



HAL
open science

Modalité d'activation des lymphocytes T g9d2 humains

Allain-Maillet Sophie

► **To cite this version:**

Allain-Maillet Sophie. Modalité d'activation des lymphocytes T g9d2 humains. Biologie moléculaire. 2006. hal-01360922

HAL Id: hal-01360922

<https://ephe.hal.science/hal-01360922>

Submitted on 6 Sep 2016

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.

MINISTERE DE LA JEUNESSE, L'EDUCATION NATIONALE ET DE LA
RECHERCHE.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences et Vie de la Terre

MEMOIRE
Présenté par

Sophie ALLAIN-MAILLET

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratiques des Hautes Etudes.

Modalités d'activation des lymphocytes T g9d2 humains.

Soutenu le 6 Décembre 2006, devant le jury suivant :

M. CANQUE Bruno –Président du jury
M. BETTAÏEB Ali - Rapporteur
M. SCOTET Emmanuel - Examineur
M. JOSIEN Régis - Examineur

DIRECTEUR EPHE : JEANNIN Jean-François
Université de Bourgogne

INSERM U517
Laboratoire EPHE d'immunologie et
immunothérapie des cancers
7 Bd Jeanne d'Arc
21000 Dijon

Directeur Scientifique: Bonneville Marc
Institut de biologie
INSERM U601- Département de cancérologie
9 quai Moncoussu
44093 NANTES

MODALITES D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T g9d2 HUMAINS

RESUME

Les lymphocytes T g9d2 représentent la majeure population des LT gd circulant dans le sang périphérique chez l'Homme adulte. Ce sont des cellules cytotoxiques impliquées dans la réponse immunitaire contre de nombreux pathogènes et contre les cellules tumorales. Ils reconnaissent des antigènes solubles, non-peptidiques, de faible masse moléculaire : des intermédiaires de la voie de synthèse des isoprénoïdes appelés phosphoantigènes. Les aminobisphosphonates permettent l'accumulation de ces intermédiaires phosphoantigéniques dans de nombreuses cellules. Les LT g9d2 reconnaissent également des antigènes membranaires comme le complexe apolipoprotéine A1 ATPsynthase (présent sur de nombreuses cellules tumorales). On attribue aux LT g9d2 une implication directe dans le contrôle immunitaire des cancers et des infections grâce à leurs réactivités anti-tumorales et contre de nombreux pathogènes, à leur capacité à produire des cytokines inflammatoires et à leur activité cytotolytique et bactéricide.

Les modalités précises d'activation des LT g9d2 humains par les phosphoantigènes ne sont pas encore totalement connues. Nous avons mis en évidence la potentialisation de la réponse lymphocytaire T g9d2 par les cellules dendritiques (DC). En effet, les LT g9d2 répondent mieux aux phosphoantigènes, endogènes ou exogènes, en présence de cellules dendritiques (contrairement aux autres cellules présentatrices d'antigènes), et ce, avec un contact entre les deux types cellulaires. Nous avons vu que les DC immatures potentialisent mieux la réponse cytokinique (Th1 et Th2) des LT g9d2 que les DC matures, mais qu'elles n'influencent pas la réponse cytotoxique ou la prolifération. Aux faibles doses d'antigène, les DCi stimulent les LT g9d2 pour qu'ils produisent les cytokines nécessaires à leur propre maturation (complète) sans toutefois provoquer leur lyse, leur permettant ainsi d'activer d'autres cellules immunitaires. Notons également que les LT g9d2 n'induisent pas la maturation des DC environnantes ne présentant pas de phosphoantigènes. De plus, nous avons mis en évidence une réponse spécifique des LT g9d2 vis-à-vis de cellules dendritiques infectées par des mycobactéries (production de cytokines, prolifération), où seules les DC infectées ayant rencontré les LT g9d2 deviennent matures (maturation complète). Cependant nous avons observé une fenêtre de temps très courte entre l'infection des DC et l'activation efficace des LT g9d2. Des résultats préliminaires laissent penser que la voie de synthèse des isoprénoïdes est perturbée dans les DC infectées par le BCG.

En conclusion, la capacité des DC immatures à potentialiser sélectivement les réponses mémoires des LT g9d2 souligne l'effet adjuvant de ces lymphocytes et peut-être d'autres cellules mémoires naturelles ou de lymphocytes T conventionnels.

Mots-clés : Lymphocytes T g9d2 humains, cellules dendritiques, phosphoantigènes, mycobacterium tuberculosis.

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS..... 6

INTRODUCTION..... 7

I-LES LYMPHOCYTES T g9d2 HUMAINS.....	7
1. L'immunité lymphocytaire T / Généralités.....	7
2. Les lymphocytes T « innate-like » humains : NKT et LT g9d2.....	9
3. Le récepteur T gd.....	10
4. La sous-population g9d2.....	11
5. Propriétés fonctionnelles.....	12
5.1. Cytokines.....	12
5.2. Lyse des cellules cibles.....	13
5.3. Prolifération.....	14
6. Les récepteurs NK (NKR).....	14
7. Spécificités antigéniques des lymphocytes T g9d2 humains.....	15
7.1. Antigènes solubles.....	15
7.2. Modulation des voies métaboliques des isoprénoïdes.....	17
7.3. Structure et activité biologique des phosphoantigènes.....	18
7.4. Autres ligands : l'ATPsynthase.....	18
8. Contexte de reconnaissance des phosphoantigènes par les LT g9d2.....	18
II-LES CELLULES DENDRITIQUES.....	22
1. Sous-populations et phénotypes des cellules dendritiques.....	22
2. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes du sang périphérique.....	22
3. Coopération lymphocytes T / DC.....	25
III-LES MYCOBACTÉRIES :Modèle <i>M.bovis</i> BCG (M.BCG).....	27
1. Rappel sur les mycobactéries.....	27
2. Tuberculose humaine.....	28
2.1. Souches bactériennes / souche atténuée.....	28
2.2. Processus d'infection.....	29
2.3. Cibles cellulaires et échappement.....	29
2.4. Réponse lymphocytaires T et échappement.....	30
3. Mycobactéries et LT g9d2.....	31
QUESTIONS ABORDEES.....	33

MATERIEL ET METHODES.....

I-ANTICORPS ET REACTIFS.....

II-MISE EN PLACE DES OUTILS DE NOTRE MODELE D'ETUDE.

1. Obtention des LT g9d2.....
2. Obtention des cellules dendritiques immatures et matures.....

III-TECHNIQUES UTILISEES POUR LES TESTS FONCTIONNELS

1. Phénotypage des cellules.....
2. Détection des cytokines.....
 - 2.1. Marquage intracytoplasmique..... **Signet non défini.**
 - 2.2. Dosage dans les surnageants de culture..... **Signet non défini.**
3. Test de cytotoxicité au chrome⁵¹.....
4. Mesure de la prolifération.....
5. Inserts de culture type Transwell^a.....
6. Vidéomicroscopie.....

IV-LES MYCOBACTERIES.....

1. Les souches de M.BCG.....
2. La culture du M.BCG.....

RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....

Problématique.....

1^{ère} PARTIE : POTENTIALISATION DES LT g9d2 PAR LES CELLULES DENDRITRIQUES DANS LE CONTEXTE D'UNE ACTIVATION PHOSPHOANTIGENIQUE DIRECTE.

1. Meilleures réponses cytokiniques des LT g9d2 vis-à-vis d'antigènes spécifiques en présence de cellules dendritiques (DC)
 - 1.1. Activation des LT g9d2 par des phosphoantigènes solubles purifiés. **Signet non défini.**
 - 1.2. Cas des aminobisphosphonates et des statines..... **Signet non défini.**
2. Les DC immatures sont plus efficaces que les DC matures.....
 - 2.1. Effet des molécules utilisées sur l'état de maturation des DC. **Signet non défini.**
 - 2.2. Activation des LT g9d2 en présence de DCi ou de DCm. **Signet non défini.**
3. Effets des DC sur les fonctions cytolytiques des LT g9d2.....
4. Ce phénomène est-il observé au sein de PBMC ?.....
5. La potentialisation cytokinique observée avec les DC concerne-t-elle uniquement les cytokines pro-inflammatoires?
6. Ces fonctions spécifiques des DC sont-elles valables uniquement pour LT g9d2 ?
7. Effets sur la prolifération des LT g9d2.....
8. Réponses calciques et cinétique de production des cytokines des LT g9d2 activés par les phosphoantigènes.
9. Quelle est l'importance du contact entre les deux cellules partenaires ?
10. Effet réciproque de l'activation des LT g9d2 sur les DC.....
11. Conclusion générale de la première partie.....

2^{ème} PARTIE : DIALOGUE ENTRE LES LT g9d2 ET LES CELLULES DENDRITRIQUES LORS D'UNE INFECTION à MYCOBACTÉRIES M.BCG.

1. Détermination des conditions optimales d'infection des cellules dendritiques.
 - 1.1. Infection des DC par le M.BCG-EGFP..... **Signet non défini.**
 - 1.2. Réponse des LT g9d2 aux DC infectées..... **Signet non défini.**
 - 1.3. Les réponses cytolytiques des LT g9d2 vis-à-vis de DC infectées par le M.BCG ? **Signet non défini.**
2. Activation des LT g9d2 de PBMC en présence de DC autologues infectées par le M.BCG.
3. Etat de maturation des DC infectées par le M.BCG, rôle des LT g9d2.

3^{ème} PARTIE : MECANISMES D'ACTIVATION DES LT g9d2 PAR LES CELLULES DENDRITRIQUES INFECTÉES PAR M.BCG, et mécanismes d'échappements des mycobactéries à la

réponse des LT g9d2.

1. Y-a-t-il des signaux solubles activateurs transmis par les DC infectées par le M.BCG aux LT g9d2 ?
2. Echappement du M.BCG à la réponse immunitaire.....
3. Effets des statines sur l'activation des LT g9d2 par des DC infectées par le M.BCG.

DISCUSSION.....

BIBLIOGRAPHIE..... 34

ANNEXE.....

-

ABBREVIATIONS

-

ABP: Aminobisphosphonates
ADN: Acide Déoxyribonucléique
APC: Allophycocyanine
ApoA1: Apolipoprotéine A1
AS: ATP synthase
BCG: Bacille bilié de Calmette et Guérin
BCR: *B Cell Rreceptor*
BFA: Bréfeldine A
BrHPP: Bromohydrine Pyrophosphate
CD: *Cluster of Differentiation*
CDR3: *Complementary Determining Region 3*
CFSE: Carboxyfluorescéine Diacétate, Succinimidyl Ester
CMF: Cytométrie en Flux
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNA: Cellules Non-Adhérentes
CPA: Cellules Présentatrices de l'Antigène
DC: *Dendritic cells*
DCi: Cellule Dendritique immature
DCm: Cellule Dendritique mature
DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific ICAM 3-Grabbing Non-integrin*
DMAPP: *Diméthylallyl Pyrophosphate*
EBV: *Epstein-Barr Virus*
EGFP: *Enhanced Green Fluorescent protein*
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FBPP: *Formyl-Butyl Pyrophosphate*
FITC: Fluorescéine Isothiocyanate
GM-CSF: *Granulocyte-macrophage ColonyStimulating Factor*
HDMAPP: *Hydroxydimethyl Allyl Pyrophosphate*
HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HLA: *Human Leukocytes Antigen*
HMBPP: voir HDMAPP
HMG-CoA: *Hydroxy-Méthyl-Glutaryl Co-enzyme A*
ICAM-1: *Intracellular Adhesion Molecule*
IFN-g: Interféron-gamma
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
IPP: *Isopentenyl Pyrophosphate*
LB: Lymphocytes B
LFA: *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*
LPS: Lipopolysaccharide
LT: Lymphocytes T
M.BCG: *mycobacterium bovis BCG*
M.tub: *Mycobacterium tuberculosis*
MICA: *CMH-I Related Protein A*
NK: *Natural Killer*
NKR: *Natural Killer Receptor*
NKT: *Natural Killer T cell*
Pam: Pamidronate
PAMPs: *Pathogen Associated Molecular Patterns*
PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
PC5: *Phycoérythrine-Cyanine 5*
PE: *Phycoérythrine*
PFA: *Paraformaldéhyde*
PHA: *Phytohémagglutinine*
PMA: *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*
Poly (I:C): *Polyinosinic : polycytidylic acid*
Snarf-1: *Semi-naphtorhodafluor-1*
TCR: *T Cell Receptor*
TGF-b : *Transforming Growth Factor-b*
TLR: *Toll Like Receptor*
TNF-a: *Tumor Necrosis Factor-alpha*
TUBag: *TuberculosisAantigen*

INTRODUCTION

-

-

I-LES LYMPHOCYTES T g9d2 HUMAINS.

1. L'immunité lymphocytaire T / Généralités.

Les réponses immunitaires mises en jeu lors de l'entrée d'un pathogène dans l'organisme (figure 1, face à page 6), sont diverses. Deux types de réponses immunitaires peuvent être mises en jeu lors d'une infection :

- la réponse immunitaire innée (ou non spécifique) mettant en jeu des mécanismes d'élimination des pathogènes de manière générale par les phagocytes (polynucléaires neutrophiles, macrophages) ainsi que le système du complément (système aboutissant à la lyse des cellules infectées),
- la réponse immunitaire adaptative (ou spécifique) impliquant les lymphocytes T naïfs portant le TCR (*T Cell Receptor*) spécifique des antigènes de l'agent infectieux et les LT mémoires ayant déjà rencontré le pathogène lors d'une infection antérieure ; aboutissant également à l'élimination des cellules infectées.

Les lymphocytes du sang périphérique humain représentent 25 à 35% des globules blancs qui supportent une majeure partie de système immunitaire. Ils sont issus de progéniteurs hématopoïétiques de la lignée lymphoïde. Ils se divisent en trois catégories : les lymphocytes B (LB), les lymphocytes T (LT) et les *natural killer* (NK). Les lymphocytes T sont largement impliqués dans l'immunité cellulaire permettant la destruction et l'élimination des pathogènes. Ils expriment à leur membrane un TCR composé de chaînes α et β ou γ et δ . Les LT $\alpha\beta$ se divisent en deux populations majoritaires : les LT auxiliaires ($CD4^+$) et les LT cytotoxiques ($CD8^+$).

La spécificité antigénique des lymphocytes T est apportée par le TCR qu'ils portent à leur surface. Ce récepteur est un hétérodimère, ancré dans la membrane plasmique des cellules, constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β ou des chaînes γ et δ . Le TCR, qu'il soit $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, est composé de deux chaînes polypeptidiques de type immunoglobuline (Ig), chacune étant elle-même composée de deux domaines :

- le domaine N-terminal est le plus externe. Il est extrêmement variable d'un lymphocyte T à un autre et est responsable de la reconnaissance de l'antigène.

- le domaine C-terminal est plus proche de la membrane cellulaire. Pour une chaîne donnée (α , β , γ ou δ), ce domaine est identique d'un lymphocyte T à l'autre : on dit que ce domaine est « constant ». Il se prolonge par une courte séquence hydrophobe d'une vingtaine d'acides aminés qui assurent l'ancrage de la chaîne protéique dans la membrane cellulaire, et par un très court segment intracytoplasmique.

Le TCR est par ailleurs très étroitement associé au CD3, qui est un complexe multiprotéique (ϵ , δ et ζ), dont la fonction est de transmettre un signal d'activation au lymphocyte T lorsque le TCR est stimulé. Cette activation est réalisée grâce aux motifs ITAM (*Immuno Tyrosine based Activation Motif*), qui jouent un rôle primordial dans la transduction du signal en activant, une fois phosphorylés, des tyrosines kinases spécifiques et en initiant la cascade d'activation.

Un des éléments de la diversité du TCR est le résultat d'un phénomène de réarrangement génique au niveau des locus des chaînes du TCR. Un phénomène similaire de réarrangement génique,

à l'origine de la diversité des immunoglobulines, se déroule au niveau des lymphocytes B. Comme dans le cas des gènes des immunoglobulines, les segments géniques séparés V, (D) et J se réarrangent lors de la maturation des cellules T pour former des gènes fonctionnels qui codent pour les chaînes du récepteur des cellules T (Garcia, Teyton et al. 1999).

Le TCR reconnaît l'antigène présenté dans une configuration particulière à la surface d'une autre cellule. Il reconnaît des molécules, généralement peptidiques, issues de la dégradation des pathogènes et lié à une molécule du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), on parle d'antigène apprêté.

Les LT sont aussi caractérisés au niveau fonctionnel par les cytokines qu'ils produisent après activation antigénique. Brièvement, les lymphocytes T de type Th1 sécrètent principalement des cytokines pro-inflammatoires, comme l'interféron-g (IFN-g), qui sont impliqués dans les processus de contrôle de l'infection. Les LT de type Th2 qui produisent principalement de l'IL-4, participent à la réponse humorale en favorisant la production d'anticorps par les LB. Quant aux lymphocytes T cytotoxiques, ils lysent les cellules tumorales ou infectées ainsi que les pathogènes qu'elles contiennent par les voies perforine/granzyme, granulysine, Fas/FasL...

Nous nous intéressons au laboratoire à certaines sous-populations de lymphocytes T humains périphériques : les LT gd et les NKT (*Natural Killer T cells*) dont les caractéristiques et les fonctions particulières les placent à l'interface de l'immunité innée et acquise.

2. Les lymphocytes T « innate-like » humains : NKT et LT g9d2.

Récemment, plusieurs sous-populations lymphoïdes T exprimant des TCR ab ou gd ont été identifiées, capables de reconnaître des antigènes conservés de nature chimique variée (glycolipides esters pyrophosphatés, ...), tantôt sous forme native ou en association avec des molécules monomorphes apparentées aux molécules d'histocompatibilité (Bendelac, Bonneville et al. 2001).

Les lymphocytes NKT ont la particularité d'exprimer un TCR ab « invariant » Va24inv/Vb11. Ils reconnaissent des glycolipides présentés par une molécule d'histocompatibilité très conservée : le CD1d, qui a une structure apparentée aux CMH I classiques. Ils sont recrutés très activement sur des sites inflammatoires aigus induits par des infections bactériennes ou directement par des glycolipides bactériens. Ils migrent vers les sites d'inflammation aiguë. Les lymphocytes NKT produisent de l'IL-4 et de l'IFN-g après activation antigénique sans sensibilisation antérieure, d'où leur positionnement à l'interface de l'immunité innée et adaptative.

Les LT gd sont faiblement représentés dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, plaques de Peyer) mais peuvent être prédominants dans certains sites épithéliaux : on parle de lymphocytes intra-épithéliaux. Dans le sang périphérique adulte les LT gd représentent 1 à 5 % des lymphocytes T totaux. Les travaux réalisés dans le modèle murin montre que les LT gd apparaissent en plusieurs vagues d'émigrations thymiques distinctes, avant les LT ab

(Hayday 2000). Les LT ab et gd ont des progéniteurs communs mais se développent de manière indépendante. Des modèles murins (transgénèse) ont suggéré l'existence d'une sélection thymique négative et positive des LT gd qui paraît cependant moins drastique que la sélection des LT ab. Cet aspect est cependant compensé par des mécanismes de sélection extra-thymique comme l'anergie fonctionnelle. Avant la naissance, ce sont les LT g1/d1 qui sont majoritaires, mais la tendance s'inverse au cours de l'enfance jusqu'à la prédominance de la recombinaison g9/d2 chez l'adulte (également appelée g2/d2 dans la littérature, selon la nomenclature choisie). D'autres populations de lymphocytes T gd peuvent devenir majoritaires comme les LT g3/d3 dans certains cas pathologiques, mais leur connaissance reste limitée (Kabelitz, Hinz et al. 1997).

Les LT gd sont retrouvés dans d'autres espèces (oiseaux, ruminants, souris, primates non-humains). Chez la souris, les LT gd sont présents mais leurs caractéristiques et leurs fonctions sont souvent différentes des LT gd humains, ce qui ne permet pas de rapprocher les études murines et humaines de manière systématique. C'est chez les singes (*Macaca fascicularis*) que les LT gd sont les plus proches de ceux de l'Homme, ce qui peut permettre quelques études approfondies ou même des essais pré cliniques (Daubenberger, Salomon et al. 2001; Sicard, Ingoure et al. 2005).

3. Le récepteur T gd.

Le clonage des chaînes g et d du TCR et la connaissance de leur structure primaire, classe le TCR gd dans la superfamille des immunoglobulines et laisse supposer une structure quaternaire proche de celle du TCR ab. Comme le TCR ab, le TCR gd est associé aux molécules CD3 et aux chaînes z. L'existence de plusieurs segments d'ADN différant par leur nombre d'exons se traduit par la possibilité d'exprimer différents TCR (14 gènes g dont 6 sont fonctionnels et environ 10 chaînes d), notamment les sous-populations exprimant g1 ou g9 et d1, d2 ou encore d3. La diversité théorique du TCR gd est plus faible en comparaison à celle du TCR ab si on considère le nombre d'éléments V(D)J disponibles. Cependant, cet aspect est compensé par une forte diversité jonctionnelle. Les LT gd, auxquels nous nous intéressons plus particulièrement ici expriment une combinaison particulière des régions variables du TCR : l'association entre g9 et d2.

4. La sous-population g9d2.

Les LT exprimant les chaînes du TCR g9 et d2, auxquels l'équipe dirigée par Marc Bonneville s'intéresse depuis de nombreuses années, représentent environ 1 à 5% des lymphocytes T du sang périphérique de l'adulte (Lanier, Ruitenberg et al. 1988; Groh, Porcelli et al. 1989) mais plus de 90% des LT gd totaux périphériques. Les principales caractéristiques des lymphocytes T g9d2 résident dans l'expression d'un TCR unique et conservé et l'absence des co-récepteurs de CD4 et CD8 qui sont habituellement très impliqués dans la réponse immunitaire. Le TCR g9d2 est unique car il se compose toujours des mêmes chaînes g et d, et est conservé inter-espèces ; par exemple, les LT g9d2 des singes *Macaca fascicularis* ont une spécificité antigénique et des fonctionnalités très similaires à

leur contre-partie humaine, caractéristique qui n'est pas retrouvée chez la souris. Les lymphocytes T g9d2 partagent de nombreux marqueurs constitutifs avec les LT ab, entre autres CD2, CD3, LFA-1, LFA-3, CD95/Fas, récepteurs aux chimiokines, CD25, HLA-DR. Les LT g9d2 expriment également des marqueurs d'activation dont l'expression est induite comme le CD16.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les LT g9d2 jouent un rôle important dans la protection de l'organisme contre de nombreux pathogènes et tumeurs de part leur spécificité, leur fréquence, leur localisation et leurs fonctions effectrices. Ils reconnaissent une grande diversité d'agent infectieux et de cellules tumorales d'origine variée. En effet, les LT g9d2 sont capables de reconnaître des cellules infectées par des bactéries, des protozoaires ou des virus. Notamment, les LT g9d2 ont des réactivités reconnues contre des bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* (Holoshitz, Koning et al. 1989), *Legionella* (Kroca, Johansson et al. 2001), *Salmonella* (Hara, Mizuno et al. 1992), *Neisseria meningitidis* (Raziuddin, Mir et al. 1994) ou encore *Listeria monocytogenes* (Jouen-Beades, Paris et al. 1997). Des réactivités leur sont également attribuées contre les *Plasmodium* (Ho, Webster et al. 1990), les toxoplasmes (Scalise, Gerli et al. 1992) et contre les virus EBV et HIV (pour revue (Bonneville, 2006 #350)). Les lymphocytes T g9d2 sont également impliqués dans la défense anti-tumorale, ils reconnaissent de nombreux antigènes cellulaires tumoraux et exercent une forte activité cytotoxique, suggérant leur implication dans l'élimination des cellules cancéreuses. En effet, de nombreuses lignées de cellules tumorales sont reconnues par les LT g9d2, comme les cellules Daudi (lignée B issue d'un lymphôme) (Fisch, Malkovsky et al. 1990) ou encore la lignée RPMI-8233 (Selin, Stewart et al. 1992), des lignées lymphoblastiques T (De Libero, Casorati et al. 1991) et même des lignées d'érythroleucémies (K-562) (Di Fabrizio, Kimura et al. 1991), de carcinomes (Corvaisier, Moreau-Aubry et al. 2005) ou de mélanomes.

5. Propriétés fonctionnelles.

Comme nous l'avons vu, les LT g9d2 jouent un rôle important dans la lutte contre de nombreux pathogènes et cellules tumorales grâce à leur réactivité rapide et efficace. Bien que leurs rôles semblent important dans différentes pathologies, la réponse des LT g9d2 est intégrée dans l'immunité à médiation cellulaire globale mise en œuvre lors d'une infection. En réponse aux cellules reconnues, les LT g9d2 : (i) produisent beaucoup de cytokines, (ii) peuvent lyser leurs cellules cibles et (iii) prolifèrent largement en présence d'IL-2 exogène.

5.1. Cytokines.

La production de cytokines par les LT g9d2 est remarquablement importante dans l'immunité contre les pathogènes. Ils ont la possibilité de produire, après activation antigénique des doses élevées de cytokines, notamment des interleukines (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5), du TNF- α , de l'IFN- γ , du GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) ou encore du TGF- β (*Transforming*

Growth Factor-b) (Wesch, 2001 #351; Otto, 2005 #197). On peut distinguer trois types de profil de sécrétion:

- les cellules T g9d2 de type Th1, qui produisent beaucoup d'IFN-g et peu d'IL-4,
- les cellules T g9d2 de type Th0, qui produisent autant d'IFN-g que d'IL-4
- les cellules T g9d2 de type Th2, qui produisent très peu d'IFN-g et beaucoup d'IL-4.

Lors d'une stimulation antigénique, environ 25% des LT g9d2 ont un profil Th1 avec une forte sécrétion d'IFN-g, de TNF-a et de GM-CSF ; mais très peu (<5%) produisent de l'IL-4. Les LT g9d2 produisent peu d'IL-2, ce qui nécessite un apport d'IL-2 exogène pour induire leur expansion. Ceci est en adéquation avec les effets directs de LT g9d2 dans le cadre d'une infection bactérienne. En effet, l'IFN-g est une cytokine pro-inflammatoire importante dans la réponse immunitaire : augmentation des molécules de présentation antigénique sur les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) (CMH I et II) et favorise l'activité des NK. De manière synergique, le TNF-a renforce l'activité cytotoxique des cellules, augmente l'adhésivité de l'endothélium vasculaire pour les lymphocytes (ce qui favorise la migration des lymphocytes vers les ganglions) et favorise également la surexpression de CMH I et II sur les macrophages.

5.2 Lyse des cellules cibles.

En plus d'une production importante de cytokines, les LT g9d2 sont hautement cytotoxiques, ils lysent les cellules qui leur présentent des antigènes non-peptidiques (Lang, Peyrat et al. 1995). En effet, les LT g9d2 sont programmés pour proliférer et tuer les cellules infectées par une grande diversité de bactéries (Dagna, Iellem et al. 2002; von Lilienfeld-Toal, Nattermann et al. 2006); ils tuent également les mérozoïtes des *plasmodium* et les cellules tumorales. Pour cela, les LT g9d2 utilisent deux voies (Oliaro, Dudal et al. 2005): la voie perforine-granzyme (Mami-Chouaib, Flament et al. 1996) et la voie Fas/FasLigand (Dieli, Troye-Blomberg et al. 2000; Dalton, Howell et al. 2004). En outre, les LT g9d2 ont la capacité de détruire des pathogènes extracellulaires et intracellulaires comme *Mycobacterium tuberculosis* par dégranulation de granulysine et perforine (Dieli, Troye-Blomberg et al. 2001). L'activité cytotoxique de ces LT est modulée par l'expression de multiples récepteurs NK (lectines type-C et superfamille des Ig) fonctionnels chez les LTg9d2. Ils peuvent aussi bien inhiber la reconnaissance des antigènes non-peptidiques de cellules infectées ou de cellules tumorales que stimuler la production d'IFN-g (Poccia, Cipriani et al. 1997).

5.3 Prolifération.

De nombreux pathogènes induisent l'amplification des LT g9d2. Lors d'infections bactériennes, les LT g9d2 peuvent représenter jusqu'à 25% des LT du sang périphérique, notamment dans l'infection par les mycobactéries (Holoshitz, Koning et al. 1989) ou par *Neisseria meningitidis* (Raziuddin, Mir et al. 1994). Certains parasites induisent également une amplification importante des LT g9d2 comme les *Plasmodium* (Ho, Webster et al. 1990). Par contre, les virus n'induisent qu'une réponse limitée des LT g9d2 et ont peu d'influence sur leur prolifération (Poccia, Agrati et al. 2005). Par exemple, dans le cadre d'une infection par le HIV, des études montrent une augmentation brève

des LT g9d2 suivi d'une déplétion complète.

L'amplification des LT g9d2 *in vivo* a été observée lors d'essais pré-cliniques et cliniques réalisés chez le primate et des patients atteints de cancers. L'administration d'agonistes synthétiques non-peptidiques à différentes doses, à plusieurs reprises et l'injection simultanée de petites doses d'IL-2, induit une prolifération spécifique des LT g9d2 dans le sang périphérique (Sicard, Ingoure et al. 2005). Cette étude est potentiellement prometteuse pour des traitements anti-cancéreux.

6. Les récepteurs NK (NKR).

Les LT g9d2 matures expriment à leur surface des récepteurs NK activateurs ou inhibiteurs de signaux (les LT g9d2 du sang de cordon ou du thymus n'en n'expriment pas) (Meissner, Radke et al. 2003). Ces récepteurs NK regroupent trois catégories de molécules: les lectines de type-C, des molécules apparentées aux immunoglobulines et les hétérodimères CD94/NKG2x (*NK gene 2*). Les NKR reconnaissent des molécules CMH I. Les NKR activateurs (KAR) sont associés à la protéine transmembranaire DAP12 et transduisent les signaux activateurs.

Alors que seulement 7% des LTab expriment au moins un NKR à sa surface, plus de 70% des LT d2 expriment un ou plusieurs NKR. Ceci leur permet un bon contrôle de leurs activités effectrices ou mémoires. 60 à 80 % des LT g9d2 expriment l'hétérodimère inhibiteur CD94/NKG2A (Halary, Peyrat et al. 1997) et autant expriment NKG2D (activateur) (Bauer, Groh et al. 1999). NKG2D reconnaît les ligands MICA (*CMH-I related protein A*). Chez la souris comme chez l'homme, la liaison de NKG2D avec MICA induit la fonction cytotoxique des LTg9d2, la production de cytokines (TNF- α) ou encore l'augmentation de l'expression de CD25 et CD69 (marqueurs d'activation des LT). Cette activation est abrogée lors du blocage de NKG2D par un anticorps monoclonal (Rincon-Orozco, Kunzmann et al. 2005). Des données récemment obtenues dans le laboratoire suggèrent que le récepteur inhibiteur ILT2 qui est exprimé par les LT g9d2 joue un rôle critique dans le contrôle de l'activation antigénique.

Ces récepteurs NK permettent de faire la différence entre une cellule saine et une cellule infectée, activée ou tumorale, ce qui est primordial pour l'équilibre de la réponse immunitaire. Il existe une balance permanente des signaux activateurs et inhibiteurs, qui est principalement assurée par CD94/NKG2D pour les LT g9d2. L'équilibre est rompu quand le LT reconnaît les épitopes présentés par les CMH I d'une cellule infectée ou tumorale et qui induisent son activation. Au contraire, lorsque l'activation doit s'arrêter, les signaux inhibiteurs prennent le dessus, jusqu'au rétablissement de l'équilibre.

7. Spécificités antigéniques des lymphocytes T g9d2 humains.

Les lymphocytes T g9d2 humains et de primates reconnaissent dans leur majorité des petits composés non-peptidiques phosphorylés, de manière TCR dépendante qui vont être détaillés ci-

dessous.

-

7.1. Antigènes solubles.

Dès la caractérisation des LT g9d2, il a été montré qu'ils reconnaissent une grande variété d'agent infectieux et de cellules tumorales. Dans les années 1990, les principaux LT g9d2 circulant dans le sang ont été associés à une réactivité vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tub*) et des lymphocytes B tumoraux (Pfeffer, Schoel et al. 1990). C'est alors qu'a émergé l'hypothèse d'antigènes de nature non-peptidique reconnus par les LT g9d2.

Rapidement, des équipes ont décrit la réactivité des LT g9d2 vis-à-vis de molécules relarguées par *M. tub.* (et bactéries associées) (O'Brien, Happ et al. 1989; Kabelitz, Bender et al. 1990). L'étude de ces fractions activatrices, séparées par chromatographies, ont abouties à l'identification de quatre fractions nommées TUBag 1 à 4 (*Tuberculosis antigen*) (Constant, Davodeau et al. 1994). Puis l'analyse de ces fractions a montré qu'elles contenaient des groupements phosphoester et pyrophosphoester (Poquet, Constant et al. 1996). Parallèlement, l'équipe de Tanaka et al. a identifié un groupe de molécules activant spécifiquement les LT g9d2, contenant également un groupement phosphate : l'isopentényl pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) (Tanaka, Morita et al. 1995). Des études moléculaires des fractions TUBag 1 à 4 ont ensuite montré que les molécules activant les LT g9d2 sont des dérivés d'IPP ou de DMAPP.

Les molécules IPP et DMAPP, dénommées phosphoantigènes, sont des intermédiaires de la voie de synthèse des isoprénoïdes. Il existe deux voies de synthèse des isoprénoïdes : (i) la voie des mévalonates, principalement dans les archéobactéries, certaines eubactéries et surtout dans les cellules eucaryotes qui aboutit notamment à la synthèse de cholestérol (Banthorpe, Charlwood et al. 1972) (figure 3, ci-contre) et (ii) la voie de Rhomer MEP ou DOXP (2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate) principalement utilisée par les eubactéries, les chloroplastes des algues et des plantes (Rohmer, Knani et al. 1993).

Physiologiquement, l'IPP est produit par les cellules procaryotes et eucaryotes normales mais sa concentration intracellulaire est insuffisante pour déclencher l'activation des LT g9d2. Lors d'une dérégulation cellulaire donnant des cellules cancéreuses par exemple, l'IPP est détecté en quantité non négligeable, ce qui favorise la reconnaissance naturelle de cellules tumorales par les LT g9d2 (Gober, Kistowska et al. 2003). En effet, la voie des mévalonates est suractivée dans les cellules tumorales pour pouvoir produire assez de stérols nécessaires à la croissance de la cellule et à l'intégrité de sa membrane. Ceci présente un avantage car la cellule est ainsi mieux repérée par le système immunitaire. De plus il n'existe pas de voie alternative de production de HMBPP dans les cellules de mammifères (Edwards and Ericsson 1999).

7.2. Modulation des voies métaboliques des isoprénoïdes.

Les phosphoantigènes sont très spécifiques des LT g9d2 : des expériences sur les PBMC ont

montré que la stimulation par ces molécules non-peptidiques phosphorylées était restreinte aux LT g9d2 (Constant, Davodeau et al. 1994; Espinosa, Belmant et al. 2001). Ces résultats ont été confirmés par des expériences de blocage du TCR à l'aide d'anticorps spécifiques et de transfert de TCR dans la lignée T Jurkat (Bukowski, Morita et al. 1995).

De manière importante, certains inhibiteurs pharmacologiques de la voie des mévalonates, comme les aminobisphosphonates (ABP) et les alkylamines, peuvent sensibiliser certaines cellules saines ou tumorales à une reconnaissance par les LT g9d2 (Thompson, 2006 #315; Kunzmann, 2000 #75; Gober, 2003 #107). Il a été démontré que ces molécules ciblent la FPP synthase, enzyme participant à la conversion de l'IPP, ce qui aboutit à une accumulation extra-physiologique de ce phosphoantigène dans les cellules. Les principaux ABP sont l'édronate, le clorodronate, le pamidronate ou encore le zolédronate. Initialement utilisés comme agents thérapeutiques pour limiter les remaniements osseux associés à certaines tumeurs, l'intérêt des ABP est maintenant ré-évalué dans le traitement des cancers par stimulation des LT g9d2 (Wilhelm, 2003 #352).

A l'inverse, les composés pharmacologiques de la famille des statines bloquent la HMG-CoA réductase, par conséquent inhibent la synthèse d'IPP. En pharmacologie, ces molécules sont utilisées comme hypolipémiants pour abaisser la cholestérolémie (pour revue (Arnaud, Veillard et al. 2005)). L'atorvastatine et la mévastatine sont deux molécules appartenant à cette famille et facilement disponibles chez des fournisseurs de molécules chimiques de synthèse. Dans notre modèle d'étude, ces molécules nous permettent de bloquer la voie des mévalonates pour inhiber totalement la présence des intermédiaires comme l'IPP ou le HMBPP dans les cellules traitées (Hewitt, Lissina et al. 2005).

7.3. Structure et activité biologique des phosphoantigènes.

De nombreux phosphoantigènes synthétiques sont dorénavant produits à large échelle, dans des conditions GMP, notamment par la société InnatePharma, comme le Bromohydrine Pyrophosphate (BrHPP) (Espinosa, Belmant et al. 2001).

Les phosphoantigènes les plus puissants pour activer les LTg9d2 sont produits par la voie DOXP (micro-organismes). Parmi ceux-ci, le HDMAPP est actif à une concentration de 0,1 nM. Les métabolites de la voie des mévalonates (eucaryotes), comme l'IPP, sont 10 000 fois moins puissants. La forte bioactivité des composés microbiens, produits à de très faibles quantités, permet alors une capacité de détection de quelques micro-organismes pathogènes par les LT g9d2.

7.4. Autres ligands : l'ATP synthase.

Nous avons récemment montré que les cellules Tg9d2 reconnaissent un complexe composé de l'apolipoprotéine A1 et de l'ATP synthase (AS) qui est un complexe multimérique normalement présent dans la membrane interne mitochondriale et qui est parfois présent à la surface des cellules tumorales reconnues par les LT g9d2 (Scotet, Martinez et al. 2005). La contribution réelle de l'apoA1

n'est pas élucidée. Nous savons toutefois que l'apoA1 n'est pas suffisante à elle seule pour induire l'activation des LT g9d2. Comme nous l'avons montré au laboratoire dans un système acellulaire avec des billes recouvertes d'apoA1 et/ou d'AS, l'apoA1 doit être complexé à l'AS pour induire l'activation des LT g9d2. Les mécanismes de translocation du complexe apoA1-AS à la surface des cellules tumorales reste toutefois méconnu. Le lien potentiel entre les phosphoantigènes et l'AS reste encore à démontrer.

8. Contexte de reconnaissance des phosphoantigènes par les LT g9d2.

Les modalités précises de reconnaissance des phosphoantigènes par les LT g9d2 restent peu claires. Diverses études ont cependant ébauché les mécanismes mis en jeu (Espinosa, Belmant et al. 2001) et une implication du TCR a été clairement démontrée.

En 1993, notre laboratoire a décrit la spécificité des LT g9d2 plus en détail (Davodeau, Peyrat et al. 1993). Bien que l'activation des LT g9d2 par les phosphoantigènes survienne dans les secondes qui suivent l'exposition antigénique, celle-ci nécessite un contact entre les cellules présentatrices et les LT g9d2 (Lang, Peyrat et al. 1995; Morita, Beckman et al. 1995). Les phosphoantigènes pourraient alors être reconnus en association avec des molécules membranaires qui, sur la base de nombreux travaux, seraient distinctes des molécules du CMH classiques ou non-classiques. En effet, grâce à l'utilisation d'anticorps, notre laboratoire a décrit que les molécules du CMH de classe I et II ainsi que les CD1 a, b et c n'interviennent pas dans cette reconnaissance (Lang, Peyrat et al. 1995). Pourtant, des cellules Jurkat (naturellement dépourvues de TCR) transfectées avec les chaînes g9 et d2 ont développé une réactivité vis-à-vis d'antigènes mycobactériens et de cellules Daudi (Bukowski, Morita et al. 1995).

L'implication du TCR dans la reconnaissance de ligands solubles ou de cellules tumorales par les LT g9d2 est aujourd'hui largement acceptée bien que le mécanisme réel ne soit toujours pas démontré. La modélisation cristallographique du TCR g9d2 permet de visualiser la présence d'une cavité susceptible de recevoir des petites molécules comme les phosphoantigènes (Allison, Winter et al. 2001). En effet, la présence de résidus chargés positivement pourrait interagir avec les groupements phosphate. Il est également possible que la boucle CDR3 de la chaîne d du TCR interagisse avec la portion hydrophobe des phosphoantigènes. Les essais de co-cristallisation du TCR g9d2 avec ses ligands phosphorylés ont échoué (Rudolph, Wingren et al. 2004). Il existe plusieurs hypothèses permettant d'expliquer la réactivité des LT g9d2 envers les phosphoantigènes : (i) ils pourraient être directement reconnus sous forme native ou modifiée, (ii) ils pourraient être présentés par des molécules exprimées à la surface des cellules cibles (ex. ATP synthase) ou (iii) ils pourraient induire la modification ou l'expression de molécules qui, présentes à la surface des cellules cibles, seraient alors reconnues par les LT g9d2.

La majorité des études sur ce sujet vont dans le sens d'une présentation indépendante du CMH mais où un contact cellulaire est nécessaire. L'IPP et les autres phosphoantigènes n'ont pas besoin d'être internalisés par les CPA pour être présentés au LT g9d2 (Morita, Beckman et al. 1995) ;

contrairement aux aminobisphosphonates qui sont internalisés pour atteindre leur cible intracellulaire (enzyme de la voie des mévalonates) et stimuler correctement les LT g9d2 (Gober, Kistowska et al. 2003).

Lorsqu'elles sont incubées en présence de phosphoantigènes solubles (IPP), les cellules T g9d2 voient leur acidification augmenter dès les premières minutes de contact (microphysiométrie) et commencent à sécréter du TNF-a après 30 minutes, ce qui suggère que le TCR est rapidement engagé par ces agonistes (Sireci, Espinosa et al. 2001). Cependant, de manière surprenante, les signaux intracellulaires (phosphorylation de ERK et de MAPK), délivrés après engagement du TCR sont très retardés dans ces conditions en comparaison à une stimulation de ces cellules par un anticorps anti-CD3 (Lafont, Liautard et al. 2001). Les modalités précises de transduction du signal TCR après activation par des phosphoantigènes restent donc encore largement méconnues.

Les travaux de l'équipe de Fournié (Espinosa, Tabiasco et al. 2002; Favier, Espinosa et al. 2003) montrent clairement que les LT g9d2 établissent une synapse immunologique mature avec des cellules myélo-monocytaires (lignée tumorale THP1) en présence de phosphoantigènes. Cette synapse est caractérisée par un enrichissement en molécules de TCR, en CD2 et en tyrosines phosphorylées. Les co-récepteurs activateurs CD94 et NKG2D sont également présents dans cette synapse immunologique. L'activation des LT g9d2 et la production de cytokines sont couplées à la formation de la synapse. La formation d'une synapse immunologique a été formellement démontrée aussi bien pour les antigènes membranaires que pour les antigènes solubles (Espinosa, Tabiasco et al. 2002).

Le rôle des molécules d'adhésion dans l'activation des LT g9d2 a aussi été analysé. Il a été montré que ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*) participe activement à ce processus (Kato, Tanaka et al. 2003; Corvaisier, Moreau-Aubry et al. 2005). ICAM-1 est exprimé à la surface de cellules présentatrices d'antigènes et se lie à son ligand appelé LFA-1 qui est fortement exprimé par les LT g9d2. En effet, les expériences menées par ces équipes montrent que des cellules tumorales traitées au pamidronate (donc accumulant beaucoup d'IPP) sont capables d'activer efficacement les LT g9d2 seulement lorsqu'elles expriment fortement ICAM-1.

Les modalités précises d'activation des LT g9d2 par des phosphoantigènes, qu'ils soient solubles ou exprimés par des cellules tumorales ou infectées, doivent encore être mieux définies afin de pouvoir comprendre la biologie de cette sous population lymphocytaire et d'envisager une manipulation des LT g9d2 et leur utilisation à terme dans le cadre d'essais immuno-thérapeutiques.

II-LES CELLULES DENDRITIQUES.

Les cellules monocytaires représentent une population cellulaire hétérogène composé des monocytes, des cellules dendritiques et des macrophages. Elles résident principalement dans le sang et les tissus périphériques et plus particulièrement sur les lieux où les contacts avec l'environnement extérieur est important (peau et muqueuses). Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules spécialisées dans l'apprêtement et la présentation d'antigènes, elles sont le prototype des cellules

présentatrices d'antigènes et jouent un rôle critique dans la réponse immunitaire. Elles se définissent d'un point de vue morphologique, phénotypique et fonctionnel.

1. Sous-populations et phénotypes des cellules dendritiques.

Dans le sang humain, les cellules dendritiques sont partagées en deux sous populations : les DC myéloïdes, $CD11c^+ CD123^{\text{faible}}$ avec une morphologie monocytique (O'Doherty, Peng et al. 1994) et les DC plasmacytoïdes, $CD123^{++} CD11c^-$ plutôt de type lymphocytaire (Olweus, BitMansour et al. 1997). Les DC myéloïdes ont des interactions avec de nombreux pathogènes (virus ou bactéries). Les DC plasmacytoïdes jouent un rôle important dans l'immunité antivirale innée et dans l'auto-immunité, elles produisent de grandes quantités IFN- α (puissant antiviral). Dans notre modèle d'étude, nous nous intéresserons uniquement aux DC myéloïdes dont les propriétés vont être décrites ci-dessous.

2. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes du sang périphérique.

Les cellules dendritiques dérivées de monocytes traversent différents stades de développement : forme de précurseur (monocyte), forme immature (DCi) puis mature (DCm) avant la mort cellulaire. Les DC sont des cellules qui ne se divisent pas et sont difficilement isolables telles quelles à partir d'échantillons ex vivo en raison de leur faible fréquence. En effet, elles circulent très peu dans le sang périphérique (environ 1% des PBMC) (Pacanowski, Kahi et al. 2001); elles sont principalement présentes dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans les épithéliums. De ce fait, les cellules utilisées *in vitro* sont obtenues par différenciation de monocytes circulant dans le sang, qui sont présents en quantité plus importante (10 à 15 % des PBMC) et dont l'isolement est plus aisé.

L'initiation de la maturation des cellules dendritiques nécessite au moins un stimuli signalant un « danger » lors d'une rencontre avec un pathogène, lors d'une inflammation ou d'une lésion tissulaire (ex : CD40ligand, TNF- α , IL-1, IL-6, lipopolysaccharides...) (Matzinger 2002). Ces signaux sont captés et transmis par des protéines transmembranaires des DC : les *Toll-like receptors* (TLR), les récepteurs de cytokines, ceux de la famille du TNF-Récepteur ou encore les récepteurs Fc. Actuellement, onze TLR différents ont été identifiés dont neuf ont des spécificités connues (pour revue (Kawai and Akira 2005)). Les cellules dendritiques portent de nombreux TLR à leur surface (figure 6, ci-contre). Ces deux états (immature et mature) correspondent à deux situations fonctionnelles distinctes. Les cellules dendritiques immatures capturent les antigènes et les apprêtent à leur membrane en association avec les molécules du CMH. Pendant ce processus, les cellules dendritiques subissent des modifications aboutissant au stade mature permettant des interactions importantes et efficaces avec les LT. La maturation des cellules dendritiques est un procédé complexe qui entraîne des changements :

- morphologiques : réorganisation du cytosquelette, apparition de dendrites caractéristiques,
- phénotypiques : augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD83, CD86) et de présentation (CMH I ou II) , augmentation de molécules d'adhésion (ICAM), et de DC-LAMP (protéine lysosomale), induction de la production de cytokines (IL-12, TNF- α , IL-15) et de chimiokines (IP-10, RANTES, MIP-1, ...),
- fonctionnels : diminution de la capacité phagocytaire, migration vers les tissus lymphoïdes (principalement les ganglions), présentation de l'antigène aux LT et LB.

Les cellules dendritiques en cours de maturation ont également une mobilité plus importante pour se rendre sur les sites privilégiés de rencontre avec les LT comme les ganglions lymphatiques et leur présenter les antigènes.

Dans les organes lymphoïdes, les DC peuvent rencontrer jusqu'à 500 lymphocytes par heure (Stoll, Delon et al. 2002; Bousso and Robey 2003). Après des contacts brefs avec beaucoup de LT, les DC sont capables d'établir des interactions stables et longues (plusieurs heures) avec une dizaine de cellules simultanément. Ces interactions induisent une prolifération importante des LT naïfs et la production massive de cytokines par les LT mémoires, ainsi que l'augmentation des marqueurs d'activation (co-récepteurs, TCR, récepteurs à l'IL-2, CD69...). Après séparation des cellules, les LT migrent rapidement et se multiplient activement, avant de sortir du ganglion par les vaisseaux efférents (Mempel, Henrickson et al. 2004). Les LT ainsi obtenus ont un caractère mémoire qui permettra une réactivation plus rapide et plus intense lors d'une infection ultérieure par le même pathogène. La bonne activation du LT par la DC dépend de beaucoup de facteurs comme la quantité d'antigène sur la DC, l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide, la durée du contact cellulaire, le stade de maturation de la DC et le type de stimulus de maturation reçu par la DC (Gett, Sallusto et al. 2003).

Les antigènes présentés par les DC peuvent être d'origine exogène (bactéries, virus, débris apoptotiques, protéines, *heat shock protein*, complexes immuns) ou endogène (synthétisés dans la cellule tel qu'une protéine ou un métabolite). Les pathogènes sont internalisés partout dans l'organisme via des récepteurs Fc, des lectines de type C ou encore des intégrines. Les cellules dendritiques fractionnent les protéines en peptides pour les charger sur les molécules du CMH (classe I ou II) puis gagnent les formations lymphoïdes secondaires pour les présenter aux LT. Les peptides endogènes sont dégradés par ubiquitination et transportés dans le réticulum endoplasmique où ils sont chargés sur des molécules CMH I. Les complexes CMH I-peptide subissent des dernières modifications dans l'appareil de Golgi avant d'être transportés à la surface des DC. Le complexe CMH I-peptide est alors présenté aux LT CD8⁺. Les pathogènes ou autres molécules exogènes phagocytées par la DC sont pré-digérées dans les vésicules endosomales puis celles-ci fusionnent avec des lysosomes qui contiennent des protéases permettant la lyse des protéines en peptides. Ces peptides sont chargés sur des molécules CMH II puis les complexes sont transportés jusqu'à la surface via des tubules pour être présentés aux LT CD4⁺ (Chow, Toomre et al. 2002). Il existe un phénomène de présentation croisée permettant la présentation de peptides d'origine exogène sur des

CMH I. Ceci est possible car certaines molécules de CMH I contiennent des signaux leur permettant de recevoir des peptides exogènes provenant des vésicules lysosomales et sont transportées ainsi à la membrane des DC (Albert, Pearce et al. 1998).

Le modèle le plus couramment utilisé en laboratoire pour réaliser des études phénotypiques et fonctionnelles des DC humaines est celui mis au point par F. Sallusto & A. Lanzavecchia (Sallusto and Lanzavecchia 1994) où les cellules dendritiques sont obtenues à partir de monocytes isolés à partir des PBMC, en présence de GM-CSF et d'IL-4. Il est également possible d'obtenir des cellules dendritiques à partir des précurseurs médullaires, mais l'isolement de ces derniers est moins aisé que celui des PBMC. Dans des conditions usuelles de culture, il faut environ 7 jours pour obtenir des cellules dendritiques (immatures). Le protocole est détaillé dans la section « matériel et méthodes ».

3. Coopération lymphocytes T / DC.

Comme nous l'avons vu ci-dessus les DC interagissent avec toutes les populations de lymphocytes T. Le rôle majeur des DC est, suite à une maturation induite par un pathogène, de pouvoir présenter des antigènes et d'activer les lymphocytes T naïfs (« priming »). Les cellules dendritiques initient la réponse des LT naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques, la rate ou les tissus lymphatiques associées aux muqueuses. Les LT « innate-like », grâce à leurs propriétés effectrices particulières qui leur permettent d'être activés efficacement et rapidement lors de situations pathologiques comme l'infection, se situent à l'interface de l'immunité innée et adaptative. Un des rôles possible de ces cellules serait donc de participer à l'amplification de la réponse immune en favorisant la maturation des DC, et par conséquent leur capacité à activer les effecteurs de la réponse adaptative.

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules NKT (*Natural Killer T Cells*) expriment à la fois les marqueurs des cellules NK (*Natural Killer*) et un TCR. Ces molécules lipidiques portées par les pathogènes ou provenant directement des tissus sont présentées par les cellules dendritiques via des molécules CD1d aux lymphocytes NKT. Des travaux récents réalisés dans un modèle murin ont montré que les cellules NKT, lorsqu'elles sont activées par des DCi sensibilisées par un glycolipide antigénique, peuvent induire la maturation fonctionnelle des DC (Fujii, Liu et al. 2004). De manière similaire, les cellules Vd1 qui reconnaissent le CD1c, lorsqu'elles sont activées par des cellules dendritiques immatures induisent une maturation fonctionnelle des DC (production d'IL-12p70 et capacité d'activation des cellules T conventionnelles naïves). Au moment où nous avons démarré nos travaux, deux études *in vitro* montraient que les LT g9d2 activés par des phosphoantigènes solubles (BrHPP) ou induits (ABP) sont capables d'induire la maturation de DCi (augmentation de HLA-DR, CD86, CD83, production d'IL-12p40/70) (Conti, 2005 #112; Ismaili, 2002 #228).

Les mécanismes mis en jeu dans ces situations impliquent des facteurs solubles comme le TNF- α et des interactions membranaires de type CD40/CD40L (pour revue (Munz, Steinman et al. 2005)).

Cependant, dans ces modèles *in vitro* l'induction de maturation des DC par les LT g9d2 et le devenir des DC porteuses d'antigènes n'a pas été analysée de manière précise. En effet, il est intéressant de déterminer si l'induction de la maturation concerne à la fois les DC porteuses d'antigènes et les DC environnantes (effet « by-stander ») ou nécessite des interactions directes LT g9d2-DC. De plus, ces travaux ont été réalisés avec des modèles peu physiologiques puisqu'ils sont basés sur une activation des LT g9d2 avec des agonistes synthétiques (BrHPP) ou des inhibiteurs pharmacologiques (ABP). Il est donc intéressant d'étudier ce phénomène dans un contexte infectieux dans lequel les LT g9d2 peuvent être activés par des DC infectées (modèle mycobactérien).

III-LES MYCOBACTÉRIES :Modèle *M.bovis* BCG (M.BCG).

I. Rappel sur les mycobactéries.

Les mycobactéries appartiennent au genre unique *Mycobacterium*. Ce sont des bacilles atypiques comprenant plus de cinquante espèces commensales ou pathogènes opportunistes qui vivent dans les matières organiques décomposées et trois espèces pathogènes strictes : *M. tuberculosis* (*M.tub.*) ou bacille de Koch, responsable de 90% des cas de tuberculose humaine, *M. bovis*, et *M. africanum* ...). *M. leprae* ou bacille de Hensen est l'agent de la lèpre. Ces bactéries sont des bacilles fins, légèrement incurvés, aérobies stricts et immobiles. Ils se distinguent par l'acido-alcool-résistance de leur paroi. En effet, la structure de la paroi des mycobactéries est très atypique (figure 8) :

- une couche basale composée de peptidoglycane auquel est associé un polymère d'arabinose et de galactose, l'arabino-galactane,
- une couche intermédiaire composée d'acides mycoliques (longs acides gras ramifiés) qui estérifient l'arabino-galactane,
- une couche externe (variable selon les espèces) qui contient des sulfolipides, des phospholipides, du lipo-arabinomannane et du mycolate de tréhalose (contenu uniquement dans les souches pathogènes), et des protéines transmembranaires.

La structure particulière de la paroi des mycobactéries, très riche en lipide, explique en grande partie, la résistance des mycobactéries à de nombreux antibiotiques (antibiotiques hydrophobes) qui ne peuvent atteindre leurs sites d'action. Les pathogènes de l'homme et de l'animal ont une croissance lente caractéristique : temps de génération moyen de 24 h.

Alors que la tuberculose était un fléau au XIX^e siècle, l'incidence de cette maladie a considérablement diminuée ; notamment grâce à de meilleures conditions de vie et d'hygiène, grâce à

la découverte d'antibiotiques efficaces et grâce à la vaccination utilisée dans les pays industrialisés, et quand cela est possible dans les pays plus pauvres. Cependant, une recrudescence est observée depuis 1985. En effet, *Mycobacterium tuberculosis* reste un agent très pathogène et mortel infectant environ 30% de la population mondiale et auquel est attribué 2 à 3 millions de décès par an dans les pays ne bénéficiant pas de vaccination systématique (Boom 1999). Cette pathogénicité est accentuée chez les sujets-immunodéprimés qui sont souvent co-infectés (contamination par le HIV) (Kaufmann and Schaible 2003).

2. Tuberculose humaine.

2.1. Souches bactériennes / souche atténuée.

La tuberculose humaine est une infection pulmonaire par *M.tuberculosis*, découvert en 1882 par Robert Koch. Beaucoup de préparations vaccinales composées de bacilles ont été d'abord mises au point, sans cependant conférer une immunité suffisante aux sujets vaccinés.

Au début du XX^e siècle, messieurs Calmette et Guérin préparent une souche de *M.bovis* (hautement pathogène pour l'homme) dont la virulence a été atténuée par repiquages successifs sur « des morceaux de pommes de terre cuits dans la bile de bœuf ». La préparation obtenue induit une réponse immunitaire cellulaire protectrice lors d'une nouvelle infection. Cette préparation de *M.bovis* atténuée est le BCG (bacille bilié de Calmette et Guérin) toujours utilisé en vaccination préventive et reste le meilleur outil de protection des jeunes enfants contre la tuberculose, mais demeure peu efficace chez les adultes. Actuellement, de nouvelles pistes de vaccins plus immunogènes chez l'adulte sont en cours de développement. Par exemple, un mutant de *M.tub.* a été généré et confère une immunité plus efficace aux souris, ce qui serait une piste pour l'immunisation efficace des adultes (Martin, Williams et al. 2006).

Au cours des passages successifs les différentes préparations de M.BCG ont subi des mutations, notamment la perte du gène *mpt-64* codant pour une protéine antigénique. La souche BCG Pasteur-1173P2, qui est utilisée dans notre laboratoire, est une souche clonale dérivée de 1961 par Augier d'une colonie isolée *in vitro*, et présente les caractéristiques les plus proches de celles qui sont décrites par Calmette. Les caractéristiques et les processus d'infection de M.BCG et *M.tub* sont très similaires.

2.2. Processus d'infection.

L'infection d'un organisme par *M.tub* se fait principalement par voie aérienne, par inhalation d'aérosols comportant un faible nombre de bacilles infectieux. Les macrophages et les cellules dendritiques des alvéoles pulmonaires phagocytent *M.tub* dès son entrée dans le système respiratoire. Comme souvent, la reconnaissance de ces bactéries se fait entre autres par des récepteurs du

complément et des récepteurs au mannose (Schlesinger and Horwitz 1991; Schlesinger, Hull et al. 1994) ; et par les TLR2 et TLR4 de manière CD14-dépendante (Means, Wang et al. 1999). Dans le macrophage infecté, deux mécanismes peuvent se produire : en présence d'IFN-g, les mycobactéries sont éliminées par le macrophage, dans le cas contraire elles survivent et se multiplient, aboutissant à la destruction du macrophage et à leur dissémination dans l'organisme.

Comme dans toutes les infections, la sécrétion de chimiokines et de cytokines (rôle important des cytokines inflammatoires comme l'IFN-g) conduit au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires sur le site d'infection. Après deux à six semaines d'infection, les cellules forment un granulome constitué des macrophages au centre et des lymphocytes en périphérie pour contenir l'infection et éliminer les bactéries. Dans 90% des cas, les granulomes contiennent l'infection qui peut demeurer silencieuse ou asymptomatique pendant des années. Dans une minorité de cas, l'individu n'arrive pas à contrôler la primo-infection, et la persistance des bactéries conduit à une inflammation chronique. Les mycobactéries ont de nombreux mécanismes leurs permettant de déjouer le système immunitaire.

2.3. Cibles cellulaires et échappement.

Les principales cellules cibles de *M.tub in vivo* sont les macrophages alvéolaires (Schlesinger 1996). De manière générale, l'élimination des bactéries par les macrophages résulte d'un processus de maturation du phagosome dans lequel résident les bactéries. La vésicule phagocytaire fusionne avec les lysosomes présents dans le macrophage. En situation normale, le pH diminue à l'intérieur du phago-lysosome et les enzymes deviennent fonctionnelles. Les bactéries sont alors dégradées par des enzymes, les dérivés toxiques (H_2O_2 , NO) (Sano, Tomioka et al. 2004; Timmins, Master et al. 2004) et le pH acide du lysosome.

Les mycobactéries peuvent échapper au contrôle du macrophage en inhibant la fusion phago-lysosomale par exclusion de lipides des phagosomes qui sont nécessaires à la fusion (Vergne, Chua et al. 2005). Le bacille de la tuberculose bloque également l'acidification des vacuoles. Le macrophage devient alors un lieu privilégié favorisant la multiplication des mycobactéries qui s'expandent jusqu'à la mort de la cellule. Les macrophages morts forment un caséum rempli de bacilles qui peuvent rester à l'état latent et être réactivés ultérieurement ou se disséminer dans les voies aériennes. Ces processus ont lieu uniquement avec des bactéries vivantes.

Malgré ces stratégies d'échappement développées par les mycobactéries, le système immunitaire de l'hôte infecté met en place des mécanismes cellulaires pour contrôler et supprimer l'infection.

Il existe plusieurs mécanismes mis en jeu par l'organisme contre l'infection par *M.tub.* dont la production de cytokines par les lymphocytes T sensibilisés ainsi que l'activité bactéricide des macrophages des alvéoles pulmonaires (Li, Rossman et al. 1996). L'infection persistante de l'organisme par les mycobactéries est due à un déséquilibre entre les réponses immunitaires de l'hôte et les nombreux mécanismes de résistances des mycobactéries ainsi que des stratégies d'échappement

des bactéries au système immunitaire.

2.4. Réponse lymphocytaires T et échappement

La réponse lymphocytaire est multiple : les polynucléaires sont les premières cellules à arriver sur les lieux de l'infection, suivies des NK, des LT gd et des LT ab.

Assez rapidement après l'infection, les LT CD4⁺ et CD8⁺ activés sont présents en grand nombre dans les ganglions lymphatiques drainant les poumons (pic 4 semaines après infection) puis migrent vers les poumons (Feng, Bean et al. 1999). Ces LT ont été activés par des macrophages ou des DC infectées qui ont gagné les ganglions pour initier la réponse des LT qui vont ensuite contenir l'infection et prévenir une réactivation bactérienne.

Parallèlement, il a été montré que les mycobactéries infectent les DCi initiant le processus de maturation et la production de cytokines par les DC (Henderson, Watkins et al. 1997). Cependant, des travaux ultérieurs ont montré que dans beaucoup de cas, la maturation des DC n'est pas optimale, ce qui peut représenter, là encore, un mécanisme d'échappement au système immunitaire (Hanekom, Mendillo et al. 2003). Les cellules phagocytaires intra-épithéliales (notamment celles des alvéoles pulmonaires) captent les bacilles de *M.tub* et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles stimulent la réponse immunitaire T adaptative anti-mycobactérienne.

Les LT CD4⁺ jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire contre *M.tub*. Ils sont activés par la présentation de peptides antigéniques sur les molécules CMH II des cellules présentatrices de l'antigène. Leur principale fonction effectrice est la sécrétion d'IFN-g (et autres cytokines) (Newport, Huxley et al. 1996) qui activent les macrophages environnants. Les macrophages et les cellules dendritiques activées produisent de l'IL-12 (Henderson, Watkins et al. 1997) qui elle-même polarise la réponse des LT CD4⁺ vers un profil de sécrétion de type Th1 (IFN-g, TNF- α). Là encore, il a été montré que les macrophages infectés par des mycobactéries ont un défaut de transport de molécules de présentation CMH II néo-synthétisées, ce qui diminue leur efficacité de présentation de l'antigène aux LT CD4⁺ et facilite la persistance de l'infection (Hmama, Gabathuler et al. 1998).

Quant aux LT CD8⁺, ils sont activés via les complexes CMH I-peptide issus de la présentation croisée par un mécanisme indirect dans lequel les vésicules apoptotiques des cellules infectées stimulent directement les LT CD8⁺ (Winau, Weber et al. 2006). Ils produisent également de l'IFN-g et de l'IL-4 et jouent un rôle dans la régulation des réponses Th1 et Th2. Ils vont également détruire les cellules infectées. La destruction des bactéries intracellulaires se fait par la voie perforine/granulysine (Stenger, Hanson et al. 1998). La destruction des cellules par la voie Fas/FasL ne permet pas la destruction des bactéries intracellulaires (Stenger, Mazzaccaro et al. 1997). Comme beaucoup de pathogènes, les mycobactéries sont capables d'atténuer les effets de la réponse immunitaire cellulaire en induisant l'apoptose des LT ce qui favorise l'installation de la maladie.

Comme nous l'avons vu précédemment, les molécules CD1 présentent des lipides à certains lymphocytes T comme les LT CD1 restreint ou les NKT (CD1d restreint). Dans le cadre d'une infection mycobactérienne, les cellules dendritiques présentent des lipides de la paroi des

mycobactéries sur les CD1 aux LT. Ces lipides sont essentiellement des lipoarabinomannanes pour les CD8 CD1 restreints (Prigozy, Sieling et al. 1997) et des phosphatidyinositol mannosides pour les NKT (Fischer, Scotet et al. 2004).

3. Mycobactéries et LT g9d2.

Plusieurs sous-populations de lymphocytes gd peuvent être impliquées dans la réponse immune dirigées contre des mycobactéries. Il a été montré, notamment dans des modèles murins, que les LT gd (Vd1 et Vd2) sont rapidement recrutés et amplifiés dans les poumons après infection mycobactérienne (Dieli, Ivanyi et al. 2003) et participent à l'établissement d'une réponse immune conventionnelle dirigée contre *M.tub* (Caccamo, Sireci et al. 2006). Des travaux récents montrent que des LT Vd1 sont activés par des fractions lipidiques de *M.tub* en présence de DC (Das, Sugita et al. 2004). Nous nous intéresserons ici principalement à la réponse des LT g9d2 contre les mycobactéries.

La réponse LT g9d2 aux mycobactéries est importante au début de l'infection et jouerait un rôle dans la mise en place d'une immunité protectrice contre ces pathogènes. En effet, comme nous l'avons vu, les LT g9d2 reconnaissent des antigènes non-peptidiques phosphorylés produits par différents pathogènes (bactéries, parasites), sans sensibilisation préalable. *M.tub* produit des métabolites phosphorylés reconnus par les LT g9d2 (ex. HDMAPP). En effet, les LT g9d2 reconnaissent et lysent les cellules infectées par les mycobactéries et produisent beaucoup de cytokines de type Th1 (IFN- γ) (Tsukaguchi, Balaji et al. 1995). De plus, les LT g9d2 peuvent détruire directement les mycobactéries intracellulaires (macrophages) et extracellulaires, par le mécanisme de dégranulation perforine/granulysine (Dieli, Troye-Blomberg et al. 2000). En plus de cette réponse immunitaire directe, des études réalisées ces dernières années montrent l'importance de l'impact de la réponse g9d2 dans l'établissement d'une immunité adaptative dirigée contre *M.tub*, dans des modèles primates (Shen, Zhou et al. 2002; Chen 2005).

L'implication des LT g9d2 dans la réponse immunitaire adaptative a d'abord été montrée pendant des infections mycobactériennes chez des individus vaccinés contre la tuberculose par le M.BCG (Hoft, Brown et al. 1998). En effet, 7 jours après stimulation des lymphocytes sanguins des individus par des antigènes mycobactériens, les auteurs ont observé une expansion spectaculaire des LT g9d2 chez les sujets vaccinés par rapport aux sujets « naïfs ». De plus les LT gd qui ont proliféré sont essentiellement des LT g9d2 spécifiques de l'IPP. Le TCR de ces cellules joue un rôle important dans l'expansion clonale et la réponse adaptative pendant les infections à mycobactéries. En effet, Lai et al ont montré une expansion clonale des LT g9d2 spécifiques des phosphoantigènes pendant une primo-infection par *M.bovis* chez des singes macaques (Lai, Shen et al. 2003). Lors d'une ré-infection BCG ou *M.tub* d'animaux vaccinés par le M.BCG, ces LT g9d2 spécifiques de l'antigène présentent un phénotype mémoire et s'accumulent rapidement ; et ce de manière prolongée et intense. Certaines équipes ont réalisé des travaux dans ce sens dans un modèle primate, montrant une réponse secondaire forte et rapide des LT g9d2 après une pré-exposition à l'antigène par le M.BCG

(Langermans, Andersen et al. 2001).

Récemment, une équipe a montré que les LT g9d2 pourraient être naturellement sensibilisés par des alkylamines présentes dans l'alimentation végétale (thé, champignons, pommes, vin) conférant une mémoire immunologique à ces cellules qui deviennent plus rapidement efficaces lors d'une ré-activation microbienne (Kamath, Wang et al. 2003).

QUESTIONS ABORDEES.

Pour répondre à quelques questions soulevées ici, nous avons étudié le rôle des cellules présentatrices de l'antigène dans l'activation optimale des LT g9d2 humains *in vitro* et *ex-vivo*, ainsi que les conséquences sur le phénotype et les fonctions effectrices des CPA mises en jeu dans ce système. Après avoir étudié les relations DC-LT g9d2 dans un contexte artificiel nous nous sommes intéressés à une situation plus physiologique dans le cadre d'infection par les mycobactéries. Le modèle d'étude et les axes étudiés sont représentés schématiquement ci-contre.

BIBLIOGRAPHIE

- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-68.
- Allison, T. J., C. C. Winter, et al. (2001). "Structure of a human gamma delta T-cell antigen receptor." *Nature* **411**(6839): 820-4.
- Arnaud, C., N. R. Veillard, et al. (2005). "Cholesterol-independent effects of statins in inflammation, immunomodulation and atherosclerosis." *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**(2): 127-34.
- Banthorpe, D. V., B. V. Charlwood, et al. (1972). "The biosynthesis of monoterpenes." *Chem Rev* **72**(2): 115-55.
- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* **285**(5428): 727-9.
- Bendelac, A., M. Bonneville, et al. (2001). "Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes." *Nat Rev Immunol* **1**(3): 177-86.
- Bonneville, M. and E. Scotet (2006). "Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors." *Curr Opin Immunol* **18**(5): 539-46.
- Boom, W. H. (1999). "Gammadelta T cells and Mycobacterium tuberculosis." *Microbes Infect* **1**(3): 187-95.
- Bouso, P. and E. Robey (2003). "Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes." *Nat Immunol* **4**(6): 579-85.
- Brandes, M., K. Willimann, et al. (2003). "Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity." *Blood* **102**(10): 3693-701.
- Brandes, M., K. Willimann, et al. (2005). "Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells." *Science* **309**(5732): 264-8.
- Bukowski, J. F., C. T. Morita, et al. (1995). "V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer." *J Immunol* **154**(3): 998-1006.
- Caccamo, N., G. Sireci, et al. (2006). "gammadelta T cells condition dendritic cells in vivo for priming pulmonary CD8 T cell responses against Mycobacterium tuberculosis." *Eur J Immunol*.
- Chen, Z. W. (2005). "Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections." *Clin Immunol* **116**(3): 202-7.
- Chow, A., D. Toomre, et al. (2002). "Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane." *Nature* **418**(6901): 988-94.
- Constant, P., F. Davodeau, et al. (1994). "Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands."

Science **264**(5156): 267-70.

- Constant, P., Y. Poquet, et al. (1995). "The antituberculous *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is an attenuated mycobacterial producer of phosphorylated nonpeptidic antigens for human gamma delta T cells." Infect Immun **63**(12): 4628-33.
- Conti, L., R. Casetti, et al. (2005). "Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines." J Immunol **174**(1): 252-60.
- Corvaisier, M., A. Moreau-Aubry, et al. (2005). "V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells." J Immunol **175**(8): 5481-8.
- Dagna, L., A. Iellem, et al. (2002). "Skewing of cytotoxic activity and chemokine production, but not of chemokine receptor expression, in human type-1/-2 gamma delta T lymphocytes." Eur J Immunol **32**(10): 2934-43.
- Dalton, J. E., G. Howell, et al. (2004). "Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells." J Immunol **173**(6): 3660-7.
- Das, H., M. Sugita, et al. (2004). "Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components." J Immunol **172**(11): 6578-86.
- Daubenberger, C. A., M. Salomon, et al. (2001). "Functional and structural similarity of V gamma 9V delta 2 T cells in humans and *Aotus* monkeys, a primate infection model for *Plasmodium falciparum* malaria." J Immunol **167**(11): 6421-30.
- Davodeau, F., M. A. Peyrat, et al. (1993). "Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors." J Immunol **151**(3): 1214-23.
- De Libero, G., G. Casorati, et al. (1991). "Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral gamma/delta T cells." J Exp Med **173**(6): 1311-22.
- Di Fabrizio, L., Y. Kimura, et al. (1991). "Specific triggering of gamma, delta T cells by K562 activates the gamma, delta T cell receptor and may regulate natural killer-like function." J Immunol **146**(8): 2495-503.
- Dieli, F., J. Ivanyi, et al. (2003). "Characterization of lung gamma delta T cells following intranasal infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin." J Immunol **170**(1): 463-9.
- Dieli, F., F. Poccia, et al. (2003). "Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites." J Exp Med **198**(3): 391-7.
- Dieli, F., M. Troye-Blomberg, et al. (2000). "Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*." Eur J Immunol **30**(5): 1512-9.
- Dieli, F., M. Troye-Blomberg, et al. (2001). "Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes." J Infect Dis **184**(8): 1082-5.
- Edwards, P. A. and J. Ericsson (1999). "Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway." Annu Rev Biochem **68**: 157-85.
- Espinosa, E., C. Belmont, et al. (2001). "Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells." J Biol Chem **276**(21): 18337-44.
- Espinosa, E., C. Belmont, et al. (2001). "Y2K+1 state-of-the-art on non-peptide phosphoantigens, a novel category of immunostimulatory molecules." Microbes Infect **3**(8): 645-54.
- Espinosa, E., J. Tabiasco, et al. (2002). "Synaptic transfer by human gamma delta T cells stimulated with soluble or cellular antigens." J Immunol **168**(12): 6336-43.
- Favier, B., E. Espinosa, et al. (2003). "Uncoupling between immunological synapse formation and functional outcome in human gamma delta T lymphocytes." J Immunol **171**(10): 5027-33.
- Feng, C. G., A. G. Bean, et al. (1999). "Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **67**(7): 3242-7.
- Fisch, P., M. Malkovsky, et al. (1990). "Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells." Science **250**(4985): 1269-73.
- Fischer, K., E. Scotet, et al. (2004). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10685-90.
- Fujii, S., K. Liu, et al. (2004). "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 **199**(12): 1607-18.
- Gagliardi, M. C., R. Teloni, et al. (2005). "*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production." J Leukoc Biol **78**(1): 106-13.
- Garcia, K. C., L. Teyton, et al. (1999). "Structural basis of T cell recognition." Annu Rev Immunol **17**: 369-97.
- Geginat, J., F. Sallusto, et al. (2001). "Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells." J Exp Med **194**(12): 1711-9.
- Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, et al. (2003). "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function." J Exp Med **197**(1): 7-17.
- Gett, A. V., F. Sallusto, et al. (2003). "T cell fitness determined by signal strength." Nat Immunol **4**(4): 355-60.
- Gober, H. J., M. Kistowska, et al. (2003). "Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells." J Exp Med **197**(2): 163-8.
- Groh, V., S. Porcelli, et al. (1989). "Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and

- evenly distributed throughout the lymphoid system." *J Exp Med* **169**(4): 1277-94.
- Halary, F., M. A. Peyrat, et al. (1997). "Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors." *Eur J Immunol* **27**(11): 2812-21.
- Hanekom, W. A., M. Mendillo, et al. (2003). "Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro." *J Infect Dis* **188**(2): 257-66.
- Hara, T., Y. Mizuno, et al. (1992). "Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection." *J Clin Invest* **90**(1): 204-10.
- Hayday, A. C. (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* **18**: 975-1026.
- Henderson, R. A., S. C. Watkins, et al. (1997). "Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis." *J Immunol* **159**(2): 635-43.
- Hermans, I. F., J. D. Silk, et al. (2003). "NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells." *J Immunol* **171**(10): 5140-7.
- Hewitt, R. E., A. Lissina, et al. (2005). "The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins." *Clin Exp Immunol* **139**(1): 101-11.
- Hmama, Z., R. Gabathuler, et al. (1998). "Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium tuberculosis is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers." *J Immunol* **161**(9): 4882-93.
- Ho, M., H. K. Webster, et al. (1990). "Increased gamma delta T cells in acute Plasmodium falciparum malaria." *Immunol Lett* **25**(1-3): 139-41.
- Hoft, D. F., R. M. Brown, et al. (1998). "Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype." *J Immunol* **161**(2): 1045-54.
- Holoshitz, J., F. Koning, et al. (1989). "Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid." *Nature* **339**(6221): 226-9.
- Ismaili, J., V. Orlislagers, et al. (2002). "Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation." *Clin Immunol* **103**(3 Pt 1): 296-302.
- Jiao, X., R. Lo-Man, et al. (2002). "Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity." *J Immunol* **168**(3): 1294-301.
- Jouen-Beades, F., E. Paris, et al. (1997). "In vivo and in vitro activation and expansion of gammadelta T cells during Listeria monocytogenes infection in humans." *Infect Immun* **65**(10): 4267-72.
- Kabelitz, D., A. Bender, et al. (1990). "A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein." *J Exp Med* **171**(3): 667-79.
- Kabelitz, D., T. Hinz, et al. (1997). "Clonal expansion of Vgamma3/Vdelta3-expressing gammadelta T cells in an HIV-1/2-negative patient with CD4 T-cell deficiency." *Br J Haematol* **96**(2): 266-71.
- Kamath, A. B., L. Wang, et al. (2003). "Antigens in tea-beverage prime human Vgamma 2Vdelta 2 T cells in vitro and in vivo for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 6009-14.
- Kato, Y., Y. Tanaka, et al. (2003). "Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate." *J Immunol* **170**(7): 3608-13.
- Kaufmann, S. H. and U. E. Schaible (2003). "A dangerous liaison between two major killers: Mycobacterium tuberculosis and HIV target dendritic cells through DC-SIGN." *J Exp Med* **197**(1): 1-5.
- Kawai, T. and S. Akira (2005). "Pathogen recognition with Toll-like receptors." *Curr Opin Immunol* **17**(4): 338-44.
- Kroca, M., A. Johansson, et al. (2001). "V gamma 9V delta 2 T cells in human legionellosis." *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(5): 949-54.
- Lafont, V., J. Liautard, et al. (2001). "Isopentenyl pyrophosphate, a mycobacterial non-peptidic antigen, triggers delayed and highly sustained signaling in human gamma delta T lymphocytes without inducing down-modulation of T cell antigen receptor." *J Biol Chem* **276**(19): 15961-7.
- Lai, X., Y. Shen, et al. (2003). "Immune biology of macaque lymphocyte populations during mycobacterial infection." *Clin Exp Immunol* **133**(2): 182-92.
- Lang, F., M. A. Peyrat, et al. (1995). "Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands." *J Immunol* **154**(11): 5986-94.
- Langermans, J. A., P. Andersen, et al. (2001). "Divergent effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on Mycobacterium tuberculosis infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11497-502.
- Lanier, L. L., J. Ruitenberg, et al. (1988). "Structural and serological heterogeneity of gamma/delta T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood." *Eur J Immunol* **18**(12): 1985-92.
- Leslie, D. S., M. S. Vincent, et al. (2002). "CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells." *J Exp Med* **196**(12): 1575-84.
- Li, B., M. D. Rossman, et al. (1996). "Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis." *J Immunol* **157**(9): 4222-9.

- Mami-Chouaib, F., C. Flament, et al. (1996). "TCR alpha/beta and TCR gamma/delta CD4-/CD8- HLA-DR alloreactive CTL clones do not use Fas/Fas ligand pathway to lyse their specific target cells." *Hum Immunol* **51**(1): 13-22.
- Martin, C., A. Williams, et al. (2006). "The live Mycobacterium tuberculosis phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs." *Vaccine* **24**(17): 3408-19.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." *Science* **296**(5566): 301-5.
- Means, T. K., S. Wang, et al. (1999). "Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis." *J Immunol* **163**(7): 3920-7.
- Meissner, N., J. Radke, et al. (2003). "Serial analysis of gene expression in circulating gamma delta T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles." *J Immunol* **170**(1): 356-64.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* **427**(6970): 154-9.
- Mills, K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" *Nat Rev Immunol* **4**(11): 841-55.
- Miyagawa, F., Y. Tanaka, et al. (2001). "Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen." *J Immunol* **166**(9): 5508-14.
- Morita, C. T., E. M. Beckman, et al. (1995). "Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells." *Immunity* **3**(4): 495-507.
- Munz, C., R. M. Steinman, et al. (2005). "Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity." *J Exp Med* **202**(2): 203-7.
- Newport, M. J., C. M. Huxley, et al. (1996). "A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection." *N Engl J Med* **335**(26): 1941-9.
- O'Brien, R. L., M. P. Happ, et al. (1989). "Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor gamma delta by an antigen derived from Mycobacterium tuberculosis." *Cell* **57**(4): 667-74.
- O'Doherty, U., M. Peng, et al. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." *Immunology* **82**(3): 487-93.
- Oliaro, J., S. Dudal, et al. (2005). "Vgamma9Vdelta2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria Brucella." *J Leukoc Biol* **77**(5): 652-60.
- Olweus, J., A. BitMansour, et al. (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12551-6.
- Pacanowski, J., S. Kahi, et al. (2001). "Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection." *Blood* **98**(10): 3016-21.
- Pfeffer, K., B. Schoel, et al. (1990). "Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands." *Eur J Immunol* **20**(5): 1175-9.
- Poccia, F., C. Agrati, et al. (2005). "Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated non-cytolytic antiviral mechanisms and their potential for cell-based therapy." *Immunol Lett* **100**(1): 14-20.
- Poccia, F., B. Cipriani, et al. (1997). "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* **159**(12): 6009-17.
- Poquet, Y., P. Constant, et al. (1996). "A novel nucleotide-containing antigen for human blood gamma delta T lymphocytes." *Eur J Immunol* **26**(10): 2344-9.
- Prigozy, T. I., P. A. Sieling, et al. (1997). "The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules." *Immunity* **6**(2): 187-97.
- Raziuddin, S., N. A. Mir, et al. (1994). "Gamma delta T lymphocytes and proinflammatory cytokines in bacterial meningitis." *J Allergy Clin Immunol* **93**(4): 793-8.
- Rincon-Orozco, B., V. Kunzmann, et al. (2005). "Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D." *J Immunol* **175**(4): 2144-51.
- Rohmer, M., M. Knani, et al. (1993). "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate." *Biochem J* **295** (Pt 2): 517-24.
- Rudolph, M. G., C. Wingren, et al. (2004). "Combined pseudo-merohedral twinning, non-crystallographic symmetry and pseudo-translation in a monoclinic crystal form of the gammadelta T-cell ligand T10." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 4): 656-64.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Sano, K., H. Tomioka, et al. (2004). "Interaction of antimycobacterial drugs with the anti-Mycobacterium avium complex effects of antimicrobial effectors, reactive oxygen intermediates, reactive nitrogen intermediates, and free fatty acids produced by macrophages." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2132-9.
- Scalise, F., R. Gerli, et al. (1992). "Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis." *Immunology* **76**(4): 668-70.
- Schlesinger, L. S. (1996). "Role of mononuclear phagocytes in M tuberculosis pathogenesis." *J Investig Med* **44**(6): 312-23.
- Schlesinger, L. S. and M. A. Horwitz (1991). "Phagocytosis of Mycobacterium leprae by human monocyte-derived

- macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium." J Immunol **147**(6): 1983-94.
- Schlesinger, L. S., S. R. Hull, et al. (1994). "Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages." J Immunol **152**(8): 4070-9.
- Scotet, E., L. O. Martinez, et al. (2005). "Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I." Immunity **22**(1): 71-80.
- Selin, L. K., S. Stewart, et al. (1992). "Reactivity of gamma delta T cells induced by the tumour cell line RPMI 8226: functional heterogeneity of clonal populations and role of GroEL heat shock proteins." Scand J Immunol **36**(1): 107-17.
- Shen, Y., D. Zhou, et al. (2002). "Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections." Science **295**(5563): 2255-8.
- Sicard, H., S. Ingoure, et al. (2005). "In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model." J Immunol **175**(8): 5471-80.
- Sireci, G., E. Espinosa, et al. (2001). "Differential activation of human gammadelta cells by nonpeptide phosphoantigens." Eur J Immunol **31**(5): 1628-35.
- Stenger, S., D. A. Hanson, et al. (1998). "An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin." Science **282**(5386): 121-5.
- Stenger, S., R. J. Mazzaccaro, et al. (1997). "Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection." Science **276**(5319): 1684-7.
- Stoll, S., J. Delon, et al. (2002). "Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes." Science **296**(5574): 1873-6.
- Tanaka, Y., C. T. Morita, et al. (1995). "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." Nature **375**(6527): 155-8.
- Timmins, G. S., S. Master, et al. (2004). "Requirements for nitric oxide generation from isoniazid activation in vitro and inhibition of mycobacterial respiration in vivo." J Bacteriol **186**(16): 5427-31.
- Tsukaguchi, K., K. N. Balaji, et al. (1995). "CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production." J Immunol **154**(4): 1786-96.
- Vaidya, S. A. and G. Cheng (2003). "Toll-like receptors and innate antiviral responses." Curr Opin Immunol **15**(4): 402-7.
- van der Vliet, H. J., N. Nishi, et al. (2001). "Potent expansion of human natural killer T cells using alpha-galactosylceramide (KRN7000)-loaded monocyte-derived dendritic cells, cultured in the presence of IL-7 and IL-15." J Immunol Methods **247**(1-2): 61-72.
- Vergne, I., J. Chua, et al. (2005). "Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4033-8.
- von Lilienfeld-Toal, M., J. Nattermann, et al. (2006). "Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells." Clin Exp Immunol **144**(3): 528-33.
- Winau, F., S. Weber, et al. (2006). "Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis." Immunity **24**(1): 105-17.