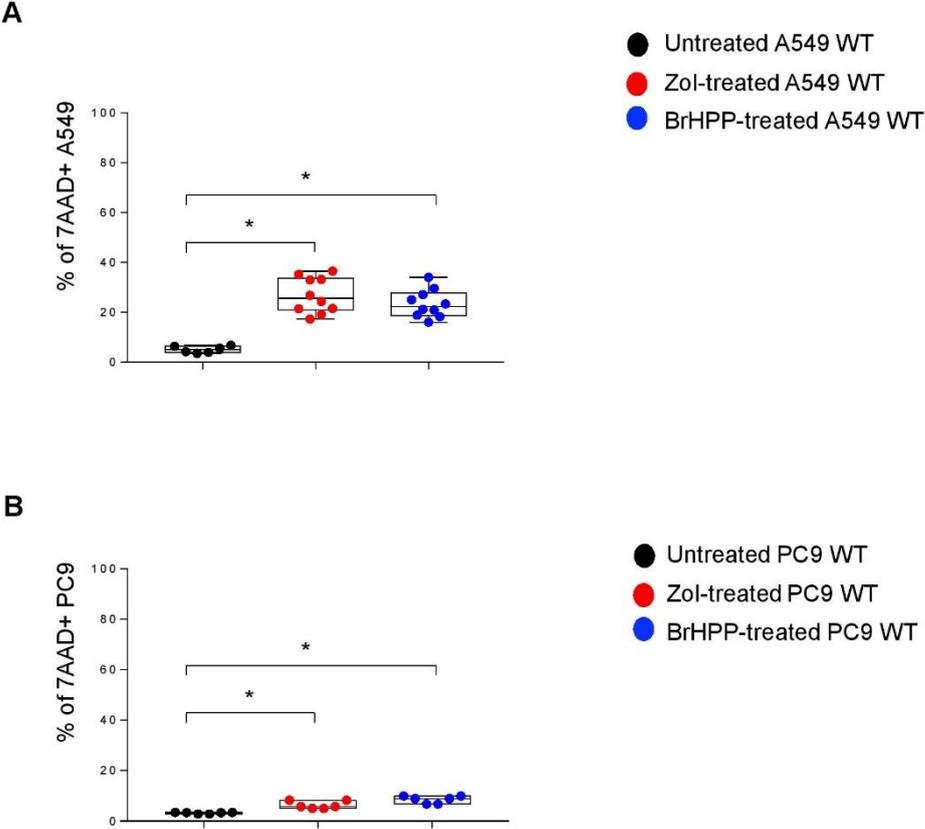
Figure S2



Percentage of V γ 9V δ 2 T cells expressing PKH67 (trogocytosis), analyzed by flow cytometry, after a co-culture with beforehand PKH67 stained Daudi or A549 pretreated or not (UT) by zoledronate (red dots) or BrHPP (blue dots) (n > 4 independent experiments).

Supplemental figures

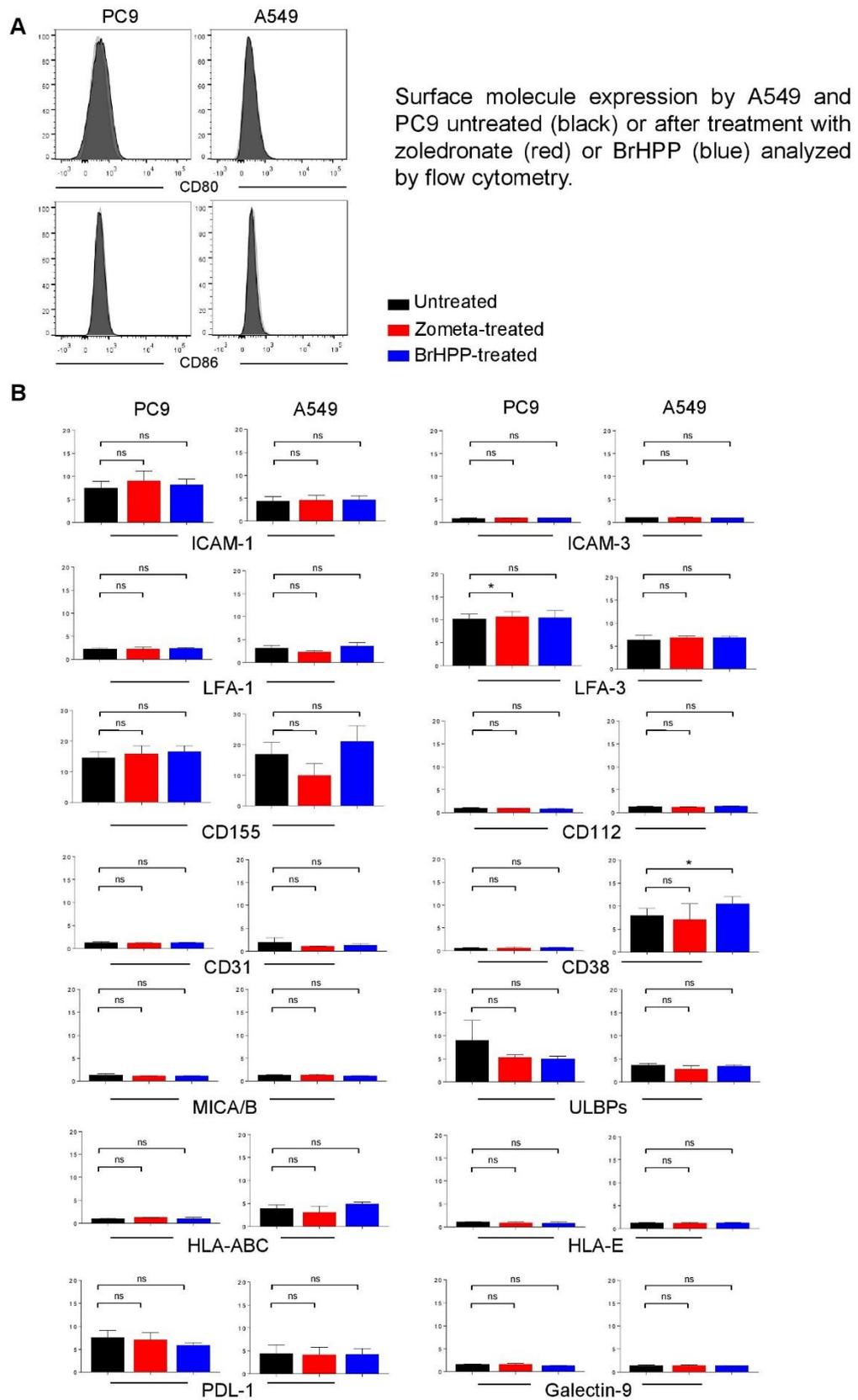
Figure S3



Percentage of A549 (A) or PC9 (B) pretreated or not (black dots) by zoledronate (red dots) or BrHPP (blue dots) expressing 7-AAD, after a co-culture with Vγ9Vδ2 T cells (flow cytometry analysis). (n > 4 independent experiments).

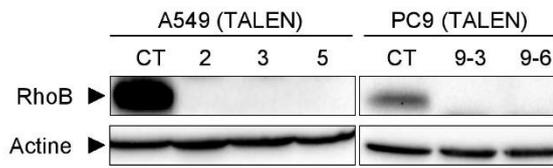
Supplemental figures

Figure S4



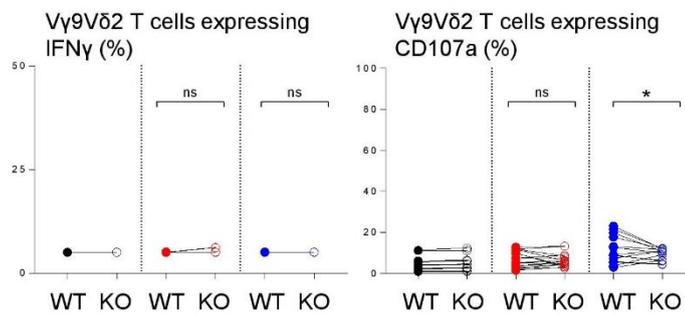
Supplemental figures

Figure S5



Western blot of A549 and PC9 wild type (CT) or KO for RHOB (2, 3, 5, 9-3, 9-6).

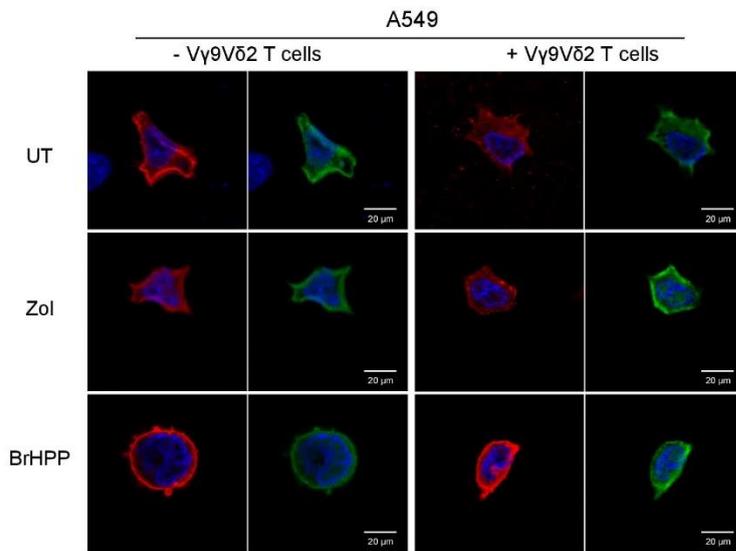
Figure S6



Flow cytometry analysis of the IFN γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture for 4h with PC9 wild type (WT) or knock down for RHOB (KO) with Zoledronate (red) or BrHPP (blue) pretreatment.

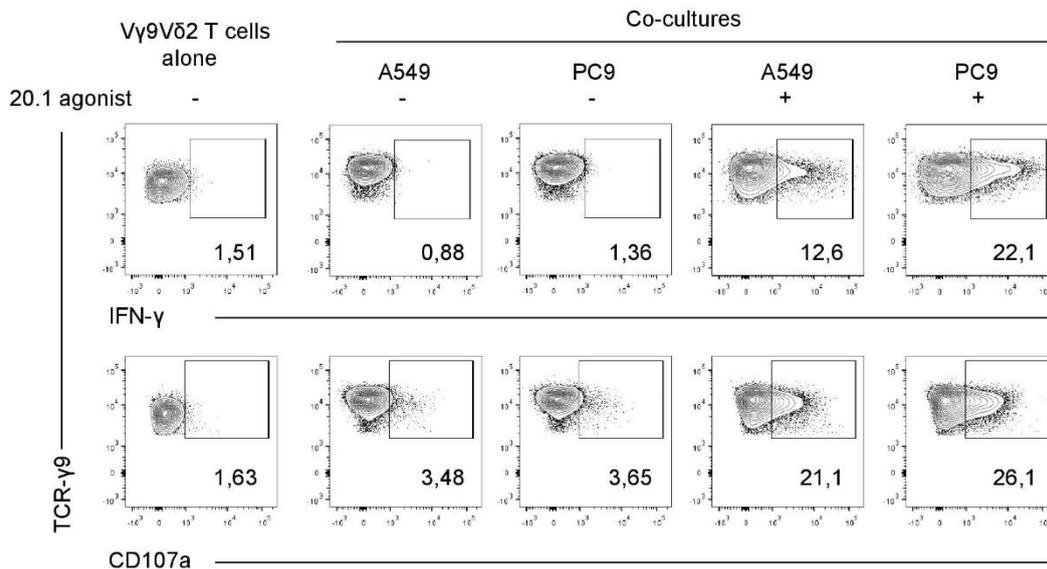
Supplemental figures

Figure S7



Confocal imaging of total (red) and active (green) RHOB localization in A549 pre-treated or not by zoledronate (5 μ M, overnight) or BrHPP (1 μ M, 4h), in presence or not of V γ 9V δ 2 T cells (one representative image).

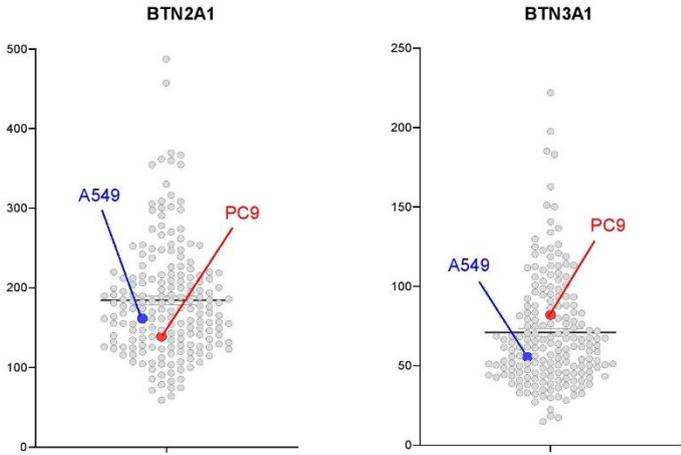
Figure S8



Percentage of V γ 9V δ 2 T cells expressing IFN- γ and CD107a, analyzed by flow cytometry, after co-culture for 4h with A549 or PC9 pretreated or not by the 20.1 BTN3A1 agonist.

Supplemental figures

Figure S9



mRNA expression of BTN2A1 compared to BTN3A1 in A549 (blue) and PC9 (red) from Cancer Cell Line Encyclopedia.

III. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que certaines lignées NSCLC pré-traitées par des PAgS solubles (BrHPP) ou par le zoledronate entraînant l'accumulation de PAgS endogènes vont être capables, dans des proportions variables, d'activer les LT V γ 9V δ 2 et d'induire une cytotoxicité. En effet, nous avons montré que les A549 pré-traitées aux phosphoantigènes sont bien reconnues et tuées par les LT V γ 9V δ 2 en comparaison aux PC9, qui sont très peu sensibilisantes. Ces deux lignées présentent des profils d'expression de molécules de surface divergents mais qui ne permettent pas d'expliquer les différences de réactivité des LT V γ 9V δ 2. De plus, les BTN2A1 et BTN3A1 sont présentes dans des niveaux similaires entre les PC9 et A549, ce qui permet de réfuter l'hypothèse d'un niveau d'expression plus faible de ces BTN chez les PC9 par rapport aux A549. Cette étude montre que RhoB permet de moduler la réactivité des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS dans les deux lignées testées. De façon intéressante, ces travaux ont permis d'observer que la résistance des PC9 à la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 était liée à un détournement de RhoB dans les compartiments d'endosomes tardifs et de dégradation. Par conséquent, la séquestration de RhoB dans ces compartiments altère sa fonction initiale dans ce mécanisme, empêchant alors de modifier la conformation de la BTN3A1 pour activer les LT V γ 9V δ 2.

DISCUSSION

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont des lymphocytes T non conventionnels qui présentent une hétérogénéité structurelle et fonctionnelle. Ils forment un pont entre l'immunité innée et adaptative et participent à différents types de réponses immunitaires. Ces lymphocytes expriment certains récepteurs communs aux cellules NK tels que NKG2D. De plus, ils présentent une forte activité cytotoxique, via le système granzyme-perforine, et par le mécanisme d'ADCC possible grâce à l'expression du CD16. D'autre part, les LT V γ 9V δ 2 produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ ou le TNF- α , et peuvent également primer des cellules T au niveau du site tumoral comme les cellules présentatrices d'antigènes. Différentes études ont montré que les LT V γ 9V δ 2 sont capables de tuer un large panel de cellules tumorales provenant de cancers solides et hématologiques. Ainsi, leur infiltration dans les tumeurs est un marqueur pronostic positif dans différentes pathologies malignes. Enfin, l'utilisation en clinique des LT V γ 9V δ 2 présente une bonne sécurité mais une efficacité limitée suite à l'apparition rapide du phénomène d'anergie des lymphocytes.

Le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les cibles tumorales est un processus complexe, dans lequel certaines zones d'ombres subsistent. Après l'identification des antigènes reconnus par les LT V γ 9V δ 2, appelés PAg, dans les années 1990 ⁽²⁹⁵⁾, différentes études ont permis de comprendre les étapes et les intermédiaires de ce processus. Comme pour les LT conventionnels, le TCR des LT V γ 9V δ 2 est impliqué dans leur activation. De plus, les protéines de la famille des BTN3A, et particulièrement la BTN3A1, ont été identifiées comme étant des molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des LT V γ 9V δ 2. Grâce aux récentes publications ayant identifié la BTN2A1 comme un nouvel acteur essentiel au mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2, une nouvelle étape dans la compréhension du mécanisme est franchie ^(161–163). Ces études ont permis d'établir plus finement la séquence chronologique d'activation des LT V γ 9V δ 2. Ainsi, le TCR V γ 9V δ 2 est uniquement critique lors de l'initiation de la conjugaison des LT V γ 9V δ 2 avec la cible, correspondant au signal initial pour l'activation des LT et de maintenir une forte densité de la synapse immunologique. Ce phénomène d'initiation n'est pas dépendant du PAg. En revanche, la BTN3A1 opère comme un ligand de co-stimulation indispensable, fonctionnant comme un signal secondaire, permettant de stabiliser le conjugué et la formation de la synapse. Ce phénomène est dépendant du PAg mais pas de la présence du TCR V γ 9V δ 2.

Dans une des dernières études, il a été montré que le traitement par PAg n'induit pas de modification de clusturation de la BTN3A ⁽¹⁶³⁾. Cependant, les chercheurs ont observé une augmentation de l'expression de la BTN3A dans la région de contact avec le LT. Le traitement des cibles par le Pamidronate va entraîner une diminution de la mobilité de la membrane de

Discussion

la BTN3A qui pourrait faciliter la formation de clusters hétérogènes, incluant la BTN3A et le ligand du TCR V γ 9V δ 2, permettant aux deux molécules d'interagir avec des récepteurs au sein de la synapse immunologique. Parmi les candidats potentiels de partenaires à la BTN3A, le récepteur Lymphotoxin- β est encore en cours d'investigation ⁽²⁹⁶⁾.

Parmi les autres acteurs impliqués dans le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2, la protéine RhoB a été identifiée en 2016 par l'équipe du Dr. Z. Sebestyen. Cette étude a montré que RhoB permettait de modifier la conformation de la BTN3A1 afin d'entraîner l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS endogènes dans les cancers hématologiques.

Nos résultats présentés dans ce manuscrit permettent de confirmer l'implication de cette protéine dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS endogènes, et nouvellement par les PAgS solubles, grâce à un modèle de cancer solide du poumon non à petites cellules (NSCLC) ⁽²⁹²⁾. Nos travaux ont démontré que RhoB était un acteur clé dans le processus d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes. La localisation de la protéine RhoB dans la cible tumorale lors de sa rencontre avec le LT V γ 9V δ 2 est primordiale pour permettre d'exercer son action dans la modification de la conformation extracellulaire des BTN3A. En effet, dans la lignée NSCLC PC9, qui n'active pas les LT V γ 9V δ 2 malgré le traitement par des PAgS, RhoB a une localisation particulièrement endosomale, notamment au niveau des MVB, rendant la protéine peu accessible pour effectuer son rôle de modification de la conformation de la BTN3A1 afin de permettre l'activation des LT V γ 9V δ 2. De plus, la capacité de la cellule cible à utiliser les pools de stockage intracellulaires de la BTN3A pourraient être finement lié à sa capacité à activer RhoB. Ainsi, la protéine RhoB se situe à la fin du processus, au niveau de la membrane et induit des changements dans la mobilité membranaire et la conformation de la BTN3A.

La protéine RhoB est grandement impliquée dans le processus d'activation des LT V γ 9V δ 2. En effet, nous avons obtenus des résultats complémentaires non publiés, qui ont montré une absence de modulation de l'expression des BTN2A1 et BTN3A1 à la surface des lignées NSCLC A549 et PC9 suite au traitement par les PAgS. Ainsi, ces résultats permettent d'exclure que les différences de profils d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les A549 et PC9 traitées par les PAgS observées dans notre étude était en fait la conséquence d'une expression altérée des BTN à la surface des lignées PC9 non activatrices des LT V γ 9V δ 2. Ces résultats confortent ainsi l'hypothèse d'une forte implication de RhoB, et notamment de par sa localisation, dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 analysée lors de notre étude.

Discussion

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'enrichissement juxta-membranaire de RhoB pourrait être un paramètre d'étude intéressant afin de prédire la susceptibilité des cellules tumorales à des thérapies utilisant les LT V γ 9V δ 2. Cependant ces prédictions ne peuvent pas être basées uniquement sur ce critère puisque la cible tumorale Daudi ne présente pas un enrichissement juxta-membranaire de RhoB. Ainsi, ce mécanisme n'explique qu'en partie le processus de reconnaissance de la cible par les LT V γ 9V δ 2.

Outre le fait que la prise en compte de la localisation de RhoB pourrait représenter un facteur prédictif de réponse aux immunothérapies par les LT V γ 9V δ 2, ce paramètre pourrait également être un facteur pronostic global intéressant chez les patients. En effet, nous pourrions émettre l'hypothèse que les patients présentant des tumeurs où RhoB est très membranaire pourraient présenter une survie globale plus favorable que les patients porteurs de tumeurs où RhoB est très endosomal. Ainsi, il serait intéressant d'inclure ce paramètre lors de la conduction des essais thérapeutiques utilisant les LT V γ 9V δ 2 pour voir s'il existe une corrélation entre la localisation de RhoB et la survie globale du patient.

BIBLIOGRAPHIE

1. Steinman RM. The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* avr 1991;9(1):271-96.
2. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* mars 2002;2(3):151-61.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* oct 2004;5(10):987-95.
4. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* avr 2008;8(4):279-89.
5. Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM. The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation. *J Exp Med.* 21 juin 2004;199(12):1607-18.
6. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature.* janv 2015;517(7534):293-301.
7. Chiossone L, Dumas P-Y, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* nov 2018;18(11):671-88.
8. Ogasawara K, Lanier LL. NKG2D in NK and T Cell-Mediated Immunity. *J Clin Immunol.* nov 2005;25(6):534-40.
9. Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. Two Human ULBP/RAET1 Molecules with Transmembrane Regions Are Ligands for NKG2D. *J Immunol.* 15 juill 2004;173(2):1078-84.
10. Bauer S. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science.* 30 juill 1999;285(5428):727-9.
11. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* 1 nov 1992;176(5):1387-98.
12. Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, et al. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol.* sept 2005;6(9):928-37.
13. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest.* 1 sept 2011;121(9):3609-22.
14. Croxatto D, Martini S, Chiossone L, Scordamaglia F, Simonassi CF, Moretta L, et al. IL15 induces a potent antitumor activity in NK cells isolated from malignant pleural effusions and overcomes the inhibitory effect of pleural fluid. *Oncol Immunology.* 3 avr 2017;6(4):e1293210.

Bibliographie

15. Bertone S, Schiavetti F, Bellomo R, Vitale C, Ponte M, Moretta L, et al. Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1999;29(1):23-9.
16. Ruggeri L. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science.* 15 mars 2002;295(5562):2097-100.
17. Benson DM, Hofmeister CC, Padmanabhan S, Suvannasankha A, Jagannath S, Abonour R, et al. A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood.* 22 nov 2012;120(22):4324-33.
18. Vey N, Bourhis J-H, Boissel N, Bordessoule D, Prebet T, Charbonnier A, et al. A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood.* 22 nov 2012;120(22):4317-23.
19. Poggi A, Zocchi MR. Cyclosporin A regulates human NK cell apoptosis induced by soluble HLA-I or by target cells. *Autoimmun Rev.* nov 2005;4(8):532-6.
20. Lugli E, Marcenaro E, Mavilio D. NK Cell Subset Redistribution during the Course of Viral Infections. *Front Immunol [Internet].* 14 août 2014 [cité 3 juin 2020];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00390/abstract>
21. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med.* 6 juill 2009;206(7):1495-503.
22. Pesce S, Tabellini G, Cantoni C, Patrizi O, Coltrini D, Rampinelli F, et al. B7-H6-mediated downregulation of NKp30 in NK cells contributes to ovarian carcinoma immune escape. *Oncol Immunology.* 3 avr 2015;4(4):e1001224.
23. Arnon TI, Markel G, Mandelboim O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin Cancer Biol.* oct 2006;16(5):348-58.
24. Thorén FB, Riise RE, Ousbäck J, Della Chiesa M, Alsterholm M, Marcenaro E, et al. Human NK Cells Induce Neutrophil Apoptosis via an NKp46- and Fas-Dependent Mechanism. *J Immunol.* 15 févr 2012;188(4):1668-74.
25. Pesce S, Thoren FB, Cantoni C, Prato C, Moretta L, Moretta A, et al. The Innate Immune Cross Talk between NK Cells and Eosinophils Is Regulated by the Interaction of Natural Cytotoxicity Receptors with Eosinophil Surface Ligands. *Front Immunol.* 28 avr 2017;8:510.
26. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J Exp Med.* 18 août 2003;198(4):557-67.
27. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes. *Immunity.* juin 1996;4(6):573-81.
28. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol.* avr 2015;15(4):243-54.

Bibliographie

29. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci.* 17 sept 2002;99(19):12293-7.
30. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2017;139(1):335-346.e3.
31. Zeh HJ, Hurd S, Storkus WJ, Lotze MT. Interleukin-12 Promotes the Proliferation and Cytolytic Maturation of Immune Effectors: Implications for the Immunotherapy of Cancer. *J Immunother.* août 1993;14(2):155-61.
32. Waldmann TA. Interleukin-15 in the treatment of cancer. *Expert Rev Clin Immunol.* déc 2014;10(12):1689-701.
33. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Brees H, Cabeza-Cabrero M, Sammicheli S, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell.* févr 2018;172(5):1022-1037.e14.
34. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol.* juin 2015;15(6):388-400.
35. Krzewski K, Gil-Krzewska A, Nguyen V, Peruzzi G, Coligan JE. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood.* 6 juin 2013;121(23):4672-83.
36. Wallin RPA, Screpanti V, Michaëlsson J, Grandien A, Ljunggren H-G. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* oct 2003;33(10):2727-35.
37. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* févr 2005;42(4):501-10.
38. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* juill 2018;19(7):723-32.
39. Schantz SP, Savage HE, Racz T, Taylor DL, Sacks PG. Natural killer cells and metastases from pharyngeal carcinoma. *Am J Surg.* oct 1989;158(4):361-6.
40. Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, et al. Natural killer cells infiltrating human non-small-cell lung cancer are enriched in CD56^{bright}CD16⁻ cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer.* 15 févr 2008;112(4):863-75.
41. Weigelin B, Krause M, Friedl P. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol Lett.* juill 2011;138(1):19-21.
42. Neeffjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* déc 2011;11(12):823-36.
43. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev.* avr 2008;222(1):129-44.

Bibliographie

44. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. févr 2003;421(6925):852-6.
45. Shedlock DJ. Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory. *Science*. 11 avr 2003;300(5617):337-9.
46. Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, et al. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*. juill 1986;322(6075):145-9.
47. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. nov 1984;312(5989):36-40.
48. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Toma H, Uchiyama T. Gamma /delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 23 mai 2001;50(3):115-24.
49. Carding SR, McNamara JG, Pan M, Bottomly K. Characterization of γ/δ T cell clones isolated from human fetal liver and thymus. *Eur J Immunol*. juin 1990;20(6):1327-35.
50. McVay LD, Carding SR. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 oct 1996;157(7):2873-82.
51. Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development. *Nat Rev Immunol*. sept 2010;10(9):657-63.
52. Carding SR, Egan PJ. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. mai 2002;2(5):336-45.
53. Lanier LL, Ruitenberg J, Bolhuls RLH, Borst J, Phillis JH, Testi R. Structural and serological heterogeneity of γ/δ T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur J Immunol*. déc 1988;18(12):1985-92.
54. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Pelicci P, Fagioli M, Martelli MF, et al. Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 1989;143(8):2480-8.
55. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med*. 1 avr 1989;169(4):1277-94.
56. Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med*. 1 mai 1990;171(5):1597-612.
57. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Cellular and molecular immunology. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018. 565 p.
58. Pereira P, Boucontet L. Rates of Recombination and Chain Pair Biases Greatly Influence the Primary $\gamma\delta$ TCR Repertoire in the Thymus of Adult Mice. *J Immunol*. 1 sept 2004;173(5):3261-70.
59. Chien Y, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:121-55.

Bibliographie

60. Chien Y, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev.* févr 2007;215:46-58.
61. Harly C, Peigné C-M, Scotet E. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 5 janv 2015 [cité 3 juin 2020];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00657/abstract>
62. Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development? *J Transl Med.* 10 2018;16(1):3.
63. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood.* 7 juill 2011;118(1):129-38.
64. Kimura Y, Nagai N, Tsunekawa N, Sato-Matsushita M, Yoshimoto T, Cua DJ, et al. IL-17A-producing CD30⁺ V δ 1 T cells drive inflammation-induced cancer progression. *Cancer Sci.* sept 2016;107(9):1206-14.
65. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev Cell.* juin 2008;14(6):818-29.
66. Rong L, Li K, Li R, Liu H-M, Sun R, Liu X-Y. Analysis of tumor-infiltrating gamma delta T cells in rectal cancer. *World J Gastroenterol.* 7 avr 2016;22(13):3573-80.
67. Wistuba-Hamprecht K, Di Benedetto S, Schilling B, Sucker A, Schadendorf D, Garbe C, et al. Phenotypic characterization and prognostic impact of circulating $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T-cells in metastatic malignant melanoma: Prognostic Value of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T-Cells in Malignant Melanoma. *Int J Cancer.* 1 févr 2016;138(3):698-704.
68. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Haehnel K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, et al. Proportions of blood-borne V δ 1⁺ and V δ 2⁺ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2016;64:116-26.
69. Mao Y, Yin S, Zhang J, Hu Y, Huang B, Cui L, et al. A new effect of IL-4 on human $\gamma\delta$ T cells: promoting regulatory V δ 1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of V δ 2 T cells. *Cell Mol Immunol.* mars 2016;13(2):217-28.
70. Peng G, Wang HY, Peng W, Kiniwa Y, Seo KH, Wang R-F. Tumor-Infiltrating $\gamma\delta$ T Cells Suppress T and Dendritic Cell Function via Mechanisms Controlled by a Unique Toll-like Receptor Signaling Pathway. *Immunity.* août 2007;27(2):334-48.
71. Casetti R, Agrati C, Wallace M, Sacchi A, Martini F, Martino A, et al. Cutting Edge: TGF- β 1 and IL-15 Induce FOXP3⁺ $\gamma\delta$ Regulatory T Cells in the Presence of Antigen Stimulation. *J Immunol.* 15 sept 2009;183(6):3574-7.
72. Ye J, Ma C, Wang F, Hsueh EC, Toth K, Huang Y, et al. Specific Recruitment of Regulatory T Cells in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* 15 oct 2013;73(20):6137-48.
73. Daley D, Zambirinis CP, Seifert L, Akkad N, Mohan N, Werba G, et al. $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation. *Cell.* sept 2016;166(6):1485-1499.e15.

Bibliographie

74. Ye J, Ma C, Hsueh EC, Eickhoff CS, Zhang Y, Varvares MA, et al. Tumor-Derived $\gamma\delta$ Regulatory T Cells Suppress Innate and Adaptive Immunity through the Induction of Immunosenescence. *J Immunol*. 1 mars 2013;190(5):2403-14.
75. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. juill 2010;10(7):479-89.
76. Patil RS, Shah SU, Shrikhande SV, Goel M, Dikshit RP, Chiplunkar SV. IL17 producing $\gamma\delta$ T cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients: $\gamma\delta$ 17 in Gallbladder Cancer. *Int J Cancer*. 15 août 2016;139(4):869-81.
77. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, et al. Tumor-infiltrating IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur J Immunol*. juill 2010;40(7):1927-37.
78. Kong X, Sun R, Chen Y, Wei H, Tian Z. $\gamma\delta$ T Cells Drive Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated CD8⁺ T Cell Exhaustion in Hepatitis B Virus-Induced Immunotolerance. *J Immunol*. 15 août 2014;193(4):1645-53.
79. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al. $\gamma\delta$ T17 Cells Promote the Accumulation and Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Human Colorectal Cancer. *Immunity*. mai 2014;40(5):785-800.
80. Welte T, Zhang XH-F. Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1-6.
81. Cai Y, Xue F, Fleming C, Yang J, Ding C, Ma Y, et al. Differential developmental requirement and peripheral regulation for dermal V γ 4 and V γ 6T17 cells in health and inflammation. *Nat Commun*. sept 2014;5(1):3986.
82. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells that Facilitate Tumor Progression. *J Immunol*. 1 janv 2006;176(1):284-90.
83. Rei M, Goncalves-Sousa N, Lanca T, Thompson RG, Mensurado S, Balkwill FR, et al. Murine CD27(-) V 6(+) T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci*. 26 août 2014;111(34):E3562-70.
84. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C-S, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. juin 2015;522(7556):345-8.
85. Sabbione F, Gabelloni ML, Ernst G, Gori MS, Salamone G, Oleastro M, et al. Neutrophils suppress $\gamma\delta$ T-cell function: Innate Immunity. *Eur J Immunol*. mars 2014;44(3):819-30.
86. Kalyan S, Chandrasekaran V, Quabius ES, Lindhorst TK, Kabelitz D. Neutrophil uptake of nitrogen-bisphosphonates leads to the suppression of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells. *Cell Mol Life Sci*. juin 2014;71(12):2335-46.
87. Kobayashi H, Tanaka Y. $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy—A Review. *Pharmaceuticals*. 12 févr 2015;8(1):40-61.

Bibliographie

88. Girardi M. Regulation of Cutaneous Malignancy by gamma delta T Cells. *Science*. 19 oct 2001;294(5542):605-9.
89. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. nov 2015;15(11):683-91.
90. Ma Y, Aymeric L, Locher C, Mattarollo SR, Delahaye NF, Pereira P, et al. Contribution of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med*. 14 mars 2011;208(3):491-503.
91. Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, Franklin RA, Luo CT, Oh SA, et al. Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell*. janv 2016;164(3):365-77.
92. Donia M, Ellebaek E, Andersen MH, Straten P, Svane IM. Analysis of V δ 1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes. *Oncol Immunology*. nov 2012;1(8):1297-304.
93. Devaud C, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Paroissin C, Khairallah C, et al. Anti-metastatic potential of human V δ 1+ $\gamma\delta$ T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. juill 2013;62(7):1199-210.
94. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. août 2015;21(8):938-45.
95. Tosolini M, Pont F, Poupot M, Vergez F, Nicolau-Travers M-L, Vermijlen D, et al. Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncol Immunology*. 4 mars 2017;6(3):e1284723.
96. Pizzolato G, Kaminski H, Tosolini M, Franchini D-M, Pont F, Martins F, et al. Single-cell RNA sequencing unveils the shared and the distinct cytotoxic hallmarks of human TCRV δ 1 and TCRV δ 2 $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 22 mai 2019;201818488.
97. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, Park BS, Chiang K-Y, Abhyankar S, et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased $\gamma\delta$ T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. juin 2007;39(12):751-7.
98. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, et al. Granulysin-Dependent Killing of Intracellular and Extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V γ 9/V δ 2 T Lymphocytes. *J Infect Dis*. 15 oct 2001;184(8):1082-5.
99. Niu C, Jin H, Li M, Xu J, Xu D, Hu J, et al. In vitro analysis of the proliferative capacity and cytotoxic effects of ex vivo induced natural killer cells, cytokine-induced killer cells, and gamma-delta T cells. *BMC Immunol*. déc 2015;16(1):61.
100. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, et al. Differentiation of Effector/Memory V δ 2 T Cells and Migratory Routes in Lymph Nodes or Inflammatory Sites. *J Exp Med*. 4 août 2003;198(3):391-7.
101. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, Diamantini A, Poupot R, Bernardi G, et al. Fc γ RIII discriminates between 2 subsets of V γ 9V δ 2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood*. 15 sept 2004;104(6):1801-7.

Bibliographie

102. Dhar S, Chiplunkar SV. Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells by V γ 9V δ 2 T cells. *Cancer Immun.* 12 nov 2010;10:10.
103. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, et al. $\gamma\delta$ T Cells Provide an Early Source of Interferon γ in Tumor Immunity. *J Exp Med.* 4 août 2003;198(3):433-42.
104. Ramstead AG, Jutila MA. Complex Role of $\gamma\delta$ T-Cell-Derived Cytokines and Growth Factors in Cancer. *J Interferon Cytokine Res.* déc 2012;32(12):563-9.
105. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF- β 1. *J Immunol.* 1 janv 2009;182(1):240-9.
106. Sedlak C, Patzl M, Saalmüller A, Gerner W. IL-12 and IL-18 induce interferon- γ production and de novo CD2 expression in porcine $\gamma\delta$ T cells. *Dev Comp Immunol.* nov 2014;47(1):115-22.
107. Dokouhaki P, Schuh NW, Joe B, Allen CAD, Der SD, Tsao M-S, et al. NKG2D regulates production of soluble TRAIL by ex vivo expanded human $\gamma\delta$ T cells: Cellular immune response. *Eur J Immunol.* déc 2013;43(12):3175-82.
108. Li Z, Xu Q, Peng H, Cheng R, Sun Z, Ye Z. IFN- γ enhances HOS and U2OS cell lines susceptibility to $\gamma\delta$ T cell-mediated killing through the Fas/Fas ligand pathway. *Int Immunopharmacol.* avr 2011;11(4):496-503.
109. Fisher JPH, Yan M, Heuwerkerk J, Carter L, Abolhassani A, Frosch J, et al. Neuroblastoma Killing Properties of V α 2 and V α 2-Negative T Cells Following Expansion by Artificial Antigen-Presenting Cells. *Clin Cancer Res.* 15 nov 2014;20(22):5720-32.
110. Couzi L, Pitard V, Sicard X, Garrigue I, Hawchar O, Merville P, et al. Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human $\gamma\delta$ T cells expressing CD16 (Fc γ RIIIa). *Blood.* 9 févr 2012;119(6):1418-27.
111. Lafont V, Liautard J, Liautard JP, Favero J. Production of TNF- α by Human V γ 9V δ 2 T Cells Via Engagement of Fc γ RIIIA, the Low Affinity Type 3 Receptor for the Fc Portion of IgG, Expressed upon TCR Activation by Nonpeptidic Antigen. *J Immunol.* 15 juin 2001;166(12):7190-9.
112. Huang Y, Getahun A, Heiser RA, Detanico TO, Aviszus K, Kirchenbaum GA, et al. $\gamma\delta$ T Cells Shape Preimmune Peripheral B Cell Populations. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 janv 2016;196(1):217-31.
113. Bansal RR, Mackay CR, Moser B, Eberl M. IL-21 enhances the potential of human $\gamma\delta$ T cells to provide B-cell help. *Eur J Immunol.* janv 2012;42(1):110-9.
114. Brandes M. Professional Antigen-Presentation Function by Human $\gamma\delta$ T Cells. *Science.* 8 juill 2005;309(5732):264-8.
115. Muto M, Baghdadi M, Maekawa R, Wada H, Seino K. Myeloid molecular characteristics of human $\gamma\delta$ T cells support their acquisition of tumor antigen-presenting capacity. *Cancer Immunol Immunother.* août 2015;64(8):941-9.
116. Mao C, Mou X, Zhou Y, Yuan G, Xu C, Liu H, et al. Tumor-Activated TCR $\gamma\delta$ + T Cells from Gastric Cancer Patients Induce the Antitumor Immune Response of TCR $\alpha\beta$ + T Cells via Their Antigen-Presenting Cell-Like Effects. *J Immunol Res.* 2014;2014:1-10.

Bibliographie

117. Van Acker HH, Anguille S, Van Tendeloo VF, Lion E. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncolimmunology*. 3 août 2015;4(8):e1021538.
118. Moser B, Eberl M. $\gamma\delta$ T-APCs: a novel tool for immunotherapy? *Cell Mol Life Sci*. juill 2011;68(14):2443-52.
119. Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes. *J Exp Med*. 18 juill 2005;202(2):203-7.
120. Conti L, Casetti R, Cardone M, Varano B, Martino A, Belardelli F, et al. Reciprocal Activating Interaction Between Dendritic Cells and Pamidronate-Stimulated $\gamma\delta$ T Cells: Role of CD86 and Inflammatory Cytokines. *J Immunol*. 1 janv 2005;174(1):252-60.
121. Devilder M-C, Maillet S, Bouyge-Moreau I, Donnadieu E, Bonneville M, Scotet E. Potentiation of Antigen-Stimulated V γ 9V δ 2 T Cell Cytokine Production by Immature Dendritic Cells (DC) and Reciprocal Effect on DC Maturation. *J Immunol*. 1 févr 2006;176(3):1386-93.
122. Maniar A, Zhang X, Lin W, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, et al. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood*. 9 sept 2010;116(10):1726-33.
123. Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V, Angelini D, Borsellino G, Poccia F, et al. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human V γ 9V δ 2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol*. juin 2005;35(6):1764-72.
124. Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, Poccia F, Fournié JJ, Meraviglia S, et al. CXCR5 Identifies a Subset of V γ 9V δ 2 T Cells which Secrete IL-4 and IL-10 and Help B Cells for Antibody Production. *J Immunol*. 15 oct 2006;177(8):5290-5.
125. Constant P, Davodeau F, Peyrat M, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*. 8 avr 1994;264(5156):267-70.
126. Pfeffer K, Schoel B, Plesnila N, Lipford GB, Kromer S, Deusch K, et al. A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 janv 1992;148(2):575-83.
127. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ T cells. *Immunity*. oct 1995;3(4):495-507.
128. Eric Espinosa. Activation et mode d'activation des lymphocytes T(gamma)9(delta)2 humains par les phosphoantigènes. [Toulouse]: Université Paul Sabatier; 2002.
129. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature*. mai 1995;375(6527):155-8.
130. 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*. mars 2020;19(3):169-84.

Bibliographie

131. Nedellec S, Bonneville M, Scotet E. Human V γ 9V δ 2 T cells: From signals to functions. *Semin Immunol.* août 2010;22(4):199-206.
132. Belmant C, Decise D, Fournié J-J. Phosphoantigens and aminobisphosphonates: New leads targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug Discov Today Ther Strateg.* mars 2006;3(1):17-23.
133. Ali Z, Shao L, Halliday L, Reichenberg A, Hintz M, Jomaa H, et al. Prolonged (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl Pyrophosphate-Driven Antimicrobial and Cytotoxic Responses of Pulmonary and Systemic V γ 2V δ 2 T Cells in Macaques. *J Immunol.* 15 déc 2007;179(12):8287-96.
134. Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S, et al. Phosphostim-Activated $\gamma\delta$ T Cells Kill Autologous Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Immunol.* 1 févr 2005;174(3):1338-47.
135. Coppens I. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat Rev Microbiol.* déc 2013;11(12):823-35.
136. Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.* 15 oct 1993;295(2):517-24.
137. Poupot M, Fournié J-J. Non-peptide antigens activating human V γ 9/V δ 2 T lymphocytes. *Immunol Lett.* sept 2004;95(2):129-38.
138. Gober H-J, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T Cell Receptor $\gamma\delta$ Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *J Exp Med.* 20 janv 2003;197(2):163-8.
139. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev.* févr 2007;215(1):59-76.
140. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Human $\gamma\delta$ T Cells Recognize Alkylamines Derived from Microbes, Edible Plants, and Tea. *Immunity.* juill 1999;11(1):57-65.
141. Dhillon S, Lyseng-Williamson KA. Zoledronic Acid: A Review of its Use in the Management of Bone Metastases of Malignancy. *Drugs.* 2008;68(4):507-34.
142. Catros V, Toutirais O, Bouet F, Cabillic F, Desille M, Fournie J-J. [Tgammadelta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]. *Med Sci MS.* févr 2010;26(2):185-91.
143. Thompson K, Rogers MJ. Statins Prevent Bisphosphonate-Induced γ,δ -T-Cell Proliferation and Activation In Vitro. *J Bone Miner Res.* 16 déc 2003;19(2):278-88.
144. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood.* 15 juill 2000;96(2):384-92.
145. Rust CJJ, Verreck F, Vietor H, Koning F. Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V γ 9 region. *Nature.* août 1990;346(6284):572-4.

Bibliographie

146. Rust C, Orsini D, Kooy Y, Koning F. Reactivity of Human gammadelta T Cells to Staphylococcal Enterotoxins: a Restricted Reaction Pattern mediated by Two Distinct Recognition Pathways. *Scand J Immunol.* juill 1993;38(1):89-94.
147. Kalyan S, Chow AW. Human Peripheral $\gamma\delta$ T Cells Potentiate the Early Proinflammatory Cytokine Response to Staphylococcal Toxic Shock Syndrome Toxin-1. *J Infect Dis.* 15 mai 2004;189(10):1892-6.
148. Marcu-Malina V, Heijhuurs S, van Buuren M, Hartkamp L, Strand S, Sebestyen Z, et al. Redirecting $\alpha\beta$ T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Blood.* 7 juill 2011;118(1):50-9.
149. Lang F, Peyrat MA, Constant P, Davodeau F, David-Ameline J, Poquet Y, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juin 1995;154(11):5986-94.
150. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S, Sturm E, Braakman E, Klein B, et al. Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science.* 30 nov 1990;250(4985):1269-73.
151. Martinet L, Fleury-Cappellesso S, Gadelorge M, Dietrich G, Bourin P, Fournié J-J, et al. A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells: Immunomodulation. *Eur J Immunol.* mars 2009;39(3):752-62.
152. Arnett HA, Viney JL. Immune modulation by butyrophilins. *Nat Rev Immunol.* août 2014;14(8):559-69.
153. Compte E, Pontarotti P, Collette Y, Lopez M, Olive D. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur J Immunol.* août 2004;34(8):2089-99.
154. Kabelitz D. CD277 takes the lead in human $\gamma\delta$ T-cell activation. *Blood.* 13 sept 2012;120(11):2159-61.
155. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné C-M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood.* 13 sept 2012;120(11):2269-79.
156. Gu S, Nawrocka W, Adams EJ. Sensing of Pyrophosphate Metabolites by V γ 9V δ 2 T Cells. *Front Immunol [Internet].* 22 janv 2015 [cité 7 juin 2020];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00688/abstract>
157. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, Ramanjaneyulu GS, Cavallari M, El Daker S, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. *Nat Immunol.* sept 2013;14(9):908-16.
158. Salim M, Knowles TJ, Baker AT, Davey MS, Jeeves M, Sridhar P, et al. BTN3A1 Discriminates $\gamma\delta$ T Cell Phosphoantigens from Nonantigenic Small Molecules *via* a Conformational Sensor in Its B30.2 Domain. *ACS Chem Biol.* 20 oct 2017;12(10):2631-43.
159. Gu S, Sachleben JR, Boughter CT, Nawrocka WI, Borowska MT, Tarrasch JT, et al. Phosphoantigen-induced conformational change of butyrophilin 3A1 (BTN3A1) and its

- implication on Vgamma9Vdelta2 T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 août 2017;114(35):E7311-20.
160. Riaño F, Karunakaran MM, Starick L, Li J, Scholz CJ, Kunzmann V, et al. Vγ9Vδ2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (*BTN3A1*) and additional genes on human chromosome 6: Antigen processing. *Eur J Immunol*. sept 2014;44(9):2571-6.
161. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by γδ T cells. *Science*. 7 févr 2020;367(6478):eaay5516.
162. Karunakaran MM, Willcox CR, Salim M, Paletta D, Fichtner AS, Noll A, et al. Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the Vγ9Vδ2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity*. mars 2020;52(3):487-498.e6.
163. Vyborova A, Beringer DX, Fasci D, Karaiskaki F, van Diest E, Kramer L, et al. γδ2T cell diversity and the receptor interface with tumor cells. *J Clin Invest [Internet]*. 2 juin 2020 [cité 14 juin 2020]; Disponible sur: <http://www.jci.org/articles/view/132489>
164. Scotet E, Martinez LO, Grant E, Barbaras R, Jenou P, Guiraud M, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity*. janv 2005;22(1):71-80.
165. Mookerjee-Basu J, Vantourout P, Martinez LO, Perret B, Collet X, Périgaud C, et al. F1-Adenosine Triphosphatase Displays Properties Characteristic of an Antigen Presentation Molecule for Vγ9Vδ2 T Cells. *J Immunol*. 15 juin 2010;184(12):6920-8.
166. Castella B, Kopecka J, Sciancalepore P, Mandili G, Foglietta M, Mitro N, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 regulates phosphoantigen release and Vγ9Vδ2 T cell activation by dendritic cells. *Nat Commun*. août 2017;8(1):15663.
167. Rhodes DA, Chen H-C, Williamson JC, Hill A, Yuan J, Smith S, et al. Regulation of Human gammadelta T Cells by BTN3A1 Protein Stability and. *Front Immunol*. 2018;9:662.
168. Sebestyen Z, Scheper W, Vyborova A, Gu S, Rychnavska Z, Schiffler M, et al. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by Vgamma9Vdelta2 T Cell Receptor. *Cell Rep*. 31 mai 2016;15(9):1973-85.
169. Rhodes DA, Chen H-C, Price AJ, Keeble AH, Davey MS, James LC, et al. Activation of human gammadelta T cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 mars 2015;194(5):2390-8.
170. Rubio G, Aramburu J, Ontañón J, López-Botet M, Aparicio P. A novel functional cell surface dimer (kp43) serves as accessory molecule for the activation of a subset of human gamma delta T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 1993;151(3):1312-21.
171. Kong Y, Cao W, Xi X, Ma C, Cui L, He W. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRγ9/δ2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRγδ and NKG2D. *Blood*. 9 juill 2009;114(2):310-7.

Bibliographie

172. Ribeiro ST, Ribot JC, Silva-Santos B. Five Layers of Receptor Signaling in $\gamma\delta$ T-Cell Differentiation and Activation. *Front Immunol* [Internet]. 26 janv 2015 [cité 7 juin 2020];6. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00015/abstract>
173. Wrobel P, Shojaei H, Schitteck B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, et al. Lysis of a Broad Range of Epithelial Tumour Cells by Human $\gamma\delta$ T Cells: Involvement of NKG2D ligands and T-cell Receptor- versus NKG2D-dependent Recognition. *Scand J Immunol*. août 2007;66(2-3):320-8.
174. Gundermann S, Klinker E, Kimmel B, Flierl U, Wilhelm M, Einsele H, et al. A Comprehensive Analysis of Primary Acute Myeloid Leukemia Identifies Biomarkers Predicting Susceptibility to Human Allogeneic V γ 9V δ 2 T Cells: *J Immunother*. 2014;37(6):321-30.
175. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier J-F, Scotet E, et al. V γ 9V δ 2 T Cell Response to Colon Carcinoma Cells. *J Immunol*. 15 oct 2005;175(8):5481-8.
176. Poccia F, Cipriani B, Vendetti S, Colizzi V, Poquet Y, Battistini L, et al. CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 déc 1997;159(12):6009-17.
177. Angelini DF, Zambello R, Galandrini R, Diamantini A, Placido R, Micucci F, et al. NKG2A inhibits NKG2C effector functions of $\gamma\delta$ T cells: implications in health and disease. *J Leukoc Biol*. janv 2011;89(1):75-84.
178. Boullier S, Poquet Y, Halary F, Bonneville M, Fournie JJ, Gougeon ML. Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94- peripheral Vgamma9 Vdelta2 T cells but not on CD94- thymic or mature gammadelta T cell clones. *Eur J Immunol*. 1998;28(11):3399-410.
179. Lesport E, Baudhuin J, Sousa S, LeMaout J, Zamborlini A, Rouas-Freiss N, et al. Inhibition of human V γ 9V δ 2 T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cell Mol Life Sci*. oct 2011;68(20):3385-99.
180. Trichet V, Benezech C, Dousset C, Gesnel M-C, Bonneville M, Breathnach R. Complex Interplay of Activating and Inhibitory Signals Received by V γ 9V δ 2 T Cells Revealed by Target Cell β 2 -Microglobulin Knockdown. *J Immunol*. 1 nov 2006;177(9):6129-36.
181. Wesch D, Beetz S, Oberg H-H, Marget M, Krenzel K, Kabelitz D. Direct Costimulatory Effect of TLR3 Ligand Poly(I:C) on Human $\gamma\delta$ T Lymphocytes. *J Immunol*. 1 févr 2006;176(3):1348-54.
182. Deetz CO, Hebbeler AM, Propp NA, Cairo C, Tikhonov I, Pauza CD. Gamma Interferon Secretion by Human V γ 2V δ 2 T Cells after Stimulation with Antibody against the T-Cell Receptor plus the Toll-Like Receptor 2 Agonist Pam3Cys. *Infect Immun*. août 2006;74(8):4505-11.
183. Serrano R, Wesch D, Kabelitz D. Activation of Human $\gamma\delta$ T Cells: Modulation by Toll-Like Receptor 8 Ligands and Role of Monocytes. *Cells*. 13 mars 2020;9(3):713.
184. Wesch D, Peters C, Oberg H-H, Pietschmann K, Kabelitz D. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci*. juill 2011;68(14):2357-70.

Bibliographie

185. Treisman J, Hwu P, Minamoto S, Shafer GE, Cowherd R, Morgan RA, et al. Interleukin-2-transduced lymphocytes grow in an autocrine fashion and remain responsive to antigen. *Blood*. 1 janv 1995;85(1):139-45.
186. Espinosa E, Belmont C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagné F, et al. Chemical Synthesis and Biological Activity of Bromohydrin Pyrophosphate, a Potent Stimulator of Human $\gamma\delta$ T Cells. *J Biol Chem*. 25 mai 2001;276(21):18337-44.
187. Baccala R, Witherden D, Gonzalez-Quintial R, Dummer W, Surh CD, Havran WL, et al. $\gamma\delta$ T Cell Homeostasis Is Controlled by IL-7 and IL-15 Together with Subset-Specific Factors. *J Immunol*. 15 avr 2005;174(8):4606-12.
188. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med*. 3 janv 2005;201(1):139-48.
189. Barjon C, Michaud H-A, Fages A, Dejou C, Zampieri A, They L, et al. IL-21 promotes the development of a CD73-positive Vgamma9Vdelta2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology*. 2017;7(1):e1379642.
190. Duault C, Franchini DM, Familliades J, Cayrol C, Roga S, Girard J-P, et al. TCRV γ 9 $\gamma\delta$ T Cell Response to IL-33: A CD4 T Cell-Dependent Mechanism. *J Immunol*. 1 janv 2016;196(1):493-502.
191. Duault C, Betous D, Bezombes C, Roga S, Cayrol C, Girard J-P, et al. IL-33-expanded human V γ 9V δ 2 T cells have anti-lymphoma effect in a mouse tumor model. *Eur J Immunol*. déc 2017;47(12):2137-41.
192. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, et al. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:375-96.
193. Uchida R, Ashihara E, Sato K, Kimura S, Kuroda J, Takeuchi M, et al. $\gamma\delta$ T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem Biophys Res Commun*. mars 2007;354(2):613-8.
194. Wang P, Malkovsky M. 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. *Mol Med Camb Mass*. mars 2000;6(3):196-207.
195. Kato Y, Tanaka Y, Hayashi M, Okawa K, Minato N. Involvement of CD166 in the Activation of Human $\gamma\delta$ T Cells by Tumor Cells Sensitized with Nonpeptide Antigens. *J Immunol*. 15 juill 2006;177(2):877-84.
196. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. avr 2008;8(4):299-308.
197. Kenna T. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol*. oct 2004;113(1):56-63.
198. Capietto A-H, Martinet L, Fournié J-J. Stimulated $\gamma\delta$ T Cells Increase the In Vivo Efficacy of Trastuzumab in HER-2 + Breast Cancer. *J Immunol*. 15 juill 2011;187(2):1031-8.

Bibliographie

199. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, et al. Targeting Human T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res.* 1 août 2007;67(15):7450-7.
200. Lang JM, Kaikobad MR, Wallace M, Staab MJ, Horvath DL, Wilding G, et al. Pilot trial of interleukin-2 and zoledronic acid to augment $\gamma\delta$ T cells as treatment for patients with refractory renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* oct 2011;60(10):1447-60.
201. Fournié J-J, Sicard H, Poupot M, Bezombes C, Blanc A, Romagné F, et al. What lessons can be learned from $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol.* janv 2013;10(1):35-41.
202. Zou C, Zhao P, Xiao Z, Han X, Fu F, Fu L. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Oncotarget.* 31 janv 2017;8(5):8900-9.
203. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, et al. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood.* 1 juill 2003;102(1):200-6.
204. Bennouna J, Levy V, Sicard H, Senellart H, Audrain M, Huret S, et al. Phase I study of bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, IPH 1101), a V γ 9V δ 2 T lymphocyte agonist in patients with solid tumors. *Cancer Immunol Immunother.* oct 2010;59(10):1521-30.
205. Brégeon D, Ferron L, Chrétien A, Guillen F, Zgonnik V, Rivaud M, et al. Synthesis of phosphoantigens: Scalable accesses to enantiomers of BrHPP and studies on N-HDMAPP synthesis. *Bioorg Med Chem Lett.* sept 2012;22(18):5807-10.
206. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, 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.* 1 févr 2007;56(4):469-76.
207. Cui J, Wang N, Zhao H, Jin H, Wang G, Niu C, et al. Combination of radiofrequency ablation and sequential cellular immunotherapy improves progression-free survival for patients with hepatocellular carcinoma: Radiofrequency Ablation with Cellular Immunotherapy for HCC. *Int J Cancer.* 15 janv 2014;134(2):342-51.
208. Märten A, von Lilienfeld-Toal M, Büchler MW, Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity. *Int J Cancer.* 15 nov 2006;119(10):2359-65.
209. Lo Presti E, Toia F, Oieni S, Buccheri S, Turdo A, Mangiapane LR, et al. Squamous Cell Tumors Recruit $\gamma\delta$ T Cells Producing either IL17 or IFN γ Depending on the Tumor Stage. *Cancer Immunol Res.* mai 2017;5(5):397-407.
210. Wang X, Zhao X, Feng C, Weinstein A, Xia R, Wen W, et al. IL-36 γ Transforms the Tumor Microenvironment and Promotes Type 1 Lymphocyte-Mediated Antitumor Immune Responses. *Cancer Cell.* sept 2015;28(3):296-306.
211. Gründer C, van Dorp S, Hol S, Drent E, Straetemans T, Heijhuurs S, et al. γ 9 and δ 2CDR3 domains regulate functional avidity of T cells harboring γ 9 δ 2TCRs. *Blood.* 20 déc 2012;120(26):5153-62.

Bibliographie

212. Scheper W, Sebestyén Z, Kuball J. Cancer Immunotherapy Using $\gamma\delta$ T Cells: Dealing with Diversity. *Front Immunol* [Internet]. 20 nov 2014 [cité 7 juin 2020];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00601/abstract>
213. Scheper W, Gründer C, Kuball J. Multifunctional $\gamma\delta$ T cells and their receptors for targeted anticancer immunotherapy. *Oncol Immunology*. mai 2013;2(5):e23974.
214. de Bruin RCG, Veluchamy JP, Loughheed SM, Schneiders FL, Lopez-Lastra S, Lameris R, et al. A bispecific nanobody approach to leverage the potent and widely applicable tumor cytolytic capacity of V γ 9V δ 2-T cells. *Oncol Immunology*. 2 janv 2018;7(1):e1375641.
215. Lamb LS, Bowersock J, Dasgupta A, Gillespie GY, Su Y, Johnson A, et al. Engineered Drug Resistant $\gamma\delta$ T Cells Kill Glioblastoma Cell Lines during a Chemotherapy Challenge: A Strategy for Combining Chemo- and Immunotherapy. *Castro MG, éditeur. PLoS ONE*. 11 janv 2013;8(1):e51805.
216. Correia DV, Fogli M, Hudspeth K, da Silva MG, Mavilio D, Silva-Santos B. Differentiation of human peripheral blood V δ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood*. 28 juill 2011;118(4):992-1001.
217. Almeida AR, Correia DV, Fernandes-Platzgummer A, da Silva CL, da Silva MG, Anjos DR, et al. Delta One T Cells for Immunotherapy of Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical-Grade Expansion/Differentiation and Preclinical Proof of Concept. *Clin Cancer Res*. 1 déc 2016;22(23):5795-804.
218. Capsomidis A, Benthall G, Van Acker HH, Fisher J, Kramer AM, Abeln Z, et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation. *Mol Ther*. févr 2018;26(2):354-65.
219. Fisher J, Anderson J. Engineering Approaches in Human Gamma Delta T Cells for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 26 juin 2018;9:1409.
220. Li Y, Hermanson DL, Moriarity BS, Kaufman DS. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell*. août 2018;23(2):181-192.e5.
221. de Witte MA, Sarhan D, Davis Z, Felices M, Vallera DA, Hinderlie P, et al. Early Reconstitution of NK and $\gamma\delta$ T Cells and Its Implication for the Design of Post-Transplant Immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. juin 2018;24(6):1152-62.
222. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*. sept 2017;9(9):1183-97.
223. Straetemans T, Kierkels GJJ, Doorn R, Jansen K, Heijhuurs S, Dos Santos JM, et al. GMP-Grade Manufacturing of T Cells Engineered to Express a Defined gammadeltaTCR. *Front Immunol*. 2018;9:1062.
224. Bouchie A, DeFrancesco L, Sheridan C, Webb S. Nature Biotechnology's academic spinouts of 2016. *Nat Biotechnol*. avr 2017;35(4):322-33.
225. Scheper W, Gründer C, Straetemans T, Sebestyén Z, Kuball J. Hunting for clinical translation with innate-like immune cells and their receptors. *Leukemia*. juin 2014;28(6):1181-90.

Bibliographie

226. Braham MVJ, Minnema MC, Aarts T, Sebestyén Z, Straetemans T, Vyborova A, et al. Cellular immunotherapy on primary multiple myeloma expanded in a 3D bone marrow niche model. *Oncolimmunology*. 3 juin 2018;7(6):e1434465.
227. Netherlands Trial Register 2017.
228. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood*. 8 août 2013;122(6):863-71.
229. Rossi C, Gravelle P, Decaup E, Bordenave J, Poupot M, Tosolini M, et al. Boosting $\gamma\delta$ T cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by PD-1 blockade in follicular lymphoma. *Oncolimmunology*. 4 mars 2019;8(3):1554175.
230. Li Z, Li N, Li F, Zhou Z, Sang J, Chen Y, et al. Immune checkpoint proteins PD-1 and TIM-3 are both highly expressed in liver tissues and correlate with their gene polymorphisms in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma: *Medicine (Baltimore)*. déc 2016;95(52):e5749.
231. He Y, Yu H, Rozeboom L, Rivard CJ, Ellison K, Dziadziszko R, et al. LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Thorac Oncol*. mai 2017;12(5):814-23.
232. Lines JL, Pantazi E, Mak J, Sempere LF, Wang L, O'Connell S, et al. VISTA Is an Immune Checkpoint Molecule for Human T Cells. *Cancer Res*. 1 avr 2014;74(7):1924-32.
233. Du S-H, Li Z, Chen C, Tan W-K, Chi Z, Kwang TW, et al. Co-Expansion of Cytokine-Induced Killer Cells and V γ 9V δ 2 T Cells for CAR T-Cell Therapy. Dieli F, éditeur. *PLOS ONE*. 6 sept 2016;11(9):e0161820.
234. Chen H, Joalland N, Bridgeman JS, Alchami FS, Jarry U, Khan MWA, et al. Synergistic targeting of breast cancer stem-like cells by human $\gamma\delta$ T cells and CD8⁺ T cells. *Immunol Cell Biol*. août 2017;95(7):620-9.
235. Valencia A, Kjeldgaard M, Pai EF, Sander C. GTPase domains of ras p21 oncogene protein and elongation factor Tu: analysis of three-dimensional structures, sequence families, and functional sites. *Proc Natl Acad Sci*. 15 juin 1991;88(12):5443-7.
236. Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 5 févr 2018;217(2):447-57.
237. Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*. juin 1989;57(7):1167-77.
238. Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*. 5 oct 1992;267(28):20033-8.
239. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. janv 1991;349(6305):117-27.
240. Olofsson B. Rho Guanine Dissociation Inhibitors. *Cell Signal*. août 1999;11(8):545-54.

Bibliographie

241. Zalcmán G, Closson V, Linares-Cruz G, Lerebours F, Honoré N, Tavitian A, et al. Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene*. 18 mai 1995;10(10):1935-45.
242. Zalcmán G, Dorseuil O, Garcia-Ranea JA, Gacon G, Camonis J. RhoGAPs and RhoGDIs, (His)stories of two families. *Prog Mol Subcell Biol*. 1999;22:85-113.
243. Ju J, Gilkes D. RhoB: Team Oncogene or Team Tumor Suppressor? *Genes*. 30 janv 2018;9(2):67.
244. Schaefer A, Reinhard NR, Hordijk PL. Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases*. 3 avr 2014;5(2):e968004.
245. Baron R, Fourcade E, Lajoie-Mazenc I, Allal C, Couderc B, Barbaras R, et al. RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: Evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc Natl Acad Sci*. 10 oct 2000;97(21):11626-31.
246. Allal C, Pradines A, Hamilton AD, Sebti SM, Favre G. Farnesylated RhoB Prevents Cell Cycle Arrest and Actin Cytoskeleton Disruption Caused by the Geranylgeranyltransferase I Inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle*. nov 2002;1(6):430-7.
247. Lebowitz PF, Casey PJ, Prendergast GC, Thissen JA. Farnesyltransferase Inhibitors Alter the Prenylation and Growth-stimulating Function of RhoB. *J Biol Chem*. 20 juin 1997;272(25):15591-4.
248. Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol*. 1 nov 1992;119(3):617-27.
249. Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR. Differential Localization of Rho Gtpases in Live Cells. *J Cell Biol*. 8 janv 2001;152(1):111-26.
250. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*. 18 juin 2008;582(14):2093-101.
251. Gerald D, Adini I, Shechter S, Perruzzi C, Varnau J, Hopkins B, et al. RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription. *Nat Commun*. déc 2013;4(1):2824.
252. Wherlock M. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J Cell Sci*. 1 juill 2004;117(15):3221-31.
253. Pérez-Sala D, Boya P, Ramos I, Herrera M, Stamatakis K. The C-Terminal Sequence of RhoB Directs Protein Degradation through an Endo-Lysosomal Pathway. *Chu CT, éditeur. PLoS ONE*. 2 déc 2009;4(12):e8117.
254. Valero RA, Oeste CL, Stamatakis K, Ramos I, Herrera M, Boya P, et al. Structural Determinants Allowing Endolysosomal Sorting and Degradation of Endosomal GTPases. *Traffic*. sept 2010;11(9):1221-33.
255. Zaoui K, Rajadurai CV, Duhamel S, Park M. Arf6 regulates RhoB subcellular localization to control cancer cell invasion. *J Cell Biol*. 4 nov 2019;218(11):3812-26.

Bibliographie

256. Arthur WT, Ellerbroek SM, Der CJ, Burrige K, Wennerberg K. XPLN, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for RhoA and RhoB, But Not RhoC. *J Biol Chem.* 8 nov 2002;277(45):42964-72.
257. Hamel B, Monaghan-Benson E, Rojas RJ, Temple BRS, Marston DJ, Burrige K, et al. SmgGDS Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor That Specifically Activates RhoA and RhoC. *J Biol Chem.* 8 avr 2011;286(14):12141-8.
258. Zalzman G, Closson V, Camonis J, Honoré N, Rousseau-Merck M-F, Tavitian A, et al. RhoGDI-3 Is a New GDP Dissociation Inhibitor (GDI): identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem.* 29 nov 1996;271(48):30366-74.
259. Wang M, Guo L, Wu Q, Zeng T, Lin Q, Qiao Y, et al. ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nat Commun.* déc 2014;5(1):4901.
260. Xu J, Li L, Yu G, Ying W, Gao Q, Zhang W, et al. The Neddylation-Cullin 2-RBX1 E3 Ligase Axis Targets Tumor Suppressor RhoB for Degradation in Liver Cancer. *Mol Cell Proteomics.* mars 2015;14(3):499-509.
261. Huang M, Prendergast GC. RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol.* 2006;21(2):213-8.
262. Srougi MC, Burrige K. The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PloS One.* 23 févr 2011;6(2):e17108.
263. Liu M, Tang Q, Qiu M, Lang N, Li M, Zheng Y, et al. miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett.* 3 oct 2011;585(19):2998-3005.
264. Tan Y, Yin H, Zhang H, Fang J, Zheng W, Li D, et al. Sp1-driven up-regulation of miR-19a decreases RHOB and promotes pancreatic cancer. *Oncotarget.* 10 juill 2015;6(19):17391-403.
265. Tillement V, Lajoie-Mazenc I, Casanova A, Froment C, Penary M, Tovar D, et al. Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp Cell Res.* sept 2008;314(15):2811-21.
266. Ballif BA, Carey GR, Sunyaev SR, Gygi SP. Large-Scale Identification and Evolution Indexing of Tyrosine Phosphorylation Sites from Murine Brain. *J Proteome Res.* janv 2008;7(1):311-8.
267. Schmidt M, Voss M, Thiel M, Bauer B, Grannass A, Tapp E, et al. Specific inhibition of phorbol ester-stimulated phospholipase D by *Clostridium sordellii* lethal toxin and *Clostridium difficile* toxin B-1470 in HEK-293 cells. Restoration by Ral GTPases. *J Biol Chem.* 27 mars 1998;273(13):7413-22.
268. Benard V, Bokoch GM. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol.* 2002;345:349-59.
269. Chuang TH, Xu X, Quilliam LA, Bokoch GM. SmgGDS stabilizes nucleotide-bound and -free forms of the Rac1 GTP-binding protein and stimulates GTP/GDP exchange through a substituted enzyme mechanism. *Biochem J.* 1 nov 1994;303 (Pt 3):761-7.

Bibliographie

270. Ellenbroek SIJ, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24(8):657-72.
271. Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. janv 2005;23(1):102-7.
272. Cabantous S, Waldo GS. In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP. *Nat Methods*. oct 2006;3(10):845-54.
273. Cabantous S, Nguyen HB, Pedelacq J-D, Koraïchi F, Chaudhary A, Ganguly K, et al. A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci Rep*. 4 oct 2013;3:2854.
274. Koraïchi F, Gence R, Bouchenot C, Grosjean S, Lajoie-Mazenc I, Favre G, et al. High-content tripartite split-GFP cell-based assays to screen for modulators of small GTPase activation. *J Cell Sci*. 08 2018;131(1).
275. Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer*. nov 2001;1(2):162-8.
276. Prendergast GC, Khosravi-Far R, Solski PA, Kurzawa H, Lebowitz PF, Der CJ. Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*. 15 juin 1995;10(12):2289-96.
277. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol*. mars 1999;19(3):1831-40.
278. Liu Ax null, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Prendergast GC. RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 mai 2001;98(11):6192-7.
279. Liu A x, Du W, Liu JP, Jessell TM, Prendergast GC. RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors. *Mol Cell Biol*. août 2000;20(16):6105-13.
280. Luis-Ravelo D, Antón I, Zandueta C, Valencia K, Pajares M-J, Agorreta J, et al. RHOB influences lung adenocarcinoma metastasis and resistance in a host-sensitive manner. *Mol Oncol*. mars 2014;8(2):196-206.
281. Calvayrac O, Mazieres J, Figarol S, Marty-Detraves C, Raymond-Letron I, Bousquet E, et al. The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Mol Med*. févr 2017;9(2):238-50.
282. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, et al. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer*. 1 févr 2007;120(3):543-51.
283. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 avr 2004;10(8):2742-50.

Bibliographie

284. Calvayrac O, Pradines A, Raymond-Letron I, Rouquette I, Bousquet E, Lauwers-Cances V, et al. RhoB determines tumor aggressiveness in a murine EGFR^{L858R}-induced adenocarcinoma model and is a potential prognostic biomarker for Lepidic lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 déc 2014;20(24):6541-50.
285. Tybulewicz VLJ, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* sept 2009;9(9):630-44.
286. Liu S, Huang L, Lin Z, Hu Y, Chen R, Wang L, et al. RhoB induces the production of proinflammatory cytokines in TLR-triggered macrophages. *Mol Immunol.* 2017;87:200-6.
287. Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, et al. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J.* 6 sept 2006;25(17):4108-19.
288. Galandriani R, Henning SW, Cantrell DA. Different functions of the GTPase Rho in prothymocytes and late pre-T cells. *Immunity.* juill 1997;7(1):163-74.
289. Henning SW, Galandriani R, Hall A, Cantrell DA. The GTPase Rho has a critical regulatory role in thymus development. *EMBO J.* 1 mai 1997;16(9):2397-407.
290. Verschueren H, De Baetselier P, De Braekeleer J, Dewit J, Aktories K, Just I. ADP-ribosylation of Rho-proteins with botulinum C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. *Eur J Cell Biol.* juin 1997;73(2):182-7.
291. Vielkind S, Gallagher-Gambarelli M, Gomez M, Hinton HJ, Cantrell DA. Integrin regulation by RhoA in thymocytes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2005;175(1):350-7.
292. Laplagne C, Meddour S, Figarol S, Michelas M, Calvayrac O, Favre G, et al. Vγ9Vδ2 T Cells Activation Through Phosphoantigens Can Be Impaired by a RHOB Rerouting in Lung Cancer. *Front Immunol.* 7 juill 2020;11:1396.
293. Izumi H, Yamasaki A, Takeda K, Kodani M, Touge H, Tanaka N, et al. Acute-phase reaction induced by zoledronate and its effect on prognosis of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* août 2018;122:200-5.
294. Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J. γδ T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* févr 2014;3(1):23-33.
295. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci.* 16 août 1994;91(17):8175-9.
296. Corey DM, Ring AM, Weissman IL. BTN3A ectodomain proteins and methods of use. US patent WO2016191305A12016.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.



ETUDE DE L'IMPLICATION DE LA PROTEINE RHOB LORS DE L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ DANS UN MODELE DE CANCER DU POUMON

L'immunothérapie correspond à une nouvelle approche thérapeutique permettant de stimuler le système immunitaire du patient pour renforcer ses défenses contre les cellules cancéreuses. Il existe différents types d'immunothérapies, notamment le transfert adoptif cellulaire ayant fait l'objet de nombreuses études.

Dans cette approche, les lymphocytes T (LT) $V\gamma 9V\delta 2$ sont des candidats intéressants puisqu'ils présentent de nombreuses fonctions effectrices sans nécessité de restriction par les molécules du CMH. Ces LT non conventionnels sont des acteurs majeurs de l'immunité anti-tumorale. Ils sont activés par des antigènes non peptidiques appelés phosphoantigènes (PAGs), pouvant être accumulés *in situ* par des molécules pharmacologiques telles que les aminobiphosphonates. L'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ est médiée par différentes protéines, notamment les butyrophilines (BTN) BTN2A1 et BTN3A1, formant un complexe autour du TCR $V\gamma 9V\delta 2$ et permettant la reconnaissance du PAG.

Au cours de l'activation, d'autres acteurs interviennent pour réguler ce mécanisme. Ainsi, la petite GTPase RhoB permettrait de coordonner la mobilité intracellulaire des BTN, favorisant l'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$. Cependant l'utilisation en clinique des LT $V\gamma 9V\delta 2$ est complexe et leur action reste limitée. Il est donc nécessaire d'approfondir la compréhension de l'implication de RhoB dans ce mécanisme afin d'améliorer l'efficacité des immunothérapies utilisant les LT $V\gamma 9V\delta 2$.

STUDY OF THE INVOLVEMENT OF THE RHOB PROTEIN DURING THE ACTIVATION OF $\gamma\delta$ T CELLS IN A MODEL OF LUNG CANCER

Immunotherapy is a new therapeutic approach to stimulate the patient's immune system to strengthen its defenses against cancer cells. There are different types of immunotherapies, including adoptive cell transfer, which has been the subject of numerous studies.

In this approach, $V\gamma 9V\delta 2$ T cells are interesting candidates since they have numerous effector functions without the need for restriction by MHC molecules. These unconventional T cells are major players in anti-tumor immunity. They are activated by non-peptide antigens called phosphoantigens (PAGs), which can be accumulated *in situ* by pharmacological molecules such as aminobiphosphonates. The activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is mediated by various proteins, in particular the butyrophilins (BTN) BTN2A1 and BTN3A1, forming a complex around the $V\gamma 9V\delta 2$ TCR and allowing recognition of PAG.

During the activation, other actors operate to regulate this mechanism. Thus, the small GTPase RhoB would coordinate the intracellular mobility of BTNs, promoting the activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. However, the clinical use of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is complex and their action remains limited. It is therefore necessary to deepen the understanding of the involvement of RhoB in this mechanism in order to improve the effectiveness of immunotherapies using $V\gamma 9V\delta 2$ T cells.

MOTS CLES : Lymphocytes T $\gamma\delta$, RhoB, Cancer, phosphoantigènes, Immunothérapie

DISCIPLINE : INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R.

Université de Bordeaux – U.F.R. Sciences Pharmaceutique
14 rue du Dr. Hoffmann Martinot, 33000 Bordeaux