

Année 2015

THÈSE PRÉSENTÉE

pour le

**DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

**ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé**

**SPÉCIALITÉ : Microbiologie - Immunologie**

*Présentée et soutenue publiquement*

*Le 14 Avril 2015*

*Par Camille KHAIRALLAH*

*Née le 26 Juillet 1988 à Orléans*

**Infection par le Cytomégalo virus murin : réponse des lymphocytes  
T gamma delta et impact sur le développement tumoral**

**Membres du Jury**

Monsieur le Professeur Vincent PRALORAN  
Madame le Docteur Armelle PREVOST-BLONDEL  
Monsieur le Docteur Marc DALOD  
Monsieur le Docteur Jean-François FONTENEAU  
Monsieur le Professeur Patrick BLANCO  
Madame le Docteur Myriam CAPONE

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de Thèse

## **Infection par le Cytomégalo­virus murin : réponse des lymphocytes T gamma delta et impact sur le développement tumoral**

L'infection à cytomégalo­virus (CMV) cause des pathologies graves en absence d'immunité. Les lymphocytes T (LT)  $\gamma\delta$  participent à la réponse anti-CMV puisqu'ils s'amplifient dans le sang de patients transplantés rénaux concomita­ment à une diminution de la charge virale. D'autre part, l'amplification T  $\gamma\delta$  est associée à un risque moindre de cancers cutanés chez ces patients. Nous avons choisi d'utiliser le modèle murin de l'infection à CMV afin d'étudier la capacité des LT $\gamma\delta$  à protéger les souris contre l'infection et le cancer.

Nous avons montré qu'en absence de LT $\alpha\beta$  dans des souris TCR $\alpha^{-/-}$  ( $\alpha\beta\gamma\delta^{+}$ ), différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$  s'amplifient dans les organes cibles du CMV. Le contrôle de la charge virale observé *in situ* suite à leur amplification protège les souris TCR $\alpha^{-/-}$  des dommages hépatiques/pulmonaires et de la mort, alors que les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  ( $\alpha\beta\gamma\delta^{-}$ ) succombent à l'infection. Enfin, l'effet protecteur des LT $\gamma\delta$  est également observé en absence de NK, de LT $\alpha\beta$  et de LB, montrant l'importance que peuvent avoir ces cellules dans un contexte d'immunodéficience touchant les autres acteurs immunitaires.

Nous avons montré la capacité du CMV à inhiber la croissance de tumeurs coliques (MC38) et de mélanomes (B16F10) implantés en sous-cutané dans des souris immunodéficientes, révélant un rôle anti-tumoral du CMV indépendant de l'immunité et des LT $\gamma\delta$ . La permissivité au CMV de ces lignées tumorales suggère un effet direct du virus, par apoptose (B16F10) ou par un mécanisme encore indéterminé (MC38). Enfin, une inhibition comparable est observée pour une lignée carcinomateuse humaine, présupposant un effet indirect du virus sur le microenvironnement tumoral.

**Mots clés :** cytomégalo­virus, lymphocytes T  $\gamma\delta$ , immunodéficience, croissance tumorale

---

### **Murine cytomegalovirus infection : gamma delta T cell response and impact on tumor growth**

Cytomegalovirus causes serious pathologies in immune-compromised hosts.  $\gamma\delta$  T cells increase in the peripheral blood of renal transplant recipients concomita­ntly to a decrease of CMV viral antigenemia, indicating that they participate to the immune response against CMV. Moreover,  $\gamma\delta$  T cell amplification is associated with a reduced risk of skin cancer in these patients. We chose to use the mouse model of CMV infection to study the capacity of  $\gamma\delta$  T cells to protect mice against CMV-infection and cancer.

We showed that in the absence of  $\alpha\beta$  T cells in TCR $\alpha^{-/-}$  mice ( $\alpha\beta\gamma\delta^{+}$ ), different  $\gamma\delta$  T cell subsets are increased in CMV target organs. A concomitant decrease of viral load was observed in TCR $\alpha^{-/-}$  mice which survived CMV infection, in contrast to CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice which died and displayed damage to the lungs and liver.  $\gamma\delta$  T cell antiviral protective effect was also observed in the absence of NK,  $\alpha\beta$  T and B cells, showing the crucial role that these cells could play in immunodeficient contexts where other immune players are compromised.

We showed the ability of CMV to inhibit the growth of subcutaneous colonic tumors (MC38) and melanomas (B16F10) in immunodeficient mice, thus revealing an anti-tumor role of CMV independently of immunity and  $\gamma\delta$  T cells. CMV was able to infect these tumor cell lines in accordance with a direct anti-tumor effect of the virus, through apoptosis (B16F10) or by means of a still unresolved mechanism. Finally, CMV also inhibits the growth of human colonic tumors, leading to the hypothesis that a viral-mediated indirect anti-tumor effect could also operate.

**Keywords :** cytomegalovirus,  $\gamma\delta$  T cells, immunodeficiency, tumor growth

---

#### **Laboratoire d'accueil**

Composantes Innées de la Réponse Immunitaire et Différenciation (CIRID), UMR CNRS 5164

Université de Bordeaux

Bâtiment 1B, 1<sup>er</sup> étage, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

*« Tout obstacle renforce la détermination.  
Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »*

Léonard De Vinci



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier le Professeur Vincent Praloran, qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci pour votre soutien tout au long de ce travail, ainsi que pour nos discussions d'ordre scientifique et autre, qui ont toujours été très enrichissantes.

Je remercie le Docteur Armelle Prévost-Blondel, le Docteur Marc Dalod et le Docteur Jean-François Fonteneau d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Patrick Blanco, qui a accepté de faire partie du jury et ce malgré la très grande récurrence des lettres grecques «  $\gamma$  » et «  $\delta$  » et de l'association «  $\gamma\delta$  » tout au long du manuscrit... merci de t'être dévoué ! Les « GD » t'en sont reconnaissants et moi aussi !

Un très grand merci à ma directrice de thèse, le Docteur Myriam Capone, sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes. Je te remercie infiniment d'avoir accepté de m'encadrer, ainsi que pour tout ce que tu m'as appris, la confiance que tu m'as accordée et pour ton soutien constant. Je me rappellerai encore longtemps de nos discussions scientifiques ou non qui ont souvent fini par des crises de fous rires, tes nombreuses phrases « mythiques » qui nous ont elles aussi tant fait rire, ta gentillesse, ta bonne humeur toujours au rendez-vous et ton intégrité exemplaire. Merci sincèrement pour tout, tu vas me manquer !

J'exprime également ma gratitude au Docteur Julie Déchanet-Merville, pour m'avoir accueillie au sein de son groupe lors de mon master 2 et de ma thèse. Merci de m'avoir accordé ta confiance et d'avoir pris autant de temps pour discuter des projets, de la planification des manipes et des résultats. Merci aussi pour tes encouragements et ta disponibilité qui m'ont permis de dépasser chacun de mes doutes, qui ont été nombreux au cours de la thèse. Pour tes nombreux « Bon les blondes ! » qui m'ont toujours aidé à me sentir intégrée au groupe, merci !

Je remercie le Professeur Jean-François Moreau, de m'avoir intégrée dans son unité. Merci pour votre soutien, votre disponibilité et vos nombreux conseils qui sont toujours arrivés à point nommé au cours de cette thèse et m'ont permis d'avancer. Merci de m'avoir fait part d'une fraction de vos connaissances sur d'innombrables sujets, et ainsi de me permettre d'apprendre de nouvelles choses à chaque conversation.

### **Mes remerciements vont également...**

À Sonia, qui m'a accompagnée tout au long des expériences et qui a réussi à me supporter (ainsi que mon stress) lors des nombreuses journées « souris ». Je garderai de très bons

souvenirs de ces moments qui étaient ponctués par de franches rigolades, dont la plus mémorable restera certainement le tout premier dépôt de ce truc rose appelé méthylcellulose... Rappelle-toi : « la méthylcellulose, c'est utile !!! ».

À Vincent, pour m'avoir formée tant en culture cellulaire qu'en cytométrie. Merci d'avoir toujours répondu présent quand j'ai eu besoin d'aide et/ou de conseils.

À Santi, merci pour ta patience au trieur, ta bonne humeur permanente, nos délires (souvent le vendredi après-midi) et pour nos discussions « ordi-téléphone-applis-etc. » que je ne pouvais avoir qu'avec toi !

À mes collègues thésards et postdocs, Aurore, Jenny, Lili, Clem, Romain, Angela, Jonathan, Thomas, MET, Layal. Avec vous les journées au laboratoire ont toujours été synonyme de sourire, bonne humeur, délires en tous genres et d'entre-aide dans les moments difficiles. Merci à vous tous, vous m'avez permis d'avancer chaque jour.

À la team « Bad », Séverine, Cap'taine Maria, Sophie, Dorothée, Angela, Dada, Romain... merci pour tout les moments sportifs, les fous rires, ainsi que les burgers-bières bien mérités après tant d'efforts ! Et pour tant d'autres choses encore...

À Isa (ou devrais-je dire caporal-chef ?), pour ton aide et tes conseils sur les manipes et les analyses, pour ton soutien quotidien, tous nos rires et nos discussions autour d'un café du relai H. Merci d'avoir veillé sur moi pendant ces années.

À tous les autres « CIRIDIens », merci pour les moments que j'ai partagé avec chacun de vous qu'ils soient d'ordre scientifique ou autre.

Aux membres des animaleries, particulièrement Benoît Rousseau et Pierre Costet pour leur aide précieuse et leurs conseils qui ont grandement participé au bon déroulement de ma thèse. Merci aussi à Murielle Fèvre et Julien Izotte de m'avoir aidée un nombre de fois incalculable à l'animalerie et pour tous les bons moments passés avec vous.

### **À mes proches,**

À Dada et Wilo, pour tous les moments qu'on a partagé ensemble, de notre premier Halloween aux dernières soirées, et qui ont rendu mes années bordelaises inoubliables !

À Ludo, mon chouchou, mon « grand frère ». Tu as toujours su veiller sur moi que ce soit à Orléans ou à Bordeaux et tu as toujours répondu présent quand j'en avais besoin. Je te dois beaucoup et je peux te dire que cette thèse est également la tienne.

À Julien, merci pour ton soutien, ton attention et ta compréhension. Je sais que tu as beaucoup pris sur toi lorsque je passais mes soirées et une partie de mes weekends au laboratoire... Tu ne peux pas imaginer à quel point je t'en suis reconnaissante.

**À ma famille**, malgré la distance vous m'avez donné toute la force dont j'ai eu besoin au cours de cette thèse. Il n'y a pas de mot assez juste pour vous dire à quel point je vous en suis reconnaissante et quel point vous avez été importants pendant ces années.

À mes parents, sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre soutien sans faille et vos nombreux encouragements à chaque étape de mon parcours. Ils m'ont permis de repousser mes limites et d'en arriver là aujourd'hui.

À mon frère, mon Charly ! Toi aussi tu me donnes envie de me dépasser et d'aller toujours plus loin. Un jour tu m'as dit qu tu étais fier de suivre le même chemin que moi. Sache que tu ne pouvais pas me faire plus beau compliment et que ces quelques mots resteront présents et m'aideront à poursuivre sur cette lancée !

**Sans oublier...**

Aux nombreux m&m's® qui m'ont tenu compagnie et apporté des forces pendant cette thèse... à l'exception des jaunes (n'est-ce-pas Cap'taine ?!)

## ***Table des matières***

<b>Table des illustrations.....</b>	<b>11</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>16</b>
<b>I. Les Lymphocytes T <math>\gamma\delta</math>.....</b>	<b>17</b>
A. Caractéristiques.....	17
1. Le récepteur à l'antigène ou TCR .....	17
a) Organisation des loci des gènes $\gamma$ et $\delta$ et phylogénie .....	17
b) Structure et association au complexe CD3.....	19
• Structure générale.....	19
• Association au complexe de signalisation CD3.....	22
c) Diversité du TCR $\gamma\delta$ .....	23
2. Ontogénie et localisation physiologique .....	24
a) Développement pré- et extra-thymique .....	24
b) Développement thymique et localisation .....	25
3. Molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	26
a) Ligands des TCRs $\gamma\delta$ .....	27
• Antigènes du non-soi.....	27
• Antigènes partagés entre le non-soi et le soi.....	27
• Antigènes du soi .....	28
b) Corécepteurs des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	31
B. Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	32
1. Quelques fonctions effectrices des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	33
a) Production de cytokines et de chimiokines.....	33
b) Élimination des cellules cibles .....	33
c) Maturation des DC et activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ .....	34
d) Aide aux lymphocytes B .....	34
e) Régulation de la fonction des cellules stromales .....	34
2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ : effecteurs pré-programmés ou plastiques ?.....	35
a) Acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins.....	35
• Programmation thymique lors de la vie fœtale .....	35

•	Plasticité des lymphocytes T $\gamma\delta$ dérivés de la moelle osseuse.....	37
b)	Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains : programmation thymique ou acquisition en périphérie ? .....	39
C.	Place des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la réponse immunitaire.....	41
1.	Acteurs de la réponse lymphocytaire aux antigènes de stress .....	41
2.	Rôles des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les infections.....	42
a)	Infections à herpesvirus .....	42
•	Chez la souris.....	42
•	Chez l'homme.....	43
b)	Autres infections virales .....	44
3.	Rôles dans le cancer .....	45
a)	Effets bénéfiques des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	45
•	Chez la souris.....	45
•	Chez l'homme.....	45
b)	Effets néfastes .....	46
•	Inhibition des réponses anti-tumorales .....	46
•	Cas particulier de l'IL-17 .....	47
4.	Balance entre les lymphocytes T $\gamma\delta$ $V\gamma 1^+$ et $V\gamma 4^+$ murins .....	47
<b>II.</b>	<b>Effets de l'infection à Cytomégalovirus (CMV) sur la réponse immunitaire .....</b>	<b>49</b>
A.	Quelques caractéristiques du virus .....	49
1.	Génome et structure .....	50
2.	Cycle réplcatif .....	53
3.	Tropisme, dissémination et latence .....	54
4.	Pathologies associées au CMV .....	55
B.	L'immunité anti-CMV .....	58
1.	Réponse innée.....	59
a)	Les cellules dendritiques .....	59
b)	Les cellules NK .....	60
2.	Réponse adaptative.....	62
a)	Réponse cellulaire médiée des lymphocytes T $\alpha\beta$ .....	62
•	Lymphocytes T $CD8^+$ .....	62
•	Lymphocytes T $CD4^+$ .....	63
b)	Réponse humorale des lymphocytes B .....	65
C.	Mécanismes d'échappement du CMV .....	65

<b>III. Place des lymphocytes T <math>\gamma\delta</math> dans la réponse immunitaire dirigée contre le CMV .....</b>	<b>67</b>
<b>IV. Effet de l'infection à CMV sur le cancer .....</b>	<b>70</b>
A. Infections virales et cancer .....	70
1. Le cancer : nature et caractéristiques de la pathologie .....	70
2. Les virus oncogéniques.....	71
3. Les virus oncolytiques .....	73
B. Le CMV et le cancer .....	76
1. Rôle pro-tumoral du CMV .....	76
a) Présence du CMV dans de nombreux cancers humains et corrélations chez les patients	76
b) Propriétés oncogéniques du virus .....	77
c) Propriétés oncomodulatrices du CMV .....	77
• Effets sur la cellule tumorale elle-même.....	78
• Effets sur le microenvironnement tumoral.....	78
• Effets sur l'immunité .....	79
2. Rôle anti-tumoral du CMV.....	80
C. Infection à CMV et transformation tumorale : deux situations de stress reconnues par les lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	82
1. Reconnaissance croisée de cellules infectées par le CMV et de cellules tumorales <i>in vitro</i> .	82
2. Impact de cette reconnaissance croisée <i>in vivo</i> .....	82
<b>Résultats.....</b>	<b>84</b>
<b>I. Projet n°1 – Étude du potentiel anti-viral des lymphocytes T <math>\gamma\delta</math> dans le modèle murin d'infection à MCMV .....</b>	<b>85</b>
A. Contexte de travail et problématique .....	85
B. Discussion .....	117
C. Perspectives.....	120
<b>II. Projet n°2 – Effet anti-tumoral de l'infection à MCMV dans un contexte d'immunodéficience .....</b>	<b>122</b>
A. Contexte de travail et problématique .....	122
B. Matériels et Méthodes.....	125
C. Résultats .....	127
D. Discussion .....	136
E. Perspectives.....	140
<b>Bibliographie.....</b>	<b>143</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>171</b>

## Tables des illustrations

### Figures

Figure 1- Organisation des loci des gènes $\gamma$ et $\delta$ murins et humains. ....	18
Figure 2- Relations phylogénétiques entre les segments géniques V de l'homme, des primates et de la souris. ....	20
Figure 3- Structure générale des TCRs $\gamma\delta$ et comparaison des boucles CDR3 $\delta$ . ....	21
Figure 4- Distribution des longueurs des CDR3 des chaînes des récepteurs immuns spécifiques d'antigène chez l'homme. ....	23
Figure 5- Développement programmé des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins. ....	25
Figure 6- Reconnaissance des ligands par les TCRs $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ . ....	29
Figure 7- Modalités de reconnaissance des antigènes du soi par les lymphocytes T $\gamma\delta$ . ....	30
Figure 8- Récepteurs des lymphocytes T $\gamma\delta$ . ....	31
Figure 9- Six des fonctions les mieux caractérisées des lymphocytes T $\gamma\delta$ . ....	32
Figure 10- Acquisition des caractéristiques fonctionnelles des sous-populations murines T $\gamma\delta$ . ....	39
Figure 11- Surveillance du stress. ....	41
Figure 12 - Cytokines sécrétées par les sous-populations lymphocytaires T $\gamma\delta$ $V\gamma 1^+$ et $V\gamma 4^+$ murines. ....	49
Figure 13- Schéma d'un virion de cytomégalovirus humain. ....	51
Figure 14- Modèle de virions herpétiques et cycle de réplication lytique. ....	54
Figure 15 - Modèle pour l'infection du CMV humain et pour sa dissémination chez l'hôte. ....	55
Figure 16 – Réponse immunitaire dirigée contre le CMV. ....	58
Figure 17- Interactions entre les DC et les cellules NK au cours de l'infection à MCMV. ....	59
Figure 18- Protéines du MCMV et du HCMV affectant la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK. ....	67
Figure 19 – Phénotype des lymphocytes T $\alpha\beta$ $CD8^+$ spécifiques du CMV et des lymphocytes T $\gamma\delta$ $V\delta 2^{neg}$ induits par le CMV. ....	69
Figure 20 – Caractéristiques ou « hallmarks » des cellules malignes. ....	70
Figure 21 – Liens entre les oncovirus humains et l'activation des voies cellulaires menant à l'acquisition de caractéristiques tumorales. ....	73
Figure 22 – L'infection par le MCMV inhibe la croissance tumorale chez les souris $CD3\epsilon^{-/-}$ . ....	123
Figure 23 – Inhibition dose-dépendante de la croissance tumorale et impact de l'immunité innée sur cette réponse. ....	128
Figure 24 – L'effet dose du MCMV sur la croissance des cellules MC38 est maintenu chez les souris immunodéficientes NSG. ....	130
Figure 25 – Le MCMV infecte les lignées tumorales B16F10 et MC38 mais à différentes MOI. ....	132
Figure 26 – Le MCMV induit l'apoptose des cellules NIH 3T3 et B16F10 de manière dose dépendante. ....	134
Figure 27 – La croissance des cellules tumorales humaines HT29 est également inhibée en présence du MCMV mais pas du HCMV. ....	135
Figure 28 – Les cellules humaines HT29 sont faiblement permissives au MCMV mais l'infection n'affecte pas leur viabilité <i>in vitro</i> . ....	136
Figure 29 – L'infection des souris après l'apparition des tumeurs visibles inhibe faiblement la croissance tumorale. ....	139

## Tableaux

Tableau 1- Fonctions effectrices des différentes sous-populations T $\gamma\delta$ murines.....	35
Tableau 2- Contribution des sous-populations T $\gamma\delta$ $V\gamma 1^+$ et $V\gamma 4^+$ murines à la pathogenèse et/ou à la pathologie de différentes maladies.....	48
Tableau 3- Classification des herpès virus humains.....	50
Tableau 4- Protéines virales homologues détectées dans le HCMV et le MCMV.....	52
Tableau 5- Caractéristiques du MCMV en faisant un modèle pertinent de la maladie induite par le HCMV.....	57
Tableau 6 – Exemples sélectionnés d’essais cliniques en cours avec des virus de 9 familles différentes. .....	75

## ABREVIATIONS

### A

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

### B

BTN3-A1 : Isoforme A1 de la butyrophiline 3

### C

CDR : Complementary-Determining Region

CEACAM1 : Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

COX2 : Cyclooxygénase 2

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CVB3 : Coxsackievirus B3

### D

DC : Cellule dendritique

DC-SIGN : DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin

DDR : DNA damage repair

DETC : Dendritic Epidermal  $\gamma\delta$  T Cell

### E

EBNA3C : Epstein-Barr nuclear antigen 3C

EBV : Epstein-Barr virus

EGFR : Epidermal growth factor receptor

Eomes : Éomésodermine

EPCR : Endothelial protein C receptor

### F

FasL : Fas ligand

Fc $\gamma$ R : Récepteur au fragment constant des IgG

Fc $\epsilon$ R : Récepteur au fragment constant des IgE

FGF : Fibroblast growth factor

### G

gB : Glycoprotéine B du CMV

gI : glycoprotéine I du HSV-1

GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor

GVHD : Graft versus host disease

GVL : réponse du griffon contre la leucémie

### H

HBV : Hepatitis B virus

HCMV : Cytomégalovirus humain

HCV : Hepatitis C virus

HGF : Hepatocyte growth factor

HHV-8 : Herpesvirus humain 8

HMGB : High-Mobility Group Box

HPV : Human papillomaviruses

Hsp60 : Heat shock protein 60

HSV-1 et 2 : Herpes simplex virus 1 et 2

HTLV-1 : Human T cell lymphotropic virus-1

### I

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule 1

IE : Immediate early

IFN $\gamma$  : Interféron  $\gamma$

Ig : Immunoglobuline

ILC : Cellule lymphoïde innée

## **K**

KSHV : Kaposi's sarcoma herpesvirus

## **L**

LANA : Latency-associated nuclear antigen

LLA : Leucémie lymphoblastique aiguë

LLO : Listériolysine O

LMA : Leucémie myéloïde aiguë

LMC : Leucémie myéloïde chronique

## **M**

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCMV : Murine Cytomegalovirus

MDSC : cellule myéloïde suppressives

MICA/MICB : MHC class I-related chain A/B

MMP : Métalloprotéase matricielle

## **N**

NK : Cellule natural killer

NKT : Cellule T natural killer

NKR : Natural killer receptor

NP : 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl

NSG : NOD-scid gamma

## **O**

ORF : Open Reading Frame

## **P**

pAg : phosphoantigène

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PDGF- $\alpha$  : Platelet-derived growth factor- $\alpha$

PE : Phycoérythrine

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PLZF : Promyelocytic leukaemia zinc-finger

PRR : Pathogen recognition receptor

## **R**

Rae-1 : Retinoic acid early-1

Rb : Retinoblastoma protein

## **S**

SLAM : Signalling Lymphocytic Activation Molecule

SAP : SLAM-associated Protein

SCID : Déficits immunitaires combinés sévères

## **T**

TCR : Récepteur T à l'antigène

TEMRA : T effecteur mémoire ré-exprimant le CD45RA

TdT : Terminal deoxynucleotidyl transférase

TFH : Lymphocytes T folliculaire « helper »

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor- $\beta$

TIL : Lymphocyte infiltrant les tumeurs

TLR : Toll like receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor- $\alpha$

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing factor

**U**

ULBP : UL-16 binding protein

**V**

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VSV : Vesicular stomatis virus

**W**

WNV : West Nile Virus

# INTRODUCTION

## I. Les Lymphocytes T $\gamma\delta$

L'immunité est classiquement divisée en deux compartiments : l'immunité innée qui confère une protection immédiate et non spécifique contre les pathogènes puisque non restreinte à un antigène, et l'immunité adaptative qui est elle plus tardive, spécifique d'antigène et acquise à long terme. À l'interface entre ces deux compartiments se trouvent les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , qualifiés également de lymphocytes T non conventionnels. Ces cellules possèdent des caractéristiques appartenant à la fois à l'immunité innée, comme leur localisation majoritairement épithéliale, et à l'immunité adaptative car elles présentent à leur surface un récepteur T à l'antigène (TCR). L'ensemble de ces caractéristiques confère aux lymphocytes T  $\gamma\delta$  des fonctions variées leur permettant d'être impliqués dans de nombreuses situations physiopathologiques telles que les infections ou le cancer.

### A. Caractéristiques

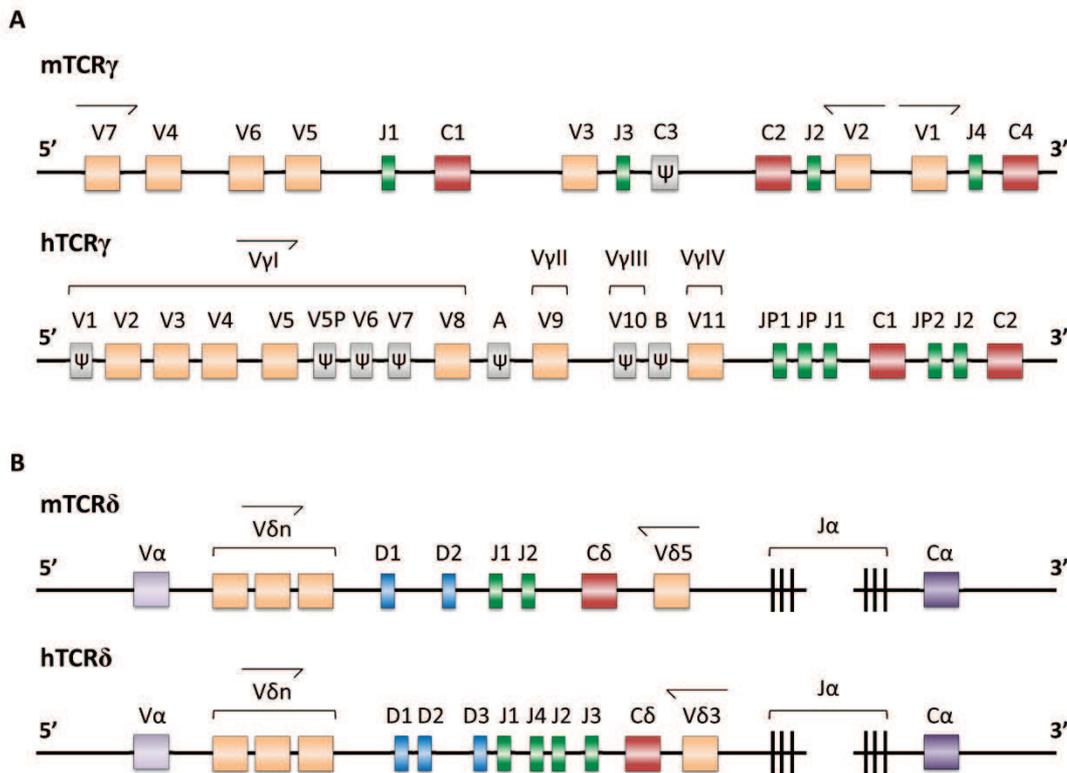
#### 1. Le récepteur à l'antigène ou TCR

Dans les années 1980, la recherche des gènes codants les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur à l'antigène des lymphocytes T  $\alpha\beta$  a permis d'identifier les gènes  $\gamma$  et  $\delta$  (Saito et al., 1984). Ces gènes codent pour les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  qui s'associent pour former le TCR  $\gamma\delta$ , récepteur hétérodimérique caractéristique des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .

##### a) *Organisation des loci des gènes $\gamma$ et $\delta$ et phylogénie*

Chez la souris, les gènes codants pour la chaîne  $\gamma$  et la chaîne  $\delta$  se trouvent respectivement sur les chromosomes 13 et 14. Le locus de la chaîne  $\gamma$  contient 7 gènes variables V (V1, V2, V3, V4, V5, V6 et V7) classés en 5 sous-groupes selon leurs similarités de séquence, 3 éléments jonctionnels J (J1, J2 et J4) ainsi que 3 gènes codants pour des régions constantes C (C1, C2 et C4) (nomenclature de (Heilig and Tonegawa, 1986)) (Figure 1A, panel supérieur). Seuls ces gènes sont fonctionnels, le gène C3 étant un pseudogène. Le locus de la chaîne  $\delta$  est intégré dans le locus codant pour la chaîne  $\alpha$  du TCR  $\alpha\beta$ . Il est composé de 10 régions variables dont 5 peuvent potentiellement réarranger avec des éléments de la chaîne  $\alpha$ , 2 régions de diversité, 2 éléments de jonction et d'une seule région constante (Figure 1B, panel supérieur).

De manière intéressante, les loci des gènes  $\gamma$  et  $\delta$  humains présentent certaines similarités avec ceux de la souris comme par exemple leur faible nombre de régions variables comparativement aux gènes  $\alpha$  et  $\beta$  (7 gènes  $V\gamma$  et 8 gènes  $V\delta$  fonctionnels contre environ 40 gènes  $V\alpha$  et 40 gènes  $V\beta$  fonctionnels). Le locus de la chaîne  $\delta$  est localisé sur le chromosome 14 et présente une organisation comparable du fait qu'il soit intégré dans le locus  $\alpha$  et que l'ensemble des gènes variables soient localisés en 5' des éléments de jonction et régions constantes, à l'exception du gène  $V\delta 3$  qui se situe en 3' comme le gène murin  $V\delta 5$  (nomenclature de (Lefranc and Rabbitts, 1990))(figure 1B). La comparaison des séquences des loci  $\delta$  murins et humains a montré qu'ils sont fortement similaires (plus de 70% de



**Figure 1- Organisation des loci des gènes  $\gamma$  et  $\delta$  murins et humains.**

A/ Loci des gènes  $\gamma$  murins (mTCR $\gamma$ ) et humains (hTCR $\gamma$ ). B/ Loci des gènes  $\delta$  murins (mTCR $\delta$ ) et humains (hTCR $\delta$ ). Les nomenclatures utilisées sont celles de Heilig et Tonegawa pour les gènes murins, et Lefranc et Rabbits pour les gènes humains. V, région variable ; D, région de diversité ; J, élément jonctionnel ; C, région constante. Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes. Les pseudogènes sont représentés en gris et par le symbole  $\psi$ .

similarité), tant au niveau de leur séquences nucléotidiques codantes que non codantes et également au niveau des séquences peptidiques des régions constantes qui partagent plus de 70% de similarité (Koop et al., 1994)(Koop et al., 1992). Ces similarités sont retrouvées lors d'une analyse phylogénique où des gènes V $\delta$  murins sont clairement montrés comme homologues à des gènes V $\delta$  humains et primates, comme par exemple les différents gènes V $\delta$ 6 murins (notés MumuDV6, Figure 2A) et le cluster V $\delta$ 1 humain/primates qui ont 58% d'identité sur leurs séquences peptidiques ou encore le gène V $\delta$ 5 murin (noté MumuDV5, Figure 2A) et le cluster V $\delta$ 3 dont les séquences sont identiques à 61% (Koop et al., 1994)(Kazen et al., 2011).

Le locus  $\gamma$  est globalement moins conservé et semble avoir évolué de manière plus dynamique que le locus  $\delta$ , suggérant une forte sélection des gènes spécifiques à chaque espèce. Chez l'homme, il est localisé sur le chromosome 7 et contient 12 gènes regroupés en 4 sous-groupes notés V $\gamma$ I à V $\gamma$ IV (Figure 1A). La comparaison des régions variables des gènes  $\gamma$  de l'homme et de la souris montre que seul le gène V $\gamma$ IV humain et le sous-groupe V $\gamma$ I (comprenant les gènes V $\gamma$ 1, V $\gamma$ 2 et V $\gamma$ 3) murin forment un cluster (Figure 2B)(Huck et al., 1988)(Kazen et al., 2011). Le gène V $\gamma$ 4 murin est également relativement proche au gène V $\gamma$ 11 humain avec lequel il partage 52% d'homologie sur la séquence peptidique (Huck et al.,

1988). Au niveau de l'organisation, les loci  $\gamma$  humain et murin sont relativement différents bien qu'ils soient tous deux caractérisés par l'absence de région de diversité. Le locus murin a subi plusieurs duplications du segment V-J-C générant 4 copies complètes alors que chez l'homme, le segment J-C et les gènes V ont été dupliqués de manière indépendante (Figure 1A). De manière intéressante, la comparaison des gènes  $\gamma$  humains et primates montre que seule une partie des gènes  $V\gamma$ , dont le gène  $V\gamma 11$  mentionné plus haut, est bien conservée entre ces espèces pourtant proches (Figure 2B). Les autres gènes semblent être des gènes paralogues dont l'évolution est difficile à déterminer probablement à cause de nombreuses duplications de ces segments géniques (Figure 2B, agrandissement de la région comprenant les gènes  $V\gamma 7$ ,  $V\gamma 1$ ,  $V\gamma 8$  et  $V\gamma 6$ ). Il semblerait donc que seuls certains gènes  $V\gamma$  soient partagés entre différentes espèces, les autres gènes évoluant rapidement par duplication et générant un répertoire spécifique à chaque espèce.

Ainsi une dichotomie existe dans l'évolution des gènes  $\gamma$  et  $\delta$ , avec des gènes  $\delta$  dont la nature est globalement conservée entre différentes espèces dont l'homme et la souris et des gènes  $\gamma$  qui ont subi une diversification importante réduisant à un seul cluster les homologues humains/murins. Ces éléments suggèrent que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains et murins peuvent exprimer des TCRs proches, leur conférant certainement des caractéristiques communes surtout lorsque la reconnaissance antigénique implique la chaîne  $\delta$ , mais pouvant également générer des populations spécifiques d'espèce comme les lymphocytes T  $V\gamma 5V\delta 1$  trouvés uniquement chez la souris au niveau de la peau ou les lymphocytes T  $V\delta 2V\gamma 9$  circulants qui forment une population spécifique aux primates et à l'homme qui se sont certainement adaptés pour réagir aux antigènes rencontrés sur ces sites particuliers.

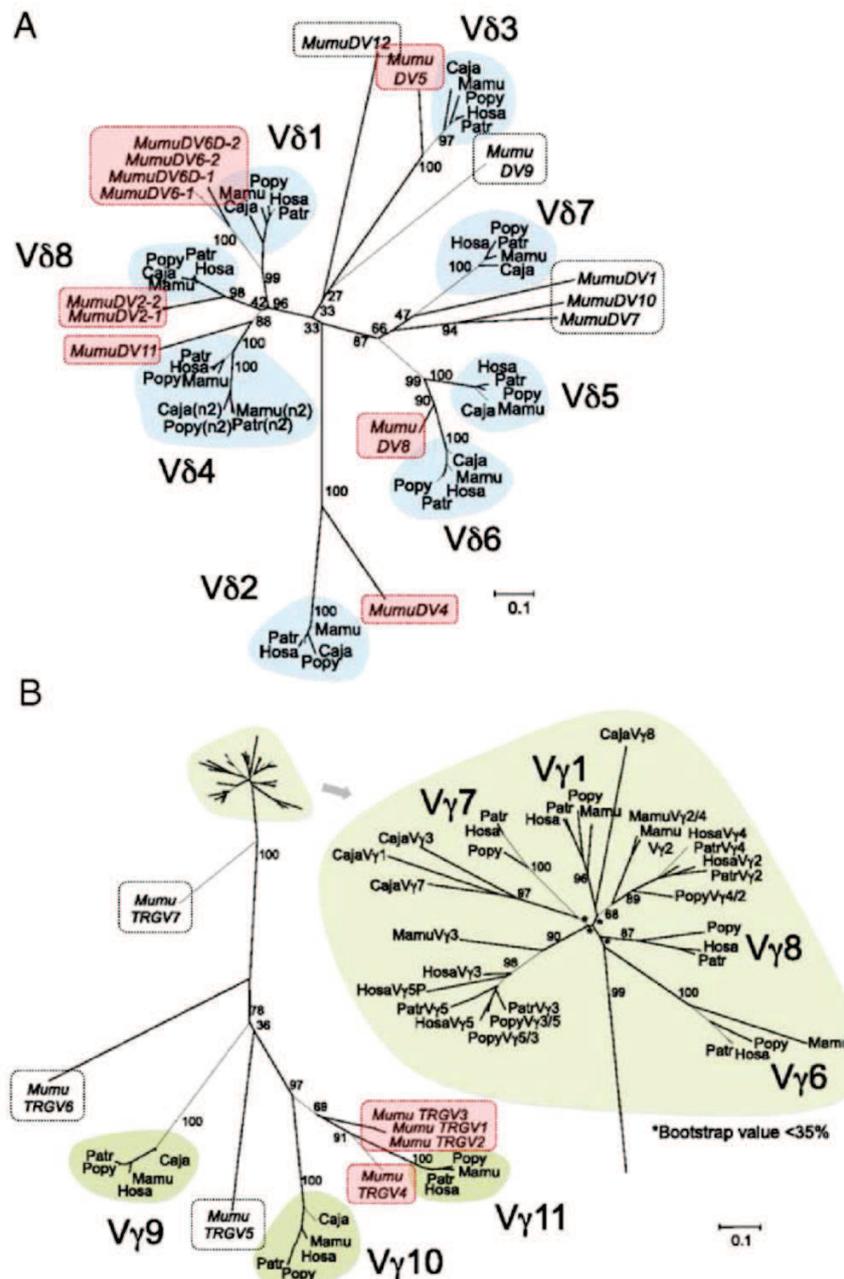
### **b) Structure et association au complexe CD3**

- Structure générale

Malgré les nombreuses études menées sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ces dernières années, très peu de ligands ont été caractérisés (détaillés ci-après) et seules six structures de TCRs  $\gamma\delta$  ont été cristallisées à l'heure actuelle : le domaine  $V\delta 3$  du TCR humain « ES204 » dont la spécificité n'est pas connue (Li et al., 1998), les domaines extracellulaires des clones humains « G115 »  $V\delta 2V\gamma 9$  (Allison et al., 2001), «  $\delta 1A/B-3$  »  $V\gamma 1.4V\delta 1$  reconnaissant MICA (Xu et al., 2011), « 9C2 »  $V\gamma 5V\delta 1$  et « DP10.7 »  $V\gamma 4V\delta 1$  reconnaissant respectivement le CD1d- $\alpha$ -GalCer ou le CD1d-sulfatide (Uldrich et al., 2013)(Luoma et al., 2013), et enfin le TCR murin « G8 »  $V\gamma 4V\alpha 11$  avec son ligand T22 (Adams et al., 2005).

De manière comparable aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  et aux fragments Fab des immunoglobulines, les TCRs  $\gamma\delta$  sont formés par deux chaînes polypeptidiques comprenant chacune deux domaines « immunoglobulin-like » (Ig-like) : le domaine amino-terminal V et le domaine carboxy-terminal C (Figure 3A)(Allison et al., 2001)(Adams et al., 2005). Cependant, des différences structurelles notables distinguent le récepteur T  $\gamma\delta$  des deux autres récepteurs adaptatifs comme par exemple leur conformation particulière et relativement

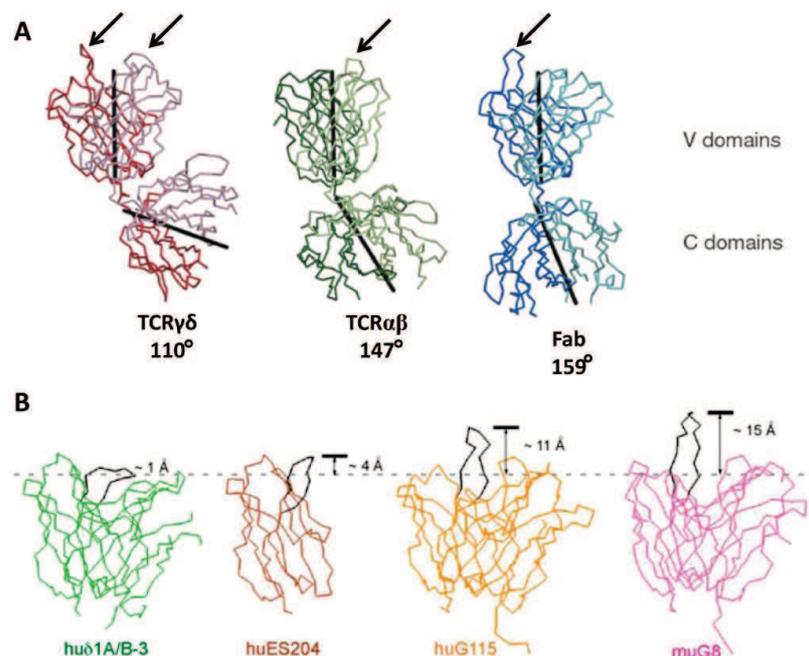
« fermée » en comparaison aux TCRs  $\alpha\beta$  et aux Fab et qui laisse penser que l'orientation des TCRs  $\gamma\delta$  et leurs points de contact avec les antigènes sont différents des autres récepteurs (Figure 3A).



**Figure 2- Relations phylogénétiques entre les segments géniques V de l'homme, des primates et de la souris.**

Arbres obtenus par la méthode de neighbor joining pour (A) les gènes V $\delta$  et (B) les gènes V $\gamma$ . L'intervalle de confiance est mentionné pour la plupart des branches. Les groupes les plus solides entre l'homme et les primates sont mis en évidence par les plages colorées en bleu (gènes  $\delta$ ) ou vert clair (gènes  $\gamma$ ). Les gènes murins présentant une homologie avec les gènes humains sont mis en évidence par les plages rouges, les gènes les plus éloignés sont entourés par des pointillés noirs. Le nom de chaque groupe correspond aux gènes humains. Une échelle des distances est mise en bas à droite de chaque arbre. Hosa, gènes humains ; Mumu, gènes murins ; Caja/Popy/Mamu/Patr, gènes primates. Adapté de (Kazen, 2011)

De plus, la surface du domaine V du TCR  $\gamma\delta$  est généralement irrégulière et peut présenter de nombreuses protubérances dont font partie les 3 boucles de reconnaissance des antigènes appelées *complementary-determining region* (CDR) nommées CDR1, CDR2 et CDR3 (détaillées dans le paragraphe suivant). La longueur des boucles CDR, et en particulier celle de la boucle CDR3, influence de manière importante la structure du TCR  $\gamma\delta$  et certainement la reconnaissance antigénique. La comparaison des longueurs des boucles CDR3 des TCR  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  et des immunoglobulines a montré que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ont des CDR3 de longueurs semblables et restreintes, ce qui peut refléter le fait que les deux chaînes du TCR  $\alpha\beta$  doivent se fixer au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et au peptide pour que le TCR soit fonctionnel. En revanche, les CDR3 des chaînes lourdes des immunoglobulines et des chaînes  $\delta$  sont plus variables et longues que celles des chaînes légères et des chaînes  $\gamma$ , respectivement (Figure 4)(Rock et al., 1994)(Chien and Konigshofer, 2007). De ce fait, au niveau structural, la boucle CDR3 $\delta$  se détache de manière plus ou moins prononcée de la surface du TCR générant une protubérance importante pour les clones G8 et G115 alors que les deux autres clones ont une boucle plus petite et une surface plus plane (Figure 3B)(Li et al., 1998)(Xu et al., 2011). Globalement et malgré cette hétérogénéité, la topologie des TCRs  $\gamma\delta$  est moins plane que celle des lymphocytes T  $\alpha\beta$  et se rapproche de celles des immunoglobulines, suggérant que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  reconnaissent des antigènes différents des lymphocytes T  $\alpha\beta$ .



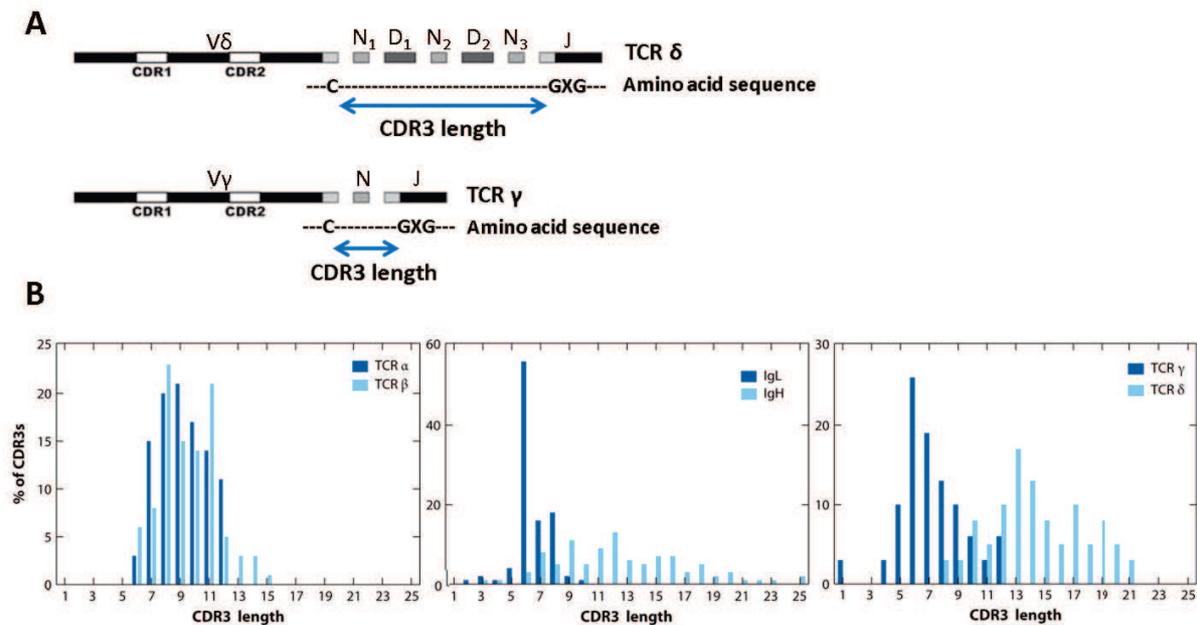
**Figure 3- Structure générale des TCRs  $\gamma\delta$  et comparaison des boucles CDR3 $\delta$ .**

(A) Structure du TCR  $\gamma\delta$  G115 (rouge), d'un TCR  $\alpha\beta$  (vert) et d'un Fab alignés selon leurs domaines V. Les pseudos axes de symétrie bilatérale dans les domaines V et C sont représentés par les traits noirs pleins. L'angle formé entre ces deux axes est noté pour chaque TCR. Les chaînes  $\gamma$ ,  $\beta$  et lourdes sont représentées par les nuances les plus claires, les chaînes  $\delta$ ,  $\alpha$  et légère par les nuances foncées. Les boucles CDR3 proéminentes sont marquées par les flèches. (B) Représentation selon la même orientation des régions V de quatre structures de TCR  $\gamma\delta$  avec les TCRs humains  $\delta$ 1A/B-3 (vert), G115 (orange), la chaîne  $\delta$  du TCR ES204 (marron) et le TCR murin G8 (rose). Les boucles CDR3 $\delta$  sont représentées en noir. Adapté de (Allison, 2001) et d'après (Xu, 2011).

- Association au complexe de signalisation CD3

Pour les TCRs  $\alpha\beta$ , le domaine C permet leur ancrage à la membrane et leur association avec le complexe de signalisation CD3 classiquement composé des dimères CD3 $\delta\epsilon$ , CD3 $\gamma\epsilon$  et CD3 $\zeta\zeta$ . Les domaines C du TCR  $\gamma\delta$  sont structurellement différents des domaines C  $\alpha\beta$  et ne s'associent pas obligatoirement au même complexe CD3. En effet, le complexe exprimé à la surface des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains et murins peut inclure un autre membre de la famille du CD3 $\zeta$  : la chaîne Fc $\gamma$ R commune aux récepteurs au fragment constant des IgG (Fc $\gamma$ R I et III) et IgE (Fc $\epsilon$ R I) pouvant former un homodimère ou un hétérodimère avec la chaîne  $\zeta$  (Orloff et al., 1990). L'engagement du TCR des lymphocytes T  $\alpha\beta$  induit un changement de conformation du complexe CD3, passant d'une conformation fermée à une conformation ouverte permettant la transduction du signal intracellulaire nécessaire à leur activation (Minguet et al., 2007). La liaison du TCR  $\gamma\delta$  avec son ligand n'induit pas de changement de conformation du complexe CD3 mais malgré cela, suffit à activer la production de cytokines et la prolifération du lymphocyte T  $\gamma\delta$  chez l'homme et la souris, comme montré récemment avec le clone murin G8 et un clone humain V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 après reconnaissance de leurs antigènes respectifs la molécule T22 et les phosphoantigènes (Dopfer et al., 2014). Cette différence entre les lymphocytes T  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  pourrait venir de plusieurs éléments : (i) les thymocytes s'orientant vers le lignage  $\gamma\delta$  ont une capacité de transduction du signal importante, grâce à une forte expression de kinases entre autres, suggérant que ces cellules n'ont pas besoin d'amplifier les signaux qu'elles reçoivent pour s'activer, (ii) les TCRs  $\gamma\delta$  ont une meilleure capacité de « clusterisation » permettant la transduction du signal (iii) l'activation des lymphocytes T  $\alpha\beta$  est dépendante du CD4 ou CD8 qui séquestre la kinase Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) et la libère uniquement lors de la reconnaissance de molécules du CMH ; les lymphocytes T  $\gamma\delta$  n'expriment généralement pas le CD4 ou CD8 et pourraient, de ce fait, activer rapidement la Lck suite à la liaison du TCR par un antigène autre que le CMH (Haks et al., 2005)(Jensen et al., 2008)(Van Laethem et al., 2007).

Les différences conformationnelles observées entre les domaines V et C des TCRs  $\gamma\delta$  et TCRs  $\alpha\beta$  renforcent l'idée que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  reconnaissent des antigènes différents des lymphocytes T conventionnels et que leur TCR s'associe à un complexe de signalisation singulier pouvant leur conférer un seuil d'activation plus bas que celui des lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont donc des acteurs de l'immunité bien distincts des lymphocytes T conventionnels.



**Figure 4- Distribution des longueurs des CDR3 des chaînes des récepteurs immuns spécifiques d'antigène chez l'homme.**

(A) Schéma représentant la manière de déterminer la longueur des CDR3 sur la chaîne δ (panel supérieur) et la chaîne γ (panel inférieur) avec G, Glycine ; X, acide aminé quelconque et C, Cystéine. (B) Les histogrammes représentent le pourcentage de séquences CDR3 comprenant de 1 à 25 acides aminés pour les chaînes TCR α, TCR β, IgL, IgH, TCR γ et TCR δ. Adapté de (Chien and Bonneville, 2006) et (Chien, 2014).

### c) Diversité du TCR γδ

Chez l'homme comme chez la souris, les différents récepteurs adaptatifs sont générés suite aux recombinaisons somatiques des gènes V-(D)-J. Les chaînes composant le TCR αβ ou les immunoglobulines (Ig) possèdent une grande diversité combinatoire due aux nombreux segments géniques V, D et J (Tonegawa et al., 1983). À l'inverse, la diversité combinatoire du TCR γδ est bien plus limitée à cause du faible nombre de segments pouvant composer les chaînes γ et δ. Cette diversité combinatoire est d'autant plus limitée par le fait que les chaînes γ et δ ne s'apparient pas de manière aléatoire (Pereira et al., 2004).

Lors des recombinaisons somatiques, les sites de reconnaissance des antigènes sont formés et portés par les boucles CDR qui sont au nombre de trois : les CDR1 et CDR2, codées par des régions hypervariables des segments V, et la CDR3, formée suite aux recombinaisons V-(D)-J (Figure 4A). Pendant ces réarrangements, plusieurs segments Dδ peuvent s'associer et générer trois cadres de lecture alternatifs. À cela s'ajoutent des mécanismes d'excision et/ou d'addition aléatoire de N-nucléotides par la terminal deoxynucleotidyl transférase (TdT) au niveau des régions jonctionnelles ce qui permet d'augmenter très nettement la diversité des régions CDR3 des chaînes γ (100 combinaisons possibles) et surtout δ du fait de la présence de segments D ( $10^{16}$  combinaisons). Grâce à ces mécanismes, les lymphocytes T γδ ont une diversité jonctionnelle plus importante que les lymphocytes T αβ ou les immunoglobulines avec  $10^{18}$  TCR γδ potentiels contre  $10^{15}$  TCR αβ ou  $10^{11}$  Ig (Davis and

Bjorkmann, 1988). Une telle diversité devrait permettre aux lymphocytes T  $\gamma\delta$  de reconnaître de nombreux antigènes. Cependant, des études récentes sur l'analyse des déterminants portant la reconnaissance antigénique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  suggèrent que la diversité des régions CDR3 pourrait, au contraire, leur conférer des affinités de liaison variées pour un même antigène et ainsi limiter le nombre d'antigènes reconnus. C'est par exemple le cas de la molécule T22 qui est reconnue par différents clones T  $\gamma\delta$  murins mais avec des affinités différentes dépendantes de la composition des boucles CDR3 $\delta$  des TCRs (Chien and Konigshofer, 2007)(Sandstrom et al., 2012).

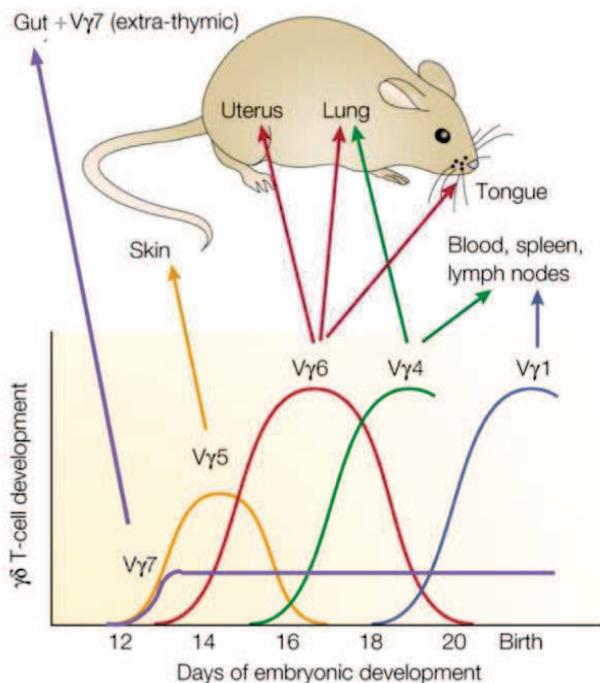
## **2. Ontogénie et localisation physiologique**

Le développement des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est, aujourd'hui encore, moins bien caractérisé que celui des lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Ce sont les premiers lymphocytes T à être détectés au cours du développement embryonnaire chez de nombreux, si ce n'est tous les vertébrés. Chez la souris, les différentes sous-populations T  $\gamma\delta$  apparaissent par « vagues » successives très régulées pendant l'ontogénèse permettant de contrôler leur répertoire et de leur conférer des propriétés de homing spécifiques et différentes des lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Il semble en être de même chez l'homme. Bien que le thymus soit un organe majeur du développement des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , certaines sous-populations ont un développement extra-thymique (McVay and Carding, 1996)(Carding et al., 1990)(Pardoll et al., 1988).

### **a) Développement pré- et extra-thymique**

L'ontogénèse des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins et humains débute dans le foie fœtal et l'intestin primitif bien avant la formation du thymus. En effet chez la souris, des transcrits réarrangés du gène V $\gamma$ 7 sont détectés dans le foie fœtal et dans l'intestin primitif dès le 11<sup>ème</sup> jour de gestation. Ces organes vont supporter plus tardivement, à partir du jour 17 dans l'intestin et du jour 19 dans le foie, le développement d'autres sous-populations T  $\gamma\delta$  (Carding et al., 1990). Les premières sous-populations produites expriment des TCRs invariants puis vont permettre la génération de sous-populations bien plus diverses grâce aux réarrangements V-(D)-J-C médiés par les recombinaisons Rag1 et Rag2 (détaillées ci-après).

De manière assez comparable, des lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont retrouvés dans le foie et l'intestin dès la 5<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme. Ces cellules, qui expriment préférentiellement un TCR V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 invariant, forment la sous-population des lymphocytes T V $\delta$ 2<sup>+</sup> spécifique à l'homme et aux primates (McVay et al., 1996). Elles ont une diversité du TCR limitée due au fait que seuls quelques nucléotides sont ajoutés sur la chaîne V $\delta$ 2 lors des réarrangements, la chaîne V $\gamma$ 9 ayant une séquence canonique invariante. Dès la 6<sup>ème</sup> semaine de gestation, des sous-populations minoritaires de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dites V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, qui expriment des chaînes autre que la V $\delta$ 2, sont produites (McVay et al., 1998). Après la 8<sup>ème</sup> semaine, une divergence des répertoires est observée dans le foie et l'intestin générant des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> spécifiques à chacun d'eux.



**Figure 5- Développement programmé des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins.**

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  présentent à leur surface des TCRs qui sont codés par des segments géniques V $\gamma$ . Ils sont exportés du thymus à différentes périodes du développement fœtal et néonatal puis ils migrent et peuplent différents tissus épithéliaux chez les animaux adultes. Le développement de certains lymphocytes T V $\gamma 7^+$  intraépithéliaux résidents dans l'intestin peut être indépendant du thymus. Adapté de (Carding et al., 2002).

### **b) Développement thymique et localisation**

Avant d'être un organe majeur du développement des lymphocytes, le thymus fœtal nouvellement formé est colonisé par des cellules souches hématopoïétiques provenant du foie fœtal. Cette colonisation se fait approximativement à la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme et au 13<sup>ème</sup> jour chez la souris. Chez cette dernière, des études extensives menées ont permis de décomposer en quatre vagues le développement thymique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  et de montrer la spécificité tissulaire de chacune des sous-populations produites (Figure 5). La première vague débute au 13<sup>ème</sup> jour de gestation et génère des thymocytes exprimant un TCR invariant V $\gamma 5$ V $\delta 1$  et des récepteurs de homing dont le CCR10 permettant la colonisation de l'épiderme par cette population T  $\gamma\delta$  particulière, appelée dendritic epidermal T cell ou DETC (Havran and Allison, 1988)(Asarnow et al., 1988)(Xiong et al., 2004)(Lewis et al., 2006). Lors de la seconde « vague » fœtale, également transitoire mais plus tardive, des thymocytes T  $\gamma\delta$  exprimant un TCR invariant V $\gamma 6$ V $\delta 1$  sont générés (Itohara et al., 1990). Ces cellules ont un tropisme pour les épithélia de l'utérus, de la langue ou encore des poumons grâce à l'expression du CCR6 à leur surface (Figure 5). Ces deux populations T  $\gamma\delta$  partagent la même chaîne V $\delta 1$  et ont des TCR invariants puisque la TdT, enzyme responsable de la diversité jonctionnelle, est faiblement exprimée à ce stade de développement. À partir du 16<sup>ème</sup> jour de gestation et jusqu'à l'âge adulte, le thymus va supporter la production de sous-populations T  $\gamma\delta$  très hétérogènes, exprimant majoritairement la chaîne V $\gamma 4$  ou V $\gamma 1$  et possédant une grande diversité jonctionnelle. Ces cellules colonisent plus particulièrement la rate, les ganglions lymphatiques, les poumons et circulent dans le sang (Carding et al., 2002). De manière contrastée avec l'ensemble des autres sous-populations qui sont produites de manière séquentielle dans le thymus, la sous-

population V $\gamma$ 7 colonisant l'épithélium intestinal est présente dans le thymus en faible proportion mais tout au long de l'ontogénie (Xiong et al., 2002).

Le développement thymique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains peut être décomposé en différentes vagues et semble ainsi suivre le même schéma que leurs homologues murins. La vague la plus précoce se déroule entre la 8<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> semaine de grossesse, vague pendant laquelle les thymocytes réarrangent leurs gènes  $\gamma$  et  $\delta$  puis expriment les chaînes V $\delta$ 2 et V $\gamma$ 9 générant de nouveaux lymphocytes T V $\delta$ 2<sup>+</sup> (McVay et al., 1991). Ces cellules sont majoritairement retrouvées dans le compartiment sanguin où elles représentent 0,5 à 6 % des lymphocytes totaux et 50 à 95% des lymphocytes T  $\gamma\delta$  chez l'adulte. Elles forment également la population T  $\gamma\delta$  la plus fréquente dans certains organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer ou encore les amygdales (Falini et al., 1989) et dans le foie (Seki et al., 1990). Les vagues suivantes génèrent les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, composés de sous-populations diverses bien qu'ils expriment majoritairement la chaîne V $\delta$ 1 (McVay et al., 1991). Ces lymphocytes deviennent prédominants dans le thymus à partir de la 15<sup>ème</sup> semaine de gestation et le restent dans le thymus post-natal. À l'âge adulte, ils sont très présents dans l'épithélium intestinal (Holtmeier et al., 2001), dans le côlon (Ullrich et al., 1990) ainsi que dans la pulpe rouge et la zone marginale de la rate (Falini et al., 1989). Ils représentent également entre 1 et 15% des lymphocytes T intra-épithéliaux du derme (Groh et al., 1989).

Le développement des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains et murins est globalement similaire, se déroulant par phases mobilisant le thymus, l'intestin primitif et/ou le foie fœtal. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  générés ont un tropisme important pour les tissus épithéliaux où ils migrent très tôt dans leur développement, contrairement aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  qui sont générés plus tardivement et localisés préférentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires. Il est intéressant de noter qu'en conditions physiologiques les TCRs exprimés par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  diffèrent d'un tissu à l'autre alors qu'au sein d'un même tissu ils expriment fréquemment des TCRs invariants ou très proches. Ces éléments suggèrent qu'un lien étroit existe entre la localisation physiologique de ces cellules, dictée par l'expression de récepteurs à chimiokines permettant leur homing, et leur spécificité antigénique.

### **3. Molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$**

À l'heure actuelle, les mécanismes permettant l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  ne sont pas encore très bien caractérisés. Ils mettent en jeu plusieurs signaux dépendants de récepteurs activateurs partagés avec des cellules de l'immunité innée et de leur récepteur à l'antigène, définissant leur spécificité. Contrairement aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  dont le TCR lie des peptides présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les lymphocytes T  $\gamma\delta$  reconnaissent de manière indépendante du CMH des antigènes non conventionnels tels que des métabolites phosphorylés ou des lipides (Schild et al., 1994) (Weintraub et al., 1994)(Sciammas et al., 1998)(Morita et al., 1995). De par cette

reconnaissance d'antigènes généralement non vus par les lymphocytes T  $\alpha\beta$ , les lymphocytes T  $\gamma\delta$  jouent un rôle non redondant dans l'immunosurveillance des tissus.

#### a) **Ligands des TCRs $\gamma\delta$**

- Antigènes du non-soi

Bien que de nombreux contextes infectieux induisent une réponse des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , peu d'antigènes microbiens sont définis de façon convainquante comme étant des ligands des TCRs  $\gamma\delta$ , par exemple par un transfert de la réactivité par expression du TCR sur une cellule reportrice ou en montrant une interaction directe par co-cristallisation du TCR et du potentiel ligand. L'infection à *Listeria monocytogenes* est un exemple assez représentatif étant donné que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  s'expandent au contact de la bactérie et s'activent une fois cultivés avec la listériolysine O (LLO), suggérant que cette molécule est bien un ligand, mais l'interaction entre les cellules T  $\gamma\delta$  et la LLO n'a pas été montrée comme dépendante du TCR (Guo et al., 1995).

Parmi les antigènes du non-soi clairement établis comme ligands de TCRs  $\gamma\delta$  se trouvent des antigènes viraux, bactériens et même des protéines d'algues. On peut citer la glycoprotéine I (gI) du Herpes Simplex Virus de type 1 (HSV-1) reconnue par un clone T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 2V $\delta$ 8 et dont la reconnaissance est bloquée par l'ajout d'un anticorps anti-TCR (Sciammas et al., 1994)(Sciammas et al., 1998), ou encore les molécules bactériennes comme les phosphoantigènes produits par *M.tuberculosis* (développés au paragraphe suivant) ou les protéines OspA et OspC de *Borrelia burgdorferi* reconnues par des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 humains (Vincent et al., 1998). Les antigènes les plus récemment caractérisés sont la phycoérythrine (PE), protéine produite par la plupart des algues rouges et certaines cyanobactéries, et deux haptènes, la cyanine 3 et le 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) (Zeng et al., 2014). Les deux haptènes sont montrés comme étant des ligands des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins alors que la PE est un ligand des cellules bovines, humaines et murines montrant que la spécificité pour cet antigène a été conservée au cours de l'évolution. La PE et le NP sont déjà connus comme des antigènes reconnus par des lymphocytes B suggérant que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  comme les lymphocytes B sont capables de répondre de manière spécifiques à de petites molécules (Xi et al., 2013)(Zeng et al., 2012)(Pape et al., 2011)(McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005). Bien que ces reconnaissances antigéniques soient clairement démontrées, leur relevance physiologique reste cependant énigmatique.

- Antigènes partagés entre le non-soi et le soi

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont mobilisés dans de nombreuses situations de stress passant de l'infection à la transformation tumorale en partie du fait que certaines molécules reconnues par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont à la fois produites par des pathogènes et surexprimées par les cellules tumorales. La Heat Shock Protein 60 (Hsp60) et les ARNt transférases sont de bons exemples pris respectivement chez la souris et l'homme de cette reconnaissance croisée. La Hsp60 est présente chez *M.tuberculosis* et sur des cellules

tumorales (cancer oral/lymphome) et suffisamment conservée pour que le même motif soit reconnu dans les deux cas (O'Brien et al., 1992)(Kaur et al., 1993)(Laad et al., 1999). Les ARNt transférases sont produites par des bactéries comme *E.coli* et des cellules de mammifères et certainement exposées suite à la mort des cellules (Bruder et al., 2012).

Le meilleur exemple connu à ce jour est celui des phosphoantigènes (pAgs) reconnus par les lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 humains (Jomaa et al., 1999). Ces molécules sont des métabolites phosphorylés issus du métabolisme des mévalonates présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Par cette reconnaissance, les lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 s'activent dans de nombreux contextes pathologiques altérant cette voie métabolique comme par exemple la transformation tumorale, qui augmente fortement le métabolisme de la cellule, ou les infections, lors desquelles les pAgs sont produits directement par le pathogène ou par la cellule infectée du fait de l'augmentation de son activité métabolique (Gober et al., 2003)(Feurle et al., 2002)(Spencer et al., 2008). La liaison du TCR avec les pAgs a été montrée comme dépendante de l'ensemble des CDRs et d'un contact entre les cellules pour stabiliser le complexe et délivrer, entre autre, des signaux de costimulation (Wang et al., 2010)(Morita et al., 1995)(Davey et al., 2011). Ce contact est également requis pour permettre l'interaction du TCR avec l'isoforme A1 de la butyrophiline-3 (BTN3-A1), molécule indispensable à l'activation des lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 par les pAgs (Vavassori et al., 2013)(Sandstrom et al., 2014).

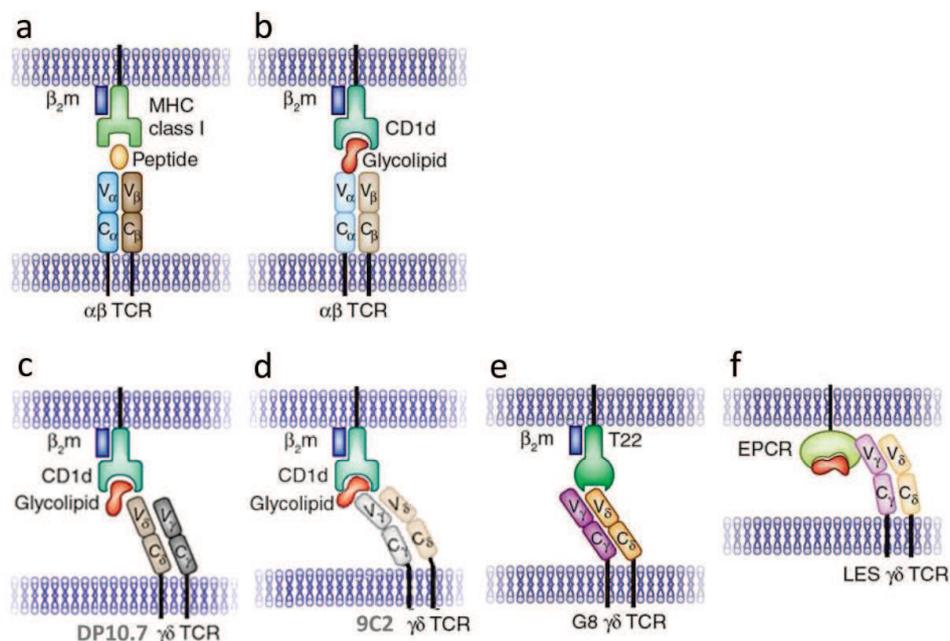
- Antigènes du soi

Bien que la reconnaissance antigénique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  ne soit pas dépendante de la présentation de peptides par les molécules du CMH, des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins dirigés contre les molécules de CMH de classe II ont été caractérisés, comme le clone V $\gamma$ 2V $\delta$ 5 LKD1 spécifique d'IA et le clone LBK5 spécifique d'IE (Bluestone et al., 1988)(Matis et al., 1989). D'autres molécules apparentées au CMH sont des ligands de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dont les molécules non classiques du CMH de classe I T10 et T22, fréquemment reconnues par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins V $\gamma$ 1<sup>+</sup>, V $\gamma$ 4<sup>+</sup> ou V $\gamma$ 7<sup>+</sup> ainsi que par les clones KN6 et G8 (Crowley et al., 2000)(Shin et al., 2005)(Ito et al., 1990), et les molécules de stress MICA et MICB (MHC class I-related chains A et B) par des lymphocytes T V $\delta$ 1 humains (Groh et al., 1998). La caractérisation des clones KN6 et G8 a permis de montrer que leur réactivité n'est pas spécifique d'un peptide présenté, mais due à la reconnaissance des molécules présentatrices elles-mêmes contrairement aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  qui lient uniquement le peptide (Figure 6a et e)(Hampl et al., 1999)(Schild et al., 1994)(Weintraub et al., 1994)(Wu et al., 2002).

De même que les cellules NKT  $\alpha\beta$  de type I, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  reconnaissent des protéines de la famille CD1, molécules proches du CMH de classe I non polymorphiques présentant des lipides et glycolipides (Sugita et al., 2000)(Spada et al., 2000)(Stanic et al., 2003). La molécule CD1d est reconnue à la fois par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains V $\delta$ 1<sup>+</sup> et V $\delta$ 3<sup>+</sup>, qu'ils soient isolés à partir du sang ou de l'épithélium intestinal (Bai et al.,

2012)(Russano et al., 2007)(Mangan et al., 2013). Le CD1d est aussi reconnu par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins lorsqu'il est chargé avec la cardiolipine, un phospholipide partagé entre le non-soi (paroi bactérienne) et le soi (membrane mitochondriale) (Russano et al., 2007)(Dieudé et al., 2011). Récemment, l'endothelial protein C receptor (EPCR), molécule présentant environ 20% d'identité avec le CMH de classe I et les protéines de la famille du CD1, a également été montré comme étant le ligand du clone LES humain T V $\gamma$ 4V $\delta$ 5 dont la reconnaissance se fait indépendamment du lipide (Willcox et al., 2012). Toutes ces interactions se font entre le TCR et la molécule de présentation directement, le lipide n'étant pas toujours nécessaire à cette liaison (Figure 6c, d, f)(Uldrich et al., 2013)(Luoma et al., 2013)(Willcox et al., 2012). Ce mode de reconnaissance distingue ainsi les lymphocytes T  $\gamma\delta$  des NKT, ces derniers ne liant que le lipide grâce à leur chaîne invariante V $\alpha$  (Figure 6b)(Stanic et al., 2003).

Les TCRs de plusieurs de ces clones ont été cristallisés, avec ou sans leur ligand, permettant soit de définir directement leur mode d'interaction, soit de le modéliser. L'ensemble des TCRs mentionnés utilisent un ou plusieurs CDRs de la chaîne  $\delta$  pour fixer leur ligand, comme par exemple le TCR G8 qui utilise un motif formé par des résidus germinaux de la boucle CDR3 de la chaîne  $\delta$  pour lier T22 (Figure 6e)(Adams et al., 2005)(Shin et al., 2005), le clone  $\delta$ 1A/B-3 représenté figure 3B qui n'utilise que les motifs germinaux des boucles CDR1 $\delta$  et CDR2 $\delta$  pour lier MICA/B (Xu et al., 2011), ou encore les différents TCRs

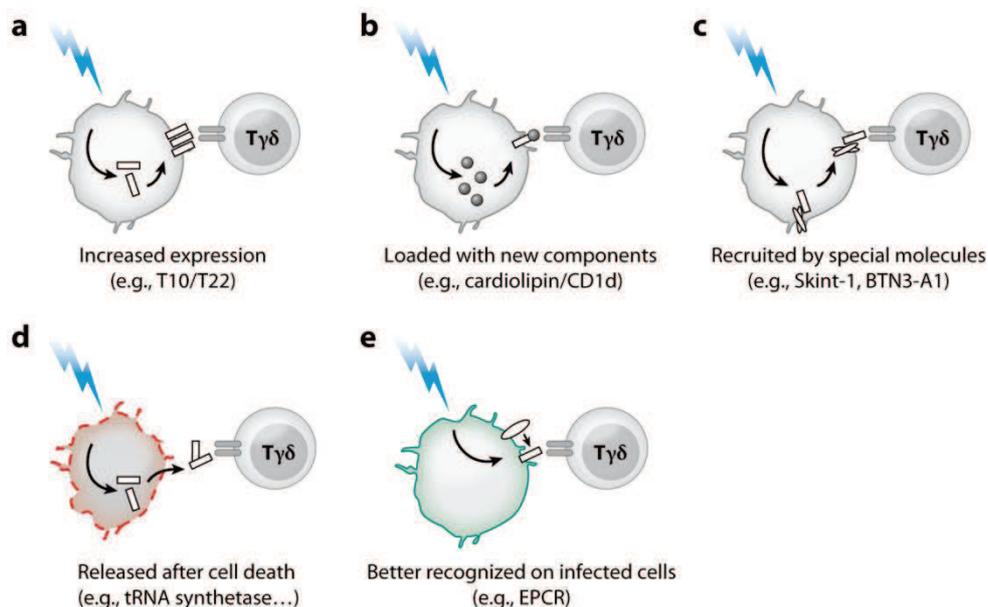


**Figure 6- Reconnaissance des ligands par les TCRs  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ .**

(a) Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  reconnaissent le peptide lié aux molécules du CMH par une interaction des deux chaînes du TCR.  $\beta_2m$ ,  $\beta_2$ -microglobuline. (b) En revanche, le TCR des cellules NKT de type I contacte le glycolipide lié au CD1d par sa chaîne TCR $\alpha$  invariante. (c,d,e,f) La reconnaissance des ligands par les cellules T  $\gamma\delta$  est moins bien caractérisée. (c) le TCR DP10.7 lie le CD1d par les CDR1 $\delta$ /CDR2 $\delta$  et le sulfatide par le CDR3 $\delta$  alors que (d) Le TCR 9C2 interagit avec le CD1d et l' $\alpha$ -GalCer lié par le CDR1 $\delta$ /CDR3 $\delta$  et le CDR3 $\gamma$  respectivement. (e) Le TCR  $\gamma\delta$  G8 contacte le sillon peptidique de la molécule T22 par la boucle CDR3 $\delta$ , la chaîne  $\gamma$  ayant une contribution mineure dans cette interaction. (f) Le TCR  $\gamma\delta$  LES contacte de manière unique son ligand l'EPCR. La boucle CDR3 de la chaîne  $\gamma$  du TCR lie l'EPCR par des résidus sur le feuillet  $\beta$  et ce indépendamment du lipide. Adapté de (Witherden and Havran, 2012)

V $\delta$ 1 liant le CD1d par une ou plusieurs des boucles CDRs de la chaîne V $\delta$ 1 et parfois le CDR3 $\gamma$  (Figure 6b, c et d)(Uldrich et al., 2013)(Luoma et al., 2013). La seule exception caractérisée est l'EPCR, molécule identifiée au laboratoire dans le contexte de l'infection à cytomégalovirus, dont la reconnaissance se fait par le TCR via la boucle CDR3 de la chaîne  $\gamma$  ce qui montre que la spécificité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  pour les molécules de présentation n'est pas toujours conférée par la chaîne  $\delta$  (Figure 6e)(Willcox et al., 2012).

On a longtemps pensé que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  pouvaient reconnaître des antigènes exogènes microbiens du fait de leur expansion au niveau du compartiment sanguin dans de nombreux contextes pathologiques. Cependant, les études réalisées ces dernières années ont permis d'identifier plusieurs molécules du soi comme autres ligands des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , soulignant leur caractère auto-réactif. Ces molécules du soi représentent maintenant les antigènes les mieux caractérisés. Seuls des contextes de stress cellulaire induisent l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , en modulant l'expression des antigènes qu'ils reconnaissent. Certaines molécules comme T10/T22 ne sont « vues » par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  qu'en cas de surexpression (Figure 7a). Dans certains autres cas, le contexte pathologique va favoriser la formation de complexes moléculaires qui sont reconnus une fois associés (Figure 7b et c) ou induire, suite à la mort des cellules, la libération d'éléments intracellulaires (Figure 7d). Dans le cas de l'EPCR, le stress lié à l'infection virale améliore la reconnaissance antigénique (Figure 7e). Les modifications mentionnées ci-dessus peuvent faire partie des mécanismes permettant de limiter l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  à des situations particulières. En plus de ces modifications, leur régulation est également contrôlée par l'ensemble des corécepteurs activateurs et inhibiteurs décrits dans le paragraphe suivant.

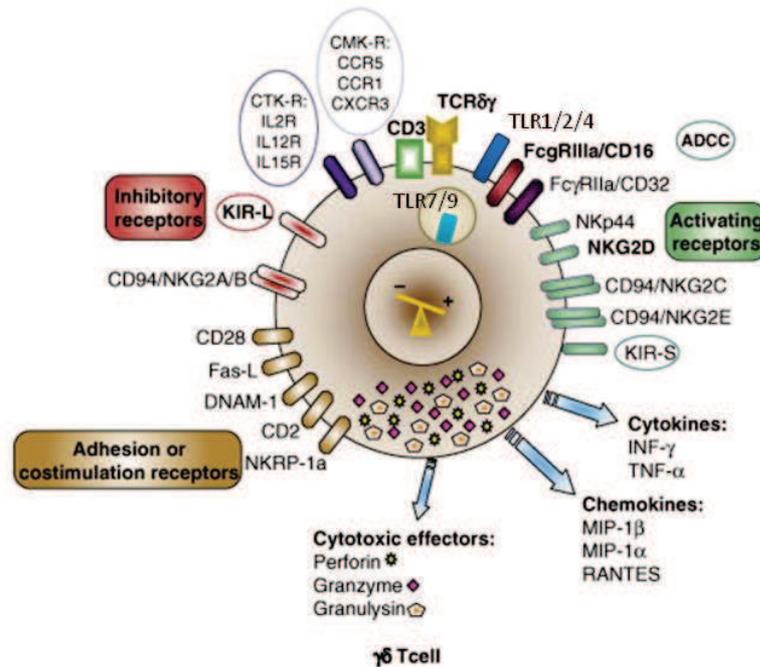


**Figure 7- Modalités de reconnaissance des antigènes du soi par les lymphocytes T  $\gamma\delta$ .**

Cette reconnaissance peut être initiée/amplifiée par (a) une surexpression en surface comme T10/22 sur les monocytes infectés par le virus de l'influenza, (b) l'acquisition de nouveaux composants, qu'ils soient de l'hôte ou d'origine microbienne, comme l'association de la cardiolipine et du CD1d, (c) recrutement d'autres molécules comme Skint-1 ou BTN3-A1, (d) libération suite à l'induction de la mort cellulaire comme la tRNA synthétase, et (e) une meilleure reconnaissance sur des cellules infectées comme l'EPCR (Endothelial Protein C Receptor). D'après (Chien, 2014).

### b) Corécepteurs des lymphocytes T $\gamma\delta$

En plus de leur TCR, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  expriment de nombreux corécepteurs dont des récepteurs de type NKR (Natural Killer Receptor) ou Pathogen Recognition Receptor (PRR) comme les TLRs (Toll Like Receptor) qui les sensibilisent à leur environnement et régulent leur activation en donnant soit un signal activateur ou au contraire un signal inhibiteur (Figure 8)(Rey et al., 2009)(Wesch et al., 2011).



**Figure 8- Récepteurs des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .**

Les récepteurs ont été classés par couleur selon leur rôle : les récepteurs activateurs impliqués dans la cytolyse (vert), les récepteurs d'adhésion et de costimulation délivrant d'autres signaux positifs (marron), les TLR activateurs extra- et intracellulaires (bleu), et les récepteurs inhibiteurs qui inhibent la cytolyse (rouge). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  partagent certains de leurs récepteurs avec les cellules Natural Killer, comme le NKG2D et les KIR, ou avec des cellules innées, comme les TLR2 ou 4. Ces signaux contribuent à la régulation des fonctions des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , comme leur activation/prolifération, la production de cytokines et/ou chimiokines et à la cytolyse médiée en partie par la production de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes. Les principaux récepteurs sont indiqués en gras. D'après (Rey, 2009).

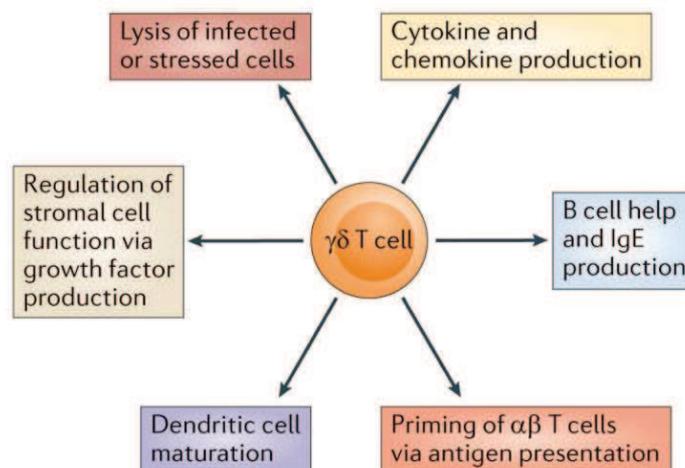
Un des corécepteurs majeurs est le NKR activateur NKG2D. Il est largement exprimé à la surface des lymphocytes T  $\gamma\delta$  et reconnaît les molécules MICA ou ULBP (UL-16 Binding Protein) chez l'homme, et Rae-1 chez la souris. Ces molécules apparentées au CMH de classe I sont surexprimées lors de stress et également reconnues, pour certaines, par des TCRs  $\gamma\delta$  (Groh et al., 1998)(Kong et al., 2009). Dans la plupart des cas, le NKG2D est un corécepteur fonctionnant en synergie avec le TCR et menant à l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains et murins lors d'un contexte infectieux, tumoral ou dans un modèle de surexpression (Thedrez et al., 2007)(Corvaisier et al., 2005)(Strid et al., 2008). De ce fait, il est hautement probable que certaines molécules puissent stimuler de manière séquentielle le TCR et le NKG2D entraînant l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Wu et al., 2002). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent également recevoir un signal de costimulation par leurs TLRs dans des contextes infectieux. Le jeu de TLRs activés dépend du pathogène rencontré, l'infection à *E.coli* étant

déTECTÉE par le TLR4 alors qu'une immunisation avec *M.tuberculosis* stimule les TLR1 et 2 (Shibata et al., 2007)(Martin et al., 2009)(Devilder et al., 2009).

Dans certains cas, les cellules T  $\gamma\delta$  peuvent être activées directement par leurs corécepteurs en absence de signal TCR. Par exemple, l'activation du NKG2D serait suffisante pour engendrer une réponse cytotoxique des DETC contre des cellules tumorales épithéliales ou des lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 contre des macrophages infectés par le virus de l'influenza (Girardi et al., 2001)(Qin et al., 2009). Les cytokines peuvent aussi, via leurs récepteurs, aboutir à l'activation des cellules comme l'IFN de type I ou la combinaison IL-1 $\beta$  et IL-23 qui induisent la production d'IL-17 (Sutton et al., 2009). Ces activations TCR indépendantes font partie des nombreux éléments reliant les lymphocytes T  $\gamma\delta$  à l'immunité innée.

## B. Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont les premiers lymphocytes T circulants fonctionnels générés que ce soit chez l'homme ou la souris (De Rosa et al., 2004)(Gibbons et al., 2009). Leurs fonctions sont diverses (Figure 9) et partiellement non redondantes de celles des lymphocytes T  $\alpha\beta$  du fait de leur localisation, de leurs récepteurs innés et adaptatifs et de leur cinétique d'activation. Au niveau des épithéliums et des muqueuses, ils forment la première ligne de défense de l'organisme ce qui leur permet d'intervenir très rapidement pour limiter la dissémination des pathogènes et d'initier les réponses immunitaires innées et adaptatives. Lors des phases plus tardives, ils peuvent avoir un rôle anti-inflammatoire et favoriser la réparation tissulaire. À l'heure actuelle, le mode d'acquisition de ces fonctions pléiotropiques fait débat et de nombreuses études sont réalisées afin de déterminer comment ces cellules, à la fois adaptatives et innées, sont programmées.



**Figure 9- Six des fonctions les mieux caractérisées des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .**

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent avoir un rôle central pour défendre l'organisme contre une grande variété de stress. Cette protection s'effectue par six mécanismes principaux. 1- Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent directement lyser et éliminer les cellules stressées, 2- ils peuvent produire diverses cytokines et chimiokines régulant les autres cellules immunes et non-immunes, 3- ils jouent un rôle d'aide aux lymphocytes B et favorisent la production des IgE, 4- ils peuvent activer les lymphocytes T  $\alpha\beta$  en leur présentant des antigènes, 5- ils peuvent déclencher la maturation des cellules dendritiques et 6- ils peuvent réguler les fonctions des cellules stromales par la production de facteurs de croissance. D'après (Vantourout and Hayday, 2013).

## 1. Quelques fonctions effectrices des lymphocytes T $\gamma\delta$

### a) Production de cytokines et de chimiokines

En règle générale l'infection par un pathogène intracellulaire induit une réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> conventionnels de type Th1 dont les cytokines « signatures » sont l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et l'IL-2. À l'inverse, l'infection par un pathogène extracellulaire induit une réponse Th2 (IL-4, IL-10, etc.). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins et humains peuvent eux aussi suivre cette règle puisque (i) l'infection de souris par la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes* induit la production d'IFN $\gamma$  alors qu'ils produisent de l'IL-4 lors d'une infection par le parasite extracellulaire *Nippostrongylus brasiliensis* (Ferrick et al., 1995), et (ii) les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 humains activés via leur TCR et cultivés en condition de type Th1 produisent de l'IFN $\gamma$  alors qu'en condition de culture de type Th2, ils produisent de l'IL-4 (Wesch et al., 2001).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , comme les lymphocytes T  $\alpha\beta$  ou les NKT, participent à la production d'IL-17 dans différents contextes pathologiques. Plusieurs éléments rapprochent les lymphocytes T  $\gamma\delta$  producteurs d'IL-17 des NKT : d'une part, ils sécrètent très rapidement et en importante quantité cette cytokine suite à une stimulation par injection de *Mycobacterium tuberculosis* inactivé à des souris C57BL/6 et d'autre part, la combinaison IL-1 et IL-23 et la stimulation de TLR sont suffisantes pour induire la production d'IL-17 par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  en absence de stimulation TCR d'où leur qualification de cellules « innate-like » (Martin et al., 2009)(Sutton et al., 2009).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent également jouer un rôle dans l'initiation de la réponse adaptative en créant un contexte favorable à sa mise en place, par recrutement des cellules sur le site stressé, comme par exemple les lymphocytes T  $\alpha\beta$  grâce à la production de la chimiokine lymphotactine, ou en orientant la réponse vers la voie Th1, Th2 ou Th17 par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-17 respectivement (Boismenu et al., 1996)(Cui et al., 2009).

### b) Élimination des cellules cibles

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent éliminer leurs cibles par différents mécanismes : le premier nécessite l'engagement de récepteur(s) de mort alors que le second passe par la sécrétion de molécules cytotoxiques ou antimicrobiennes. Suite à leur activation, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains et murins expriment à leur surface le Fas ligand (FasL) et/ou la molécule TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) dont l'engagement respectif avec les récepteurs Fas ou TRAILR induit la mort par apoptose de la cellule cible (Kabelitz et al., 2004)(De La Barrera et al., 2003)(Tramonti et al., 2008)(Dalton et al., 2004)(D'asaro et al., 2010). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent sécréter des molécules cytotoxiques telles que la perforine, le granzyme et/ou la granulysine chez l'homme (Koizumi et al., 1991)(Dieli et al., 2001)(Qin et al., 2009), ainsi que des peptides antimicrobiens comme les défensines et, chez l'homme, les cathélicidines dont le seul membre décrit à ce jour comme produit par les

lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 est le peptide LL-37 (MacLeod et al., 2013)(Agerberth et al., 2000)(Dudal et al., 2006).

### **c) Maturation des DC et activation des lymphocytes T $\alpha\beta$**

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent induire la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (DC) inflammatoires sur des sites infectieux en produisant des molécules solubles telles que l'IFN $\gamma$  ou le Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et interagissant avec ces derniers par des intégrines et/ou d'autres molécules comme le CD40 ligand (Inoue et al., 2012). Les DC différenciées vont ensuite présenter des antigènes et activer les lymphocytes T  $\alpha\beta$  (Devilder et al., 2006)(Eberl et al., 2009).

Les lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 humains activés peuvent présenter des caractéristiques phénotypiques de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), comme l'expression de molécules de co-stimulation telles que le CD80, d'adhésion comme Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) ou le CCR7 permettant leur migration vers les ganglions lymphatiques où ils seront au contact des lymphocytes T  $\alpha\beta$  (Brandes et al., 2003)(Brandes et al., 2005). D'un point de vue fonctionnel, ils sont capables de présenter *via* le CMH de classe I ou II des antigènes aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> naïfs et ainsi induire leur prolifération et différenciation (Brandes et al., 2009)(Wu et al., 2009)(Himoudi et al., 2012). Cette fonction des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est presque exclusivement étudiée *in vitro* chez l'homme et il semblerait que les cellules murines puissent avoir la même capacité (Collins et al., 1998)(Cheng et al., 2008).

### **d) Aide aux lymphocytes B**

Les cellules T  $\gamma\delta$  murines peuvent également interagir avec les lymphocytes B et favoriser la production d'anticorps en soutenant la formation de centres germinatifs nécessaires à la sélection/maturation des lymphocytes B et induisant l'hypermutation somatique améliorant l'affinité des Igs et/ou la production d'IgE suite à une infection (Wen et al., 1996)(Zheng et al., 2003). Chez l'homme, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  activés expriment des molécules de co-stimulation des lymphocytes B, migrent dans les centres germinatifs et stimulent la production d'IgM, IgG et IgA (Brandes et al., 2003).

### **e) Régulation de la fonction des cellules stromales**

Lors des phases plus tardives de la réponse immunitaire, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont impliqués dans le maintien de l'intégrité tissulaire en participant à la régulation de la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires parmi lesquelles le Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et l'IL-10 (Peng et al., 2007)(Bhagat et al., 2008) et en régulant l'infiltration des cellules myéloïdes pro-inflammatoires (Rani et al., 2014). Ils peuvent également éliminer directement les cellules effectrices mobilisées au cours de la réponse immunitaire (Qin et al., 2009).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  participent également à la réparation tissulaire par la sécrétion de facteurs de croissance comme le fibroblast growth factor (FGF) ou l'epidermal growth

factor (EGF) (Boismenu and Havran, 1994)(Jameson and Havran, 2007). Les DETC murins et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains résidant dans la peau ont clairement été montrés comme mobilisés dans la cicatrisation cutanée puisque leur absence/anergie résulte en un défaut de cicatrisation (Jameson and Havran, 2007)(Toulon et al., 2009). Bien plus récemment, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains comme murins ont été montrés comme participant à la réparation de l'ADN des kératinocytes endommagés par les ultraviolets (MacLeod et al., 2014). Ces résultats montrent que, même si les DETCs murins n'ont pas d'équivalents chez l'homme, certaines populations T  $\gamma\delta$  humaines et murines possèdent des fonctions comparables visant à maintenir l'intégrité tissulaire.

## 2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ : effecteurs pré-programmés ou plastiques ?

Les études menées chez la souris montrent que les différentes sous-populations T  $\gamma\delta$  ne sont pas programmées de la même manière, conférant à chacune d'elle des propriétés effectrices plus ou moins restreintes selon les TCRs exprimés, leur localisation tissulaire et leur état d'activation comme résumé dans le tableau 1 (pour revue, voir (Prinz et al., 2013a)).

$\gamma\delta$ T cell subset	V $\delta$	Location	Effector functions (programmed in the thymus or inducible in the periphery)
V $\gamma$ 1	ND	Lymphoid tissue	Programmed: TNF and IFN $\gamma$ Inducible: T $_H$ 2-type cytokines and IL-17
	V $\delta$ 5	Thymus and spleen	Programmed: cytokines are unknown but IL-4 and IL-13 are not produced
	V $\delta$ 6.3 and V $\delta$ 6.4	Thymus, spleen and liver	Programmed: IFN $\gamma$ , IL-4, IL-13 and cytotoxicity
V $\gamma$ 4	ND	Lymphoid tissue and lung	Programmed: IL-17 Inducible: TNF, IFN $\gamma$ and cytotoxicity
	Selected V $\delta$ 4	Lymph node	Inducible: IL-17
	V $\delta$ 5	Spleen	Inducible: IFN $\gamma$ -dependent development
V $\gamma$ 5	V $\delta$ 1 invariant	Epidermis	Programmed: IL-22, IFN $\gamma$ , TNF, KGF1, IGF1, CCL5, defensins, MIP1, XCL1 and cytotoxicity
	V $\delta$ 4 and others	Mammary gland	ND
V $\gamma$ 6	V $\delta$ 1 invariant	Tongue, uterus, placenta, testes, lung and kidney	Programmed: IL-17, IL-22, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ and cytotoxicity
V $\gamma$ 7	V $\delta$ 4 and others	Intestinal mucosa	Programmed: TNF, IFN $\gamma$ , KGF1 and cytotoxicity

**Tableau 1- Fonctions effectrices des différentes sous-populations T  $\gamma\delta$  murines.**

CCL, CC-chemokine ligand ; IGF-1, insulin-growth factor 1 ; IL, interleukine ; IFN $\gamma$ , interféron  $\gamma$  ; KGF-1, keratinocyte growth factor 1 ; MIP1, macrophage inflammatory protein 1 ; ND, non determine ; TGF $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$  ; T $_H$ , T helper ; TNF, tumor necrosis factor ; XCL1, XC-chemokine ligand 1. Tiré de (Bonneville et al., 2010).

### a) Acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes T $\gamma\delta$ murins

- Programmation thymique lors de la vie fœtale

De nombreux lymphocytes T  $\gamma\delta$  acquièrent leur(s) fonction(s) effectrice(s) au cours de leur développement thymique et montrent une plasticité limitée en périphérie. Parmi ces lymphocytes T  $\gamma\delta$ , on trouve majoritairement les sous-populations exprimant des TCRs

invariants ou ayant une diversité restreinte. Ces cellules sont généralement qualifiées de « innate-like » du fait de leur capacité à répondre à une stimulation cytokinique seule, sans activation du TCR (Wencker et al., 2014)(Sutton et al., 2009). Des études réalisées sur les DETCs  $V\gamma 5V\delta 1$ , sous-population prototypique de cellules « innate-like » résidant dans l'épithélium cutané, ont montré que leur maturation et leur capacité à produire de l'IFN $\gamma$  sont dépendantes de la molécule Skint-1 exprimée sur les cellules épithéliales thymiques (Lewis et al., 2006)(Turchinovich and Hayday, 2011). Suite à cette interaction, les DETCs vont acquérir des caractéristiques de type Th1 en augmentant l'expression des facteurs de transcription T-bet et éomésodermine (Eomes) qui leur permettront de produire des cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et des molécules cytotoxiques en périphérie (Figure 10, panel supérieur)(Boyden et al., 2008)(Xiong et al., 2004). L'absence de Skint-1 au cours de la programmation des DETCs induit l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t et la production d'IL-17 (Turbinovich and Hayday, 2011). Ces résultats montrent que Skint-1 est un facteur critique pour le bon développement fonctionnel des DETCs. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1V\delta 6.3$   $NK1.1^+CD4^{+/-}$ , localisés préférentiellement dans le foie et la rate, sont eux aussi générés à partir de progéniteurs fœtaux et caractérisés par la co-production d'IFN $\gamma$  et d'IL-4 (Figure 10, panel supérieur)(Gerber et al., 1999)(Grigoriadou et al., 2003). L'acquisition de leurs fonctions effectrices est dépendante du facteur de transcription promyelocytic leukaemia zinc-finger (PLZF) dont l'expression est induite suite à l'engagement des récepteurs de la famille Signalling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM) avec les cellules thymiques hématopoïétiques et en aval, de l'activation de la voie de signalisation médiée par SLAM-associated Protein (SAP) (Kreslavsky et al., 2009).

En plus de ces deux sous-populations T  $\gamma\delta$ , les producteurs d'IL-17 font également partie des lymphocytes « innate-like » qu'ils expriment le TCR invariant  $V\gamma 6V\delta 1$  ou un TCR composé des chaînes  $V\gamma 1$  ou  $V\gamma 4$  produit lors des premiers réarrangements de ces chaînes à la fin de la vie fœtale (Figure 10, panel supérieur). Ces cellules sont souvent appelées lymphocytes T  $\gamma\delta$  IL-17 $^+$  naturels par opposition aux producteurs d'IL-17 induits en périphérie (Chien et al., 2013). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  IL-17 $^+$  naturels sont produits uniquement au cours de la vie fœtale.

Plusieurs types de sélection ont été proposés pour ces cellules « innate-like » : elles pourraient se différencier suite à l'activation d'autres voies de signalisation TCR-indépendantes passant par le récepteur Notch1 ou des facteurs de transcription de la famille des High-Mobility Group Box (HMGB) qui contrôlent les gènes nécessaires à la production d'IL-17 (Shibata et al., 2011)(Malhotra et al., 2013), ou suite à l'activation du TCR par une oligomérisation de celui-ci ou à une sélection antigénique (Haas et al., 2012)(Wencker et al., 2014). Ce dernier type de sélection n'a été suggéré que récemment par des expériences montrant qu'après à une forte activation du TCR, ce dernier deviendrait peu réactif vis-à-vis des antigènes et les cellules deviendraient plus sensibles aux signaux « innés » en augmentant l'expression des récepteurs à cytokines, les TLRs, etc. (Wencker et al., 2014). En plus de cette étude réalisée sur les DETCs et les producteurs naturels d'IL-17  $V\gamma 6^+$  ou  $V\gamma 4^+$ ,

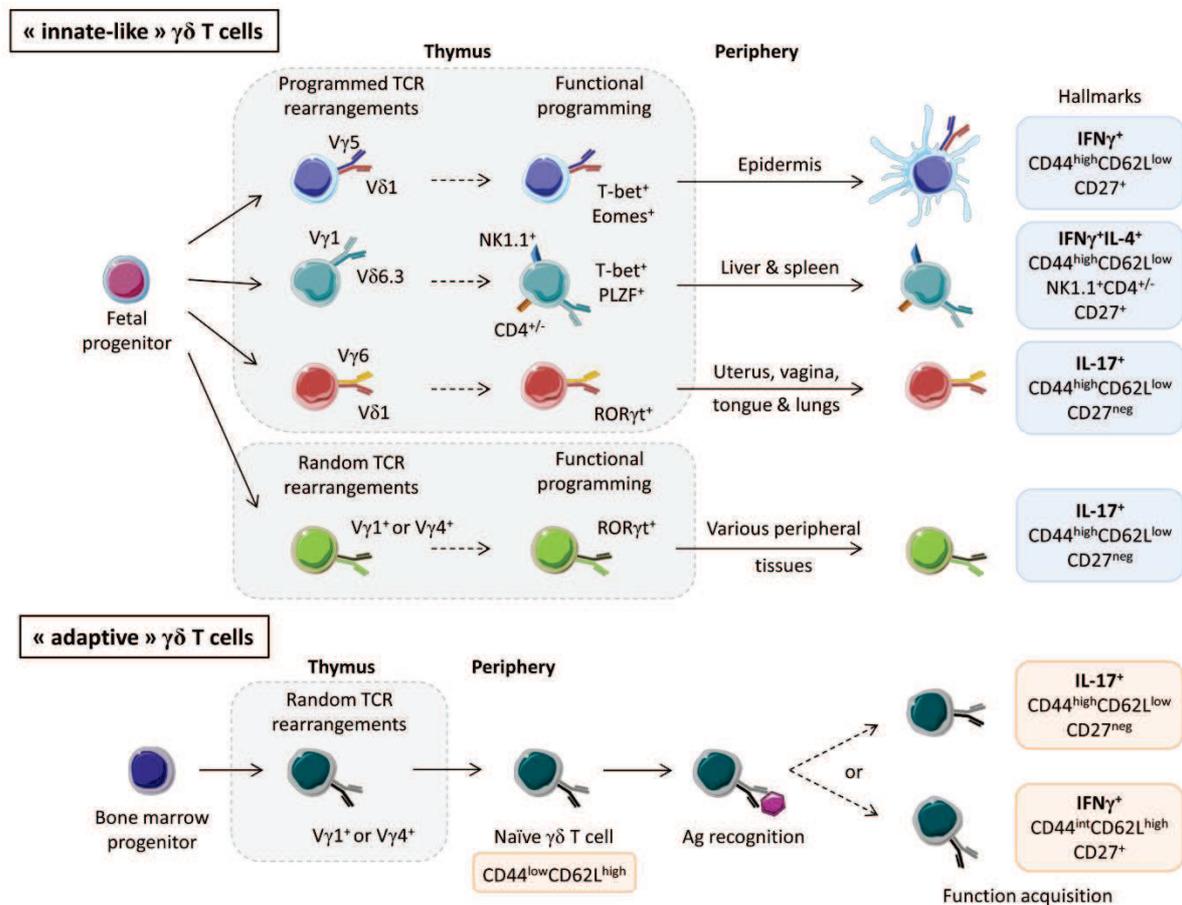
les travaux de Kreslavsky et collègues vont dans le même sens et suggèrent une implication du TCR dans la sélection et la fonctionnalisation des lymphocytes T  $V\gamma 1V\delta 6.3^+$ . Le cross-linking *in vitro* des TCRs de lymphocytes T  $\gamma\delta$  polyclonaux ou la transduction du TCR  $V\gamma 1V\delta 6.3$  suffisent à induire l'expression du facteur de transcription PLZF et donc de l'IL-4 qui est indispensable à la fonction des lymphocytes T  $V\gamma 1V\delta 6.3^+$  (Kreslavsky et al., 2009). Les caractéristiques de ces cellules « innate-like » sont donc acquises dans le thymus dans lequel elles sont sélectionnées, ce qui est en accord avec leur phénotype activé  $CD44^{high}CD62L^{low}$  (Kreslavsky et al., 2009)(Ribot et al., 2009). Cependant, les mécanismes impliqués dans la sélection de ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont encore mal définis à l'heure actuelle, et la nécessité d'une sélection antigène-dépendante n'est pas clairement établie.

- Plasticité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dérivés de la moelle osseuse

À l'inverse des sous-populations T  $\gamma\delta$  « innate-like », certains lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins conservent une plasticité fonctionnelle en périphérie leur permettant de s'adapter à la situation pathologique rencontrée. Les sous-populations plastiques sont surtout des cellules T  $V\gamma 1^+$  (non  $V\delta 6.3$ ) et  $V\gamma 4^+$  comme il a pu être observé dans différents modèles murins de maladie. Par exemple, l'activation des lymphocytes T  $V\gamma 4^+$  dans un modèle d'arthrite induite ou des  $V\gamma 1^+$  dans une maladie chronique granulomateuse aboutit à la production de fortes quantités d'IL-17 par les deux populations (Roark et al., 2007)(Romani et al., 2008), alors que dans un modèle de mélanome ou de stimulation par le complexe CD1d- $\alpha$ GalCer elles produisent de l'IFN $\gamma$  (He et al., 2010)(Paget et al., 2012). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  comme  $V\gamma 4^+$  n'auraient pas de spécificité antigénique pour des ligands thymiques et quittent le thymus avec un phénotype naïf  $CD44^{low}CD62L^{high}$ , comme montré pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$  reconnaissant la PE qui sont naïfs avant immunisation (Figure 10, panel inférieur)(Zeng et al., 2012).

La dichotomie fonctionnelle entre les cellules productrices d'IFN $\gamma$  et celles produisant de l'IL-17 a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de mieux caractériser chacune de ces sous-populations (Jensen et al., 2008)(Ribot et al., 2009)(Ribot et al., 2010)(Haas et al., 2009). Les cellules productrices d'IFN $\gamma$  sont  $CD27^{high}$ , caractérisées par un phénotype  $CD44^{int}$ ,  $CD62L^{high}$  et seraient activées en périphérie suite à la rencontre d'un antigène et d'un signal de costimulation donné par le CD27 (Soares et al., 2007). Cette fonction serait induite dans ces cellules du fait d'une faible méthylation du locus de l'IFN $\gamma$  et de l'expression constitutive du facteur de transcription Eomes (Chen et al., 2007)(Yin et al., 2002). Les producteurs d'IL-17 sont quant à eux  $CD27^{low}$  et ont un phénotype activé  $CD44^{high}$ ,  $CD62L^{low}$ . Ces cellules peuvent également produire de l'IFN $\gamma$  dans certains contextes du fait de la faible méthylation du génome sur les loci *il17* et *ifn $\gamma$*  (Schmolka et al., 2013). Après leur activation par un antigène en périphérie, ces producteurs d'IL-17 induits ne répondraient plus qu'aux signaux transmis par des récepteurs innés tels que des TLRs ou des récepteurs à cytokines comme il a été décrit pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$  IL-17 $^+$  naturels.

Deux modèles, mutuellement non exclusifs, sont proposés quant au mode d'acquisition de ces fonctions effectrices : le modèle de prédétermination, où la fonction serait déterminée avant l'expression du TCR, et le modèle de spécification TCR-dépendante. Le premier suggère que chaque sous-population T  $\gamma\delta$  immature exprime un ensemble de facteurs de transcription qui favorise l'acquisition de l'une ou l'autre des fonctions, comme par exemple les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup> qui expriment fortement le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et produisent fréquemment de l'IL-17 (Narayan et al., 2012). Des facteurs externes comme les cytokines ou les récepteurs de surface peuvent également avoir une influence sur la fonction des lymphocytes T  $\gamma\delta$  tels que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 qui les orientent vers la production d'IL-17 (Sutton et al., 2009). Le second modèle fait jouer un rôle au TCR et propose que selon l'intensité du signal TCR reçu, les cellules vont s'orienter vers l'une ou l'autre des fonctions : les cellules ayant reçu un signal de forte intensité produisant de l'IFN $\gamma$  et celles qui ont reçu un signal de faible intensité de l'IL-17 (Jensen et al., 2008)(Hayes et al., 2010). Ces modèles soulèvent encore beaucoup de questions et nécessitent des études supplémentaires pour déterminer si c'est l'affinité des ligands reconnus par le complexe TCR  $\gamma\delta$  lui-même qui joue un rôle sur l'intensité du signal délivré et comment la signalisation du TCR coopère avec les facteurs environnants (cytokines, etc.) pour orienter la cellule vers une fonction effectrice particulière.



### **Figure 10- Acquisition des caractéristiques fonctionnelles des sous-populations murines T $\gamma\delta$ .**

Panel supérieur « innate-like  $\gamma\delta$  T cells » - Les progéniteurs fœtaux génèrent, lors de vagues successives et par des réarrangements programmés, des lymphocytes T  $\gamma\delta$  exprimant les TCRs invariants ou possédant des séquences jonctionnelles très proches V $\gamma$ 5V $\delta$ 1, V $\gamma$ 1V $\delta$ 6.3 ou V $\gamma$ 6V $\delta$ 1 et ayant un phénotype activé CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>. L'interaction des cellules T invariantes V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup> avec les cellules épithéliales thymiques induit l'engagement vers un phénotype Th1-like et leur homing vers la peau, où les cellules T prendront leur morphologie dendritique. L'interaction des lymphocytes T V $\gamma$ 1V $\delta$ 6.3<sup>+</sup> avec les cellules thymiques d'origine hématopoïétique augmente l'expression du CD4 et du NK1.1 ainsi que la production d'IL-4 et d'IFN $\gamma$ , respectivement sous le contrôle des facteurs de transcription PLZF et T-bet. Les thymocytes exprimant le TCR V $\gamma$ 6V $\delta$ 1 acquièrent dans le thymus fœtal des propriétés de type Th17, sous le contrôle du facteur de transcription ROR $\gamma$ t, et des propriétés de migration les dirigeant vers les épithéliums utérins, vaginaux, de la langue et des poumons. Les autres producteurs naturels d'IL-17 expriment les chaînes V $\gamma$ 1<sup>+</sup> ou V $\gamma$ 4<sup>+</sup> et, comme les thymocytes T V $\gamma$ 6V $\delta$ 1, acquièrent dans le thymus fœtal la capacité à sécréter de l'IL-17 via l'expression de ROR $\gamma$ t. Panel inférieur « adaptive  $\gamma\delta$  T cells » - Dans le thymus, les progéniteurs dérivés de la moelle osseuse génèrent des lymphocytes T  $\gamma\delta$  exprimant des TCRs divers composés de l'association d'une chaîne V $\gamma$ 1 ou V $\gamma$ 4 avec une chaîne V $\delta$ n et ayant une grande variabilité jonctionnelle. Ces cellules ne sont pas fonctionnellement pré-programmées et migrent en périphérie avec un phénotype naïf CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>. Ces cellules peuvent se différencier et s'activer après avoir rencontré un antigène en périphérie. Selon le contexte cytokinique, elles deviendront soit des producteurs d'IL-17 caractérisés par l'absence d'expression du marqueur CD27 et un phénotype activé CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>, soit des producteurs d'IFN $\gamma$  avec un phénotype CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>. Ag : antigène; EOMES : eomesodermin; PLZF : promyelocytic leukemia zinc finger.

#### ***b) Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ humains : programmation thymique ou acquisition en périphérie ?***

Contrairement à celle des cellules murines, la programmation thymique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains reste encore assez mal comprise et l'équivalent des cellules CD27<sup>low</sup>IL-17<sup>+</sup> n'a pas été trouvé chez l'homme. Cependant, il est possible que certaines sous-populations puissent être sélectionnées dans le thymus chez l'homme. Chez la souris, l'activation des DETCs met en jeu la molécule thymique Skint-1 comme décrit précédemment (Turchinovich and Hayday, 2011). Récemment, la BTN3-A1 a été identifiée comme une molécule nécessaire à l'activation des lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9<sup>+</sup> par les phosphoantigènes. Cette molécule possède des domaines extracellulaires de type Ig similaires à ceux de Skint-1 (Wang et al., 2013). De plus, ces molécules ont toutes deux besoin de leur segment cytoplasmique pour être fonctionnelles, laissant supposer que leur fonction est dépendante de leur association avec des protéines intracellulaires. Ces quelques éléments suggèrent de ce fait un rôle comparable de ces deux molécules impliquant potentiellement la BTN3-A1 dans la programmation thymique des lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9<sup>+</sup>. Il est donc possible que ces cellules se comportent comme les lymphocytes T  $\gamma\delta$  « innate-like » murins et une étude récente menée sur des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> et V $\delta$ 2<sup>+</sup> extraits de thymus présentant, de manière surprenante, un phénotype naïf CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> va également dans ce sens. Dans cette étude, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> et V $\delta$ 2<sup>+</sup> thymiques n'ont besoin que d'une stimulation par de l'IL-2 et/ou de l'IL-15 pour produire de l'IFN $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  (Ribot et al., 2014). Ces cellules T  $\gamma\delta$  humaines, malgré leur phénotype naïf semblent donc se comporter comme les cellules « innate-like » murines en répondant uniquement aux stimuli cytokiniques.

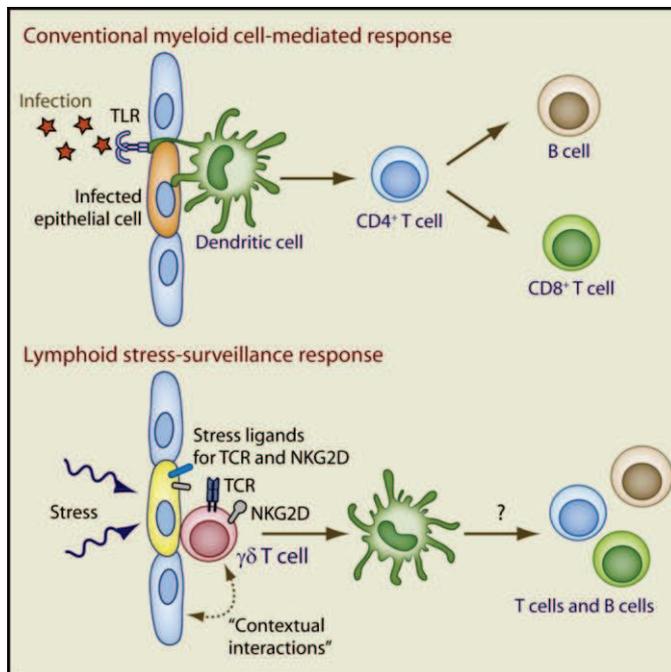
Plusieurs études menées *in vitro* sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains, qu'ils expriment un TCR V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 ou qu'ils fassent partie de la population T V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, montrent une certaine plasticité de ces cellules. En effet, les lymphocytes T V $\delta$ 2<sup>neg</sup> peuvent produire de l'IFN $\gamma$  et avoir une fonction cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales d'origines variées (Maeurer et al., 1996) ou produire de l'IL-17 et recruter des cellules immunosuppressives (Wu et al., 2014). Les lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 activés via leur TCR et la molécule de co-stimulation CD27 sont quant à eux préférentiellement polarisés vers une voie de type Th1, produisant de l'IFN $\gamma$  et des molécules cytotoxiques (Thedrez et al., 2007)(DeBarros et al., 2011)(Born and O'Brien, 2011). Cependant, cette population peut quand même être polarisée *in vitro* et acquérir des caractéristiques associées aux cellules de type Th2 ou encore de lymphocytes T folliculaires (TFH) selon le contexte cytokinique dans lequel ils sont activés via leur TCR (Vermijlen et al., 2007). Les lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9, qu'ils soient isolés de sang de cordon avec majoritairement un phénotype naïf ou triés à partir de donneurs adultes sains sur leur phénotype naïf, peuvent se différencier en producteurs d'IL-17 suite à une stimulation TCR et à l'ajout de différentes cytokines (IL-1 $\beta$ +IL-6+TGF- $\beta$  pour les cellules de sang de cordon et IL-1 $\beta$ +IL-6+TGF- $\beta$ +IL-23 pour celles de donneurs sains) (Ness-Schwickerath et al., 2010) (Caccamo et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9, comme les sous-populations murines V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup> adaptatives, sont capables de s'activer en périphérie suite à la reconnaissance d'un antigène et sécréter de l'IFN $\gamma$  ou de l'IL-17 selon le contexte cytokinique.

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains pourraient donc potentiellement être divisés en sous-populations « innate-like » et adaptatives et acquérir leur(s) fonction(s) dans le thymus ou en périphérie respectivement. Cependant, certains éléments ne vont pas dans ce sens : (i) les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins « innate-like » ont un phénotype activé contrairement aux cellules humaines extraites de thymus et (ii) la différenciation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains pourrait être terminée en périphérie puisque les cellules circulantes perdent leur phénotype naïf. Ces études doivent être complétées afin de déterminer si les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains sont engagés vers ces fonctions lors de leur développement intrathymique ou si ces mécanismes diffèrent réellement entre l'homme et la souris, aboutissant malgré tout à des fonctions similaires.

## C. Place des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la réponse immunitaire

### 1. Acteurs de la réponse lymphocytaire aux antigènes de stress

De manière classique, la surveillance immunitaire mobilise les cellules immunitaires innées comme les DCs qui vont « sentir » les modifications du microenvironnement dues à un agent pathogène par leurs récepteurs innés comme les TLRs ou autres PRRs. Suite à cette reconnaissance, les DCs vont s'activer rapidement, produire des cytokines et chimiokines recrutant d'autres effecteurs immunitaires innés et migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires pour présenter des peptides microbiens et induire une réponse T adaptative spécifique du pathogène (Figure 11, panel supérieur « conventional myeloid-cell mediated response »)(Medzhitov and Janeway, 2000). Ce mécanisme permet d'éliminer les pathogènes de manière très efficace mais sa mise en place nécessite du temps (Hayday, 2009).



**Figure 11- Surveillance du stress.**

(Panel supérieur) Réponse innée conventionnelle initiée par un pathogène et médiée par les cellules myéloïdes locales et leur communication avec les populations lymphocytaires B et T  $\alpha\beta$  adaptatives. (Panel inférieur) La réponse lymphoïde au stress est initiée par des modifications d'origine microbienne et nonmicrobienne, augmentant l'expression de ligands du TCR  $\gamma\delta$  et/ou du NKG2D et d'autres récepteurs-ligands selon le contexte, auxquels les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent répondre. Le point d'interrogation indique que certains aspects de cette réponse au stress ne sont pas encore bien déterminés. D'après (Hayday, 2009).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  jouent un rôle non redondant dans cette surveillance du stress du fait de leur localisation tissulaire et de leur capacité à « sentir » des dérégulations cellulaires/tissulaires. Ces dérégulations ne génèrent pas toujours des molécules reconnues par les DCs mais elles créent un contexte favorable à l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  en modifiant l'expression de leurs ligands. Une fois ces antigènes de stress détectés et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  activés, ils initient rapidement la réponse immunitaire sans passer par des phases d'expansion clonale ou de différenciation (Figure 11, panel inférieur « Lymphoid stress-surveillance response »)(Strid et al., 2008).

Par cette réponse, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  s'inscrivent dans le concept de la réponse/surveillance lymphoïde aux antigènes de stress et se placent à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Ces cellules sont incapables d'éradiquer complètement un pathogène mais elles peuvent cependant limiter rapidement la dissémination des cellules

infectées ou transformées, maintenir l'intégrité tissulaire et réguler la nature (Th1, Th2, etc.) et l'ampleur des réponses adaptatives générées en aval (Hayday, 2009). De ce fait, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont de plus en plus impliqués dans des situations d'infection (Shibata et al., 2007), de transformation tumorale (Strid et al., 2008), d'inflammation (Martin et al., 2009) mais également dans des cas d'allergie et d'auto-immunité (Sutton et al., 2009). Par la suite, seuls les contextes infectieux et tumoraux mobilisant les lymphocytes T  $\gamma\delta$  seront développés.

## 2. Rôles des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les infections

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont, grâce à l'ensemble des caractéristiques mentionnées précédemment, des rôles physiologiques variés dont un rôle de protection contre les pathogènes intra- et extracellulaires. Chez l'homme, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  s'expandent dans le sang périphérique d'individus atteints d'infections bactériennes (Jouen-Beades et al., 1997), parasitaires (Ho et al., 1990) ou virales (De Paoli et al., 1990)(Jason et al., 2000). Lors de ces expansions, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent atteindre jusqu'à plus de 45% des lymphocytes T chez certains patients alors qu'ils représentent moins de 5% chez les individus sains. Cependant, les preuves directes montrant le rôle protecteur de ces cellules ont été amenées dans des modèles murins d'infection qui ont permis de comprendre plus en détails les mécanismes mis en jeu par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans les réponses anti-virales.

### a) Infections à herpesvirus

L'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans l'immunité dirigée contre les infections causées par des virus à ADN est clairement établie, particulièrement pour les herpesvirus qui mobilisent les lymphocytes T  $\gamma\delta$  tant chez l'homme que chez les rongeurs.

- Chez la souris

Les études les plus abouties à l'heure actuelle concernent le HSV-1 qui est l'agent infectieux responsable de l'herpès oral. Chez la souris, deux modèles d'infection à HSV-1 sont généralement utilisés : l'un consiste à injecter le virus dans le coussinet de la souris alors que le second demande de scarifier une zone de la cornée de la souris et de déposer le virus sur cette zone. Bien que ces deux modèles soient assez différents, ils ont tous deux mis en évidence un rôle protecteur des lymphocytes T  $\gamma\delta$  contre le HSV-1 chez des souris BALB/c puisque, même en absence de lymphocytes T  $\alpha\beta$ , ils protègent les souris de la mort induite par l'infection en limitant la réplication et/ou inhibant la neurovirulence du virus (Liu et al., 1996)(Sciammas et al., 1997). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont retrouvés dans le ganglion trigéminal (ou ganglion de Gasser) suite à l'infection cornéenne, semblent exprimés majoritairement les chaînes V $\gamma$ 1 et V $\gamma$ 4, et produisent de l'IFN $\gamma$  (Sciammas et al., 1997)(Kodukula et al., 1999). La réponse T  $\gamma\delta$  observée semble être polyclonale et spécifiquement dirigée contre la glycoprotéine I du virus (Johnson et al., 1992)(Sciammas et al., 1994)(Sciammas et al., 1997)(Sciammas et al., 1998). Ces éléments suggèrent donc un rôle antiviral direct des lymphocytes T  $\gamma\delta$  passant par la production de molécules anti-virales.

Quelques études montrent également une implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins contre le HSV-2. Dans une étude, l'infection intravaginale de souris C57BL/6 par le HSV-2 induit une expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$  intraépithéliaux et une production d'IFN $\gamma$  par ces derniers qui protège les souris contre une infection léthale, la déplétion des lymphocytes T  $\gamma\delta$  aboutissant à la mort des souris rapidement (Nishimura et al., 2004). Dans un modèle semblable, la production d'IL-17 par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  intraépithéliaux est néfaste et participe à la pathologie léthale associée à l'infection intravaginale par le HSV-2 (Kim et al., 2012). Ces éléments mettent en évidence des rôles relativement antagonistes des lymphocytes T  $\gamma\delta$  selon les cytokines produites.

- Chez l'homme

De manière comparable à leurs homologues murins, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains semblent également mobilisés lors de l'infection à HSV-1. En effet, il est possible d'isoler à partir de donneurs infectés par HSV-1 des cellules T  $\gamma\delta$  spécifiques du virus, pouvant lyser de manière spécifique et non restreinte par le CMH des cellules infectées par HSV-1 (Maccario et al., 1993). En plus du HSV-1, la réponse antivirale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains a également été étudiée pour trois autres herpesvirus : l'Epstein-Barr virus (EBV), l'Herpesvirus humain 8 (HHV-8) et le Cytomégalovirus (CMV). Seules les réponses dirigées contre les deux premiers virus mentionnés ci-dessus seront développées dans ce paragraphe, l'immunité T  $\gamma\delta$  anti-CMV sera décrite plus en détail dans la partie II de l'introduction.

L'EBV induit une expansion et une activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 humains dans le compartiment sanguin chez des individus atteints d'une mononucléose induite par l'EBV (De Paoli et al., 1990). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 1<sup>+</sup> aussi s'amplifient au contact de cellules lymphoblastoïdes B transformées par l'EBV ou de lignées cellulaires de lymphome de Burkitt EBV<sup>+</sup> ou EBV<sup>neg</sup> infectées *in vitro* par l'EBV (Orsini et al., 1993)(Häcker et al., 1992). De plus, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 1<sup>+</sup> sont capables de lyser efficacement des cellules lymphoblastoïdes B EBV<sup>+</sup> *in vitro* et le transfert adoptif de lymphocytes T V $\delta$ 2V $\gamma$ 9 limite, voire fait régresser, le développement de ces lignées tumorales chez des souris immunodéficientes Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> (Fujishima et al., 2007)(Xiang et al., 2014). Cependant, il n'est pas encore défini si la réponse T  $\gamma\delta$  dans ce contexte infectieux est due à la reconnaissance d'antigènes viraux ou d'antigènes cellulaires de stress et de ce fait, la capacité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  à reconnaître directement l'EBV est encore débattue (Orsini et al., 1994)(Häcker et al., 1992).

Le HHV-8 a été impliqué dans différents cancers plus ou moins agressifs dont le sarcome de Kaposi. Les seules données disponibles sur la réponse T  $\gamma\delta$  contre ce virus ont été obtenues chez l'homme et montrent une augmentation dans le sang périphérique de la proportion des lymphocytes T V $\delta$ 1<sup>+</sup> parmi les cellules CD3<sup>+</sup> chez les individus infectés. Ces lymphocytes T V $\delta$ 1<sup>+</sup> présentent un phénotype effecteur CD57<sup>+</sup>CD45RO<sup>neg</sup> et s'amplifient suite à la reconnaissance de différentes protéines du HHV-8 comme la glycoprotéine B, les protéines ORF65, ORF73 ou encore K8.1. Suite à une stimulation par coculture avec des

cellules infectées par le HHV-8 ou juste par des protéines du virus, ces lymphocytes T  $V\delta 1^+$  produisent de l'IFN $\gamma$  qui a pour effet d'inhiber la propagation du virus *in vitro* en prévenant la libération des particules virales infectieuses (Barcy et al., 2008).

D'un point de vue général, l'ensemble des études menées sur les herpesvirus montre un rôle globalement protecteur des lymphocytes T  $\gamma\delta$  que ce soit chez l'homme ou la souris, qui semble majoritairement reposer sur la production d'IFN $\gamma$  et la lyse des cellules infectées.

### **b) Autres infections virales**

Bien que l'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  ait été montrée dans de nombreuses infections virales chez l'homme, la majorité des données obtenues à ce jour sur leurs fonctions ont été obtenues chez la souris. Ici, deux modèles murins d'infection seront développés car ils mettent en lumière plusieurs éléments : (i) les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent avoir un rôle direct vis-à-vis du virus, (ii) ils peuvent également être à l'origine de la réponse adaptative et (iii) différentes sous-populations T  $\gamma\delta$  peuvent répondre contre l'agent pathogène et avoir des rôles différents voir opposés.

Le West Nile Virus (WNV) est un flavivirus neurotrophique pouvant infecter l'homme et la souris et déclencher dans ces hôtes une encéphalite ou une méningite entre autres. Le modèle murin d'infection à WNV a montré que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent initier indirectement la réponse adaptative T CD4 $^+$  et T CD8 $^+$  en induisant la maturation des DC (CD40 $^+$ CD80 $^+$ CD86 $^+$ CMH de classe II $^+$ IL-12 $^+$ ) lors d'une primo-infection (Fang et al., 2010)(Wang et al., 2006). Ils peuvent également avoir un effet anti-viral direct, surtout la sous-population  $V\gamma 1^+$ , en limitant la dissémination du virus dans le sang et le système nerveux central par la production d'IFN $\gamma$  (Wang et al., 2003). L'effet anti-viral des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  est contre-balancé par un effet pathogénique inflammatoire de la sous-population T  $V\gamma 4^+$  qui, en produisant du TNF- $\alpha$ , favorise l'entrée du virus dans le cerveau en compromettant l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (Welte et al., 2008)(Wang et al., 2004). De plus, les lymphocytes T  $V\gamma 4^+$  régulent négativement la prolifération des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  en produisant du TGF- $\beta$  (Welte et al., 2011). Ces résultats montrent que ces cellules, en plus de favoriser l'infection du cerveau par le WNV, limitent l'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  et diminuent certainement par ce mécanisme leur action anti-virale. Ces données montrent que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent jouer un rôle dans l'initiation de la réponse adaptative et que les sous-populations T  $V\gamma 1^+$  et  $V\gamma 4^+$  peuvent ne pas avoir les mêmes fonctions voir se réguler entre elles.

La balance entre lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  et  $V\gamma 4^+$  a également été montrée dans d'autres modèles murins comme le modèle de myocardite induite par le coxsackievirus B3 (CVB3), où ces cellules ne vont pas avoir un effet direct sur le virus mais vont jouer un rôle fondamental dans l'activation de l'immunité adaptative et le développement de la pathologie associée à l'infection. Dans ce modèle également, la sous-population  $V\gamma 1^+$  joue un rôle bénéfique pour la souris en réduisant l'inflammation par une réponse de type Th2 et donc les lésions cardiaques, alors qu'à l'inverse les lymphocytes T  $V\gamma 4^+$  favorisent

l'inflammation par une réponse de type Th1 et une lyse des myocytes infectés (Huber et al., 1999)(Huber et al., 2000)(Huber et al., 2003). Cette réponse Th1 va orienter la réponse T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> vers la production d'IFN $\gamma$  et favoriser l'activation des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> effecteurs auto-immuns qui sont les principaux responsables de la myocardite (Huber et al., 2002).

### 3. Rôles dans le cancer

#### a) *Effets bénéfiques des lymphocytes T $\gamma\delta$*

- Chez la souris

De nombreuses études réalisées chez la souris sur les 15 dernières années impliquent clairement les lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans l'immunosurveillance anti-tumorale. En effet, l'absence de ces cellules résulte en une augmentation du nombre de tumeurs chez des souris traitées par des agents mutagènes ou chez les souris TRAMP développant spontanément des cancers de la prostate, en comparaison aux souris contrôles WT (Girardi et al., 2001)(Matsuda et al., 2001)(Liu et al., 2008). De plus, l'absence de lymphocytes T  $\gamma\delta$  favorise l'évolution d'un stade bénin de papillome vers un carcinome (Matsuda et al., 2001)(Girardi et al., 2003). Il semble donc que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins soient capables d'inhiber le développement tumoral et également de limiter la transition vers des formes plus agressives de cancer. Cet effet anti-tumoral des lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourrait passer par leur activité cytotoxique qui serait induite après une activation du TCR et/ou du NKG2D, comme montré pour la reconnaissance de cellules de carcinome spinocellulaire par les DETCs (Girardi et al., 2001). Les autres sous-populations T  $\gamma\delta$  infiltrant les tumeurs, qu'elles soient V $\gamma$ 1<sup>+</sup> ou V $\gamma$ 4<sup>+</sup>, apparaissent comme source importante et précoce d'IFN $\gamma$  dans plusieurs types de cancers comme des mélanomes (Gao et al., 2003)(Riond et al., 2009)(He et al., 2010), ou de métastases pulmonaires (Paget et al., 2012), et peuvent parfois produire en plus des molécules cytotoxiques comme la perforine ou les granzymes (Lança et al., 2013). Pour des tumeurs hématologiques comme le lymphome B, l'activité cytotoxique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est un élément essentiel à l'élimination de la tumeur (Street et al., 2004). On peut également mentionner un rôle anti-tumoral plus indirect des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup> et/ou V $\gamma$ 6<sup>+</sup>. Suite à un traitement chimiothérapeutique par la doxorubicine, ces cellules migrent au niveau de la tumeur et y sécrètent de l'IL-17, cytokine qui va avoir un effet attractant pour les lymphocytes T cytotoxiques conventionnels qui vont inhiber la croissance tumorale (Ma et al., 2011). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins peuvent donc jouer un rôle direct dans la réponse anti-tumorale et avoir un effet indirect en favorisant le développement de la réponse T adaptative.

- Chez l'homme

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains semblent également impliqués dans la réponse anti-tumorale et sont retrouvés parmi les lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TIL) dans de nombreux cas. Les cellules T V $\delta$ 2<sup>+</sup> circulantes sont dirigées majoritairement contre des

tumeurs hématologiques telles que les leucémies ou des lymphomes (Gertner-Dardenne et al., 2012)(Gomes et al., 2010), alors les lymphocytes T  $V\delta^{neg}$  et surtout  $V\delta1^+$  sont souvent impliqués dans l'élimination de cellules tumorales d'origine épithéliale comme des carcinomes coliques, pulmonaires ou rénaux (Maeurer et al., 1996)(Choudhary et al., 1995)(Groh et al., 1999). Dans certains cas, les lymphocytes T  $V\delta2^+$  et  $V\delta2^{neg}$  peuvent aussi reconnaître et éliminer des tumeurs épithéliales ou hématologiques respectivement (Wrobel et al., 2007)(Knight et al., 2012)(Siegers et al., 2011). De manière comparable à la souris, la réponse anti-tumorale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains nécessite l'activation du TCR (Groh et al., 1998) et/ou de molécules de costimulation comme le NKG2D (Corvaisier et al., 2005)(Wrobel et al., 2007) ou le NKp30 (Correia et al., 2011). Cette activation induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$  ou du TNF- $\alpha$  (Groh et al., 1999)(Halary et al., 2005), et peut également stimuler la fonction cytotoxique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Maeurer et al., 1996).

Il semblerait donc que les TIL  $\gamma\delta$  murins et humains participent à la réponse anti-tumorale par des mécanismes comparables incluant la production d'IFN $\gamma$ , d'IL-17 ou de molécules cytotoxiques selon le type de cancer et parfois le traitement thérapeutique donné.

#### **b) Effets néfastes**

- Inhibition des réponses anti-tumorales

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains et murins peuvent avoir une fonction pro-tumorale grâce à différents mécanismes. Dans un modèle murin de mélanome utilisant les cellules B16, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  infiltrent les tumeurs et peuvent jouer un rôle régulateur en inhibant l'activité des cellules immunitaires par la production d'IL-4, d'IL-10 ou de TGF- $\beta$  (Seo et al., 1998)(Seo et al., 1999)(Ke et al., 2003). De manière intéressante, les sous-populations T  $\gamma\delta$  peuvent se réguler entre elles. Dans le modèle de mélanome B16, les cellules T  $\gamma\delta$   $V\gamma1^+$  favorisent indirectement la croissance tumorale en inhibant l'expression du NKG2D, de l'IFN $\gamma$  et de la perforine par les lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma4^+$  nécessaires à leur activité anti-tumorale (Hao et al., 2011)(He et al., 2010). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins peuvent donc inhiber l'immunité anti-tumorale en sécrétant des facteurs solubles comme l'IL-10 ou le TGF- $\beta$ , mais également en réprimant l'expression de molécules de costimulation comme le NKG2D.

L'activité immunosuppressive des lymphocytes T  $\gamma\delta$  peut également jouer un rôle important dans les cancers chez l'homme. C'est le cas dans le cancer du sein où l'infiltration des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est un un facteur de mauvais pronostic associé positivement avec des stades de développement avancés, à la présence de métastases dans les ganglions drainants et un risque de rechute plus rapide (Ma et al., 2012). Deux autres études réalisées également sur le cancer du sein montrent que les TIL  $\gamma\delta$  sont majoritairement  $V\delta1^+$  et ont une activité régulatrice pro-tumorale en induisant une immunosénescence touchant à la fois les DCs (absence de maturation) et les lymphocytes T  $\alpha\beta$  naïfs et effecteurs (inhibition de la

prolifération et de la sécrétion d'IL-2) (Ye et al., 2013)(Peng et al., 2007). Cet effet régulateur a été confirmé *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe où la co-injection de TIL  $\gamma\delta$  et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> anti-tumoraux résulte en une inhibition de l'activité cytotoxique de ces derniers et, de ce fait, à une croissance progressive de la tumeur (Peng et al., 2007). De plus, les cellules T dont la sénescence a été induite par les TIL  $\gamma\delta$  produisent, entre autres, de fortes quantités d'IL-10 et de TGF- $\beta$  de manière plus modérée (Ye et al., 2013). Il se pourrait donc que les cellules T sénescents puissent également avoir des fonctions suppressives et favoriser elles aussi la croissance tumorale.

- Cas particulier de l'IL-17

Dans le cancer et particulièrement les carcinomes, les TIL  $\gamma\delta$  sont la source majeure d'IL-17 et peuvent jouer un rôle pro-tumoral via la production de cette cytokine (Wakita et al., 2010)(Carmi et al., 2011)(Rei et al., 2014)(Ma et al., 2014). Dans la plupart des cas, l'IL-17 sécrétée par les TIL  $\gamma\delta$  semble avoir un effet pro-tumoral indirect. L'une des propriétés connues de l'IL-17 est sa capacité à promouvoir l'angiogénèse. Chez la souris, la production d'IL-17 est liée à la production des molécules pro-angiogéniques comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et l'angiopoïétine-2 dans deux modèles complètement différents de fibrosarcome et de cancer ovarien (Wakita et al., 2010)(Rei et al., 2014). Il est probable qu'un mécanisme comparable soit mis en place chez l'homme, puisqu'il a été montré que la présence de TIL  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> corrèle avec l'invasion lymphatique et vasculaire de tumeurs colorectales, et que la présence de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF est associée à un mauvais pronostic dans des cas de carcinomes coliques (Liu et al., 2011). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  producteurs d'IL-17 peuvent également exercer leur activité pro-tumorale en agissant sur les autres cellules immunitaires. L'IL-17 peut en effet induire une immunosuppression locale en réduisant la capacité des CPA à médier une réponse Th1, augmenter le nombre de métastases et *in fine* diminuer la survie des souris dans un modèle de carcinome pulmonaire de Lewis (Carmi et al., 2011). La production d'IL-17 par les TIL  $\gamma\delta$  peut également recruter et activer des cellules immunosuppressives comme les cellules myéloïdes suppressives (ou MDSC) sur le site tumoral, comme montré chez l'homme dans le cancer colorectal (Wu et al., 2014), ou chez la souris dans un modèle de carcinome hépatocellulaire (Ma et al. 2014). L'IL-17 sécrétée semble dans ces différents contextes stimuler les fonctions suppressives des MDSC (Ma et al., 2014), expliquant probablement le fait que l'infiltration des TIL  $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> corrèle positivement avec le stade de développement tumoral et les caractéristiques clinicopathologiques associées (Wu et al., 2014).

#### 4. Balance entre les lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup> murins

Les études mentionnées et discutées précédemment sur le rôle des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins dans les infections, surtout virales, et le cancer mettent en évidence des contributions fonctionnelles distinctes et parfois opposées des sous-populations T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup>. Ces observations sont d'autant plus renforcées par le fait que cette opposition a également été démontrée dans d'autres modèles murins de maladie dont des modèles d'allergie, comme le modèle d'hyperréactivité bronchique induite par l'ovalbumine (Hahn et

al., 2004), et de maladie auto-immune comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Blink et al., 2014). Les différents modèles sont regroupés dans le tableau 2 ci-dessous.

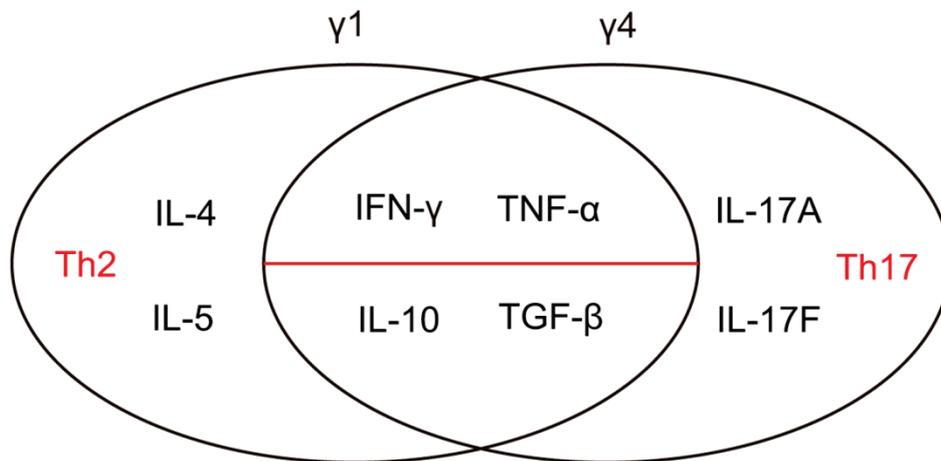
Modèle	Lymphocytes T $\gamma\delta$	V $\gamma$ 1 <sup>+</sup>	V $\gamma$ 4 <sup>+</sup>
Infection à <i>L. monocytogenes</i>	Protecteurs	Pathogéniques (résistance diminuée)	Pas d'effet
Infection au West Nile virus	Protecteurs	Protecteurs	Pathogéniques (↗encéphalite)
Infection au RSV	Pathogéniques		Pathogéniques (proinflammatoires)
Myocardite induite par le Coxsackievirus B3	Protecteur	Protecteurs (anti-inflammatoires)	Pathogéniques (proinflammatoires)
Uvéite auto-immune expérimentale	Pathogéniques	Pas d'effet	Pathogéniques (proinflammatoires)
Arthrite induite par le collagène	Variable	Pas d'effet	Pathogéniques (proinflammatoires)
Hyperréactivité bronchique allergique	Variable	Pathogéniques (proinflammatoires)	Protecteurs (anti-inflammatoires)
Réponse IgE primaire à OVA/alum (vaccination)	Variable	Catalyseurs	Inhibiteurs
Mélanome sous-cutané	Protecteurs	Pas d'effet	Protecteurs
Hyperréactivité bronchique induite par l'ozone	Pathogéniques	Pathogéniques	Pas d'effet
Encéphalomyélite expérimentale auto-immune	Variable	Protecteurs	Pathogéniques
Carcinome hépatocellulaire	Pathogéniques		Pathogéniques

**Tableau 2- Contribution des sous-populations T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup> murines à la pathogénèse et/ou à la pathologie de différentes maladies.**

↗ : promotion de la pathologie mentionnée. Adapté de (Born et al., 2010)

Bien que l'opposition fonctionnelle des sous-populations T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup> soit clairement établie, peu d'études ont été réalisées à l'heure actuelle pour déterminer quels facteurs sont responsables des différences entre ces deux sous-populations. Une analyse comparative des profils d'expression génique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup> spléniques isolés de souris C57BL/6 a montré que ces sous-populations ont globalement des profils similaires, avec une forte expression de plusieurs chimiokines (CCL-4, CCL-5) et récepteurs à chimiokines (CCR2, CCR5 et CXCR3) et un haut niveau d'expression des cytokines IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  et IL-10 leur conférant à la fois des propriétés immunorégulatrices et inflammatoires (Dong et al., 2014). Cette analyse a également mis en exergue quelques

gènes exprimés de manière différentielle entre ces sous-populations : l'IL-4 et l'IL-5 sont exprimées par la sous-population T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> qui s'oriente donc plus vers la voie Th2 une fois activée alors que la sous-population T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup> exprime plus d'IL-17A et d'IL-17F et est plutôt orientée vers la voie Th17 (Figure 12). En plus de ces différences transcriptionnelles, il semblerait que ces cellules n'utilisent pas les mêmes TLR pour s'activer : les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> semblent être plus sensibles à une stimulation par le TLR7 alors que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup> semblent plus s'activer suite à une stimulation du TLR2 et/ou 4 (Zhang et al., 2014)(Zuo et al., 2012)(Roark et al., 2013). Bien que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup> se distinguent par quelques caractéristiques, leurs fonctions communes et leur grande variabilité contextuelle en font des cellules pouvant jouer un rôle bénéfique ou au contraire néfaste pour l'hôte et il est donc particulièrement difficile d'anticiper le rôle de ces sous-populations dans un modèle donné. Ces éléments illustrent bien le caractère plastique de ces cellules discuté précédemment, et dont les fonctions sont régulées en périphérie pour s'adapter à la situation pathologique rencontrée.



**Figure 12 - Cytokines sécrétées par les sous-populations lymphocytaires T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> et V $\gamma$ 4<sup>+</sup> murines.**

Les deux sous-populations murines de lymphocytes T  $\gamma\delta$  produisent de l'IFN $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , du TGF- $\beta$  et de l'IL-10. Par contre, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 1<sup>+</sup> ont tendance à produire des cytokines de type Th2 comme l'IL-4 et l'IL-5 alors que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup> produisent des cytokines de type Th17. Tiré de (Dong et al., 2014).

## II. Effets de l'infection à Cytomégalovirus (CMV) sur la réponse immunitaire

### A. Quelques caractéristiques du virus

Le CMV, ou HHV-5 est classé avec l'EBV et le HSV-1 au sein de la famille des *Herpesviridae* (Tableau 3). Il appartient plus particulièrement à la sous-famille des *beta-herpesvirinae*. Le CMV tire son nom des modifications morphologiques des cellules qu'il infecte qui deviennent particulièrement larges ou « cytomégaliqes », et présentent des inclusions intracellulaires (Weller et al., 1960). Le CMV est retrouvé chez de nombreuses

espèces incluant l'homme, les primates non-humains et les rongeurs. Les virus infectant ces différents organismes partagent des gènes en commun mais contiennent aussi des gènes qui sont spécifiques de l'hôte infecté. De ce fait, l'éventail d'infection de chacun de ces virus est réduit, et ces virus sont considérés comme étant des virus spécifiques d'espèce ayant co-évolué avec leur(s) hôte(s) pendant plusieurs millions d'années.

### 1. Génome et structure

Le cytomégaloherpesvirus humain (HCMV) est un virus à ADN bicaténaire linéaire de grande taille (235 000 pb) contenant plus de 200 cadres de lecture et codant 165 gènes, ce qui en fait le virus herpétique avec le plus grand génome (Dolan et al., 2004). Parmi ces gènes, certains sont nécessaires pour la réplication même du virus et/ou pour définir son tropisme cellulaire (Dunn et al., 2003). Le CMV murin, ou MCMV, est semblable au HCMV avec un ADN bicaténaire linéaire de 230 000 pb contenant environ 200 cadres de lecture prédits (Rawlinson et al., 1996)(Brocchieri, 2005). La comparaison des virus humains et murins montre qu'ils présentent 45,2% d'identité de séquence d'un point de vue génomique, et sur l'ensemble des cadres de lecture du MCMV, 78 ont une identité importante au niveau peptidique avec le HCMV (Rawlinson et al., 1996). Parmi les protéines conservées se trouvent des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN, à la maturation des virions ou à leur conformation (Tableau 3).

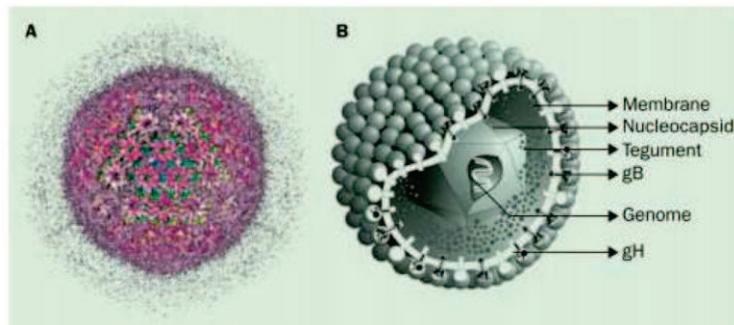
Herpesvirus	Abbreviation		Size (kb)
	Common	Formal	
<i>Alphaherpesvirinae</i>			
<i>Simplexvirus</i>			
Herpes simplex virus type 1	HSV-1	HHV-1	152
Herpes simplex virus type 2	HSV-2	HHV-2	155
<i>Varicellovirus</i>			
Varicella-zoster virus	VZV	HHV-3	125
<i>Betaherpesvirinae</i>			
<i>Cytomegalovirus</i>			
HCMV	HCMV	HHV-5	227-236
<i>Roseolovirus</i>			
Human herpesvirus type 6	HHV-6	HHV-6	159-162
Human herpesvirus type 7	HHV-7	HHV-7	144-153
<i>Gammapherpesvirinae</i>			
<i>Lymphocryptovirus</i>			
EBV	EBV	HHV-4	172-173
<i>Rhadinovirus</i>			
Human herpesvirus type 8	HHV-8	HHV-8	134-138

**Tableau 3- Classification des herpès virus humains**

D'après (Crough and Khanna, 2009).

D'un point de vue structural, les virions humains et murins ont une taille comprise entre 200 et 300 nanomètres, sont sphériques et comprennent quatre éléments morphologiques distincts : le core, la nucléocapside, le tégument et l'enveloppe (Figure 13). Le core est une structure correspondant à l'association de l'ADN avec diverses protéines. Il est contenu par une nucléocapside icosaédrique composée de 7 protéines : la smallest capsid protein (MCMV, m48.2 ; HCMV, UL48-49), la minor protein capsid (MCMV, M85 ; HCMV, pUL85), la major protein capsid (MCMV, M86 ; HCMV, pUL86), la minor capsid binding protein (MCMV, M46 ; HCMV, pUL46) et d'un complexe tri-moléculaire (Tableau 4)(Kattenhorn et al., 2004)(Varnum et al., 2004).

Le tégument est une structure amorphe qui entoure la capsid et jouant un rôle à la fois structural et immunomodulateur, bien que les protéines qui le constituent ne soit ni synthétisées ni exprimées à la surface cellulaire (Figure 13)(Varnum et al., 2004)(Crought and Khanna, 2009). Le tégument du virus humain contient jusqu'à 25 protéines phosphorylées (Gibson et al., 1996). Les gènes codant les protéines humaines ont des homologues chez la souris comme les protéines pp65 (ou UL83), UL32, UL99, UL82 et ppUL48 du HCMV avec M83, M32, M99, M82 et M48 du MCMV respectivement (Tableau 4)(Rawlinson et al., 1996).



**Figure 13- Schéma d'un virion de cytomégalovirus humain.**

A/ Reconstitution tridimensionnelle d'une particule intacte icosaédrique de cytomégalovirus humain (HCMV), vue selon un axe de symétrie triple. B/ Modèle virtuel tridimensionnel montrant les composants d'un virion du HCMV. gB : glycoprotéine B; gH : glycoprotéine H. D'après (Gandhi and Khanna, 2004).

L'enveloppe du HCMV et du MCMV est une membrane lipidique obtenue à partir des membranes intracellulaires de la cellule hôte à laquelle sont associées des glycoprotéines virales. Le CMV codent un nombre important de glycoprotéines, comparativement aux autres herpesvirus. La glycoprotéine majeure est la glycoprotéine B qui est un antigène important contre lequel les lymphocytes B réagissent et une des protéines les mieux conservée. Certaines protéines humaines semblent cependant ne pas avoir d'homologue chez la souris comme la glycoprotéine gN.

ORF du MCMV	ORF du HCMV	Protéine codée
M25	UL25	Protéine du tégument
m25.2	US22	Protéine du tégument
M28	UL28	Inconnue
M31	UL31	Inconnue
M32	UL32	Protéine du tégument, pp150
M35	UL35	Protéine du tégument, famille UL25
M43	UL43	Protéine du tégument, famille US22

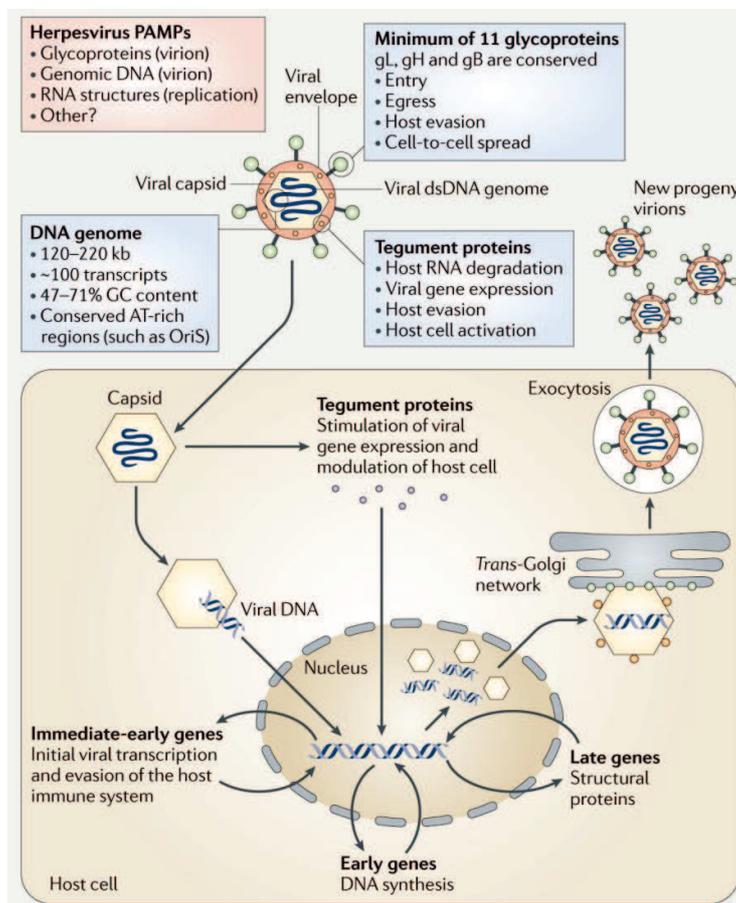
ORF du MCMV	ORF du HCMV	Protéine codée
M44	UL44	Facteur de processivité de l'ADN polymérase
M45	UL45	Ribonucléotide réductase
M46	UL46	Minor capsid binding protein
M47	UL47	Protéine du tégment
M48	UL48	Large tegument protein
m48.2	UL48-49	Smallest capsid protein
M51	UL51	Sous-unité de la terminase
M54	UL54	ADN polymérase
M55	UL55	gB
M57	UL57	Protéine de liaison à l'ADN simple brin
M69	UL69	Transactivateur viral
M70	UL70	Sous-unité du complexe hélicase/primase
M71	UL71	Protéine du tégment
M72	UL72	Homologue de la dUTPase
M74	UL74	gO
M75	UL75	gH
M77	UL77	Pyruvoyl décarboxylase
M80	UL80	Assemblage/Protéase
M82	UL82	Upper matrix phosphoprotein, pp71
M83	UL83	Lower matrix phosphoprotein, pp83
M85	UL85	Minor capsid protein
M86	UL86	Major capsid protein
M87	UL87	Inconnue
M88	UL88	Protéine du tégment
M94	UL94	Protéine du tégment
M95	UL95	Inconnue
M97	UL97	Phosphotransférase
M98	UL98	Nucléase alcaline
M99	UL99	Protéine du tégment, pp28
M100	UL100	gM
M102	UL102	Sous-unité du complexe hélicase/primase
M104	UL104	Protéine structurale
M105	UL105	Sous-unité du complexe hélicase/primase
M116	UL116	Inconnue
M121	UL121	Inconnue

**Tableau 4- Protéines virales homologues détectées dans le HCMV et le MCMV.**

Adapté de (Kattenhorn et al., 1996).

## 2. Cycle réplcatif

La réplication virale des herpesvirus suit une cascade très organisée et régulée nécessitant successivement l'expression des gènes IE (Immediate Early), E (Early) et L (Late), et ce schéma est suivi par le CMV (Figure 14). Le virus entre dans la cellule hôte par un mécanisme nécessitant en premier lieu une fixation aspécifique par l'héparan-sulfate, puis les glycoprotéines virales vont interagir avec des récepteurs cellulaires et permettre l'entrée dans la cellule par endocytose ou par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Peu de récepteurs d'entrée du CMV sont formellement caractérisés à l'heure actuelle, parmi lesquels on peut citer le récepteur au Platelet-derived growth factor- $\alpha$  (PDGF- $\alpha$ ) ou le DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) (Soroceanu et al., 2008)(Halary et al., 2002). Les protéines du tégment sont alors libérées dans la cellule et la capsid est transportée jusqu'à la membrane nucléaire afin de libérer l'ADN viral dans le noyau. C'est à ce stade que la réplication virale débute par une phase de réplication très précoce qui est initiée dans les 2 premières heures post-infection par l'expression des gènes immediate-early. Les protéines IE produites, dont les protéines immediate-early protein 1 (IE1) et IE2, sont des facteurs de transcription responsables de l'expression des gènes viraux. La phase précoce (early) a lieu dans les 24h suivant l'infection et mène à l'expression d'une ADN polymérase virale permettant la réplication du génome. Au cours de la phase tardive ou late (L), les protéines structurales de la capsid, du tégment et de l'enveloppe (dont la glycoprotéine B ou gB) sont synthétisées et s'associent avec l'ADN viral néosynthétisé pour former de nouveaux virions. Ces derniers sont libérés soit par une exocytose mobilisant le réseau trans-golgien soit grâce à la lyse des cellules.



### **Figure 14- Modèle de virions herpétiques et cycle de réplication lytique.**

Les virions sont composés d'un ADN double-brin, d'une capsidie icosaédrique, d'une structure protéique amorphe entourant la capsidie appelée tégument, et d'une enveloppe lipidique dérivée de l'appareil trans-golgien de la cellule hôte dans laquelle des glycoprotéines virales sont enchassées.

Les particules virales entrent la cellule par endocytose ou fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Les protéines du tégument sont libérées dans le cytoplasme et la capsidie transportée jusqu'à la membrane nucléaire, où l'ADN viral est relargué dans le noyau. La réplication est ensuite initiée par l'expression des gènes immediate-early qui codent des protéines responsables de l'expression des autres gènes viraux et de l'évasion immunitaire. S'en suit l'expression des protéines early, permettant la réplication du génome viral, puis des protéines late, composant la capsidie, le tégument et les protéines de l'enveloppe. Les protéines late vont s'associer avec l'ADN répliqué pour former de nouveaux virions qui sont libérés par exocytose ou lyse de la cellule hôte. D'après (Paludan et al., 2011).

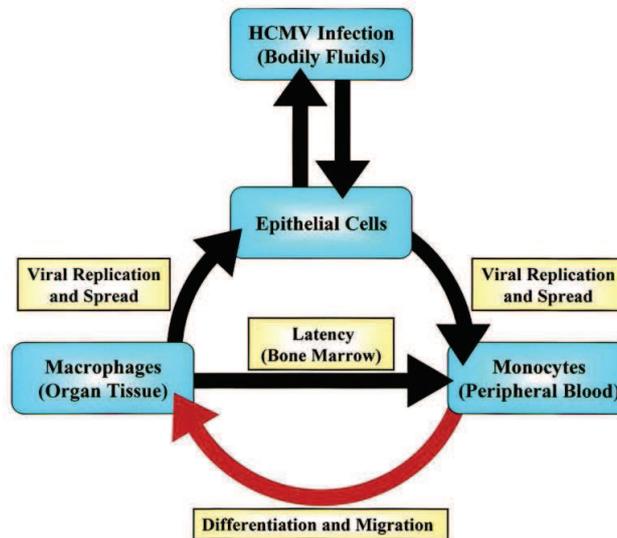
De manière générale, le cycle répliatif du virus nécessite au moins 48 à 72 heures pour générer des particules infectieuses dans des fibroblastes chez l'homme. Chez la souris, le cycle complet prend environ 30 à 36 heures (Schneider et al., 2008). Du fait de ce cycle lent et de la capacité du CMV à établir une infection latente, le virus doit à la fois moduler la cellule hôte et échapper au système immunitaire afin de terminer son cycle.

### **3. Tropisme, dissémination et latence**

Le CMV a un tropisme très large lui permettant d'infecter n'importe quel organe et la plupart des cellules hématopoïétiques, que ce soit chez l'homme ou chez la souris. L'ADN du virus a été détecté dans des types cellulaires très variés comme les pneumocytes, les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les stromales de la moëlle osseuse, les monocytes/macrophages ou encore les cellules dendritiques (Hanson et al., 1999)(Ibanez et al., 1991)(Sinzger et al., 1996)(Andrews et al., 2001)(Hsu et al., 2009)(Krmptic et al., 2003). Malgré ce tropisme particulièrement étendu, la réplication du virus ne semble pouvoir se faire que dans des cellules différenciées (Sissons et al., 2002). Par exemple, les monocytes peuvent être infectés mais la réplication virale y est généralement bloquée, alors que les macrophages peuvent être un site de réplication chez la souris et l'homme (Figure 15)(Hanson et al., 1999)(Ibanez et al., 1991). De manière intéressante, les cellules immatures comme les monocytes, ou les cellules permissives comme les cellules endothéliales participent à la dissémination du virus dans l'organisme par voie hématogène (Smith et al., 2004)(Crough and Khanna, 2009)(Daley-Bauer et al., 2014).

Le CMV, comme les autres virus herpétiques, persiste dans son hôte soit en maintenant une infection chronique à bas bruit soit en rentrant en phase de latence après la primo-infection. L'établissement de cette phase de latence est dépendante de l'expression de différentes protéines virales comme par exemple UL138 chez l'homme (Petrucci et al., 2009). Il semblerait qu'elle soit caractérisée par la présence d'ADN et l'absence de particules virales détectables (Sissons et al., 2002)(Sinclair, 2008)(Reddehase et al., 2002). Elle s'établit dans les monocytes (Sinclair and Sissons, 1996), les cellules dendritiques (Reeves et al., 2005), les cellules endothéliales et les cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> de la moëlle osseuse (Figure 15)(Hahn et al., 1998). Au cours de cette phase de latence, le virus peut se réactiver

périodiquement de manière asymptomatique chez les individus immunocompétents. Certains contextes, et particulièrement ceux créant un environnement très inflammatoire, peuvent également induire une réactivation du virus comme une transplantation, une infection, un stress (Reeves et al., 2011).



**Figure 15 - Modèle pour l'infection du CMV humain et pour sa dissémination chez l'hôte.**

Les cellules épithéliales de l'hôte sont infectées par le CMV contenu dans les fluides corporels. Le CMV se réplique ensuite et infecte les monocytes du sang périphérique par un mécanisme inconnu. Comme suggéré par la flèche rouge, l'infection primaire des monocytes induit leur différenciation en macrophages permissifs à la réplication virale. Ces macrophages peuvent devenir des sites d'infection persistante dans les tissus de l'hôte. Il est également suggéré que les macrophages induits par le CMV peuvent migrer dans la moelle osseuse et y infecter des cellules progénitrices myéloïdes, qui sont considérées comme des sites de latence du HCMV. D'après (Smith et al., 2004).

#### 4. Pathologies associées au CMV

Chez les individus immunocompétents, l'infection à CMV est bénigne et asymptomatique. Dans quelques cas, l'infection peut s'accompagner d'un syndrome mononucléosique, avec de la fièvre, une myalgie, une lymphadénopathie d'une hépatomégalie (Gandhi and Khanna, 2004). En revanche, chez les sujets immunodéficients et les enfants, l'infection peut causer un ensemble de dommages importants touchant de nombreux organes et aboutir, dans les cas les plus graves, au décès de l'individu infecté.

Une partie des manifestations cliniques les plus importantes est observée chez les nouveau-nés infectés pendant la grossesse, lorsque le fœtus n'est pas perdu à cause de l'infection (Griffiths and Baboonian, 1984). L'infection congénitale peut retarder la croissance intra-utérine du fœtus, déclencher une hépatite, mener à des défauts de l'audition et/ou à des séquelles neurologiques telles que des microcéphalies ou des désordres des neurones moteur supérieurs (Boppana et al., 1992). L'infection périnatale est généralement asymptomatique mais quelques manifestations cliniques peuvent être observées sur une courte période comme des pneumonies ou des lymphadénopathies. Bien que le MCMV n'infecte pas *in utero* les embryons, l'infection des souris gestantes induit un

retard de croissance du fœtus, un poids réduits des nouveau-nés en comparaison à des souris non infectées, et à une augmentation de la mortalité des fœtus (Fitzgerald and Shellam, 1991). L'infection des fœtus par injection in utero ou l'injection intra-cérébrale des nouveau-nés par le virus engendre des modifications similaires à celles observées lors d'une infection congénitale chez l'homme, menant à des encéphalites ou à des épendymites nécrosantes entre autres (Lussier, 1975).

Chez les patients immunocompromis, comme les individus infectés par le HIV ou transplantés, l'infection primaire ou la réactivation du virus peuvent se manifester par des pneumonies, des hépatites, des myocardites, des rétinites, ou encore des adrénalites (pour revue, voir (Crough and Khanna, 2009)). Ces pathologies sont également retrouvées chez la souris dans des modèles d'immunosuppression utilisant des souris immunodéficientes (Reuter et al., 2004), ou de modèles induits par : (i) l'injection de cyclophosphamide (Shanley et al., 1982), (ii) l'irradiation des souris (Reddehase et al., 1985) ou (iii) l'injection d'une dose létale de virus à des souris sensibles au CMV (Trgovcich et al., 2000).

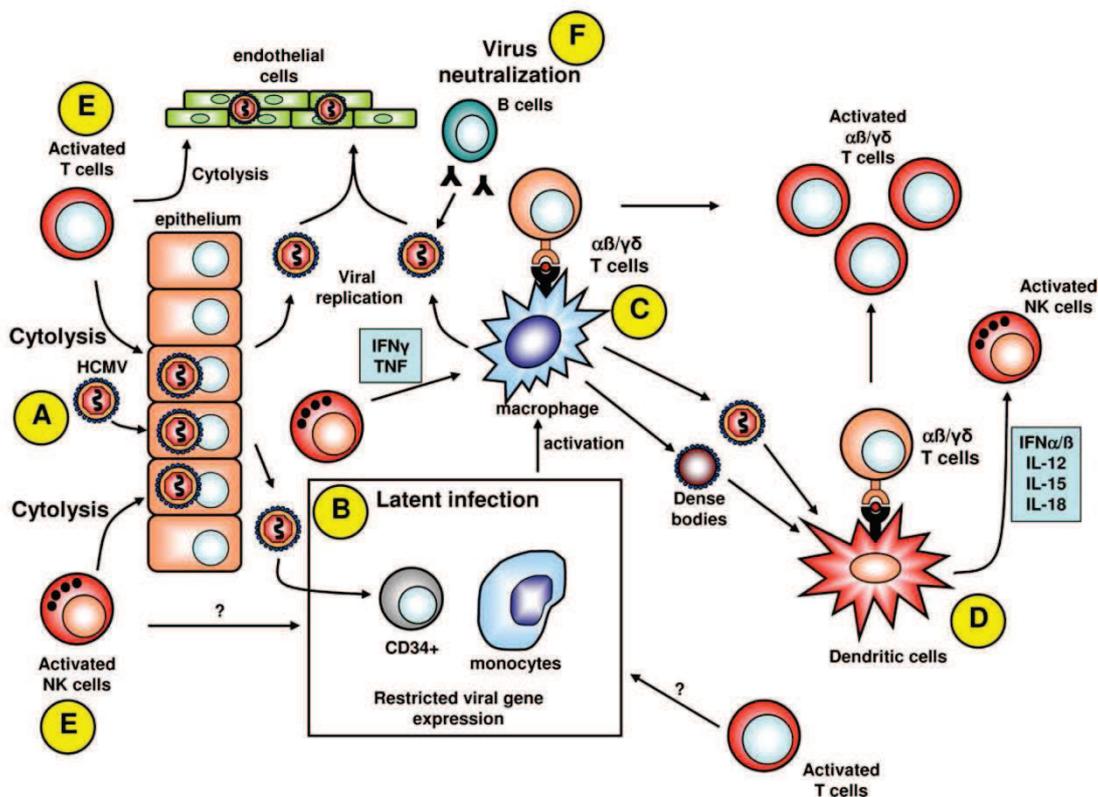
Le modèle murin d'infection à CMV récapitule globalement bien les différentes pathologies associées à l'infection à HCMV comme résumé plus en détails dans le tableau 5 ci-dessous.

Maladie humaine	Caractéristiques du modèle murin
Infection congénitale	Pas d'infection transplacentale, mais défaut de croissance du fœtus suite à l'infection maternelle comparable à ce qui est observé chez l'homme. L'infection par le MCMV faite de manière artificielle affecte le développement du tube neural.
Infection du système nerveux central	Non induit par infection congénitale. L'inoculation artificielle induit des microphthalmies et une atrophie cérébrale des fœtus. L'infection intracérébrale des nouveau-nés induit une épendymite nécrosante, une encéphalite et une malformation cérébrale, comme observé suite à une infection congénitale chez l'homme. L'infection de souris nude ou SCID adultes, mais pas de souris « normales », résulte en une infection du système nerveux central et une encéphalite.
Rétinite	L'induction d'une rétinite nécessite une infection directement en intra-oculaire. Une nécrose focale progressive est observée et amplifiée par une déplétion des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .
Effet sur le développement de l'oreille	La souris n'est pas un modèle pour la perte d'audition due à l'infection congénitale puisque l'infection à la naissance induit une périlabyrinthite, contrairement à l'infection congénitale par le HCMV qui résulte en une endolabyrinthite.
Pneumonie interstitielle	Caractéristiques essentielles comparables à la maladie humaine; arrive après immunosuppression bien que la réplication virale ne soit qu'indirectement liée à la pathologie. Les agents anti-viraux ne font que réduire la sévérité de la maladie. La réponse T anti-virale est nécessaire au développement de la pathologie, mais l'importance relative des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> est controversée.
Hépatite	Ressemble à la maladie humaine. Chez l'adulte, le virus se réplique dans les hépatocytes. Les foci inflammatoires sont majoritairement composés de cellules T; sont initiés par les cellules NK, l'IFN $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ . Lors d'une infection léthale, l'effet cytopathique direct du virus est dominant. Les fortes quantités d'IFN $\gamma$ et de TNF- $\alpha$ peuvent avoir un rôle cytotoxique.
Myocardite	Ressemble à la maladie humaine observée après une transplantation cardiaque. Les souris « normales » ont une inflammation cardiaque aiguë et persistante médiée majoritairement par les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> en présence de très faibles quantités de virus. La dose de virus et les facteurs génétiques de l'hôte influencent l'issue de l'infection. Les auto-anticorps induits par le MCMV et dirigés contre la myosine cardiaque peuvent contribuer à la pathologie, bien qu'aucun parallèle n'est été fait chez l'homme.
Athérosclérose	Le HCMV peut contribuer à la maladie en renforçant l'inflammation dans les vaisseaux sanguins, en augmentant la migration des cellules musculaires lisses et en promouvant leur prolifération. Le modèle murin a des caractéristiques similaires, mais il est majoritairement utilisé pour des études mécanistiques avec des souris knockout .
Adrénalite	L'infection des glandes surrénales de souris immunodéficientes ressemble à la nécrose surrénalienne détectée chez les patients HIV/AIDS.
Défaut hématopoïétique	Ressemble aux effets du HCMV. Dans un modèle d'irradiation et de reconstitution par de la moelle osseuse autologue, l'injection de lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> anti-viraux prévient ce défaut d'hématopoïèse et donne des bases pour de l'immunocytothérapie humaine. Le MCMV empêche la reconstitution de la moelle en inhibant la production de cytokines par les cellules stromales.

**Tableau 5- Caractéristiques du MCMV en faisant un modèle pertinent de la maladie induite par le HCMV**

## B. L'immunité anti-CMV

L'infection par les herpes virus élicite une réponse immunitaire impliquant à la fois l'immunité innée, avec un rôle prépondérant des interférons de type I produits majoritairement par les DCs et les cellules NK, et l'immunité adaptative mobilisant majoritairement les lymphocytes T (Figure 16). L'infection par le CMV ne déroge pas à ce schéma, que ce soit chez l'homme ou chez la souris. En effet, les études extensives menées sur le modèle murin d'infection à MCMV ont mis en évidence, en plus des similarités mentionnées précédemment, de nombreux points communs entre les réponses immunitaires dirigées contre le HCMV et le MCMV.

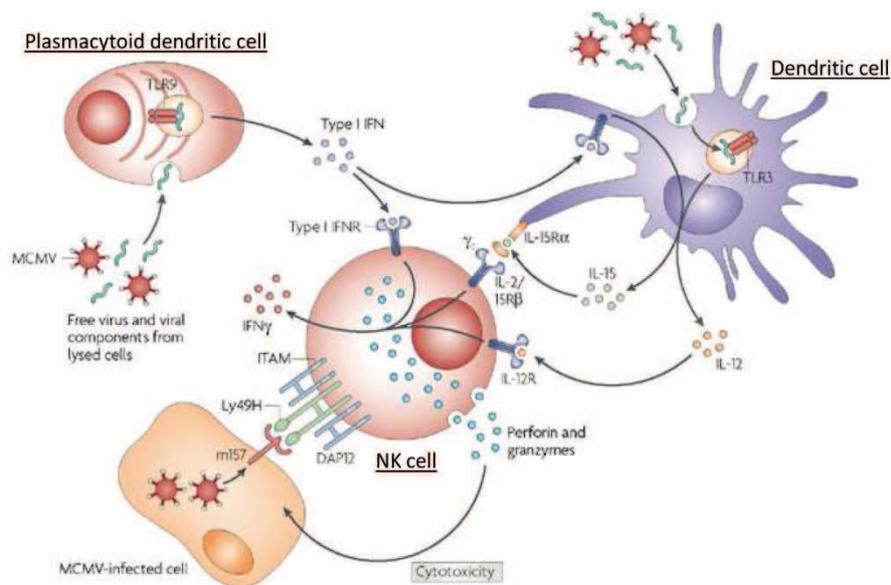


**Figure 16 – Réponse immunitaire dirigée contre le CMV.**

Suite à une primo-infection, le CMV se réplique dans l'épithélium des muqueuses (A). Il se dissémine ensuite aux cellules myéloïdes mononucléées dont les monocytes et les cellules progénitrices CD34<sup>+</sup> dans lesquels il établit une infection latente (B). L'expression des gènes viraux est réduite dans ces cellules, limitant leur reconnaissance par les cellules immunitaires effectrices. La différenciation des monocytes infectés en macrophages peut initier une réplication productive (C). Ces macrophages peuvent activer les lymphocytes T. Les particules virales ou les corps denses associés au virus peuvent être processés par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (soit les DCs), qui peuvent stimuler les lymphocytes T spécifiques (D). L'activation des DCs induit également la production des cytokines capables d'activer l'immunité innée comme les cellules NK (D). Les lymphocytes T et les cellules NK activés peuvent lyser directement les cellules infectées par le virus ou bloquer la réplication virale en sécrétant des cytokines comme l'IFN $\gamma$  (E). Les cellules présentatrices d'antigènes activent également les lymphocytes B qui vont contrôler et neutraliser le virus extracellulaire en produisant des anticorps spécifiques (F). D'après (Crough and Khanna, 2009).

## 1. Réponse innée

La réponse immunitaire innée dirigée contre le CMV joue un rôle clé dans la contention de l'infection virale. Cette réponse implique plusieurs partenaires cellulaires dont le « dialogue » par des récepteurs innés aboutit à l'élimination des cellules infectées (Figure 17).



**Figure 17- Interactions entre les DC et les cellules NK au cours de l'infection à MCMV.**

L'infection par le MCMV déclenche la production d'IFN de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) par le TLR9 ainsi que la production d'autres cytokines, comme l'interleukine-12, par les cellules dendritiques via le TLR3 ainsi que la trans-présentation de l'IL-15 induite par les IFN de type I. L'IL-15 est présentée aux cellules NK par la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-15 exprimée à la surface des DC, induisant l'activation des cellules NK. L'IL-12, en combinaison avec l'IL-15 ou d'autres cytokines pro-inflammatoires, stimule la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules NK. Environ la moitié des cellules NK présents chez la souris C57BL/6 expriment le récepteur Ly49H associé à DAP-12 et reconnaissent, par ce récepteur, la glycoprotéine virale m157 qui est présente à la surface de cellules infectées par le MCMV. L'interaction entre le Ly49H des cellules NK et le m157 des cellules infectées cause une prolifération importante des cellules NK Ly49H<sup>+</sup>, stimule leur activité cytotoxique et la sécrétion de cytokines. ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif. D'après (Lanier, 2008).

### a) Les cellules dendritiques

Les DC conventionnelles murines CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup>, leurs homologues humains respectifs CD141<sup>+</sup> et CD1c<sup>+</sup>, et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) jouent un rôle fondamental dans la réponse anti-virale précoce et l'initiation des réponses immunitaires innées et adaptatives dirigées contre le HCMV et le MCMV.

Ces cellules sont activées rapidement après une infection par voie intrapéritonéale de différentes souches de souris par le MCMV. Cette activation se fait grâce aux TLR endosomaux avec un rôle prépondérant du TLR9, reconnaissant les motifs CpG non méthylés de l'ADN viral, et de l'adaptateur MyD88 (Krug et al., 2004)(Dedale et al., 2005). Les TLR7 et TLR3, qui reconnaissent tous deux les ARN simple brin, peuvent également participer à

l'activation des DC (viraux ou autres)(Figure 17)(Zucchini et al., 2008a)(Hokeness-Antonelli et al., 2007)(Tabeta et al., 2004). Suite à cette activation, différents gènes vont être induits dans tous les types cellulaires dendritiques et en particulier des gènes associés à leur maturation et des gènes nécessaires à leur communication avec les lymphocytes T (Vu Manh et al., 2013). Grâce à l'expression de ce programme génétique commun, les cellules vont maturer et acquérir un phénotype de CPA en augmentant l'expression à leur surface de molécules de CMH de classe I et II et de molécules de costimulation comme le CD86, le CD80 ou encore le CD40, tout en conservant leur lignage (Dalod et al., 2003)(Vu Manh et al., 2013). Les DC conventionnelles CD11b<sup>+</sup> matures vont ensuite activer la réponse lymphocytaire T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> par présentation d'antigènes viraux (Mathys et al., 2003)(Walton et al., 2011), et les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> vont activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par cross-présentation (Dalod et al., 2003)(Busche et al., 2013). Les DC humaines semblent se comporter comme les cellules murines puisqu'elles peuvent être stimulées par différents TLR dont les TLR3, 7 et 9 et acquérir un phénotype de CPA post-stimulation (Loré et al., 2003)(Kvale et al., 2006). De plus, les DC conventionnelles humaines, CD1c<sup>+</sup> et CD141<sup>+</sup>, peuvent présenter ou cross-présenter des antigènes aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  humains, respectivement (Kvale et al., 2006)(Bachem et al., 2010)(Croizat et al., 2010)(Jongbloed et al., 2010).

En plus de leur capacité à présenter et cross-présenter des antigènes, les DC conventionnelles et les pDC murines activées produisent des cytokines anti-virales, dont les IFN $\alpha$  et  $\beta$  et l'IL-12. Les pDC sont les producteurs majeurs des IFN $\alpha/\beta$  et, dans une moindre mesure, d'IL-12 dans la rate (Asselin-Paturel et al., 2001)(Dalod et al., 2002)(Dalod et al., 2003)(Zucchini et al., 2008b), ainsi que dans le foie (Hokeness-Antonelli et al., 2007). Il en est de même chez l'homme avec les DC conventionnelles et les pDC circulantes qui, une fois mises au contact du HCMV, produisent des IFN  $\alpha/\beta$  et de l'IL-12 (Renneson et al., 2009)(Kvale et al., 2006). La sécrétion précoce de ces cytokines va moduler la réponse des cellules NK : en effet, les IFN $\alpha/\beta$  vont permettre leur survie via la trans-présentation de l'IL-15 (Lucas et al., 2007), induire leur prolifération et leur fonction cytotoxique alors que l'IL-12 va stimuler leur production d'IFN $\gamma$  (Figure 17)(Orange et al., 1996a et b)(Nguyen et al., 2002)(Swiecki et al., 2010). D'autres cytokines produites par les DC, et particulièrement l'IL18, ont également un rôle important sur la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK (Andoniou et al., 2005)(Tyznik et al., 2014).

Il semble donc que les cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes murines et humaines s'activent par des voies comparables et répondent par des mécanismes similaires à l'infection par le CMV de leurs hôtes respectifs.

### **b) Les cellules NK**

L'importance des cellules NK dans la réponse immunitaire dirigée contre le CMV est connue depuis longtemps, que ce soit chez l'homme (Biron et al., 1989), ou chez la souris (Bukowski et al., 1983)(Bukowski et al., 1984).

Chez la souris, la réponse NK semble se diviser en deux phases : une phase précoce aspécifique et une phase plus tardive spécifique (Dokun et al., 2001). La phase précoce a lieu dans les 2 premiers jours d'infection, avec un pic d'activation et de prolifération des cellules NK à 36 heures post-infection. Lors de cette phase, les cellules NK suivent une cinétique d'activation comparable à celle des DC conventionnelles et des pDC (Dalod et al., 2002). Cette coordination est certainement due au fait que les cytokines produites par les cellules dendritiques vont induire la sécrétion d'IFN $\gamma$  et/ou la cytotoxicité des cellules NK, qui sont nécessaires aux cellules NK pour contrôler le virus dans le foie et la rate des souris (Figure 17)(Tay and Welsh, 1997)(Loh et al., 2005).

Les études réalisées chez la souris sont faites sur des souches congéniques qui présentent des différences au niveau du locus H-2. En infectant différentes souches, il a ainsi pu être montré que certains haplotypes H-2 confèrent une susceptibilité importante vis-à-vis du MCMV, le virus induisant une mort de ces souris même à faible dose (Grundy et al., 1981). Sur la base de cette sensibilité, les souches murines ont donc été classées comme sensibles, par exemple les souris BALB/c, ou résistantes comme les souris C57BL/6. La résistance de cette souche semble être conférée par le gène *Cmv-1* codant pour le récepteur activateur Ly49H (Scalzo et al., 1992)(Brown et al., 2001)(Daniels et al., 2001)(Lee et al., 2003). Ce récepteur reconnaît la glycoprotéine virale m157 qui possède une structure similaire aux molécules de CMH de classe I et est exprimée rapidement post-infection (Smith et al., 2002)(Arase et al., 2002). La reconnaissance de la protéine m157 par les cellules NK Ly49H<sup>+</sup> est clairement montrée comme étant responsable de la protection de ces souris puisque la délétion du gène *m157* du MCMV ou celle du Ly49H des cellules NK rendent les souris sensibles vis-à-vis du virus du fait de l'absence d'activation des cellules NK (Bubic et al., 2004)(Fodil-Cornu et al., 2008), et à l'inverse, l'expression de la protéine Ly49H chez des souris sensibles leur confère une résistance contre le MCMV (Lee et al., 2003).

Ces cellules NK Ly49H<sup>+</sup> sont maintenant connues pour leur fonction de cellules « mémoires » : comme les lymphocytes T  $\alpha\beta$ , elles s'expandent lors de la phase primaire d'infection grâce à l'IL-12, subissent une phase de contraction, se maintiennent pendant plusieurs mois et sont capables de s'expandre et de protéger de manière très efficace les souris lors d'une seconde infection (Sun et al., 2009)(Sun et al., 2012)(Min-Oo et al., 2014a). De plus, ces cellules NK « mémoires » semblent relativement spécifiques du MCMV puisqu'elles perdent leur capacité à répondre aux cytokines seules et ont besoin de lier la protéine m157 pour s'activer (Min-Oo et al., 2014b). Le MCMV laisse donc une empreinte importante dans le compartiment NK en ne sélectionnant que les cellules Ly49H<sup>+</sup>. Aujourd'hui, d'autres gènes de résistance appartenant au locus des gènes NK *Ly49* ont été mis en évidence comme le récepteur Ly49L des souris BALB.K qui reconnaît la protéine virale *m04/gp34* et semble protéger les souris contre le MCMV (Pyzik et al., 2011). Il reste à savoir si ces NK peuvent également avoir une fonction mémoire de protection à long terme, puisque seule la fonction mémoire des NK Ly49H<sup>+</sup> a été étudiée à ce jour.

Il semblerait que les cellules NK humaines se comportent de manière similaire à leurs homologues murins. En effet, elles ont également des propriétés anti-virales qui sont induites par des cytokines produites par les DC et pDC comme l'IL-12 et l'IL-15. De plus, l'infection par le HCMV sélectionne et amplifie uniquement les cellules NK CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> certainement grâce à une protéine virale qui n'est pas encore connue, ce qui est relativement comparable à ce qui a été observé chez la souris avec les NK Ly49H<sup>+</sup> (Lopez-Vergès et al., 2011). De plus, ces NK CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> semblent être induites spécifiquement par le HCMV étant donné que l'infection par l'EBV ne résulte pas en une augmentation de la proportion de NK présentant ce phénotype (Hendricks et al., 2014). Ainsi, la primo-infection par les CMV humains et murins laisse une empreinte assez marquée dans le compartiment cellulaire NK, modifiant à long terme ce compartiment.

Les études réalisées chez la souris ont montré que l'absence d'activation des cellules NK dans certaines souches murines rend ces dernières sensibles vis-à-vis du CMV, mettant ainsi en exergue l'importance de ces cellules lors de l'infection. Cependant, ces cellules ne suffisent pas pour protéger leur hôte à long terme contre le virus.

## 2. Réponse adaptative

### a) Réponse cellulaire médiée des lymphocytes T $\alpha\beta$

La primo-infection par le CMV induit une réponse lymphocytaire T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> robuste qui est associée à la résolution de l'infection primaire aiguë. Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  ont un rôle protecteur particulièrement important chez les souris BALB/c puisque leur absence mène à la mort de ces souris post-infection. Ces deux sous-populations ont des rôles bien distincts au cours de l'infection primaires et évoluent différemment à long terme.

- Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Le rôle essentiel des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> dans la réponse immunitaire dirigée contre le CMV est connu depuis longtemps que ce soit chez l'homme ou chez la souris (Riddell et al., 1992)(Reddehase et al., 1985)(Reddehase et al., 1988)(Krmptotic et al., 2003). Ces cellules ont pour fonction majeure l'élimination des cellules infectées par leur activité cytotoxique et la production de grandes quantités d'IFN $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (Gamadia et al., 2003)(Pavic et al., 1993).

Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> semblent être majoritairement activés par cross-présentation de peptides viraux par les CPA (Snyder et al., 2010)(Busche et al., 2013). De nombreux peptides sont reconnus par les cellules T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> murins isolées de souris C57BL/6, parmi lesquels certains peptides élicitent des réponses importantes comme par exemple des peptides dérivés des protéines virales m139, m141 et M45, ce dernier étant l'épitope dominant la réponse T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> (Munks et al., 2006a). Chez les souris BALB/c, les peptides reconnus sont différents de ceux engendrant une réponse T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> chez les souris C57BL/6, probablement parce que ces souris n'expriment pas les mêmes molécules de CMH. De manière assez comparable, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> humains reconnaissent de

nombreux peptides dérivés du CMV dont certains sont reconnus par les lymphocytes T de plus de la moitié de la population étudiée, comme UL123 (IE1) et UL83 (pp65) (Sylwester et al., 2005)(Kern et al., 2002). De manière générale, environ 50% des ORFs du HCMV peuvent être reconnus par les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>. Le CMV peut donc induire une réponse T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> robuste majoritairement dirigée par la reconnaissance d'antigènes immunodominants.

Lors de la phase aiguë d'infection, la reconnaissance des peptides présentés engendre une expansion des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> qui est détectée dès 6 à 7 jours post-infection chez la souris et environ 20 jours après la primo-infection chez l'homme (Munks et al., 2006b)(Sierro et al., 2005)(Gamadia et al., 2003). Lors de cette phase, tous les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> présentent un phénotype similaire activé CD62L<sup>low</sup> pour les cellules murines et CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> pour les cellules humaines. Lors de la phase chronique de l'infection, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> peuvent être divisés en deux sous-populations : 1/ une population dite centrale mémoire CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup> ou CD45RA<sup>neg</sup>CD27<sup>+</sup> chez la souris ou l'homme, respectivement, et qui est maintenue à faible taux (Sierro et al., 2005)(Snyder et al., 2008)(Karrer et al., 2003)(Gamadia et al., 2003), et 2/ une population caractérisée par un fort potentiel cytotoxique et un phénotype effecteur mémoire CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> pour les cellules murines ou CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup> pour les cellules humaines dites TEMRA pour T effecteur mémoire ré-exprimant le CD45RA (Karrer et al., 2003)(Wiesel et al., 2009)(Kuijpers et al., 2003)(Gamadia et al., 2001). Les cellules humaines TEMRA sont considérées comme étant caractéristiques de l'infection à CMV (Kuijpers et al., 2003). Chez les individus infectés, la proportion des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> TEMRA augmente progressivement avec le temps pouvant représenter jusqu'à 30% de la population T CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  totale (Sylwester et al., 2005). Ce phénomène, également observé chez la souris, est qualifié d'inflation de la mémoire et pourrait être dû à une stimulation récurrente des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> par des antigènes viraux (Karrer et al., 2003)(Sierro et al., 2005).

L'infection à CMV crée de fortes modifications dans le compartiment lymphocytaire T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> chez la souris comme chez l'homme, et laisse de ce fait une « empreinte » caractéristique du virus.

- Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

L'importance des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> est évidente dans le modèle murin d'infection à CMV, dans lequel la déplétion à long terme de ces lymphocytes *in vivo* est associée à une infection persistante dans les glandes salivaires, favorisant de ce fait la transmission horizontale du virus (Jonjic et al., 1989). De plus, ces cellules peuvent compenser l'absence ou l'inactivation des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> et ainsi avoir un rôle critique dans le contrôle de la réplication virale lors de la primo-infection (Jonjic et al., 1990)(Walton et al., 2011). L'importance des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> a été mise en évidence chez l'homme plus récemment : lors d'une primo-infection chez des individus transplantés, l'apparition des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> spécifiques du CMV avant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques est corrélée à une infection asymptomatique, alors que chez les individus

ayant une infection symptomatique et une réplication virale plus longue, leur apparition est retardée (Gamadia et al., 2003). Ces éléments montrent que chez l'homme comme chez la souris, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> sont nécessaires au contrôle du CMV.

Certains lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> semblent avoir la même spécificité antigénique que les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>, que ce soit chez l'homme ou chez la souris. En effet, parmi les peptides activant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris C57BL/6 se trouvent des peptides des protéines virales m139, m141 et M45 qui peuvent également être reconnus par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, comme mentionné précédemment (Arens et al., 2008)(Munks et al., 2006a). Chez l'homme, 8 des 15 ORFs majeurs sont partagés par les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> comme par exemple UL83 (pp65) (Sylwester et al., 2005)(Beninga et al., 1995)(Kern et al., 2002). De nombreux autres épitopes du CMV ne sont reconnus que par les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup>, couvrant jusqu'à pratiquement 60% des ORFs du virus. Du fait de cette immunogénicité importante, environ 4 à 6% de la population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> est spécifique du CMV chez les individus séropositifs et chez les souris infectées (Arens et al., 2008)(Sylwester et al., 2005). Comme pour les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>, le CMV élicite une réponse particulièrement importante des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup>.

Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> producteurs d'IFN $\gamma$  apparaissent dès le 8<sup>ème</sup> jour post-infection chez la souris, et entre 7 et 10 jours après l'apparition de la virémie chez l'homme (Arens et al., 2002)(Rentenaar et al., 2000). En phase chronique d'infection, ces cellules présentent un phénotype effecteur mémoire CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> ou CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup> (Rentenaar et al., 2000). Parmi les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> humains spécifiques du CMV, une sous-population CD28<sup>neg</sup>, normalement rare, est trouvée en fortes proportions chez les individus séropositifs (van Leeuwen et al., 2004). Ces cellules particulières produisent de l'IFN $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , et peuvent avoir une activité cytotoxique vis-à-vis de cellules exprimant des peptides du CMV *in vitro* (van Leeuwen et al., 2004)(Casazza et al., 2006).

En plus de leur fonction anti-virale liée à la production de cytokines anti-virales (Davignon et al., 1996), les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> participent également à la mise en place des réponses lymphocytaires B et T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>. En effet, des souris BALB/c déplétées à long terme en lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> ne présentent que peu, voire pas d'anticorps anti-CMV en comparaison à des souris non déplétées qui ont un titre d'anticorps spécifiques du virus élevé (Jonjic et al., 1989). Ces résultats montrent clairement un rôle des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> dans la mise en place de la réponse humorale anti-CMV. De même, leur absence chez des individus recevant une thérapie cellulaire T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> réduit l'activité cytotoxique de ces derniers suggérant qu'une des fonctions des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> est nécessaire à l'établissement d'une réponse T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> efficace (Walter et al., 1995).

Les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> font donc partie intégrante de l'immunité dirigée contre le CMV chez l'homme et chez la souris, exerçant à la fois une activité anti-virale directe par la production de cytokines et parfois une activité cytotoxique, et une activité indirecte en aidant les autres effecteurs adaptatifs.

### **b) Réponse humorale des lymphocytes B**

La réponse humorale médiée par les anticorps n'est pas essentielle pour la résolution de l'infection primaire et ne prévient pas la transmission horizontale du virus chez la souris, bien que des anticorps dirigés contre le MCMV soient détectés dès le jour 7 post-infection dans le sérum de souris immunocompétentes. En effet, l'absence des lymphocytes B n'influe en rien sur la cinétique d'élimination du virus dans les glandes salivaires lors d'une primo-infection, puisque celle-ci est la même chez des souris déficientes en lymphocytes B et des souris contrôle immunocompétentes (Jonjic et al., 1994). Par contre, les lymphocytes B et plus particulièrement les anticorps dirigés contre le CMV ont un rôle important dans la neutralisation du virus dans les phases de réactivation virale, limitant ainsi sa dissémination (Jonjic et al., 1994). En effet, après l'induction d'une réactivation du MCMV, la présence d'anticorps spécifiques anti-CMV permet de diminuer de manière non négligeable (facteur 100 à 1000) la quantité de particules virales infectieuses dans les organes des souris immunocompétentes en comparaison aux souris déficientes en lymphocytes B. D'autre part, le transfert adoptif de lymphocytes B mémoires isolés de souris C57BL/6 immunisées à des souris RAG1<sup>-/-</sup> déficientes en lymphocytes T et B protège ces dernières de la mort induite par le MCMV, laissant apparaître un rôle essentiel des anticorps dans ce contexte d'immunodéfiance (Klenovsek et al., 2007). La preuve directe de l'importance des anticorps a été apportée par l'injection de sérum de souris immunisées à des souriceaux ou des souris immunodéficientes, qui permet de réduire la charge virale et les dommages liés au virus contrairement à un sérum contrôle (Klenovsek et al., 2007)(Cekinovic et al., 2008).

Chez l'homme, des IgG anti-CMV sont détectées dans le sang d'individus primo-infectés environ 15 à 17 jours après la détection d'une virémie (Gamadia et al., 2003). Ces anticorps reconnaissent majoritairement la protéine gB (40-70% des anticorps), bien que d'autres protéines virales puissent être ciblées (Britt et al., 1990)(Rasmussen et al., 1991). L'importance de la réponse humorale a également été démontrée chez l'homme dans le cas d'infections congénitales, lors desquelles les femmes enceintes infectées et ayant développé des IgG anti-CMV suffisamment afin transmettent dans une moindre mesure l'infection au fœtus que les femmes non immunisées (Stagno et al., 1986)(Schleiss, 2013).

Les lymphocytes B sont donc des acteurs de la réponse anti-virale dirigée contre le CMV. Leur rôle n'est pas de contrôler le virus dans la phase aiguë d'infection mais de limiter la dissémination du CMV au cours des phases de réactivation, et de neutraliser le rapidement lors d'une infection secondaire. De ce fait, les lymphocytes B ont un rôle un peu à part par rapport aux autres acteurs immunitaires décrits précédemment.

### **C. Mécanismes d'échappement du CMV**

Le HCMV et le MCMV ont coévolué pendant des milliers d'années avec leur hôte respectif, et cette coévolution a généré un équilibre grâce auquel le virus peut persister à vie chez son hôte. À cette fin, les CMV ont développé de nombreux mécanismes d'échappement immunitaire d'où leur qualification de « maîtres » de l'évasion. Les différents mécanismes

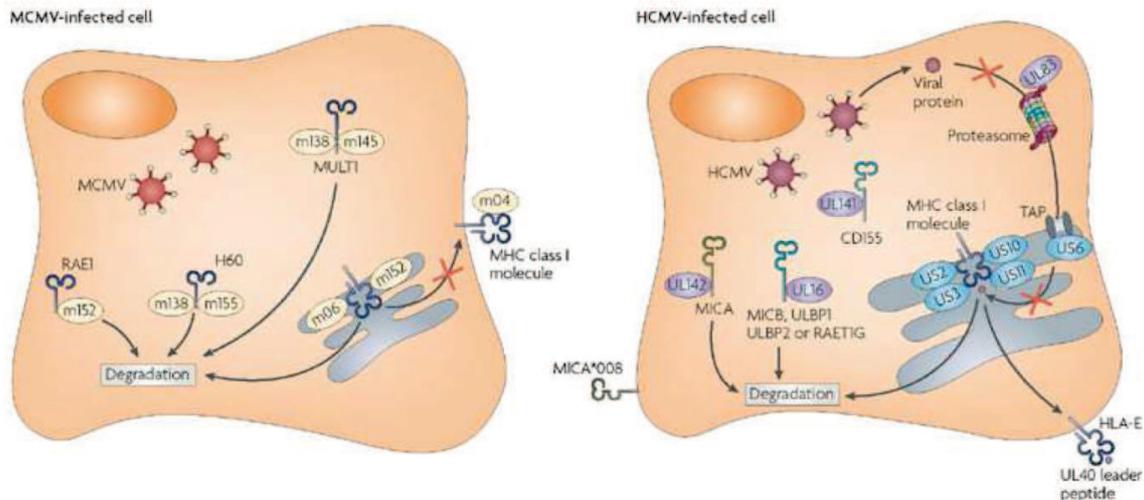
mis en place par ces virus affectent globalement l'ensemble des cellules immunitaires, induisant une perte d'efficacité globale de l'immunité anti-virale. Seuls certains de ces mécanismes seront développés dans le but d'illustrer l'éventail large de protéines d'évasion codées par le génome du MCMV et du HCMV.

Les CMV sont capables de bloquer la présentation antigénique par les DC conventionnelles, par exemple grâce à l'expression dans les cellules infectées de protéines virales interférant avec la présentation d'antigènes (Lemmermann et al., 2012)(Lu et al., 2006), ou par la production d'IL-10 d'origine virale chez l'homme ou d'origine cellulaire chez la souris (Chang et al., 2004)(Redpath et al., 1999). Ils peuvent également empêcher la production d'IFN de type I par les pDC humaines et les DC myéloïdes murines (Chang et al., 2009)(Döring et al., 2014).

Le HCMV et le MCMV peuvent également affecter de manière relativement comparable l'activation des lymphocytes T  $\alpha\beta$  et plus particulièrement, des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>. En effet, ces virus codent pour des protéines virales capables d'interférer avec les différents processus nécessaires à la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe I, comme la protéine US11 du HCMV et les protéines m04, m06 et m152 du MCMV (Jones et al., 1995)(Wagner et al., 2002). De manière générale, ces protéines peuvent inhiber la réponse T CD8<sup>+</sup> en (i) induisant la dégradation des chaînes produites et (ii) en inhibant le chargement des peptides par inhibition des transporteurs d'antigènes ou du protéasome. Ces différents mécanismes sont représentés dans la figure 18.

L'inhibition de ces molécules de CMH de classe devrait résulter en une activation des cellules NK du fait de l'absence de signaux inhibiteurs donnés par la fixation d'une molécule de CMH sur un récepteur NK inhibiteur comme le complexe CD94-NKG2A. Afin d'éviter l'activation de ces cellules, le HCMV a mis en place un mécanisme de compensation en codant la protéine UL40 qui va servir de peptide pour la molécule HLA-E et ainsi permettre son expression. Cette protéine virale est surexprimée à la surface des cellules infectées et va pouvoir interagir avec le récepteur NK inhibiteur CD94-NKG2A. Cette interaction aboutie à l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK (Figure 18)(Tomasec et al., 2000).

En plus de coder des protéines capables d'activer des récepteurs inhibiteurs des cellules NK, le HCMV produit également des molécules capables d'induire la dégradation de ligands des récepteurs activateurs comme MICA chez l'homme ou Rae-1 chez la souris qui sont tous deux reconnus par le NKG2D. Ces molécules sont ciblées par les protéines US18 et US20 du HCMV ou par la protéine m152 du MCMV qui vont inhiber leur expression en surface (Fielding et al., 2014)(Krmptotic et al., 2002). Il a également été reporté récemment que l'allèle MICA\*008, jusqu'à présent considéré comme conférant un avantage aux cellules NK humaines puisque résistant face aux mécanismes d'évasion mis en place par le CMV, peut être ciblé par la protéine virale US9 et induire sa dégradation par le protéasome (Seidel et al., 2015).



**Figure 18- Protéines du MCMV et du HCMV affectant la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK.**

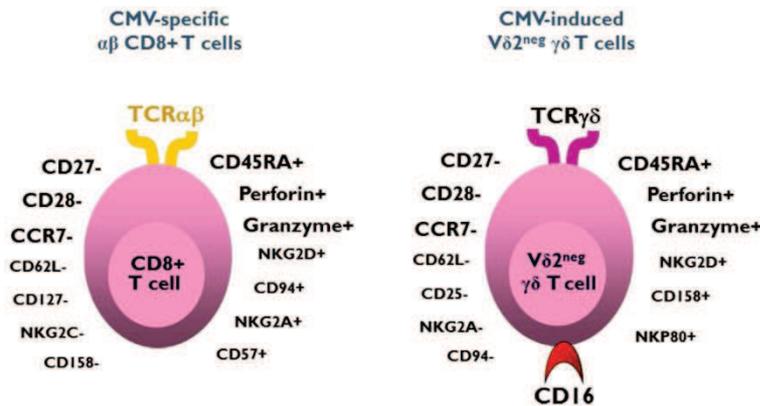
Les CMV peuvent interférer avec la présentation des CMH de classe I et ainsi empêcher l'activation des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>. Les protéines virales murines m04, m06 et m152 inhibent l'expression des CMH de classe I à la surface des cellules infectées par un processus complexe qui diffère selon les allèles présents chez l'hôte. La protéine m04 peut être exprimée en surface complexée à des molécules de CMH de classe I, mais la manière dont cette association influence la reconnaissance des molécules de CMH par les cellules NK et les lymphocytes T n'est pas connue. Le HCMV bloque également l'expression des molécules de CMH de classe I par exemple en exprimant la protéine virale humaine US11 qui interagit avec la chaîne lourde des CMH, complexée ou non avec la  $\beta$ 2-microglobuline, et induit leur dégradation. Le HCMV et le MCMV codent également des protéines pouvant inhiber la réponse NK. L'absence des CMH de classe I pouvant induire l'activation des cellules NK, le HCMV code pour la protéine UL40 qui fournit un peptide leader pouvant se lier au HLA-E et permettre son expression à la surface des cellules infectées. Cette molécule est reconnue par les cellules NK grâce au récepteur inhibiteur NKG2A/CD94 dont l'activation va empêcher la lyse des cellules infectées. En plus d'induire l'expression de molécules fixant les récepteurs NK inhibiteurs, les virus codent pour des protéines empêchant l'expression des ligands des récepteurs NK activateurs. Le MCMV code pour la protéine m152 qui cible les CMH de classe I et Rae-1 et induit leur dégradation ; le HCMV code de nombreuses protéines bloquant l'expression de MICA. Des protéines du HCMV découvertes récemment, comme US9, sont capables de cibler certains allèles de MICA présentant un domaine intracytoplasmique tronqué comme MICA\*008 et induire leur dégradation. D'après (Lanier, 2008).

### III. Place des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la réponse immunitaire dirigée contre le CMV

Du fait de leurs caractéristiques partagées à la fois avec l'immunité innée et l'immunité adaptative et de leur reconnaissance antigénique singulière en comparaison aux lymphocytes T conventionnels, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourraient avoir un rôle particulier dans l'infection à CMV et/ou compenser l'absence ou le défaut d'activation des autres cellules immunitaires. Leur implication dans la réponse immunitaire dirigée contre le CMV a été mise en évidence depuis plus de 15 ans par des études réalisées au laboratoire chez des patients transplantés rénaux. Chez ces individus greffés et immunosupprimés, l'infection à CMV aboutie à une augmentation en proportion et en nombre des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans le compartiment sanguin (Déchanet et al., 1999a), et cette expansion est maintenue à long terme (>1 an) (Déchanet et al., 1999b). Le CMV est le seul facteur significativement corrélé à

l'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , d'autres virus comme le HSV, l'EBV ou l'influenza n'entraînant pas une telle augmentation. Depuis lors, l'expansion de ces lymphocytes post-infection à CMV a été montrée dans de nombreux autres contextes comme chez des individus ayant reçu des greffes d'organes solides (foie, cœur, poumons, intestin grêle)(Puig-Pey et al., 2010)(Couzi et al., 2010), des receveurs de cellules souches allogéniques réactivant le virus (Knight et al., 2010)(Scheper et al., 2013)(Prinz et al., 2013b), des femmes enceintes et des fœtus (Fornara et al., 2011)(Vermijlen et al., 2010), des enfants immunodéficients atteints de déficits immunitaires combinés sévères (SCID) (Ehl et al., 2005)(de Villartay et al., 2005). L'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$  a également lieu chez des individus sains séropositifs (Knight et al., 2010)(Pitard et al., 2008). De manière intéressante, l'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est corrélée à la résolution de l'infection chez les patients transplantés rénaux et un délai court entre l'infection et l'expansion des lymphocytes est lié à une infection moins intense et moins longue (Lafarge et al., 2001). Ces éléments mettent en exergue le lien étroit existant entre le CMV et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et suggèrent un rôle anti-viral de ces cellules.

D'autres éléments confortent l'idée que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  font partie intégrante de la réponse immunitaire dirigée contre le CMV, et plus particulièrement de la réponse adaptative. En effet, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> ont des cinétiques d'expansion comparables chez les patients transplantés rénaux et les femmes enceintes infectés (Couzi et al., 2009)(Fornara et al., 2011). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  isolés de patients transplantés rénaux infectés par le CMV s'amplifient *in vitro* au contact de virus opsonisés ou de lysats de fibroblastes infectés. Cette expansion est la conséquence d'une reconnaissance spécifique et TCR-dépendante du CMV puisque (i) l'ajout d'un anticorps bloquant anti-TCR $\gamma\delta$  bloque cette prolifération, et (ii) aucune expansion n'est observée en présence de lysats de fibroblastes infectés par le HSV (Déchanet et al., 1999b). De plus, l'infection à CMV induit un remodelage et une restriction du répertoire T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> mais aussi T  $\gamma\delta$  en favorisant l'expansion de lymphocytes T spécifiques. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  amplifiés font majoritairement partie de la sous-population V $\delta$ 2<sup>neg</sup> (V $\delta$ 1<sup>+</sup>, V $\delta$ 3<sup>+</sup> et V $\delta$ 5<sup>+</sup>) et présentent un répertoire oligoclonal voir, chez certains individus, monoclonal, suggérant une sélection antigénique de ces lymphocytes (Déchanet et al., 1999b)(Knight et al., 2010)(Vermijlen et al., 2010)(Pitard et al., 2008). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> amplifiés par le CMV sont activés (CD69<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) et ont un phénotype TEMRA CD27<sup>neg</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>neg</sup>, phénotype caractéristique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du CMV (Figure 19) (Déchanet et al., 1999b)(Pitard et al., 2008)(Couzi et al., 2009).



**Figure 19 – Phénotype des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> spécifiques du CMV et des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  induits par le CMV.**

Les deux sous-populations lymphocytaires induites par l'infection à CMV présentent un phénotype effecteur/mémoire TEMRA (CD27<sup>neg</sup>CD45RA<sup>+</sup>) similaire à l'exception de certains récepteurs NK et du CD16. Tiré de (Couzi et al., 2015).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  exercent leur activité anti-virale par différents mécanismes qui sont également partagés avec les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>. Une fois mis au contact de fibroblastes infectés *in vitro* par le CMV, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  vont avoir une activité cytotoxique vis-à-vis de ces cellules. Cette cytotoxicité peut être due à une production importante de TNF- $\alpha$  (Halary et al., 2005), et/ou par la production de molécules cytotoxiques comme la perforine et le granzyme qui vont lyser directement les cellules infectées (Figure 19)(Vermijlen et al., 2010)(Knight et al., 2010)(Prinz et al., 2013b)(Halary et al., 2005)(Couzi et al., 2012). En plus de cette activité, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent également produire d'autres cytokines anti-virales et en particulier de l'IFN $\gamma$  (Scheper et al., 2013)(Knight et al., 2010)(Vermijlen et al., 2010)(Couzi et al., 2012). Grâce à cette cytokine, ils sont capables de limiter la propagation du virus *in vitro* (Halary et al., 2005). Ainsi, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent contrôler le virus par des mécanismes comparables aux lymphocytes T  $\alpha\beta$ .

Ainsi, de nombreuses caractéristiques des lymphocytes T  $\gamma\delta$  induits par l'infection à CMV sont partagées avec les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus. Cependant, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  expriment un panel de récepteurs NK quelque peu différent de celui des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> puisqu'ils sont NKG2D<sup>+</sup>, NKP80<sup>+</sup>, CD158<sup>+</sup> et NKG2A/CD94<sup>neg</sup> (Figure 19)(Déchanet et al., 1999b)(Couzi et al., 2009). Une autre différence vient de l'expression du CD16 ou Fc $\gamma$ RIIIA, récepteur de faible affinité au fragment constant des Ig de type G (IgG), à la surface des lymphocytes T  $\gamma\delta$  activés (Figure 19). Ce récepteur est absent à la surface des lymphocytes T  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  en conditions physiologiques mais son expression au cours de l'infection permet aux lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  de s'activer et de produire de l'IFN $\gamma$  en présence de virus opsonisés par des IgG sans activation préalable du TCR (Couzi et al., 2012). Enfin, l'infection à CMV induit à la surface des cellules cibles l'expression de ligands (comme l'EPCR) et de molécules de costimulation (comme ICAM-1) reconnus par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  qui sont bien distincts de ceux reconnus par les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> (Willcox et al., 2012). Cette spécificité antigénique particulière permettrait aux lymphocytes T  $\gamma\delta$  de reconnaître les cellules infectées alors que les mécanismes d'échappement mis en place par le virus vont empêcher l'activation des lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Ces éléments suggèrent donc un rôle des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  partiellement redondant avec celui des lymphocytes T  $\alpha\beta$

au cours de l'infection à CMV, mais leurs caractéristiques singulières d'activation en font des acteurs particulièrement importants dans des contextes où la réponse T  $\alpha\beta$  est compromise.

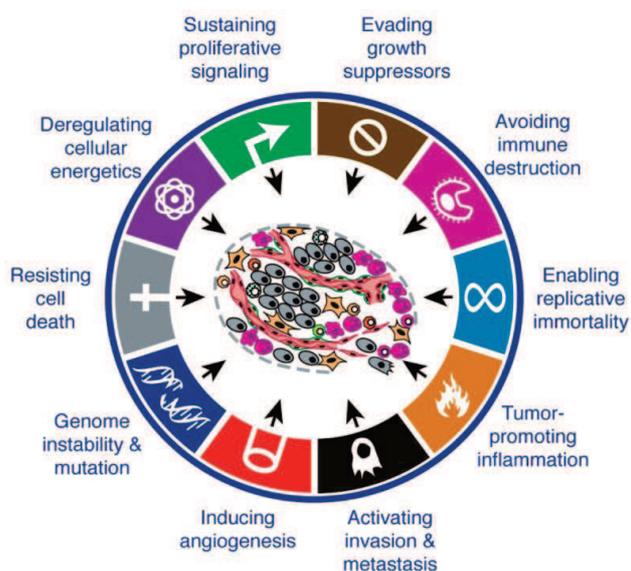
#### IV. Effet de l'infection à CMV sur le cancer

##### A. Infections virales et cancer

###### 1. Le cancer : nature et caractéristiques de la pathologie

Le terme général de « cancer » s'applique à un grand ensemble de maladies pouvant toucher n'importe quel tissu de l'organisme. C'est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde, touchant environ 14 millions d'individus et étant responsable de 8,2 millions de décès en 2012. Les principaux types de cancers développés sont le cancer du poumon (1,59 millions de décès), le cancer du foie (745 000 décès) et le cancer de l'estomac (723 000 décès) selon les chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé OMS.

Le cancer est causé par des cellules anormales qui se multiplient de manière anarchique et envahissent l'organisme. Le développement de cette maladie, ou carcinogénèse, est un processus se faisant en plusieurs étapes lors duquel les cellules vont progressivement acquérir toutes les caractéristiques ou « hallmarks » de cellules malignes/tumorales (Vogelstein and Kinzler, 1993). Cette transformation est le résultat d'une accumulation d'altérations somatiques causée par des mutations spontanées ou des mutations dues à l'exposition à des agents carcinogènes de nature variée (chimique, biologique, etc.) (Bishop, 1991). La prévalence de ces mutations somatiques est très variable entre différents types de cancer, allant d'environ 0,001 mutation par mégabase (Mb) d'ADN à plus de 400 par Mb. Cette diversité confère à chaque type de cancer une signature mutationnelle propre (Alexandrov et al., 2013).



**Figure 20 – Caractéristiques ou « hallmarks » des cellules malignes.**

Tiré de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Malgré cette diversité au niveau génomique, la plupart des cellules malignes partageraient 10 caractéristiques selon le principe révisé en 2011 par Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg (Figure 20) (Hanahan and Weinberg, 2000)(Hanahan and Weinberg, 2011). Cependant, les cellules tumorales présentes dans les tumeurs peuvent être très hétérogènes selon la ou les cellules initiatrices et pourraient donc ne pas présenter les mêmes caractéristiques (Marusyk and Polyak, 2010). De plus, les tumeurs comprennent également divers types de cellules non-transformées indispensables à la progression du cancer. On peut par exemple mentionner les cellules endothéliales nécessaires à la vascularisation des tumeurs solides ou encore les cellules immunitaires inflammatoires qui génèrent un microenvironnement favorable au développement de certains types de cancers (Hanahan and Weinberg, 2011). En prenant en compte cette complexité, les 10 caractéristiques mentionnées semblent plus s'appliquer au cancer en général qu'aux cellules tumorales elles-mêmes (Floor et al., 2012).

## **2. Les virus oncogéniques**

Bien que le potentiel oncogénique de certains virus a été clairement prouvé depuis la découverte du lien entre l'Epstein-Barr virus (EBV) et le lymphome de Burkitt, il reste cependant difficile d'identifier un virus comme un facteur causant un cancer chez l'homme. Ces difficultés proviennent de plusieurs éléments : (i) le cancer se développe rarement lors de la phase aiguë d'infection mais plusieurs années voir plusieurs décennies après, (ii) le plus souvent, les cellules tumorales ne produisent pas de particules virales infectieuses, (iii) la plupart des virus liés à des cancers sont particulièrement fréquents dans la population générale et, (iv) certains virus n'agissent que comme des carcinogènes indirects sans que leur génome ne persiste dans les cellules cancéreuses infectées (zur Hausen, 2009). Malgré ces difficultés, plusieurs virus sont connus aujourd'hui pour leurs propriétés oncogéniques et à l'échelle mondiale, approximativement 12% des cancers humains ont été montrés comme résultants d'une infection par un virus oncogénique en 2008 (de Martel et al., 2012).

Les cancers viro-induits présentent trois caractéristiques communes :

- Les oncovirus sont nécessaires mais pas suffisants pour induire le développement de ces cancers, ce qui explique que l'incidence des cancers soit très nettement inférieure à la prévalence des virus oncogéniques dans la population,
- Le cancer ne survient que plusieurs années après l'infection aiguë et uniquement dans un contexte d'infection persistante,
- Le système immunitaire peut jouer un rôle délétère ou protecteur selon le type de cancer, certains se développant dans un contexte immunosupprimé alors que d'autres apparaissent dans un contexte inflammatoire chronique (Mesri et al., 2014).

Les virus oncogéniques sont de types très divers tout comme la nature des cancers induits. Les virus clairement établis à l'heure actuelle comme étant les virus oncogéniques majeurs chez l'homme sont les virus de l'hépatite B (HBV) et de l'hépatite C (HCV) qui sont tous deux responsables de carcinomes hépatocellulaires (HCC), le virus T-lymphotropique



**Figure 21 – Liens entre les oncovirus humains et l’activation des voies cellulaires menant à l’acquisition de caractéristiques tumorales.**

A/ Risques oncogéniques liés à la réplication et à la persistance virale. Plusieurs mécanismes moléculaires employés par les virus oncogènes pour maximiser leur réplication et leur persistance nécessitent un détournement des voies de signalisation de la cellule infectée et mènent à l’acquisition de caractéristiques cancéreuses. Les principales stratégies mises en place par les virus pour se répliquer et persister sont listées à gauche. Sous chaque stratégie sont mentionnées les réponses cellulaires induites par l’infection avec le même code couleur que les hallmarks du cancer auxquels elles correspondent (à droite). B/ Le tableau relie les virus oncogéniques connus avec les principales voies qu’ils régulent et les caractéristiques tumorales qu’ils peuvent induire. Les caractéristiques sont colorées suivant le même code couleur que celui mentionné en A/. HBV : Hépatite B virus; HCV : Hépatite C virus; EBV : Epstein-Barr virus; HPVs : high-risk human papillomavirus; HTLV-1 : human T cell lymphotropic virus-1; KSHV : Kaposi’s sarcoma herpesvirus; DDR : DNA damage response; BL : Burkitt’s lymphoma; NHL : Non-Hodgkin’s lymphomas; PTLD : Posttransplant lymphoproliferative disorder; NPC : Nasopharyngeal carcinoma; CxCa : Cervical carcinoma; HNCC : Head and neck cancer; HCC : Hépatocellular carcinoma; ATL : Adult T cell leukemia/lymphoma; KS : Kaposi’s sarcoma, V-ONC : Viral oncogene. Tiré de (Mesri, Feitelson and Munger, 2014).

(« pathways ») et ainsi de mener leur cycle répliatif à terme tout en favorisant le développement tumoral. On peut par exemple mentionner leur capacité à induire la prolifération cellulaire via des protéines virales comme la protéine LANA (latency-associated nuclear antigen) du KSHV qui inactive les suppresseurs de tumeurs p53 et Rb et empêche ainsi l’arrêt du cycle cellulaire (Friborg et al., 1999)(Radkov et al., 2000), ou la protéine LMP2A (latent membrane protein 2A) qui active la voie de la PI3K et induit ainsi la prolifération et la survie des cellules infectées (Merchant et al., 2000). Ils peuvent également diminuer la sensibilité des cellules à l’apoptose, induire une inflammation, favoriser l’évasion immunitaire, etc. comme montré dans la Figure 21B et décrit plus en détails dans la revue de (Mesri et al., 2014).

### **3. Les virus oncolytiques**

Le terme de « virus oncolytique » est de manière générale employé pour définir des souches virales non pathogéniques chez des individus immunocompétents, qui infectent et tuent sélectivement les cellules cancéreuses sans causer de dommages aux cellules saines environnantes. Ces virus se multiplient dans les cellules tumorales et peuvent les tuer par des mécanismes directs comme la lyse des cellules, l’activation de l’apoptose, l’expression de protéines toxiques ou l’inhibition de la synthèse des protéines, ou par des mécanismes indirects tel que l’induction d’une réponse immunitaire anti-tumorale.

L’utilisation de virus en thérapie anti-tumorale a gagné en attention ces 25 dernières années, bien que quelques études réalisées au cours des années 50 et 70 suggéraient déjà que certains virus, comme le virus ourlien, pouvaient naturellement exercer une activité anti-tumorale et permettre la régression de certaines tumeurs (Asada, 1974). Des années plus tard, une étude utilisant une souche mutante d’HSV déficiente pour la thymidine kinase ne se répliquant que dans des cellules en division a montré que l’infection *in vitro* de lignées

cellulaires de gliomes humains par ce virus résulte en une lyse de ces cellules, ainsi qu'en une inhibition de leur croissance en sous-cutané et en intracérébral chez des souris nude (Martuza et al., 1991). Suite à cette étude, de nombreux types de virus ont été étudiés, généralement sélectionnés sur des critères particuliers (tropisme, etc.). Certains ont même été modifiés pour être plus spécifiques ou plus efficaces que les souches parentales et acquérir une ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

- Le virus doit pouvoir être délivré au niveau du site tumoral en quantité suffisante si l'injection des particules infectieuses ne se fait pas directement en intratumoral ou que plusieurs sites doivent être ciblés en même temps. On peut par exemple mentionner l'utilisation de cellules « porteuses » infectées capables d'emmener le virus sur le site tumoral telles que les lymphocytes T qui peuvent délivrer le Vesicular stomatis virus (VSV) ou le virus de la rougeole dans des modèles de tumeurs métastatiques pulmonaires ou de myélome sous-cutané ou disséminé (Qiao et al., 2008)(Ong et al., 2007). L'utilisation de ces cellules porteuses évite également la neutralisation des virus par des éléments du système immunitaire et particulièrement les anticorps.
- La spécificité du virus peut être modifiée de manière à ce qu'il infecte spécifiquement un certain type de cellules tumorales. Pour cela, les virus peuvent être amenés à se fixer sur des récepteurs exprimés par les cellules tumorales comme il a été fait avec une souche de HSV modifiée pour se fixer sur l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) surexprimé à la surface de nombreux types de cancers comme le glioblastome (Uchida et al., 2013), ou le virus de la rougeole pour le récepteur de l'urokinase qui joue un rôle critique pour le développement du cancer du sein (Jing et al., 2015).
- Le virus peut avoir, en plus de son effet direct sur la cellule tumorale infectée, un effet sur les cellules environnantes ce qui permet d'amplifier l'effet anti-tumoral. Par exemple, un HSV-1 modifié peut induire une réponse immunitaire anti-tumorale efficace en recrutant des lymphocytes T effecteurs au sein de la tumeur (Fu et al., 2015), alors que l'injection de cellules tumorales infectées par le virus de la rougeole favorise la cross-présentation d'antigènes tumoraux par les DC et les pDC (Gauvrit et al., 2008)(Guillerme et al., 2012). Il peut également être « armé » pour coder pour des molécules stimulant des cellules immunitaires comme le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)(Senzer et al., 2009).

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive et un grand nombre de mécanismes et/ou modifications autres que ceux mentionnés peuvent être impliqués dans l'effet anti-tumoral de nombreux autres virus oncolytiques. Ces différents éléments sont développés dans les revues (Russell et al., 2012)(Miest and Cattaneo, 2014).

L'efficacité de certains de ces virus a été (ou est) évaluée dans des essais cliniques. Quelques exemples d'essais en cours en 2014 sont regroupés dans le tableau 6. Parmi les

virus utilisés dans ces essais, certains sont naturellement oncolytiques comme par exemple le parvovirus H-1 (ParvOryx)(Geletneky et al., 2012) et le réovirus de type 3 (Reolysin)(Forsyth et al., 2008)(Galanis et al., 2012), les autres virus ont tous été modifiés. C'est par exemple le cas de trois virus modifiés pour exprimer le GM-CSF : l'HSV OncoVex (Talimogene laherparepvec), l'adénovirus CG0070 et le virus de la vaccine JX-594 (Tableau 6)(Senzer et al., 2009)(Heo et al., 2013)(Burke et al., 2012). Ces oncovirus modifiés sont tous en phase I à III et semblent donner des résultats prometteurs sur le mélanome, le carcinome hépatocellulaire et le cancer de la vessie, respectivement.

Virus family	Phase and type of clinical trial	Virus name	Genetic changes*	Route	Combination therapy	NCT number
<b>DNA viruses</b>						
 Herpesviridae	Phase III complete; melanoma, primary end point met	Talimogene laherparepvec	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Armed with GM-CSF</li> <li>• Tumour-specific replication: ICP34.5 deleted, US11 altered</li> <li>• Enabled antigen presentation: ICP47 deleted</li> </ul>	Intratumoural	None	<a href="#">NCT00769704</a>
 Adenoviridae	Phase II and III; bladder cancer	CG0070	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Armed with GM-CSF</li> <li>• Preferential replication in RB-deficient tumours</li> </ul>	Intravesicular	None	<a href="#">NCT01438112</a>
	Approved therapeutic (China); SCCHN	Oncorine (H101)	Preferential replication in tumours: E1B-55k deleted	Intratumoural	Cisplatin	<a href="#">PMID15601557</a>
 Poxviridae	Phase IIB; hepatocellular carcinoma	JX-594 (Pexa-Vec)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Armed with GM-CSF</li> <li>• Preferential replication in tumours: thymidine kinase deleted</li> </ul>	Intratumoural	None	<a href="#">NCT01387555</a> ; <a href="#">PMID23396206</a>
 Parvoviridae	Phase I and II; glioma	ParvOryx	None	Intravenous; intratumoural	None	<a href="#">NCT01301430</a>
<b>RNA viruses</b>						
 Paramyxoviridae	Phase I; myeloma	MV-NIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Armed with human NIS</li> <li>• Preferential replication in tumours (incompetent to block STAT1 and MDA5)</li> </ul>	Intravenous	Cyclophosphamide	<a href="#">NCT00450814</a>
 Picornaviridae	Phase I; glioma	PVS-RIPO	Translation controlled by the internal ribosome entry site of another virus	Intratumoural	None	<a href="#">NCT01491893</a>
 Rhabdoviridae	Phase I; hepatocellular carcinoma	VSV-hIFN $\beta$	Armed with human IFN $\beta$	Intratumoural	None	<a href="#">NCT01628640</a>
 Retroviridae	Phase I and II; glioma	Toca 511	Armed with cytosine deaminase	Intratumoural; intravenous; into resection cavity	5-fluorocytosine	<a href="#">NCT01156584</a> ; <a href="#">NCT01470794</a> ; <a href="#">NCT01985256</a>
 Reoviridae	Phase III; SCCHN	Reolysin	None	Intravenous	Carboplatin paclitaxel	<a href="#">NCT01166542</a>

GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; hIFN $\beta$ , human interferon- $\beta$ ; ICP, infected cell protein; MDA5, melanoma differentiation-associated protein 5; MV, measles virus; NCT, national clinical trial; NIS, sodium-iodide symporter; PVS, poliovirus Sabin; RB, retinoblastoma protein; RIPO, Rhinovirus-poliovirus hybrid; SCCHN, squamous cell carcinoma of the head and neck; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1; US, unique sequence; VSV, vesicular stomatitis virus. \*Changes can be in addition to intrinsic virus properties that favour oncolysis.

**Tableau 6 – Exemples sélectionnés d'essais cliniques en cours avec des virus de 9 familles différentes.**

Tiré de (Miest and Cattaneo, 2014).

## **B. Le CMV et le cancer**

L'impact de l'infection à CMV sur la transformation et la progression tumorale est encore aujourd'hui controversé. En effet, selon le type de cancer et/ou le modèle étudié, ce virus semble avoir soit des propriétés oncogéniques lui faisant jouer un rôle de facteur initiateur du cancer, des propriétés oncomodulatrices lui donnant un rôle dans la progression et non l'initiation tumorale ou, à l'opposé, des propriétés anti-tumorales.

### **1. Rôle pro-tumoral du CMV**

#### ***a) Présence du CMV dans de nombreux cancers humains et corrélations chez les patients***

De nombreuses observations réalisées chez l'homme montrent que le CMV est présent dans un grand nombre de cancers solides. L'ADN, les transcrits et/ou les protéines virales sont fréquemment détectés dans des polypes et adénocarcinomes colorectaux (Harkins et al., 2002), des tumeurs cérébrales dont différents types de gliomes et des astrocytomes (Cobbs et al., 2002)(Scheurer et al., 2008), des lésions préneoplasiques, néoplasiques et des carcinomes de la prostate (Samanta et al., 2003), les tissus néoplasiques des carcinomes mucoépidermoïdes (Melnick et al., 2012), les rhabdomyosarcomes qu'ils soient pléomorphiques, alvéolaires ou embryonnaires (Price et al., 2012) ou encore dans les épithélia néoplasiques de différents types de cancer du sein (Harkins et al., 2010)(Taher et al., 2013). Dans ce dernier type de cancer, la présence d'ADN viral est particulièrement associée au cancer du sein inflammatoire, qui est une forme agressive de ce cancer progressant rapidement (El-Shinawi et al., 2013). De plus, il est également détecté dans des métastases cérébrales de patients atteints de cancers du sein ou colorectaux ainsi que des métastases ganglionnaires de cancers du sein (Taher et al., 2014)(Taher et al., 2013). Dans toutes ces études, le CMV n'est généralement détecté que dans les cellules tumorales, les cellules non transformées ou stromales n'étant pas positives pour le CMV la plupart du temps ce qui a été expliqué par le fait que les tumeurs créent un microenvironnement favorable pour le virus et inversement (Cinatl et al., 2004).

Dans certaines études, des corrélations entre l'infection à CMV, la progression tumorale et la survie globale des patients ont été réalisées. De manière générale, le niveau d'infection a lui aussi une influence sur la survie des patients qu'ils aient un cancer primaire ou métastatique. Chez des individus transplantés rénaux, qui présentent un risque accru de développer des cancers, l'infection à CMV pré- ou post-transplantation augmente l'incidence des cancers, diminue le temps avant leur apparition et augmente le taux de mortalité due au cancer (Courivaud et al., 2012). Chez des individus non transplantés, quelques études suggèrent que l'intensité de l'infection est un facteur déterminant pour la survie à long terme. En effet, plus le nombre de cellules tumorales infectées est important et moins la médiane de survie globale des patients est élevée, comme montré dans les glioblastomes (Rahbar et al., 2012), ou encore dans le cancer colorectal (Chen et al., 2014). De même, un fort niveau d'infection (>50% de cellules positives pour des protéines virales) des métastases

cérébrales d'individus atteints de cancer du sein ou de cancer colorectal est corrélé à une médiane de survie globale moins importante après diagnostic des métastases, contrairement aux individus ayant un faible niveau d'infection (<50% de cellules positives)(Taher et al., 2014). L'ensemble de ces études suggèrent une association étroite entre le CMV et la progression tumorale.

### **b) Propriétés oncogéniques du virus**

Certaines études suggèrent un rôle oncogénique du CMV chez l'homme et la souris. La première étude publiée à ce sujet par Geder et collègues montre que l'infection de cellules embryonnaires pulmonaires humaines par le CMV induit la transformation d'une partie de ces cellules *in vitro*. Les cellules infectées transformées ont la capacité de former des tumeurs solides *in vivo* une fois implantées en sous-cutané sur des souris nude immunodéficientes (Geder et al., 1976), et ce malgré la diminution de l'expression des antigènes du CMV dans ces lignées cellulaires au cours du temps (Geder et al., 1978). De manière similaire, des cellules embryonnaires rénales de rat peuvent être transformées par le CMV humain et l'ADN viral est pratiquement absent des cellules transformées par l'infection (Doniger et al., 1999)(Shen et al., 1997). Différentes protéines du CMV semblent être impliquées dans l'effet oncogénique du virus parmi lesquelles se trouvent les protéines IE1 et IE2. En effet, la co-transfection de cellules embryonnaires de rein de rat avec des plasmides codant pour les protéines IE1 et IE2 induit la transformation des cellules. Les protéines IE1 et IE2 ont un effet mutagène et sont donc des éléments initiateurs de l'oncogenèse (Shen et al., 1997). Ces éléments suggèrent un effet oncogénique du CMV selon le modèle du « hit-and-run » où le virus jouerait uniquement un rôle de déclencheur (« hit ») après lequel il ne serait plus nécessaire ni détectable, et d'autres éléments favoriseraient ensuite la progression tumorale (« run »).

Bien que le concept du « hit-and-run » soit difficile à prouver et quelque peu discordant par rapport aux nombreuses études détectant le CMV dans les tumeurs, certaines études plus récentes soutiennent malgré tout l'idée que le CMV peut être un virus oncogénique. Par exemple dans le cas du carcinome mucoépidermoïde, le CMV humain active et accroît la voie de signalisation de la cyclooxygénase 2 (COX2), voie montrée comme induisant la transformation de cellules murines de glande salivaire par le MCMV *in vitro* (Melnick et al., 2012)(Melnick et al., 2011).

### **c) Propriétés oncomodulatrices du CMV**

La majorité des études réalisées à l'heure actuelle suggèrent que le CMV est un virus oncomodulateur n'initiant pas la transformation mais pouvant infecter les cellules tumorales et agir comme cofacteur favorisant la carcinogenèse, selon la définition proposée par Cinatl et collègues (Cinatl et al., 2004). Afin de mener son cycle de multiplication à terme, le CMV met en place de nombreux mécanismes visant à détourner la machinerie cellulaire pour produire en nombre des virions infectieux et à créer un environnement favorable à son développement. La plupart des mécanismes cellulaires activés/inhibés par le virus sont

régulés de manière comparable par les cellules tumorales et pourraient donc être renforcés par l'infection de ces cellules.

- Effets sur la cellule tumorale elle-même

Une fois qu'il a infecté une cellule, le CMV met en place de nombreux mécanismes pouvant amener la cellule à acquérir des caractéristiques tumorales :

- Le HCMV peut modifier le cycle cellulaire grâce à des protéines virales comme le récepteur à chimiokine US28 qui active indirectement la transition entre la phase G1 et la phase S via la cycline D1 (Gao et al., 1994)(Maussang et al., 2006), ou grâce à d'autres protéines qui vont bloquer les suppresseurs de tumeurs p53 et Rb comme IE1, pp71 ou la kinase UL97 (Cobbs et al., 2008)(Kalejta et al., 2003)(Hume et al. 2008). Le virus code aussi des protéines qui peuvent exacerber les voies de signalisation responsables de la prolifération des cellules épithéliales comme les voies Wnt, mitogen-activated protein kinase (MAPK) et phosphoinositide 3-kinase (PI3K) favorisant ainsi la transformation tumorale (Bongers et al., 2010)(Cobbs et al., 2008),
- Le HCMV peut exercer un effet anti-apoptotique dans les cellules tumorales grâce à différentes protéines virales qui vont empêcher l'activation ou le recrutement de molécules pro-apoptotiques comme la caspase-8 (Skaletskaya et al., 2001), ou encore Bax et Bak (Goldmacher et al., 1999). Le virus humain peut également activer des molécules anti-apoptotiques comme l'activating transcription factor 5 (ATF5) et B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) (Wang et al., 2014),
- Le HCMV peut favoriser l'invasion tumorale en favorisant l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium par la surexpression d'intégrines et l'activation de kinases liées aux intégrines comme la focal adhesion kinase (FAK) (Blaheta et al., 2006)(Cobbs et al., 2007)(Cobbs et al., 2014). Le HCMV favorise également la transmigration des cellules tumorales à travers l'endothélium par exemple en perturbant des molécules d'adhésion et favorise donc certainement l'établissement des métastases (Blaheta et al., 2004).

- Effets sur le microenvironnement tumoral

Le virus peut également exercer son rôle oncomodulateur de manière indirecte :

- Le HCMV peut stimuler la prolifération cellulaire en induisant la sécrétion de facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$  ou encore l'hépatocyte growth factor (HGF) par les cellules infectées comme par exemple les fibroblastes (Dumortier et al., 2008),
- Le HCMV favorise l'angiogenèse tumorale en produisant des facteurs pro-angiogéniques comme l'IL-8 (Dumortier et al., 2008)(Botto et al., 2011), ou des analogues de facteurs pro-angiogéniques comme le Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) (MacManiman et al., 2014)(Gerstel et al., 2011). Il peut aussi activer les voies de signalisation pro-angiogéniques des Mitogen-activated protein kinase (MAPK) et de la cyclooxygénase 2 (COX2) via le VEGF (Maussang et al., 2006)(Soroceanu et al., 2011)(Tsujii et al., 1998), et favoriser la migration/prolifération des cellules endothéliales

nécessaires à la formation des néo-vaisseaux (Reinhardt et al., 2005)(Kovacs et al., 1996)(Bentz et al., 2008).

- Effets sur l'immunité

En plus de cet effet pro-angiogénique, le CMV peut également créer un contexte globalement immunitaire favorable au développement tumoral. En effet, le HCMV induit une polarisation M1/M2 des macrophages particulière : les monocytes infectés se polarisent en macrophages M1 tout en présentant des caractéristiques de type M2 (Chan et al., 2008). L'acquisition des caractéristiques M1 va permettre la création d'un microenvironnement inflammatoire oncogénique via la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , qui ont toutes deux été reliées à la transformation tumorale (Grivennikov et al., 2010). L'induction simultanée d'une réponse de type M2 va permettre d'augmenter la production de VEGF, de TGF- $\beta$  et d'IL-10 (cellulaire ou virale) qui vont favoriser l'angiogenèse, le caractère invasif des tumeurs et limiter la réponse immunitaire (Kotenko et al., 2000)(Spencer et al., 2002)(Dziurzynski et al., 2011). Ce phénotype M2 a déjà été observé pour des macrophages infiltrant des glioblastomes (Wu et al., 2010). En plus de ces mécanismes, les cellules tumorales infectées par le CMV échappent de manière générale au système immunitaire grâce aux nombreux mécanismes mis en place à la fois par la cellule tumorale et par le virus pour contrôler l'activation des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (pour revue, voir (Lepiller et al., 2011)). Les mécanismes d'échappement liés au virus sont globalement les mêmes que ceux déjà développés dans la partie II de l'introduction et ne seront donc pas redécrits.

Ainsi, le CMV peut jouer un rôle particulièrement important dans les cancers en temps que facteur oncomodulateur capable d'agir sur de nombreux facteurs définis précédemment comme les « hallmarks » des cancers (Figure 20), par des mécanismes assez comparables aux autres virus oncogéniques (Figure 21).

La majorité des études citées ci-dessus ont été réalisées *in vitro* sur des cellules isolées. Seules quelques études réalisées *in vivo* renforcent l'idée que le CMV a un rôle pro-tumoral. La première montre que l'infection par le MCMV de souris Trp53<sup>+/-</sup> induit la formation de rhabdomyosarcomes pléiomorphiques détectables 9 mois post-infection. Ces souris sont connues pour développer tardivement (>9 mois) et de manière spontanée des tumeurs qui sont majoritairement de type lymphomes, ostéosarcomes et fibrosarcomes, le rhabdomyosarcome étant très rarement observé chez ces souris. De plus, la détection du virus dans les cellules musculaires de ces souris qui sont les cellules à l'origine du cancer, suggèrent un rôle direct du MCMV dans la transformation tumorale observée (Price et al., 2012). La seconde étude a été réalisée sur des souris transgéniques dont les cellules épithéliales intestinales expriment constitutivement la protéine virale US28. Ces souris développent spontanément des adénomes et des adénocarcinomes à partir de 40 semaines et lorsqu'elles sont traitées avec l'agent carcinogène azoxyméthane, elles développent un plus grand nombre de tumeurs que les souris WT ce qui suggère que la protéine virale US28, et donc le CMV, promeut le développement tumoral (Bongers et al., 2010). Du fait de ces

caractéristiques, le virus pourrait être considéré comme un virus oncogénique et/ou oncomodulateur.

## **2. Rôle anti-tumoral du CMV**

De manière assez contre-intuitive au vue de la littérature croissante décrivant un effet pro-tumoral de l'infection à CMV, ce virus peut également avoir un rôle inhibiteur sur le développement de certains types de tumeur. Cet effet anti-tumoral est particulièrement important contre les rechutes de cancers d'origine hématologique après greffe de moëlle osseuse, comme la leucémie myéloïde aiguë (LMA). En effet, les patients atteints de leucémie et ayant reçu une greffe de moëlle osseuse montrent une probabilité de rechute plus importante en absence d'infection à CMV, alors que les individus infectés et ayant une réplication virale précoce ont un risque de rechute moindre (Lönnqvist et al., 1986)(Elmaagacli et al., 2011)(Green et al., 2013)(Mariotti et al., 2014). La réplication virale est le seul facteur pronostique significatif d'un risque réduit de rechute, suggérant que le virus est directement responsable de cette diminution par un effet qualifié de « virus-versus-leukemia ». Par contre, aucune association n'a été trouvée chez les individus receveurs d'une greffe de moëlle à visée thérapeutique pour les leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) ou les lymphomes (Green et al., 2013)(Mariotti et al., 2014). Concernant les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), deux résultats différents ont été trouvés : l'étude de Green et collègues ne montre aucun rôle du CMV sur le risque de rechute sur 646 patients alors qu'une autre étude menée sur 110 patients montre une diminution de l'incidence de rechute des LMC chez les patients ayant réactivé le CMV (Ito et al., 2013). Dans une étude récente réalisée sur des patients atteints de LMA, il a été montré que les méthodes de conditionnement des patients avant la greffe (traitement myéloablatif ou conditionnement d'intensité réduite) influencent le risque de rechute (Manjappa et al., 2014). Seuls les patients ayant reçu un traitement myéloablatif et réactivant le CMV ont un risque réduit de rechute, le CMV n'ayant aucun impact sur le risque de rechute des patients ayant eu un conditionnement d'intensité réduite. L'influence du conditionnement des patients pourrait potentiellement s'appliquer aux patients atteints de LMC et de ce fait expliquer les résultats divergents obtenus dans les différentes études. Il semble donc que l'intensité de l'immunosuppression est un facteur majeur influençant, de manière positive ou négative selon le traitement, l'effet anti-tumoral du CMV dans les LMA et LMC.

Il semblerait que l'effet anti-tumoral observé ne soit pas uniquement dû au CMV mais serait également dépendant d'une réaction chronique du greffon contre l'hôte ou graft-versus-host disease (GVHD) déclenchée suite à la réplication du virus. En effet, les patients atteints de LMA ayant à la fois une réactivation précoce du virus et une GVHD chronique ont une incidence cumulative de rechute à 5 ans nettement plus faible (4%) que les individus n'ayant ni réplication virale ni GVHD chronique (42%), une réplication virale sans GVHD chronique (39%), une GVHD chronique sans réplication virale (37%) (Jang et al., 2015). De plus, les patients ayant une réactivation du CMV et une GVHD ont des taux de survie globale et de survie sans leucémie significativement plus importants (83 et 87%) que

les patients des autres groupes (environ 26 et 28%). Ces observations peuvent être dues à deux mécanismes : (i) le CMV et la GVHD peuvent être deux éléments complètement indépendants et dont le déclenchement quasi simultané pourrait aboutir à un effet cumulatif anti-tumoral expliquant la meilleure survie des patients CMV<sup>+</sup>/GVHD<sup>+</sup>, et (ii) la réplication précoce du CMV serait responsable du déclenchement d'une réponse du greffon contre la leucémie (GVL).

La première hypothèse est soutenue par différentes études réalisées dans des modèles murins. Une de ces études montre que l'induction d'une GVHD post-transplantation de moelle osseuse allogénique est associée à une activation des lymphocytes T  $\alpha\beta$ , particulièrement les CD8<sup>+</sup>, qui vont éliminer efficacement les cellules leucémiques (Cohen et al., 1993)(Weiss et al., 1999). Dans un autre modèle, l'induction d'une réponse allogénique médiée par les cellules NK augmente la survie sans rechute des souris greffées, montrant que ces cellules comme les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> peuvent être responsables d'un effet GVL (Morecki et al., 2004). Il semble en être de même chez l'homme où les cellules NK, qui font partie des premières cellules régénérées suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (Storek et al., 2001), sont des médiateurs particulièrement importants de l'effet GVL observé chez des individus greffés atteints de LMA (Ruggeri et al., 2002)(Ruggeri et al., 2008). Bien que l'effet GVL permette à l'hôte de contrôler son cancer, il a en même temps un effet néfaste en aggravant la GVHD qui aboutit à la mort des souris (Morecki et al., 2004).

La seconde hypothèse est basée sur l'observation que chez des patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques, la réactivation du CMV induit une forte augmentation en nombre de cellules NK mémoires. Ces cellules induites par le virus produisent de grandes quantités d'IFN $\gamma$  et présentent un phénotype NKG2C<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, phénotype associé aux cellules NK amplifiées spécifiquement par le CMV (Foley et al., 2012)(Lopez-Vergès et al., 2011). Ces différents éléments supportent l'idée que les NK mémoires induits par la réactivation du CMV apportent certainement leur contribution à l'effet protecteur anti-leucémique observé post-transplantation. Il a été suggéré que les cellules leucémiques myéloïdes puissent être, comme les cellules myéloïdes non transformées, un réservoir pour le CMV et ainsi supporter la réactivation du virus (Elmaagacli et al., 2011)(Barrett, 2011). Cette réactivation au sein des cellules tumorales pourrait rendre ces dernières plus immunogènes et en ferait ainsi des cibles des lymphocytes T et/ou des cellules NK spécifiques du CMV (Ruggeri et al., 2008)(Foley et al., 2012). Il est également envisageable que la GVL allogénique et la « GVL » induite par l'infection à CMV puissent avoir un effet synergique chez des individus séropositifs ou recevant une greffe CMV<sup>+</sup>. Cette synergie expliquerai pourquoi dans l'étude de Jang et collègues, seuls les patients ayant à la fois réactivés le CMV et déclenché une GHVD seraient mieux protégés à long terme.

## **C. Infection à CMV et transformation tumorale : deux situations de stress reconnues par les lymphocytes T $\gamma\delta$**

### **1. Reconnaissance croisée de cellules infectées par le CMV et de cellules tumorales *in vitro***

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'infection à CMV induit une forte expansion et une activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> dans le compartiment sanguin d'individus immunosupprimés ou d'individus sains (Déchanet et al., 1999a)(Déchanet et al., 1999b)(Pitard et al., 2008). De manière intéressante, les résultats de l'équipe montrent une activation de ces lymphocytes au contact de cellules cibles infectées par le HCMV mais également au contact de cellules tumorales *in vitro*. En effet, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> isolés de patients infectés par le CMV et ayant eu une transplantation d'organe solide co-cultivés avec des lignées cellulaires de carcinomes (colique, cutané, cervical) non infectées induit leur activation et aboutit à la production de cytokines comme l'IFN $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$  et/ou à une dégranulation et une lyse des cellules tumorales (Halary et al., 2005)(Couzi et al., 2010)(Willcox et al., 2012). De manière comparable, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> TEMRA amplifiés par, et reconnaissant le CMV chez patients atteints de LMA et ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques s'activent au contact de cellules infectées par le CMV et de cellules de cancers hématologiques (dont des cellules primaires de LMA) et produisent de l'IFN $\gamma$  (Scheper et al., 2013). Dans ces différentes études, les cellules tumorales non infectées sont globalement aussi bien reconnues que les cellules infectées par le CMV. Ces reconnaissances sont toutes médiées par la liaison du TCR  $\gamma\delta$  avec des antigènes du soi comme il a été montré pour l'EPCR, et nécessitent pour certains clones des molécules de costimulation comme ICAM-1 ou le CD8 $\alpha$  (Halary et al., 2005)(Willcox et al., 2012)(Scheper et al., 2013). Ainsi, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> sélectionnés par le CMV possèdent une réactivité croisée leur permettant de reconnaître de manière TCR-dépendante, des cellules infectées par le CMV et des cellules tumorales de différentes origines.

### **2. Impact de cette reconnaissance croisée *in vivo***

Cette réactivité croisée a été mise à l'épreuve dans un modèle de xéno greffe de cellules tumorales humaines implantées dans des souris immunodéficientes *NOD-scid gamma* (NSG). La co-injection en sous-cutané de cellules HT29 d'adénocarcinome colique humain et de clones T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> possédant la double réactivité CMV/cancer, retarde le développement des tumeurs en comparaison au groupe de souris contrôles n'ayant pas reçu de lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Devaud et al., 2009). Dans un autre scénario, la croissance d'une tumeur primaire HT29 implantée en orthotopique (intracaecal) à des souris NOD-scid gamma (NSG) est diminuée par le transfert d'un clone T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> isolé d'un individu séropositif pour le CMV. De plus, l'apparition des métastases est clairement retardée en présence de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans ce modèle (Devaud et al., 2013). Chez l'homme, l'amplification des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> post-infection à CMV est associée à un moindre risque de cancer (majoritairement cutanés) chez les patients transplantés rénaux (Couzi et

al., 2010), et à un moindre risque de rechute des LMA chez les patients ayant reçu une greffe de cellules souches allogéniques à visée thérapeutique (Scheper et al., 2013). L'ensemble de ces éléments suggère donc que, même en absence de GVHD, l'infection à CMV sélectionne et amplifie des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> possédant à la fois une fonction anti-virale et une fonction anti-tumorale et que ces deux situations pathologiques induisent l'expression d'antigènes communs de « stress » aboutissant à un effet anti-tumoral.

# RÉSULTATS

## I. **Projet n°1 – Étude du potentiel anti-viral des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le modèle murin d'infection à MCMV**

### A. **Contexte de travail et problématique**

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale, un certain nombre d'études dont des études réalisées au laboratoire montrent que les lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\delta 2^{\text{neg}}$  humains sont mobilisés et activés au cours de l'infection et/ou de la réactivation du CMV (Déchanet et al., 1999b)(Pitard et al., 2008). Il est intéressant de noter que la réponse des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\delta 2^{\text{neg}}$  induite par le CMV a également été observée chez des individus immunodéficients comme des enfants présentant des déficits immunitaires combinés sévères (SCID) en lymphocytes T  $\alpha\beta$  et en lymphocytes B (Ehl et al., 2005)(de Villartay et al., 2005). Bien que cette réponse anti-virale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains soit maintenant clairement démontrée, certaines questions restent sans réponse chez l'homme où le seul compartiment pouvant être analysé sans nécessiter un acte trop invasif est le sang : quel est ou quels sont les sites d'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\delta 2^{\text{neg}}$  dans l'organisme ? Ces cellules étant majoritairement situées dans les épithélia et les muqueuses, il est plus que probable que leur activation se fasse dans un ou plusieurs tissus. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont-ils un effet protecteur anti-viral ? Le CMV étant spécifique d'espèce, il est nécessaire de développer des modèles d'études mimant de manière suffisamment proche la pathologie et la réponse immunitaire du HCMV afin de pouvoir apporter des réponses et ainsi mieux comprendre les facteurs activant les lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans ce contexte infectieux.

Comme nous l'avons discuté précédemment, le modèle murin d'infection à MCMV semble être un bon modèle d'étude possédant des nombreuses similitudes avec l'infection par le HCMV, que ce soit au niveau des pathologies associées à l'infection ou au niveau de la réponse immunitaire mobilisée. Au démarrage de ce projet, seules deux études impliquaient les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins dans la réponse immunitaire dirigée contre le virus. L'étude réalisée par Cavanaugh et collègues sur des souris BALB/c montre que le nombre et la proportion de lymphocytes T  $\gamma\delta$  augmentent dans les glandes salivaires des souris infectées en i.p. depuis 14 jours par rapport aux souris naïves contrôles (Cavanaugh et al., 2003). Cette expansion laisse transparaître une activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  au cours de l'infection à MCMV, mais aucun mécanisme n'est proposé dans cette étude. La seconde étude, menée sur des souris C57BL/6 infectées en i.p., montre elle aussi une mobilisation en nombre et une activation précoce des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans le foie et la cavité péritonéale, débutant dès le 3<sup>ème</sup> jour d'infection et atteignant son maximum à jour 5 (Ninomiya et al., 2001). Cette expansion concerne majoritairement la sous-population T  $V\gamma 1^+$ , bien que des lymphocytes T  $V\gamma 4^+$  soient également détectés par PCR dans le foie des souris infectées. Il est suggéré que l'activité anti-virale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  passe par la production d'IFN $\gamma$  qui agirait sur la réplication du virus, puisque le traitement des souris par un anticorps anti-TCR $\gamma\delta$  aboutit à une diminution de la quantité d'IFN $\gamma$  détectée par ELISA dans le foie total et à une augmentation de la charge virale. Cependant, il a été montré par la suite que l'anticorps utilisé n'est pas déplétant et rend uniquement les lymphocytes T  $\gamma\delta$  « invisibles » (Koenecke

et al., 2009), et aucune preuve directe de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  n'a été apportée. Ces études semblent montrer que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins sont mobilisés contre le MCMV, de manière comparable à leurs homologues humains vis-à-vis du HCMV. Cependant, elles ne permettent pas d'affirmer que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont un rôle anti-viral protecteur, ni de conclure clairement sur la place et l'importance de ces cellules au sein de la réponse immunitaire dirigée contre le MCMV.

Au vu de ces éléments, l'objectif principal de cette étude a été de déterminer si les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins ont un rôle protecteur contre le MCMV et, si oui, comment ces cellules sont capables de protéger les souris infectées. Afin de tester l'importance de chaque sous-population lymphocytaire T ( $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ ) dans la réponse anti-CMV, nous avons réalisé notre étude sur des lignées de souris de fond génétique C57BL/6 déficientes en lymphocytes T  $\alpha\beta$  (TCR $\alpha^{-/-}$ ), en lymphocytes T  $\gamma\delta$  (TCR $\delta^{-/-}$ ) ou déficientes pour ces deux sous-populations lymphocytaires (CD3 $\epsilon^{-/-}$ ). L'infection de ces lignées murines en i.p. par la souche Smith du MCMV nous a permis d'évaluer l'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans la protection et le contrôle de la charge virale, et d'étudier l'évolution du compartiment T  $\gamma\delta$  au cours de la phase aiguë d'infection.

*Ce projet fait l'objet d'un article qui a été accepté pour publication dans le journal PLoS Pathogens très récemment.*

Une étude publiée très récemment dans le journal PLoS Pathogens montre des résultats globalement similaires aux nôtres, bien que le modèle utilisé soit différent et basé sur l'étude des souris JHT (Annexe 1)(Sell et al., 2015). Ces souris sont déficientes en lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8 $^{+}$  et en lymphocytes B, et l'utilisation d'un virus MCMV déficient pour la protéine m157 (MCMV-m157), qui n'active pas la réponse cellulaire NK (voir introduction p. 56), a permis aux auteurs de cet article d'étudier la réponse T  $\gamma\delta$  dans un contexte d'immunodéficiência importante. Dans la partie « Discussion » de ce travail, nous avons donc pris le parti de discuter nos résultats par rapport à cette étude.

RESEARCH ARTICLE

# $\gamma\delta$ T Cells Confer Protection against Murine Cytomegalovirus (MCMV)

Camille Khairallah<sup>1,2</sup>\*, Sonia Netzer<sup>1,2</sup>\*, Arnaud Villacreces<sup>1,2</sup>, Marina Juzan<sup>1,2</sup>, Benoît Rousseau<sup>1,3</sup>, Sara Dulanto<sup>4</sup>, Alban Giese<sup>1,5</sup>, Pierre Costet<sup>1,6</sup>, Vincent Praloran<sup>1,2,7</sup>, Jean-François Moreau<sup>1,2,8</sup>, Pierre Dubus<sup>1,5</sup>, David Vermijlen<sup>4,9</sup>, Julie Déchanet-Merville<sup>1,2</sup>\*<sup>‡</sup>, Myriam Capone<sup>1,2</sup>\*<sup>‡</sup>

**1** Université de Bordeaux, Bordeaux, France, **2** CNRS, UMR 5164, Bordeaux, France, **3** Laboratoire d'Immunologie et d'Immunogénétique, Animalerie A2, Bordeaux, France, **4** Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium, **5** EA2406 Histologie et pathologie moléculaire des tumeurs, Bordeaux, France, **6** Animalerie spécialisée, Bordeaux, France, **7** Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Bordeaux, France, **8** Centre Hospitalo-Universitaire, Bordeaux, France, **9** Institute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium

<sup>‡</sup> These authors contributed equally to this work.

\* [julie.dechanet@u-bordeaux2.fr](mailto:julie.dechanet@u-bordeaux2.fr) (JDM); [myriam.capone@u-bordeaux2.fr](mailto:myriam.capone@u-bordeaux2.fr) (MC)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Khairallah C, Netzer S, Villacreces A, Juzan M, Rousseau B, Dulanto S, et al. (2015)  $\gamma\delta$  T Cells Confer Protection against Murine Cytomegalovirus (MCMV). PLoS Pathog 11(3): e1004702. doi:10.1371/journal.ppat.1004702

**Editor:** Stephen C Jameson, University of Minnesota Medical School, UNITED STATES

**Received:** January 16, 2014

**Accepted:** January 24, 2015

**Published:** March 6, 2015

**Copyright:** © 2015 Khairallah et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Fondation pour la Recherche Médicale [DEQ20110421287], the Agence National de la Recherche [ANR-12-BSV3-0024-02], the Ligue Nationale contre le Cancer (Comités Départementaux d'Aquitaine) and the Association pour la Recherche contre le Cancer [A09/1/5022]. Camille Khairallah is supported by the Conseil Régional d'Aquitaine. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Cytomegalovirus (CMV) is a leading infectious cause of morbidity in immune-compromised patients.  $\gamma\delta$  T cells have been involved in the response to CMV but their role in protection has not been firmly established and their dependency on other lymphocytes has not been addressed. Using C57BL/6  $\alpha\beta$  and/or  $\gamma\delta$  T cell-deficient mice, we here show that  $\gamma\delta$  T cells are as competent as  $\alpha\beta$  T cells to protect mice from CMV-induced death.  $\gamma\delta$  T cell-mediated protection involved control of viral load and prevented organ damage.  $\gamma\delta$  T cell recovery by bone marrow transplant or adoptive transfer experiments rescued CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice from CMV-induced death confirming the protective antiviral role of  $\gamma\delta$  T cells. As observed in humans, different  $\gamma\delta$  T cell subsets were induced upon CMV challenge, which differentiated into effector memory cells. This response was observed in the liver and lungs and implicated both CD27<sup>+</sup> and CD27<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T cells. NK cells were the largely preponderant producers of IFN $\gamma$  and cytotoxic granules throughout the infection, suggesting that the protective role of  $\gamma\delta$  T cells did not principally rely on either of these two functions. Finally,  $\gamma\delta$  T cells were strikingly sufficient to fully protect Rag<sup>-/-</sup>  $\gamma\delta$  mice from death, demonstrating that they can act in the absence of B and NK cells. Altogether our results uncover an autonomous protective antiviral function of  $\gamma\delta$  T cells, and open new perspectives for the characterization of a non classical mode of action which should foster the design of new  $\gamma\delta$  T cell based therapies, especially useful in  $\alpha\beta$  T cell compromised patients.

## Author Summary

$\gamma\delta$  T cells are unconventional T lymphocytes that play a unique role in host protection against pathogens. Human Cytomegalovirus (HCMV) is a widespread virus that can cause severe organ disease such as hepatitis and pneumonitis in immune-compromised patients.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

Our decade-long study conveys compelling evidence for the implication of human  $\gamma\delta$  T cells in the immune response against HCMV, but their protective role could not be formally demonstrated in humans. In the present study we use the murine model of CMV infection which allows the spatial and temporal analysis of viral spread and anti-viral immune responses. We show that, in the absence of  $\alpha\beta$  T cells,  $\gamma\delta$  T cells control MCMV-induced hepatitis, pneumonitis and death by restricting viral load in the liver, lungs and spleen.  $\gamma\delta$  T cells expand in these organs and display memory features that could be further incorporated into vaccination strategies. In conclusion,  $\gamma\delta$  T cells represent an important arm in the immune response against CMV infection that could be particularly important in the context of  $\alpha\beta$  T cell immune-suppression.

## Introduction

Human CMV (HCMV) is a universally distributed pathogen that infects 50–90% of the world's population. Asymptomatic in healthy people, HCMV infection may lead to increased morbidity and mortality in immunocompromised individuals. Overall survival following transplantation is decreased when either the donor or the recipient is HCMV-seropositive [1,2,3]. Because of drug-related adverse effects and drug resistance there is growing interest for immunotherapy as an adjunct to antiviral therapy. Understanding the mechanisms developed by the immune system to control HCMV is therefore critical to enable the design of new curative or pre-emptive protocols aimed at enhancing patient immune defense against this virus.

Effective immune control of HCMV has been compellingly shown to rely on both conventional lymphocytes and NK cells [4]. However, as we initially reported, HCMV also induces a robust  $\gamma\delta$  T cell response in organ transplant recipients [5]; and later,  $\gamma\delta$  T cell response to HCMV was extended to several other situations not always associated to immunosuppression; such as immunodeficiencies, bone marrow transplantation, pregnancy, elderly and also in healthy individuals [6,7,8,9,10,11,12]. HCMV-mediated persistent expansion of  $\gamma\delta$  T cells in transplant recipients is associated with infection resolution [13], and implies tissue-associated V $\delta$ 2-negative  $\gamma\delta$  T cells which acquire a terminally differentiated phenotype upon HCMV pressure [10,14]. When isolated *in vitro*, these lymphocytes were shown to kill HCMV-infected cells, limit virus propagation and produce IFN $\gamma$  through recognition of opsonized viruses [15,16].

Several features of  $\gamma\delta$  T cells might explain their specific relationship to HCMV: (i) they are not MHC restricted, and thus not affected by HCMV strategies to inhibit HLA molecules, (ii) they recognize self-antigens on the surface of stressed cells such as virus infected cells [17,18] and (iii) they are located at external body surfaces (eg gut and lung) and organs (eg liver) involved in HCMV transmission and replication [19]. Moreover, HCMV-reactive  $\gamma\delta$  T cells exhibit dual reactivity against tumor cells, due to the recognition of stress-induced self-antigens shared by HCMV-infected and tumor cells [15,18,20]. In agreement with this, HCMV-infection and/or  $\gamma\delta$  T cell expansion have been associated with reduced cancer risk in kidney transplant recipients [21] and with graft-versus leukemia effect in bone marrow transplant recipients [22,23,24].

All these specificities are consistent with an antiviral protective role of  $\gamma\delta$  T cells against HCMV and they thus represent valuable candidates for anti-HCMV immunotherapy especially in immunocompromised patients vulnerable to neoplasia. However, their role in protection and specific contribution within the global anti-CMV immune response has not been firmly established, nor their anatomical sites of activation and intervention. The aim of the present

study was therefore to take advantage of the murine model of CMV infection to address these questions and to assess the respective ability of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells alone to protect mice from CMV infection. Murine CMV (MCMV) has been widely used to model the immune response to HCMV in mice since it reproduces with reasonable accuracy the antiviral response of CD8 T cells and NK cells [25]. Murine  $\gamma\delta$  T cells have been implicated in MCMV infection only once [26], and their sufficiency for protection has not yet been addressed. We show herein that  $\gamma\delta$  T cells are as competent as  $\alpha\beta$  T cells to control MCMV infection and protect mice from death encouraging the development of novel anti-viral immunotherapeutic protocols based on  $\gamma\delta$  T cell manipulation.

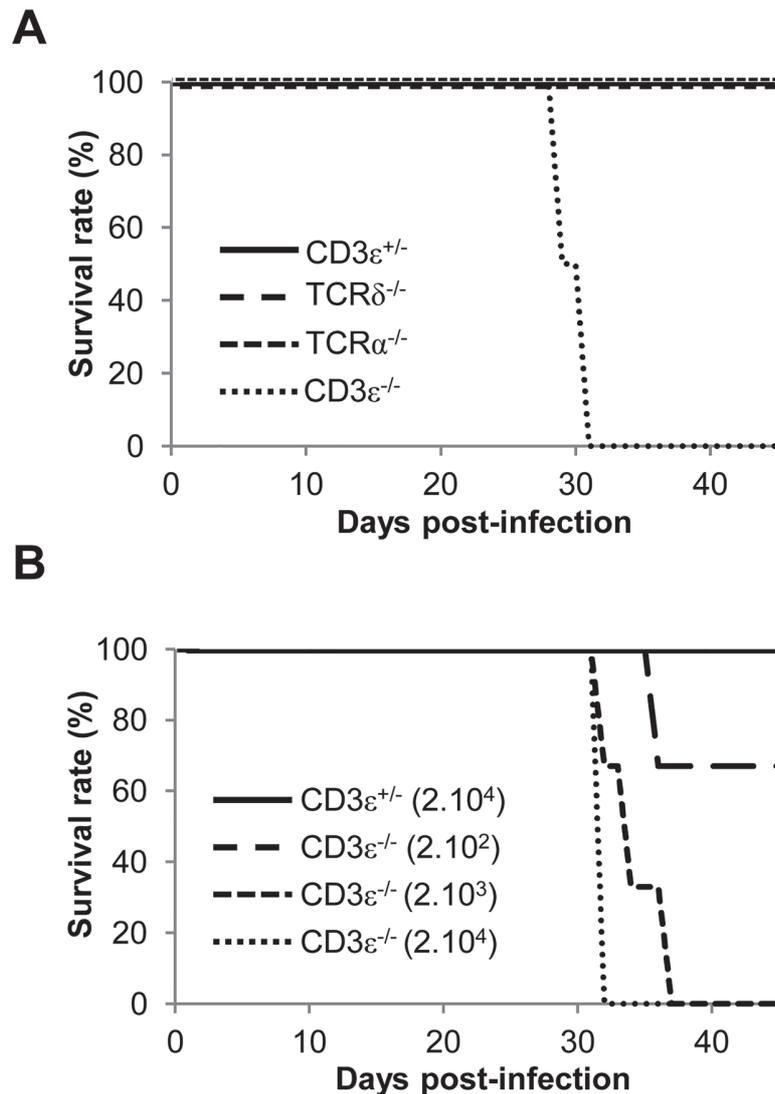
## Results

### $\gamma\delta$ T cells are as efficient as $\alpha\beta$ T cells to protect mice from MCMV-induced death

In mice, MCMV-specific  $\alpha\beta$  T cells control viral spread and protect infected mice from death [27] but little is known regarding the implication of  $\gamma\delta$  T cells. To evaluate the respective contribution of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells to the immune response against MCMV, mice deficient for  $\gamma\delta$  T cells ( $\text{TCR}\delta^{-/-}$ ), for  $\alpha\beta$  T cells ( $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ ) or for both T cell subsets ( $\text{CD}3\epsilon^{-/-}$ ) were challenged with  $10^5$  plaque forming units (PFU) of salivary gland MCMV. This dose was reported to be sublethal for C57BL/6 mice (as described at [http://mutagenetix.utsouthwestern.edu/protocol/protocol\\_rec.cfm?protocolid=5](http://mutagenetix.utsouthwestern.edu/protocol/protocol_rec.cfm?protocolid=5)). Accordingly, 100% of  $\text{CD}3\epsilon^{+/+}$  control mice survived MCMV infection, whereas  $\text{CD}3\epsilon^{-/-}$  died about 4 weeks after viral challenge (Fig. 1A), confirming the critical role of T cells in controlling MCMV infection.  $\text{CD}3\epsilon^{-/-}$  mice were extremely sensitive to MCMV despite the presence of NK cells [28] since they died at doses of MCMV as low as  $2.10^3$  PFU (Fig. 1B). Unexpectedly, both  $\text{TCR}\delta^{-/-}$  and  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  mice survived as long as  $\text{CD}3\epsilon^{+/+}$  control mice. These results reveal that the presence of either  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  T cell subset was sufficient to protect mice from MCMV infection, disclosing the potentially critical function of  $\gamma\delta$  T cells in the immune response against MCMV.

### $\gamma\delta$ T cells control viral loads in organs

To examine whether this protection against CMV by  $\gamma\delta$  T cells relies on the control of viral loads, the kinetics of MCMV spread in T cell deficient versus T cell competent mice was determined in various organs. Comparison between each mouse line is shown in Fig. 2 and comparison between different time points is shown in S1 Fig. In the absence of T cells, MCMV DNA copy numbers increased substantially from day 3 to 24, with up to  $10^7$  copies (/100ng DNA) in the spleen and lungs of  $\text{CD}3\epsilon^{-/-}$  mice before death. Interestingly,  $\gamma\delta$  T cells alone (in  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  mice) were sufficient to prevent an increase of viral load in all organs, except the salivary glands which are known to support prolonged virus replication even in wild-type mice (S1 Fig.). At the end of these experiments, MCMV copies were much lower in T cell bearing mice than in mice without T cells (Fig. 2), underlining the inability of C57BL/6 mice to control MCMV infection in the absence of T cells. It was of particular interest to see that in the lungs  $\gamma\delta$  T cells were as potent as  $\alpha\beta$  T cells to control the viral load except at day 14. As a whole, these results suggest independent control of MCMV spread by the  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell subsets, revealing that  $\gamma\delta$  T cells are sufficient to control viral load and can substitute for the absence of  $\alpha\beta$  T cells.

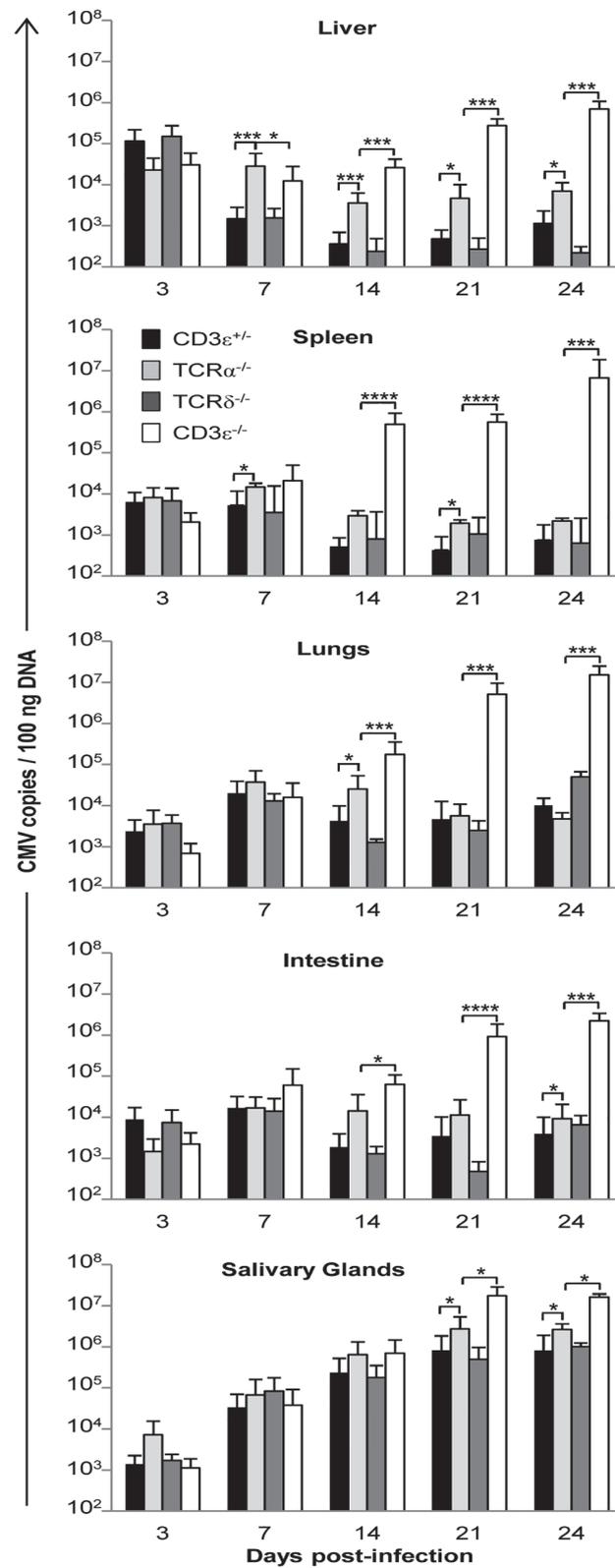


**Fig 1.  $\gamma\delta$  T cells prevent mice from MCMV-induced mortality.** **A.** TCR $\delta^{-/-}$ , TCR $\alpha^{-/-}$  CD3 $\epsilon^{+/-}$  and CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (10 of each) were infected i.p. with  $1.10^5$  PFU of MCMV at day 0 and monitored every other day for mortality. Data are from one representative of 3 independent experiments. **B.** CD3 $\epsilon^{+/-}$  and CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (4 of each) were infected i.p. with indicated doses of MCMV at day 0 and monitored every day for mortality. Data are from one experiment.

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g001

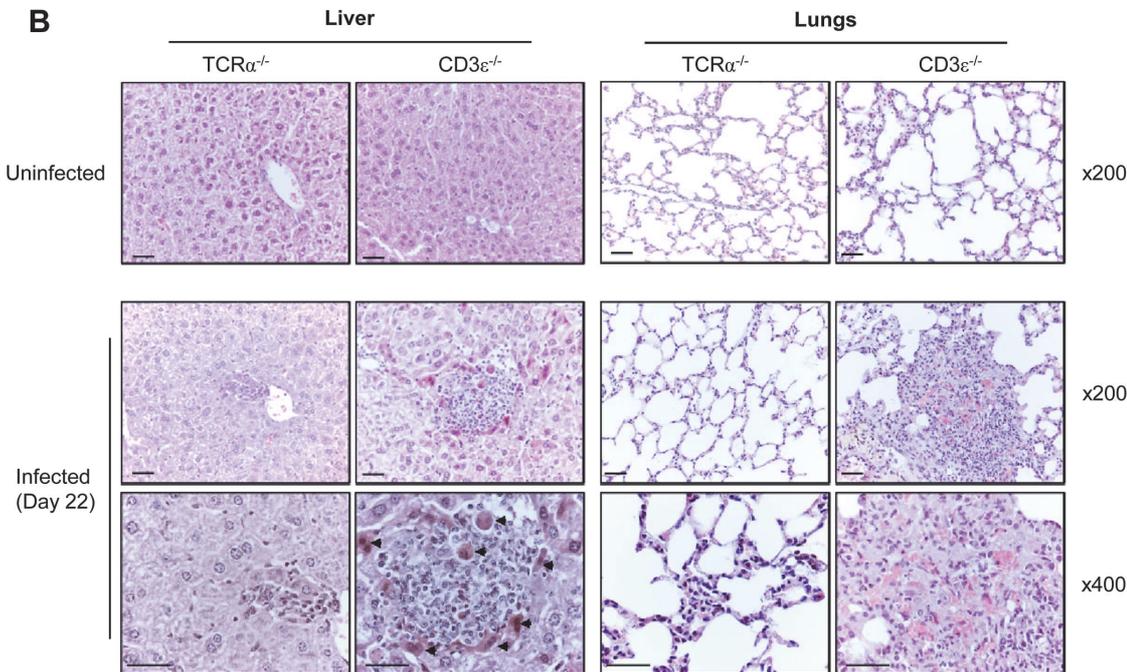
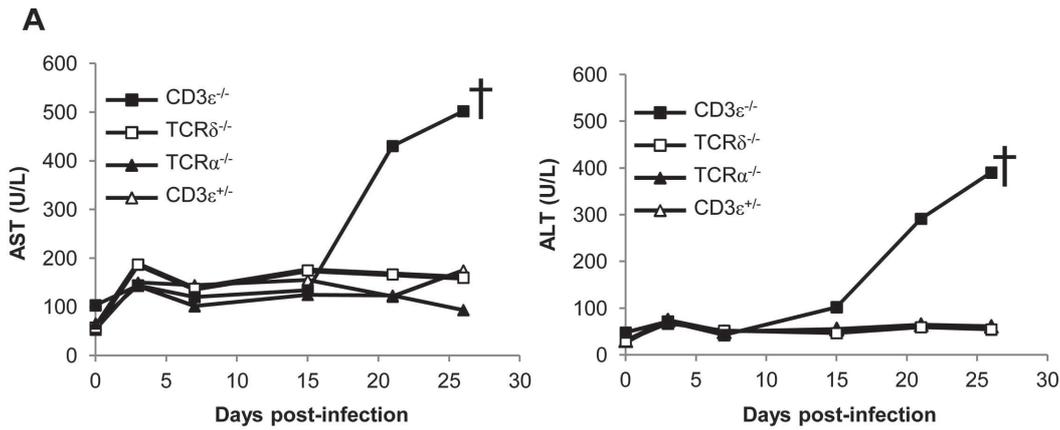
### $\gamma\delta$ T cell-dependent control of viral load associates with reduced organ damage

Hepatitis and pneumonitis are common features of CMV pathogenesis in both humans and mice. Hepatitis can be assessed in living infected mice through the quantification of transaminase levels in the serum. As shown in Fig. 3A, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) only increased in the absence of all T cells (CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice), reaching up to 8 fold the basal level before death of CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice. Accordingly, histological analysis of livers from CD3 $\epsilon^{-/-}$  infected mice before death (day 22) showed typical features of active hepatitis, with many large granulomas mainly composed of histiocytic cells associated with multiple



**Fig 2. MCMV dissemination in lungs, spleen, liver, intestine and salivary glands from T cell competent and T cell deficient mice.**  $TCR\delta^{-/-}$ ,  $TCR\alpha^{-/-}$ ,  $CD3\epsilon^{+/+}$ , and  $CD3\epsilon^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2 \cdot 10^3$  PFU of MCMV. At indicated days post-infection, 4 mice of each mouse line were dissected and MCMV gB was quantified in organs by real time PCR. The experiment was repeated 3 times under similar conditions. Histograms represent means of MCMV DNA copy number (per 100 ng genomic DNA)  $\pm$  SD of all mice from the three experiments ( $n = 4 \times 3$  mice). Statistical differences between viral loads in  $TCR\alpha^{-/-}$  versus  $CD3\epsilon^{+/+}$  mice, and in  $TCR\alpha^{-/-}$  versus  $CD3\epsilon^{-/-}$  mice are shown.

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g002



**Fig 3.  $\gamma\delta$  T cell control of MCMV infection is associated with reduced organ damage.** **A.**  $TCR\delta^{-/-}$ ,  $TCR\alpha^{-/-}$ ,  $CD3\epsilon^{+/+}$  and  $CD3\epsilon^{-/-}$  mice were infected i.p. as indicated in Fig. 1A. 3 mice/group were bled at days 0, 3, 7, 15, 21 and just before death for biochemical analyses of AST and ALT in serums. The experiment was repeated twice and data obtained for one representative mouse/group are shown. † death of  $CD3\epsilon^{-/-}$ . **B.**  $TCR\alpha^{-/-}$  and  $CD3\epsilon^{-/-}$  mice were uninfected, or i.p. infected with  $2 \cdot 10^3$  pfu of MCMV. Uninfected and Day 22-infected mice were sacrificed and the liver and lungs were embedded in paraffin for HES staining. Apoptotic hepatocytes are shown (arrowheads). Scale bar = 200  $\mu$ m. Magnifications are indicated in the right-hand side of the figure. The data are from one representative of 3 mice for each condition.

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g003

apoptotic hepatocytes (Fig. 3B). In contrast, only a few small granulomas were observed in  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  mice livers at that time point. Furthermore,  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  mice presented an active pneumopathy with large granulomas and hemorrhagic foci at day 22, while  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  lung histology was close to normal with only a slight increase of inflammatory cells in the inter-alveolar septa (Fig. 3B). In conclusion,  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  mice showed clear evidences of both liver and lung diseases 3 weeks post MCMV infection, in agreement with the high viral loads found at that time in these organs. In contrast, liver and lung disorders were not observed in  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  mice, emphasizing the ability of  $\gamma\delta$  T cells to control MCMV infection and associated organ disease. Whether  $\gamma\delta$  T cells limit organ disease only as a consequence of viral replication control or also by producing mediators of tissue repair deserves further attention.

### Expansion of $\gamma\delta$ T cells in the liver and lungs of MCMV-infected $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ mice

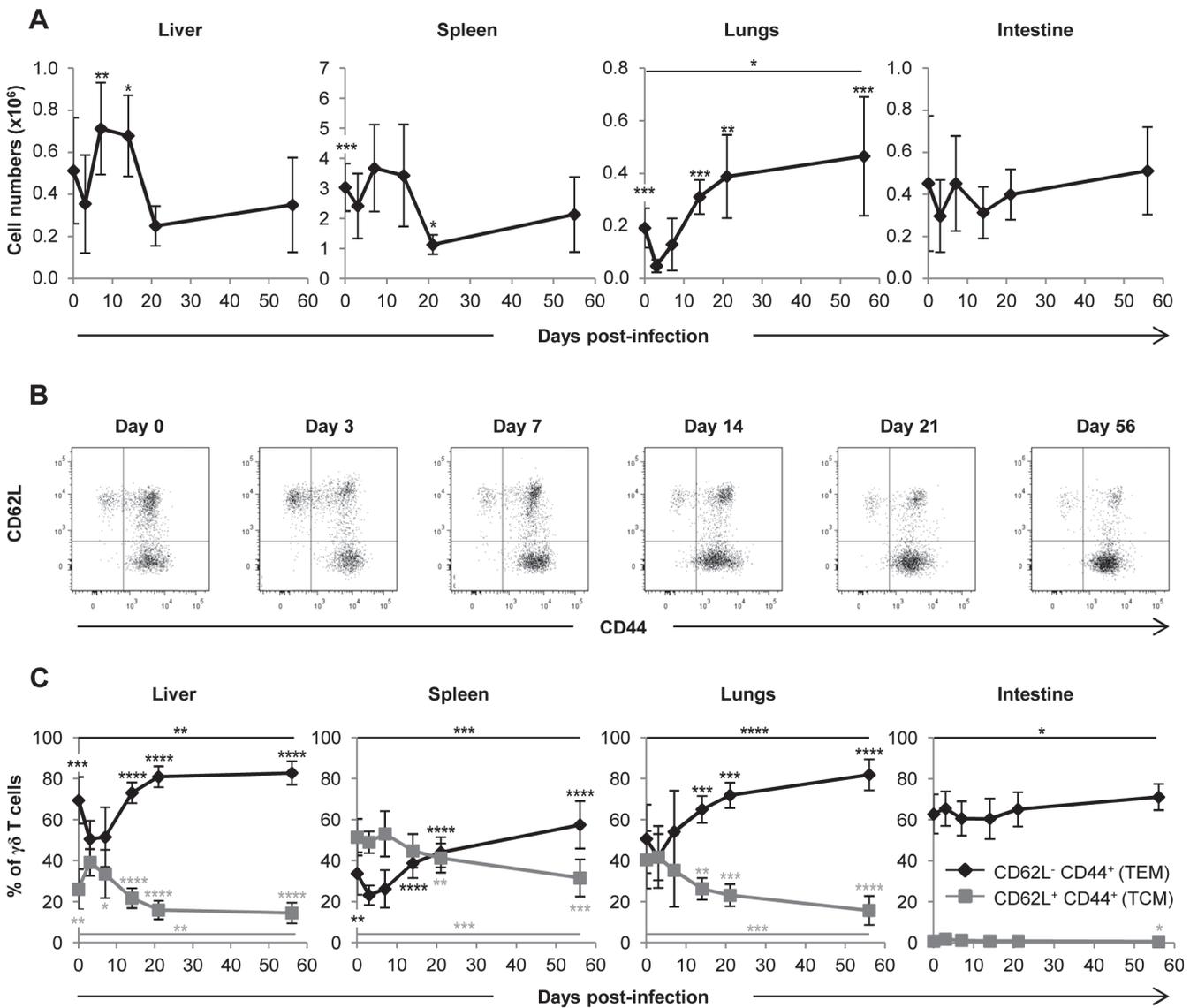
We next sought to analyze whether the control of MCMV spread was associated with an amplification of  $\gamma\delta$  T cells in infected organs. S2 Fig. shows the gating strategy used for  $\gamma\delta$  T cell flow cytometry analysis. After a slight decrease at day 3,  $\gamma\delta$  T cell numbers increased importantly in the lungs until day 21 (approximately 8 fold), and this rise persisted until the end of the experiment. A significant but more modest and transient increase was also observed in the liver (approximately 2 fold from day 3 to 7). By contrast and to our surprise given their preponderance in gut intraepithelial lymphocytes, no significant variation of  $\gamma\delta$  T cells was observed in the intestine. In the spleen,  $\gamma\delta$  T cells levels remained stable until day 21 when they decreased (Fig. 4A). In conclusion, control of MCMV infection by  $\gamma\delta$  T cells in  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  mice is associated with a transient  $\gamma\delta$  T cell increase in the liver, and a delayed but strong and persistent expansion of  $\gamma\delta$  T cells in the lungs.

### $\gamma\delta$ T cells responding to MCMV display an effector-memory phenotype

We next asked whether  $\gamma\delta$  T cells responding to MCMV differentiate into effector-memory cells as we observed previously in humans [10,14]. After a transient decrease early post MCMV challenge, the proportion of effector memory (EM,  $\text{CD44}^+\text{CD62L}^-$ )  $\gamma\delta$  T cells increased in the spleen, liver and lungs concomitantly with a decrease of central memory (CM,  $\text{CD44}^+\text{CD62L}^+$ )  $\gamma\delta$  T cells. Effector memory  $\gamma\delta$  T cells reached more than 80% in the liver and lungs at day 56 (Fig. 4B and 4C). Consistent with the absence of variation in  $\gamma\delta$  T cell numbers in the intestine, no modification of  $\gamma\delta$  T cells phenotype could be observed in this organ. These results confirm that MCMV induces a marked response of  $\gamma\delta$  T cells in the lungs and liver, which is more modestly seen in the spleen and absent from the intestine.

### $\text{V}\gamma 1^+$ and $\text{V}\gamma 4^+$ $\gamma\delta$ T cell subsets are both involved in the response to MCMV

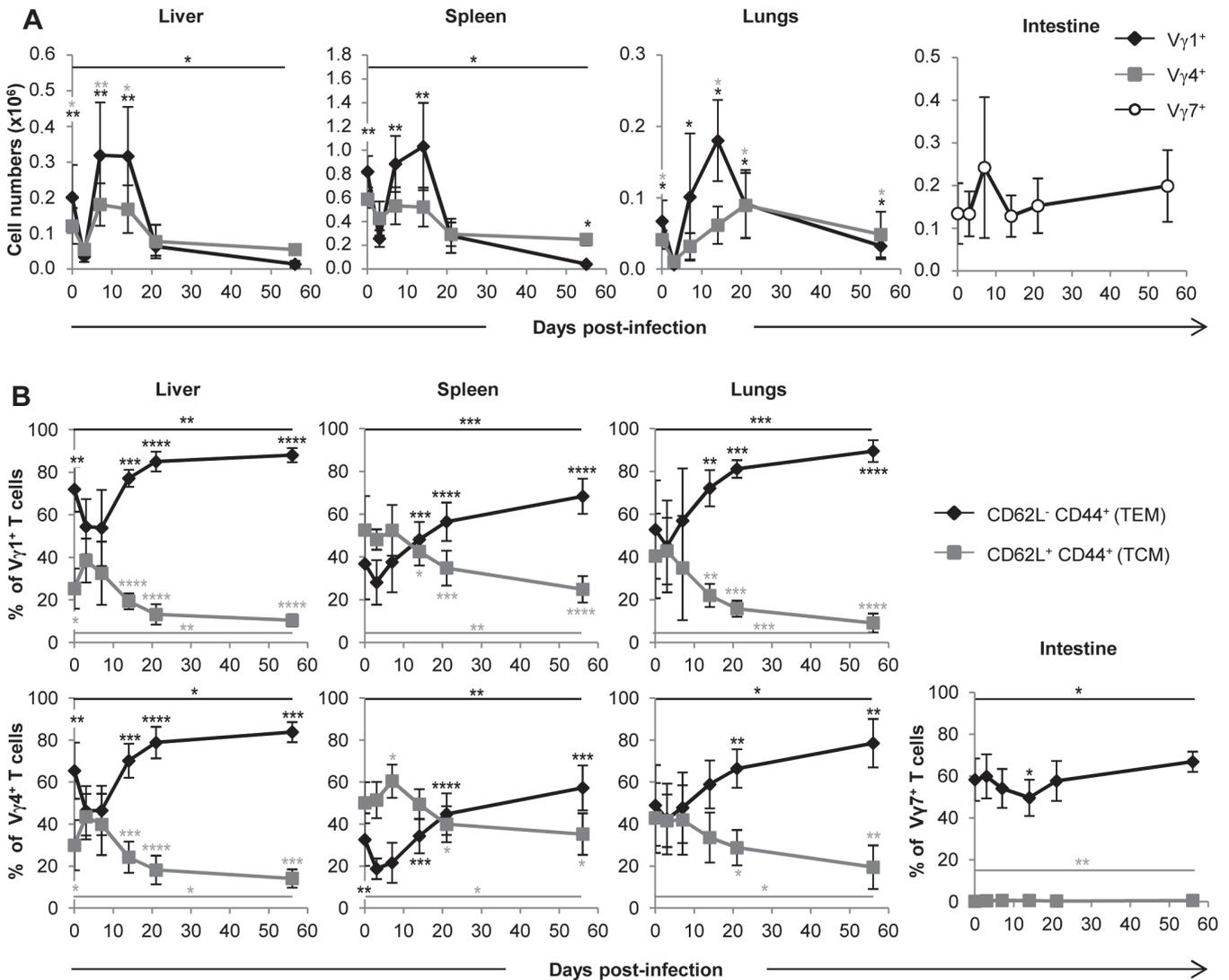
The subsets of murine  $\gamma\delta$  T lymphocytes expressing the  $\text{V}\gamma 1$  or  $\text{V}\gamma 4$  chains of the TCR predominate in the spleen, liver and lungs, whereas intestinal  $\gamma\delta$  T cells are almost exclusively  $\text{V}\gamma 7^+$  (nomenclature of Heilig and Tonegawa [29]). We assessed the quantity, repertoire and memory phenotype of these  $\gamma\delta$  T lymphocyte subsets in the liver, spleen and lungs. Not surprisingly, low proportions of  $\text{V}\gamma 1^+$   $\gamma\delta$  T cells were found in the intestine (S2 Fig.). As observed in Fig. 5A, the expansion of  $\gamma\delta$  T cells in the lungs and liver after day 3 concerned mainly  $\text{V}\gamma 1^+$  but also  $\text{V}\gamma 4^+$   $\gamma\delta$  T cells. Both subsets followed the kinetics of total  $\gamma\delta$  T cells (Fig. 4A). Analysis of subsets also showed a response of  $\text{V}\gamma 1^+$ , but not  $\text{V}\gamma 4^+$  T cells, in the spleen (Fig. 4A and Fig. 5A). The proportion of EM cells among both  $\text{V}\gamma 1^+$  and  $\text{V}\gamma 4^+$   $\gamma\delta$  T cells increased after day



**Fig 4. Mobilization of  $\gamma\delta$  T cells in MCMV-infected organs from  $TCR\alpha^{-/-}$  mice.**  $TCR\alpha^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV. At indicated post-infection days, 5–9 mice were sacrificed, immune cells prepared from each organ and  $\gamma\delta$  T cells stained as shown in S2 Fig. **A**. Kinetics of absolute  $\gamma\delta$  T cell numbers determined as described in methods. Presented data are mean  $\pm$  SEM of 8–9 mice from one representative of 2 experiments. **B**. CD62L and CD44 expression by lymphocytes was evaluated by flow cytometry, with the presented gating strategy (lungs shown as example). **C**. Longitudinal analysis of  $\gamma\delta$  T cell phenotype in all organs. Results are pooled from 2 independent experiments representing a total of 13–14 mice (means  $\pm$  SEM). Statistical analysis of cell numbers and percentages between day 3 and other time points are shown, as well as statistical differences between days 0 and 56 (solid line).

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g004

3 in the lungs, liver and spleen (Fig. 5B). In contrast,  $V\gamma 7^+$   $\gamma\delta$  T cell numbers/memory phenotype did not vary significantly upon MCMV infection (Fig. 5A and Fig. 5B), as could be expected from the analysis of the whole  $\gamma\delta$  T cell population in the intestine (Fig. 4A and Fig. 4C). The complementary-determining-region (CDR3) $\gamma 1$  and CDR3 $\gamma 4$  length profile of liver, spleen and lung-derived  $\gamma\delta$  T cells were not different between uninfected and infected mice for 14 days (S3 Fig. and S4 Fig.), indicating that there were no major changes in these CDR3 repertoires after expansion.

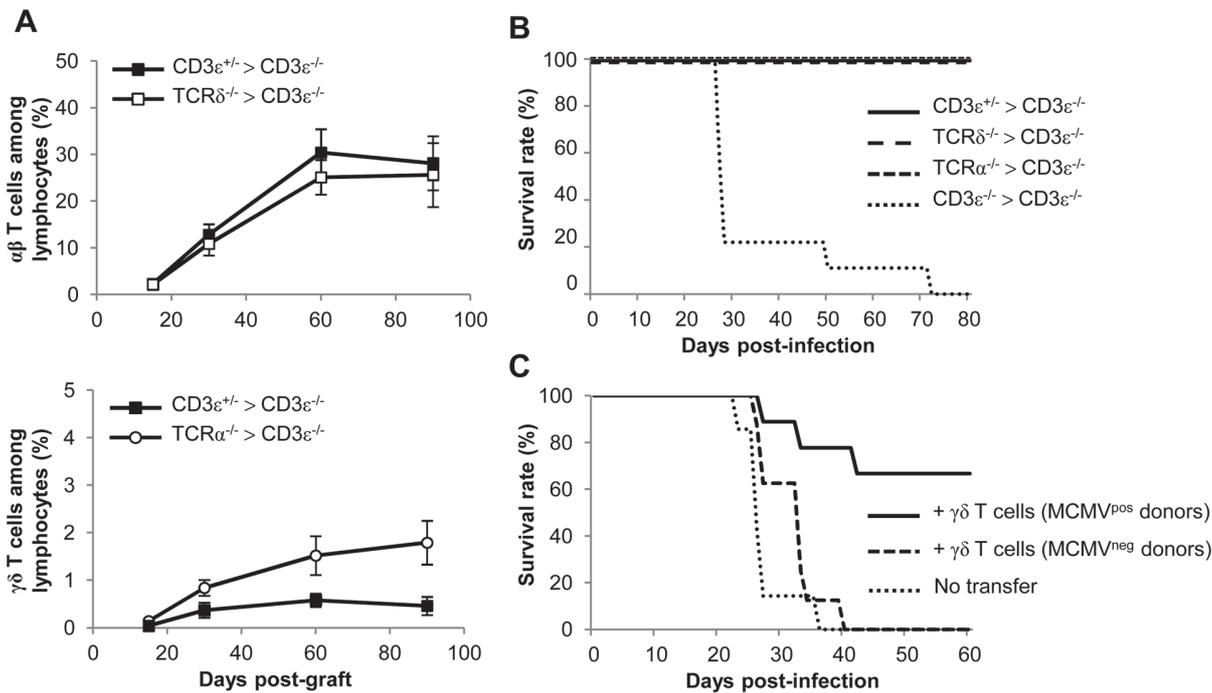


**Fig 5. Both  $V\gamma 1$  and  $V\gamma 4$  subset are involved in  $\gamma\delta$  T cell response to MCMV.**  $TCR\alpha^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV. At indicated days post-infection, 5–9 mice were sacrificed and immune cells were prepared from each organ. Expression of  $V\gamma 1$ ,  $V\gamma 4$  and  $V\gamma 7$  chains by lymphocytes was evaluated by flow cytometry (S2 Fig.). **A.** Kinetics of absolute cell numbers for each subset. Presented data are mean  $\pm$  SEM of 8–9 mice from one representative of 2 experiments. **B.**  $CD62L$  and  $CD44$  expression by  $\gamma\delta$  T cell subsets was evaluated by flow cytometry in all organs. Results are pooled from 2 independent experiments representing a total of 13–14 mice (means  $\pm$  SEM). Statistical differences of cell numbers and percentages between day 3 and other time points are shown, as well as statistical differences between days 0 and 56 (solid line).

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g005

### $\gamma\delta$ T cells recovery rescues $CD3\epsilon^{-/-}$ mice from MCMV-induced death

$\gamma\delta$  T cells development in  $CD3\epsilon^{-/-}$  mice was reconstituted by bone marrow (BM) transfer experiments using  $TCR\alpha^{-/-}$  mice as donors (referred to as  $TCR\alpha^{-/-} > CD3\epsilon^{-/-}$  mice). This method allowed the generation of the BM-derived  $V\gamma 1^+$  and  $V\gamma 4^+$   $\gamma\delta$  T cell subsets that were increased upon MCMV infection. Control BM transplants were also performed with  $TCR\delta^{-/-}$  donors ( $TCR\delta^{-/-} > CD3\epsilon^{-/-}$  mice) and with  $CD3\epsilon^{+/-}$  donors ( $CD3\epsilon^{+/-} > CD3\epsilon^{-/-}$  mice).  $\gamma\delta$  and/or  $\alpha\beta$  T cell reconstitution was allowed to establish for 3 months before MCMV infection of the mice.  $\gamma\delta$  T cell subset percentages were analyzed in blood from live mice throughout reconstitution (Fig. 6A). Two months after grafting, the percentages of blood  $\gamma\delta$  and/or  $\alpha\beta$  T cells



**Fig 6.  $\gamma\delta$  T cell recovery rescues CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice from MCMV-induced death.** **A.** Bone marrows (BM) from TCR $\delta^{-/-}$ , TCR $\alpha^{-/-}$ , CD3 $\epsilon^{+/-}$  and CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (10 of each) were transferred into CD3 $\epsilon^{-/-}$  recipient mice at day 0 (1 donor BM/recipient). At days 15, 30, 60 and 90, blood samples were collected (5 for each grafted mouse line) in order to follow  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T cell reconstitution in peripheral blood. The evolution of the proportions of  $\alpha\beta$  T cells in CD3 $\epsilon^{+/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  and TCR $\delta^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice are shown (top) as well as the evolution of  $\gamma\delta$  T cells in CD3 $\epsilon^{+/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  and TCR $\alpha^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (bottom). Results are expressed as percentages among peripheral blood lymphocytes  $\pm$  SD. **B.** Three months post-graft, CD3 $\epsilon^{+/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$ , TCR $\alpha^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$ , TCR $\delta^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  and CD3 $\epsilon^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (10 of each) were infected i.p. with  $2 \cdot 10^3$  PFU of MCMV and monitored daily for mortality. This experiment was repeated twice with concordant results. **C.**  $\gamma\delta$  T cells from uninfected or 14-days infected TCR $\alpha^{-/-}$  mice were purified and i.v. transferred ( $8-9 \cdot 10^5$  cells, 92–93% purity) into CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (8–9 recipients). 24h after transfer, reconstituted CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice were challenged with  $2 \cdot 10^3$  PFU of MCMV and monitored daily for mortality. 7 untransferred CD3 $\epsilon^{-/-}$  were used as controls. This experiment was repeated twice.

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g006

(among total lymphocytes) had reached a plateau (Fig. 6A). The proportion of peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells in CD3 $\epsilon^{+/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice was lower than that found in TCR $\alpha^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (Fig. 6A, lower panel), in accordance with previous findings which showed that  $\gamma\delta$  T cells in TCR $\alpha^{-/-}$  outnumbered  $\gamma\delta$  T cells in C57BL/6 mice [30]. When infected with MCMV at 3 months post-graft, TCR $\alpha^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice survived MCMV infection as efficiently as CD3 $\epsilon^{+/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  and TCR $\delta^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice, in marked contrast with CD3 $\epsilon^{-/-}$  > CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (Fig. 6B).

In a second experimental scenario  $\gamma\delta$  T cells were purified from TCR $\alpha^{-/-}$  splenocytes and injected intravenously (i.v.) into CD3 $\epsilon^{-/-}$  hosts one day before MCMV infection. Surprisingly, very low protection was obtained when  $\gamma\delta$  T cells isolated from control mice were transferred, whereas  $\gamma\delta$  T cells from MCMV-infected mice conferred good protection (Fig. 6C).

All together our results confirm the protective anti-CMV role of BM-derived  $\gamma\delta$  T cells, and show that priming of splenic  $\gamma\delta$  T cells with MCMV in donor mice is necessary for protection against MCMV after their adoptive transfer.

### $\gamma\delta$ T cells are not the main producers of IFN $\gamma$ and cytolytic granules during early acute MCMV infection

We next sought to gain insight into the mechanism by which  $\gamma\delta$  T cells exert their antiviral function. CD27 expression was shown to segregate  $\gamma\delta$  T cells into two functional subsets in

mice: CD27<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells being the main producers of the antiviral cytokine IFN $\gamma$  and CD27<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T cells being prone to secrete IL-17A which is not classically considered as important in antiviral responses [31] [32]. To determine which of these subsets respond to CMV, we analyzed their evolution in organs from MCMV-infected mice. As evidenced in [S5A Fig.](#), CD27<sup>-</sup> cells dominated the  $\gamma\delta$  T cell response in the lungs, while CD27<sup>+</sup> and CD27<sup>-</sup> subtypes were roughly equally implicated in the liver. However, IL-17A transcripts were barely detected in these organs ([S5B Fig.](#)). By contrast, IFN $\gamma$  was expressed in both these organs but noticeably peaked as early as day 3, before the rise of  $\gamma\delta$  T cell numbers and C $\delta$  transcripts ([S5B Fig.](#)).

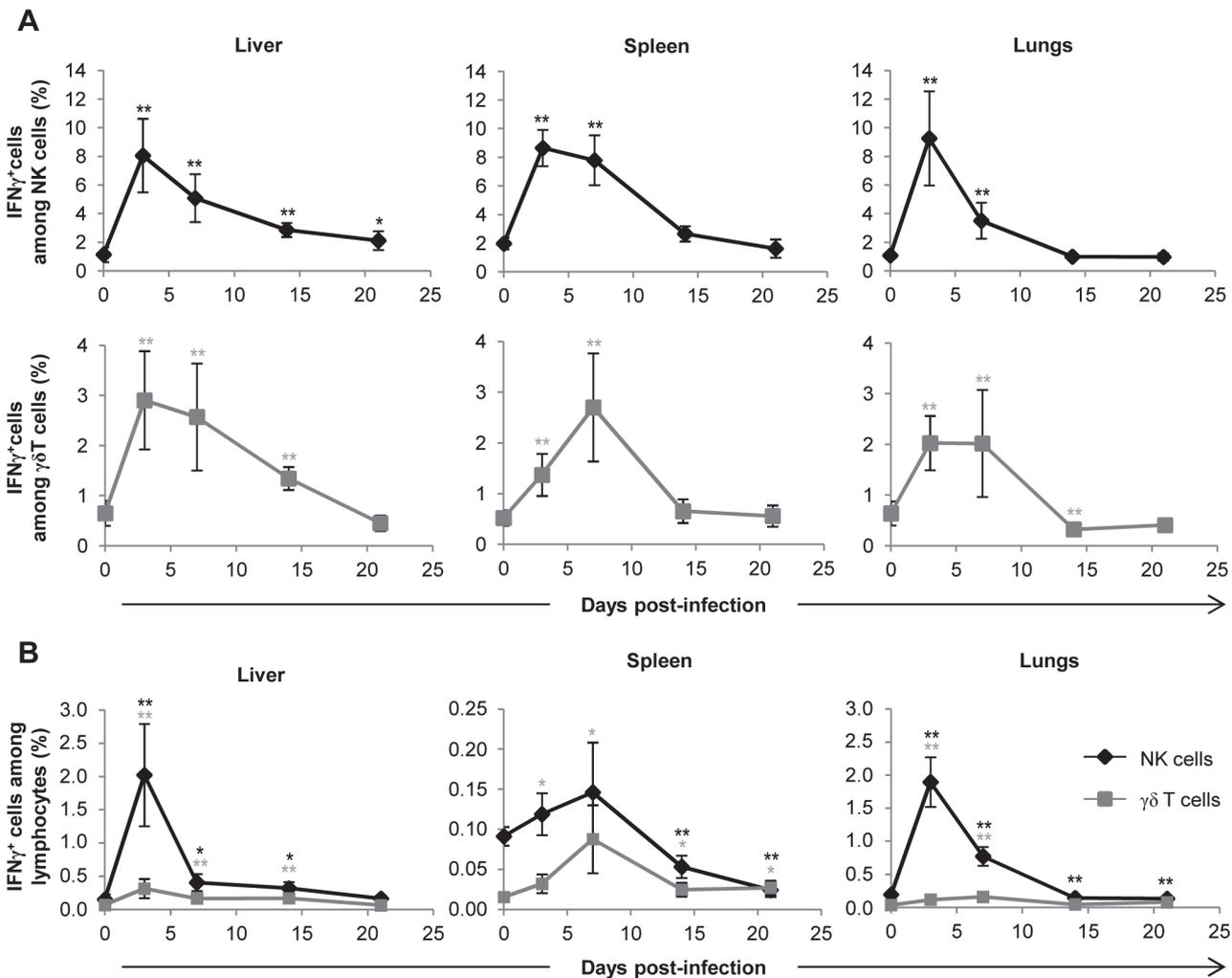
Since the presence of IFN $\gamma$  transcripts in organs from TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> infected mice could be attributed to NK cells, we determined IFN $\gamma$  production at the cellular level by intracellular staining of lymphocytes and using the gating strategy shown in [S6 Fig.](#) As shown in [Fig. 7A](#), the proportion of IFN $\gamma$ -producing NK cells peaked at day 3 in all organs. IFN $\gamma$ -producing  $\gamma\delta$  T cells also peaked 3 to 7 days post-infection ([Fig. 7A](#)), but represented a minor population when compared to IFN $\gamma$ -producing NK cells at similar time points ([Fig. 7B](#)). Consequently, NK cells were the largely preponderant producers of IFN $\gamma$  during early acute MCMV infection ([Fig. 7B](#)), accounting for 2% of lymphocytes at day 3 in the liver and lungs (i.e. when the relative expression of IFN $\gamma$  was the highest, [S5B Fig.](#)). Similarly, during the course of infection, the proportions of CD107a<sup>+</sup> NK cells were higher than that of CD107a<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T lymphocytes ([S7 Fig.](#)). These experiments are in accord with the substantial role of NK cells in the control of early MCMV infection through IFN $\gamma$  production and cytotoxicity [33], and suggest that the antiviral role of  $\gamma\delta$  T cells might not principally rely on these two functions.

### NK-independent antiviral protective effect of $\gamma\delta$ T cells

Considering the above results we hypothesized that  $\gamma\delta$  T cells could exert an indirect antiviral effect by promoting NK cells accumulation as has been previously reported [34]. We therefore compared the evolution of NK cell numbers early post-MCMV infection in TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> and CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> mice. For both mouse lines and as depicted in C57BL/6 wt mice, the overall kinetic was organ-specific with an early decrease of NK cells in the spleen in contrast to liver ([Fig. 8A](#)) [35] [36]. In contrast to our hypothesis and despite the MCMV-induced death of CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> mice, NK cell numbers were globally higher in CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> mice than in TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice at all early time points tested ([Fig. 8A](#)), showing that  $\gamma\delta$  T cells antiviral activity was not due to an early increase of NK cells. In addition, when transferred into B/NK/T cells immunodeficient Rag<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> mice, MCMV-primed  $\gamma\delta$  T cells were also strikingly sufficient to long term protect these mice from death ([Fig. 8B](#)). At day 56,  $\gamma\delta$  T cells could easily be detected in the liver, spleen and lungs of Rag<sup>-/-</sup>  $\gamma$ C<sup>-/-</sup> recipient mice in contrast to NK cells, demonstrating that the protective function of  $\gamma\delta$  T cells could act in the total absence of NK cells ([Fig. 8C](#)).

### Discussion

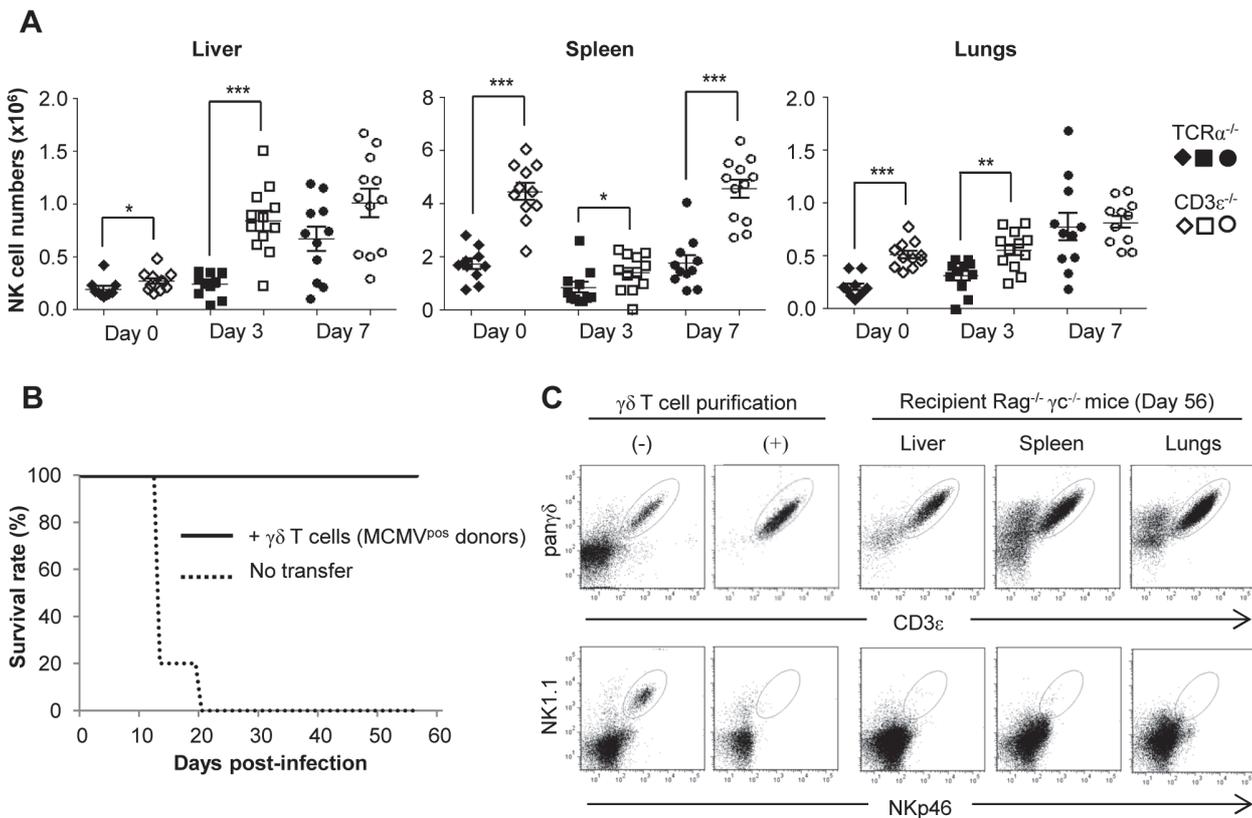
Previous work conveys compelling evidence for the implication of human V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells in the immune response against HCMV infection [5,6,7,9]. However, key questions that cannot easily be addressed in humans remain unanswered, such as the spatial and temporal regulation of the anti-HCMV  $\gamma\delta$  T cell response and its protective role. Because of its similarity with the human CMV pathogenesis and immune response, the mouse model of MCMV infection has been extensively used and is well characterized. The goal of this study was to take advantage of this model to address these questions concerning the protective role and localization of the  $\gamma\delta$  T cell response. Herein, we show that  $\gamma\delta$  T cells are as competent as  $\alpha\beta$  T cells to protect against CMV challenge, a finding that can be of particular relevance in clinical settings, situations or diseases where  $\alpha\beta$  T lymphocytes are compromised (hypomorphic Rag1 mutations, individuals



**Fig 7.  $\gamma\delta$  T cells are not the main producers of IFN $\gamma$  during early acute MCMV infection.** TCR $\alpha^{-/-}$  mice were infected i.p. with 2.10<sup>3</sup> PFU of MCMV. At indicated days post-infection, 6–8 mice were sacrificed and immune cells were isolated from each organ for ex-vivo analysis of IFN $\gamma$  production by live (7AAD<sup>-</sup>) CD3 $\epsilon^{-}$ NKp46<sup>+</sup> and CD3 $\epsilon^{+}$  $\gamma\delta^{+}$  cells. **A.** Proportions of IFN $\gamma$  producing cells for each NK or  $\gamma\delta$  T cell subtype are shown. **B.** Percentages of IFN $\gamma$  producing NK and  $\gamma\delta$  T cells among lymphocytes. Data are from 1 representative of 2 independent experiments and are expressed as mean percentages  $\pm$  SEM of 6–8 mice. Statistical differences between day 0 and other time points are shown.

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g007

treated with immunosuppressive drugs, foetuses or neonates, . . .) and where  $\gamma\delta$  T cells have already been shown to expand [6,7,8,9,10,11,12]. This protective function of  $\gamma\delta$  T cells, under conditions of suboptimal  $\alpha\beta$  T cell response, has previously been observed earlier in mice in the context of infection by Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) [37] or by the gut coccidian parasite *Eimeria vermiformis* [38]. These results also corroborate the conserved level of protection against infection observed in patients lacking TCR  $\alpha\beta$  T cells due to a mutation in the gene coding the TCR  $\alpha$  chain [39]. Since  $\gamma\delta$  T cells have been shown to play an important role in young mice in other infectious models, it would be interesting to evaluate this role in the context of MCMV infection [40]. In addition to extending our results to more a “natural setting” of suboptimal  $\alpha\beta$  T cells responses, it would allow analysis of the role of non BM-derived  $\gamma\delta$  T cell subtypes [41]. Finally this MCMV model could be used to evaluate the importance of  $\gamma\delta$  versus  $\alpha\beta$  T cells in the context of immunosuppression as used in transplant recipients.



**Fig 8. NK-independent antiviral protective effect of  $\gamma\delta$  T cells.** **A.** TCR $\alpha^{-/-}$  and CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice were uninfected (Day 0) or infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV. At indicated days post-infection, 5–6 mice were sacrificed and immune cells were isolated from each organ for flow cytometry analysis. Absolute numbers of NK cells were calculated as described in methods. Black and white symbols represent individual TCR $\alpha^{-/-}$  and CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice respectively, and horizontal lines represent the mean of 10–12 mice pooled from 2 independent experiments. Differences were evaluated using the Mann-Whitney test: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ . **B.**  $\gamma\delta$  T cells from 14-days infected TCR $\alpha^{-/-}$  mice were purified and i.v. transferred ( $1.10^6$  cells, 97% purity) into Rag $^{-/-}$   $\gamma$ C $^{-/-}$  mice (10 recipients). 24h after transfer, reconstituted Rag $^{-/-}$   $\gamma$ C $^{-/-}$  mice were challenged with  $2.10^3$  PFU of MCMV and monitored daily for mortality. 5 untransferred Rag $^{-/-}$   $\gamma$ C $^{-/-}$  mice were used as controls. Results are from one representative of 2 independent experiments. **C.** Left: flow cytometry analysis of live (7AAD $^{-}$ ) CD3 $\epsilon^+$  pan $\gamma\delta^+$  T cells (upper panels) and NKp46 $^+$  NK1.1 $^+$  cells (lower panels) in splenocytes from TCR $\alpha^{-/-}$  donors, before (-) and after (+) purification of  $\gamma\delta$  T cells as described in methods. Right: At day 56 post-infection of Rag $^{-/-}$   $\gamma$ C $^{-/-}$  recipients, 3 mice were sacrificed; organs removed and immune cells isolated for flow cytometry analysis of  $\gamma\delta$  and NK cells. Results are from one representative mouse.

doi:10.1371/journal.ppat.1004702.g008

After administration of MCMV via the intraperitoneal route, MCMV targets the liver and spleen as cell free viruses within the first hours before dissemination to the other organs [42]. Accordingly, viral loads were the highest at day 3 in the liver and spleen but peaked at day 7 in the lungs and intestine in all mouse lines tested in the present study. In TCR $\alpha^{-/-}$  mice, viral loads were the lowest at day 14 in the liver and spleen and at day 21 in the lungs (Fig. 2), i.e. after the significant increase of both V $\gamma$ 1 $^+$  and V $\gamma$ 4 $^+$   $\gamma\delta$  T cell subsets in the liver and lungs (Fig. 4A), and of V $\gamma$ 1 $^+$   $\gamma\delta$  T cells in the spleen (Fig. 5A). Three weeks post-MCMV infection, high viral loads and liver/lung injury were evidenced in CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice despite normal development and function of NK cells in these mice [28]. In contrast, liver and lung disorders were not observed in TCR $\alpha^{-/-}$  mice at that time. These results are consistent with a role for  $\gamma\delta$  T cell response/expansion in these organs to control virus multiplication and associated organ damage in the absence of  $\alpha\beta$  T cells. The protective role of  $\gamma\delta$  T cells was ascertained by reconstituting  $\gamma\delta$  T cells in CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice by bone marrow transplantation, or by adoptive transfer of splenic  $\gamma\delta$  T cells from TCR $\alpha^{-/-}$  MCMV infected mice. However, when isolated from the spleen of

$\text{TCR}\alpha^{-/-}$  uninfected mice,  $\gamma\delta$  T cells were inefficient to induce protection in  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  recipients. We can exclude the possibility that lack of protection in  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  mice which received naïve  $\gamma\delta$  T cells was due to an absence of engraftment, because both naïve and MCMV-primed  $\gamma\delta$  T cells were found in the liver, spleen and lungs of recipient mice (S8 Fig). The absence of protection by non-primed  $\gamma\delta$  T cells purified from splenocytes may be due to a delay of reconstitution/differentiation in recipient mice that allow the virus to overwhelm the  $\gamma\delta$  T cell response. Infection of donor mice by CMV most likely prime  $\gamma\delta$  splenocytes to readily respond to CMV once transferred in  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  mice, compensating this reconstitution limitation.

The development of the anti-CMV immune response involves a complex network of cells from the innate and adaptive immunity that act sequentially to favor health over disease. Research in mice has paid a lot of attention to the early control of MCMV by NK cells, which are responsible for the enhanced resistance of the C57BL/6 mouse strain when compared to BALBc mice. In C57BL/6 mice, NK cell antiviral activity relies on both perforin and  $\text{IFN}\gamma$ -release that control viral loads in the liver, spleen and lungs [33,43]. Our *ex vivo* analysis of lymphocytes from C57BL/6  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  infected organs show that the early boost (days 3–7) of  $\text{IFN}\gamma$  expression and cytotoxic granule exocytosis is mostly due to NK cells, while  $\gamma\delta$  T cells participate only modestly to these functions (Fig. 7 and S7 Fig). Thus, although we cannot exclude that this modest contribution might help in controlling MCMV loads, these results rather raise the possibility that  $\gamma\delta$  T cells operate either by regulating other immune cells or through the production of unknown antiviral mediators. Strikingly, however, our adoptive transfer experiment into  $\text{Rag}^{-/-}\gamma\text{c}^{-/-}$  immunodeficient hosts showed that  $\gamma\delta$  T cell antiviral protective function can be independent of NK/B/ $\alpha\beta$  T cells. This emphasizes their efficiency and opens interesting perspectives for their possible manipulation in clinical situations where other immune cells are defective.

The kinetics of  $\gamma\delta$  T cell response was organ specific, with a progressive increase and accumulation of  $\gamma\delta$  T cells in the lungs, whereas  $\gamma\delta$  T cells quickly increased and dropped at day 21 in the liver and spleen (Fig. 4A). The persistence within the lungs of memory  $\gamma\delta$  T cells contrasts with the transient increase of pulmonary  $\gamma\delta$  T cells that was observed in other murine infectious contexts [44,45,46]. However it reproduces the persistence of  $\gamma\delta$  T cell expansion in human blood during HCMV-infection which could result from persistent activation of  $\gamma\delta$  T cells in chronically infected tissues [5,10]. This suggests that the lungs could be an anatomical site for replication of HCMV and chronic activation of  $\gamma\delta$  T cells, consistent with the fact that HCMV is frequently found in lungs of solid organ transplant patients where it can induce tissue invasive disease [4].

The  $\gamma\delta$  T cell response to MCMV implicates bone marrow derived  $\text{V}\gamma 1^+$  and  $\text{V}\gamma 4^+$  T cells. It will be interesting in the future to determine whether these subsets play similar functions in the response to MCMV, since evidence for distinct roles of  $\text{V}\gamma 1^+$  and  $\text{V}\gamma 4^+$  T cells in the protection and/or pathogenesis during infection of mice has been reported [46,47,48]. The involvement of several subsets in the response to MCMV is in agreement with the implication of diverse  $\text{V}\delta 2^{\text{neg}}$  T cell subsets ( $\text{V}\delta 1$ ,  $\text{V}\delta 3$ ,  $\text{V}\delta 5$ ) in the response to HCMV [5]. In contrast to long term HCMV-induced  $\gamma\delta$  T cells that display a restricted CDR3 $\delta$  length repertoire [5], the CDR3 $\gamma 1$  and  $\gamma 4$  length repertoire of liver, spleen and lung-derived  $\gamma\delta$  T cells was equivalent in 14-days MCMV-infected and uninfected  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  mice (S3 Fig. and S4 Fig.). This could reflect a TCR-independent innate-like response of  $\gamma\delta$  T cells and/or high frequencies of MCMV-specific  $\gamma\delta$  T cells already existing in naïve mice. However, we cannot exclude the presence of a shared antigen-recognition motif in CDR3 $\gamma$  of different lengths (as observed for the CDR3 $\delta$  of T22-specific  $\gamma\delta$  T cells [49]). The number of CDR3 $\gamma 1$  peaks (4 or 5) confirms previous analysis of CDR3 repertoire in mice [50].

Another interesting question concerns the memory function of  $\gamma\delta$  T cells during MCMV infection, as recently described for CD44<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T cells in mouse models of bacterial infections [51,52]. Adaptive and innate like  $\gamma\delta$  T cells could both participate to memory, in light of the emerging role for innate cells in this context [53]. Previous contact with HCMV induced a rapid recall expansion of effector memory V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells, which coincided with better infection resolution of HCMV reactivation in transplant recipients [10]. CMV infection in mice also induces CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> effector memory  $\gamma\delta$  T cells that are maintained and outnumber CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> central memory  $\gamma\delta$  T cells at day 56 in all organs (Fig. 4B and Fig. 4C). By definition, effector memory cells are prone to exert rapid functions at the aggression site and the results shown here support the hypothesis that peripheral blood effector-memory human V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells are re-circulating cells that originate from CMV-targeted organs. It remains to be investigated whether murine  $\gamma\delta$  T cells recognize self-encoded stress-regulated antigens on CMV-infected cells, as demonstrated for human  $\gamma\delta$  T cells [18].

Acute infections with HCMV can result in serious disease in infected neonates and in the context of immunosuppression linked to transplantation. Inducing or enhancing the antiviral response of  $\gamma\delta$  T cells in this context is an attractive objective. Our findings open new perspectives for the use of the murine model of MCMV infection to define the precise mechanism of antiviral activity of  $\gamma\delta$  T cells and to develop new strategies to induce their activation *in vivo*. Their absence of MHC restriction, their combination of conventional adaptive and innate-like responses, their particular anatomical localization and their dual reactivity against infected and tumor cells, are specific features that place  $\gamma\delta$  T cells as unique effectors for clinical manipulation. In conjunction with the identification of stress antigens recognized by  $\gamma\delta$  T cells on infected cells, these results open new avenues for clinical manipulation of  $\gamma\delta$  T cells against CMV-mediated disease.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All experimental procedures involving animals were conducted according to European Union guidelines (European Directive 2010/63/UE) ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)) and approved by the local ethics committee: *Comité d'éthique pour l'expérimentation animale de Bordeaux* (CE50), [project n° 50120197-A].

### Mice

We used C57BL/6 mice. CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> [54], TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> [30] and Rag<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> mice [55] were from the CDTA (Centre de Distribution, Typage et Archivage Animal, Orléans, France). TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> [56] were a gift from Dr Malissen (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, France). Mice were used between 8–12 weeks of age and kept under pathogen-free conditions (Animalerie spécialisée, Université Bordeaux Segalen, France). CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> were bred to C57BL/6 mice (C57BL/6J, Charles Rivers laboratory, L'Arbresle, France) to obtain CD3 $\epsilon$ <sup>+/+</sup> control mice. MCMV-infection was performed in an appropriate animal facility (Animalerie A2, Université Bordeaux Segalen, France).

### Virus stock and infection of mice

MCMV was acquired from the American Type Culture Collection (Smith strain, ATCC VR-194) and propagated into BALBc mice (BALBcBy/J, Charles Rivers laboratory, L'Arbresle, France) to generate MCMV salivary gland extracts. Virus titers were defined by standard plaque assay on monolayers of mouse embryonic fibroblasts (MEF). Unless indicated, infections were performed by i.p. administration of 2.10<sup>3</sup> PFU of the salivary gland viral stock.

### AST and ALT quantifications

Mice were bled via the retroorbital sinus after anesthesia (one eye every other week) and the serums collected and frozen. AST and ALT were quantified using standard enzymological methods (laboratoire de Biochimie, CHU Bordeaux, France).

### Tissue processing and histology

Mice were euthanized by cervical dislocation. Liver and lungs were removed, fixed for 24 h in 3.7% neutral-buffered formalin (Sigma-Aldrich), followed by standard histological processing and paraffin embedding. Sections of 4  $\mu$ m thickness were processed for Hematoxylin/Eosin/Safran (HES) staining (following standard protocols).

### Quantification of MCMV loads

Genomic DNA was isolated from organs using Nucleospin tissue purification kit (Macherey Nagel). Real time PCR to quantify MCMV was performed in Step one plus thermocycler (Applied biosystem) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega) with primers specific for MCMV glycoprotein B (gB) (gi330510, forward primer: AGGCCGGTCGAGTACTTCTT and reverse primer: GCGCGGAGTATCAATAGAGC). Known quantities of plasmid comprising MCMV gB were used for the titration curve.

### Relative quantification of transcripts by real time PCR and spectratyping

Total RNA from immune cells was prepared with Nucleospin RNAII kit (Macherey Nagel). Goscript reverse transcriptase (Promega) was used to generate cDNA. Real time PCR was performed in CFX 384 (BioRad). The relative expression of transcripts was determined using the *GAPDH* reference gene. For spectratyping analysis, PCR (40 cycles) was performed with V $\gamma$ 1 and C $\gamma$ 4 or with V $\gamma$ 4 and C $\gamma$ 1 primers, resulting in amplification of the sequences containing the CDR3 $\gamma$ 1 or CDR3 $\gamma$ 4, respectively. Then a run-off reaction (one cycle) was performed using a fluorescently labeled J $\gamma$ 4-FAM primer for CDR3 $\gamma$ 1 and with a J $\gamma$ 1-FAM primer for CDR3 $\gamma$ 4 (primers sequences from [50]). The labeled reaction products were run on a capillary sequencer (ABI3730xl analyzer) at ImmuneHealth (Gosselies, Belgium). The fluorescence intensity was analyzed using Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems).

List of primer Fw (forward) and Rv (Reverse):

***GAPDH*** (Genbank NM\_008084):

Fw 5'-AATGGGGTGAGGCCGGTGCT-3'

Rv 5'-CACCCCTCAAGTGGGCCCCG-3'

***IFN $\gamma$***  (NM\_008337.3)

Fw: 5'-ACTGGCAAAGGATGGTGAC-3'

Rv 5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'

***IL17-A*** (NM\_010552.3)

Fw 5'-TCATCTGTGTCTCTGATGCTGTT-3'

Rv 5'-TTGGACACGCTGAGCTTTGA-3'

***C $\delta$***  (X12729.1)

Fw 5'-CTGTGCACTCGACTGACTTTGAACC-3'

Rv 5'-CCCAGCACCGTGAGGGACATC-3'

**CDR3 $\gamma$ 1**

Fw V $\gamma$ 1 5'-CCGGCAAAAAGCAAAAAGT-3'

Rv C $\gamma$ 4 5'-AAGGAGACAAAGGTAGGTCCCAGC-3'

J $\gamma$ 4-FAM 5'-TACGAGCTTTGTCCCTTTG-3'

#### CDR3 $\gamma$ 4

Fw V $\gamma$ 4 5'-CTTGCAACCCCTACCCATAT-3'

Rv C $\gamma$ 1 5'-CCACCACTCGTTTCTTTAGG-3'

J $\gamma$ 1-FAM 5'-CTTAGTTCCTTCTGCAAATACC-3'

### Preparation of immune cells from organs and numeration

We used cell strainers to mash the spleens and livers in RPMI-1640 with 8% FBS; red blood cells were lysed with NH<sub>4</sub>Cl. For the liver, immune cells were isolated by centrifugation (2000 rpm, 20 min) over a 40/80% discontinuous Percoll gradient (GE Healthcare). Pulmonary mononuclear cells were isolated as described [57]. Intestinal intraepithelial mononuclear cells were isolated as described elsewhere [58]. Total organ live cells (unstained with Trypan blue) were then counted using a hemocytometer (Malassez chamber). The proportion of  $\gamma\delta$  T cells (CD3 $\epsilon^+$ pan $\gamma\delta^+$ ) and NK cells (NK1.1<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>) among total organ live cells (7AAD<sup>-</sup>) was evaluated by FACS using a large FSC/SSC gate that included all cells but debris. This proportion was then multiplied by total organ cell number to obtain the absolute number of  $\gamma\delta$  T cells and NK cells.

### Antibodies and flow cytometry

The following monoclonal antibodies were from BD Pharmingen: anti-CD3 $\epsilon$  (145–2C11), anti-TCR $\delta$  (GL3), anti-CD44 (IM7), anti-CD62L (MEL-14), anti-CD27 (LG.3A10), anti-NK1.1 (PK136) and anti-NKp46 (29A1.4). Anti-IFN $\gamma$  (XMG1.2), anti-CD107a (1D4B) and respective isotype control mAbs: Rat IgG1 $\kappa$  (eBRG1) and Rat IgG2a $\kappa$  (eBR2a) were purchased from eBioscience. Anti-V $\gamma$ 1 (2.11), anti-V $\gamma$ 4 (49.2) and anti-V $\gamma$ 7 (F2.64) mAbs were a kind gift from P. Pereira (Institut Pasteur, Paris). For flow cytometry analysis, immune cells were first incubated with anti-mouse CD16/32 (eBioscience) and stained with relevant antibodies and 7-AAD (BD Pharmingen). Fixed cells were acquired using a LSRFortessa (BD Biosciences), and analyzed using FlowJo software (Tree Star). For intracellular IFN $\gamma$  staining, cells were incubated in complete medium for 2h at 37°C; 10 $\mu$ g/ml of Brefeldin A (Sigma-Aldrich) was added during the last hour. Intracellular staining was performed after cell surface staining, using BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit and according to the manufacturer's instruction (BD Biosciences). For CD107a staining, cells were incubated in complete medium for 2h at 37°C; 10 $\mu$ g/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) and anti-CD107a or isotype control mAb were added during the last hour. Cells were then stained with relevant monoclonal antibodies.

### Bone marrow transplant experiments

Mice femora and tibia from CD3 $\epsilon^{+/-}$ , TCR $\alpha^{-/-}$ , TCR $\delta^{-/-}$  and CD3 $\epsilon^{-/-}$  were isolated and the BM was flushed with 1 ml of IMDM with FBS (1%). BM cells from one donor were injected to one CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (8–10 per group), intravenously (i.v.) through the retrobulbar sinus in a volume of 0.2 mL IMDM. Mice were conditioned by i.p. injections of Busulfan 22.5 mg/kg (Pierre Fabre laboratory) two days and one day prior to transplantation [59].

### Adoptive transfer experiments

10 TCR $\alpha^{-/-}$  mice were uninfected, or 14 days infected with 2.10<sup>3</sup> PFU of MCMV. Immune cells were prepared from spleens and pooled before  $\gamma\delta$  T cell sorting using the TCR $\gamma/\delta^+$  T Cell Isolation kit (Miltenyi Biotec). Purity was verified by flow cytometry and 8.10<sup>5</sup> to 1.10<sup>6</sup>  $\gamma\delta$  T cells i.v. transferred into CD3 $\epsilon^{-/-}$  or Rag $\alpha^{-/-}$  $\gamma$ c $\alpha^{-/-}$  recipients. 24h after  $\gamma\delta$  T cell transfer, recipient mice were infected i.p. with 2.10<sup>3</sup> PFU of MCMV and followed daily. 2–3 months after infection, recipient mice were sacrificed to verify the presence of  $\gamma\delta$ /NK cells in organs.

## Statistical analysis

Differences were evaluated by the Mann-Whitney test and represented as follows: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ .

## Supporting Information

**S1 Fig. Longitudinal follow-up of viral loads.**  $TCR\delta^{-/-}$ ,  $TCR\alpha^{-/-}$ ,  $CD3\epsilon^{+/-}$  and  $CD3\epsilon^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV. At indicated days post-infection, 4 mice of each mouse line were dissected and MCMV gB was quantified in organs as described in methods. The experiment was repeated 3 times under similar conditions. Results of 3 independent experiments are depicted as mean of 4 mice for each experiment. Statistical differences between day 3 and other time points are shown.

(TIF)

**S2 Fig. Gating strategy for flow cytometry analysis of  $\gamma\delta$  T cells.**  $TCR\alpha^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV and sacrificed at different time points. Immune cells were isolated from each organ and stained with indicated antibodies. Lymphoid cells were gated on forward and side scatters ( $P_1$ ) and 7-AAD<sup>neg</sup> viable cells ( $P_2$ ) were selected for the analysis of  $CD3\epsilon^+$  pan $\gamma\delta^+$  T cells ( $P_3$ ).  $P_3$  was used for subsequent analysis of V $\gamma$ 1 and V $\gamma$ 4 (or V $\gamma$ 7) expression. Data are from one representative mouse.

(TIF)

**S3 Fig. The CDR3 $\gamma$ 1 repertoire of liver-, spleen- and lung-derived  $\gamma\delta$  T cells does not change upon MCMV infection as assessed by spectratyping.** Mice (6 of each) were uninfected (Day 0) or infected 14 days with  $2.10^3$  PFU of MCMV. The liver, spleen and lungs were removed and the RNA prepared for spectratyping analysis as described in the materials and methods. Each box represents the CDR3 $\gamma$ 1 data of one different mouse. Above each box the corresponding mouse ID is indicated.

(TIF)

**S4 Fig. The CDR3 $\gamma$ 4 repertoire of liver-, spleen- and lung-derived  $\gamma\delta$  T cells does not change upon MCMV infection as assessed by spectratyping.** Mice (6 of each) were uninfected (Day 0) or infected 14 days with  $2.10^3$  PFU of MCMV. The liver, spleen and lungs were removed and the RNA prepared for spectratyping analysis as described in the materials and methods. Each box represents the CDR3 $\gamma$ 4 data of one different mouse. Above each box the corresponding mouse ID is indicated.

(TIF)

**S5 Fig.  $\gamma\delta$  T cells are not the main producers of IFN $\gamma$  and cytolytic granules during early acute MCMV infection.**  $TCR\alpha^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV. At indicated days post-infection, 5–9 mice were sacrificed and immune cells were prepared from each organ. **A.** Kinetics of absolute  $CD27^+$  and  $CD27^-$   $\gamma\delta$  T cell numbers. The proportions of  $CD27^+$  and  $CD27^-$   $\gamma\delta$  T cells among live cells were determined by flow cytometry analysis and reported to total organ cell counts. **B.** Total RNA was prepared and transcripts for indicated molecules were quantified as described in methods. These experiments were performed twice with comparable results and data are the means  $\pm$  SEM of 8–9 mice from one experiment. Statistical differences between day 0 and other time points are shown.

(TIF)

**S6 Fig. Gating strategy for flow cytometry analysis of IFN $\gamma$  producing  $\gamma\delta$  T cells and NK cells.**  $TCR\alpha^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV and sacrificed at different time points. Immune cells were isolated from each organ and stained with indicated antibodies.

Lymphoid cells were gated on forward and side scatters ( $P_1$ ) and 7-AAD<sup>-</sup> viable cells ( $P_2$ ) were selected for the analysis of CD3 $\epsilon^+$ pan $\gamma\delta^+$  T cells ( $P_3$ ) and CD3 $\epsilon^-$ NKp46<sup>+</sup> cells ( $P_5$ ). IFN $\gamma$ -producing  $\gamma\delta$  T cells ( $P_4$ ) were analysed among total  $\gamma\delta$  T cells ( $P_3$ ) or among live lymphocytes ( $P_2$ ). IFN $\gamma$ -producing NK cells ( $P_6$ ) were analysed among total NK cells ( $P_5$ ) or among live lymphocytes ( $P_2$ ). Data are from the liver of one representative mouse.

(TIF)

**S7 Fig.  $\gamma\delta$  T cells are not the main cytotoxic effectors during acute MCMV infection**

**TCR $\alpha^{-/-}$  mice were infected i.p. with  $2.10^3$  PFU of MCMV.** At indicated days post-infection, 6–8 mice were sacrificed and immune cells were prepared from each organ for flow cytometry analysis. The proportions of CD107a<sup>+</sup> for each CD3 $\epsilon^-$ NKp46<sup>+</sup> (NK) or CD3 $\epsilon^+$  $\gamma\delta^+$  ( $\gamma\delta$ ) cell subtype are shown, as well as percentages of CD107a<sup>+</sup> NK and CD107a<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells among lymphocytes. Data are from 1 representative of 2 independent experiments and are expressed as the mean percentages  $\pm$  SEM of 6–8 mice. Statistical differences between day 0 and other time points are indicated.

(TIF)

**S8 Fig.  $\gamma\delta$  T cells are present in the liver, spleen and lungs of adoptively transferred mice.**

$\gamma\delta$  T cells from uninfected or 14-days infected TCR $\alpha^{-/-}$  mice were purified and i.v. transferred ( $8-9.10^5$  cells, 92–93% purity) into CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice (8–9 recipients). 24h after transfer, reconstituted CD3 $\epsilon^{-/-}$  mice were challenged with  $2.10^3$  PFU of MCMV and monitored daily for mortality. 3 naïve  $\gamma\delta$  T cells transferred mice were sacrificed at day 26 just before death (anticipated by defined signs of infection such as piloerection) and all MCMV-primed  $\gamma\delta$  T cells transferred mice were sacrificed at day 62 (end of the experiment). Immune cells were prepared from liver, spleen and lungs for flow cytometry analysis of live (7AAD<sup>-</sup>) CD3 $\epsilon^+$  $\gamma\delta^+$  cells. Data are from one representative mouse for each group.

(TIF)

**Acknowledgments**

We thank Pr François Moreau-Gaudry for the liver aminotransferase assays, Drs. Marie and Bernard Malissen for providing TCR $\delta^{-/-}$  mice [56], Dr. Di Santo for providing Rag $^{-/-}$  $\gamma_c^{-/-}$  mice and Dr. P Pereira for providing  $\gamma\delta$  T cell subset specific antibodies. We are also grateful to Dr. JL Taupin for helpful discussions, to Santiago Gonzalez and Vincent Pitard for expert assistance in flow cytometry (Plateforme de Cytométrie en Flux, SFR TransBioMed, Université Bordeaux Segalen), and we thank Jennifer Howard for careful reading of the manuscript.

**Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: CK SN AV PD DV MC VP JDM. Performed the experiments: CK SN BR SD AG MJ AV MC. Analyzed the data: CK SN AV PD DV MC JDM JFM. Wrote the paper: MC JDM.

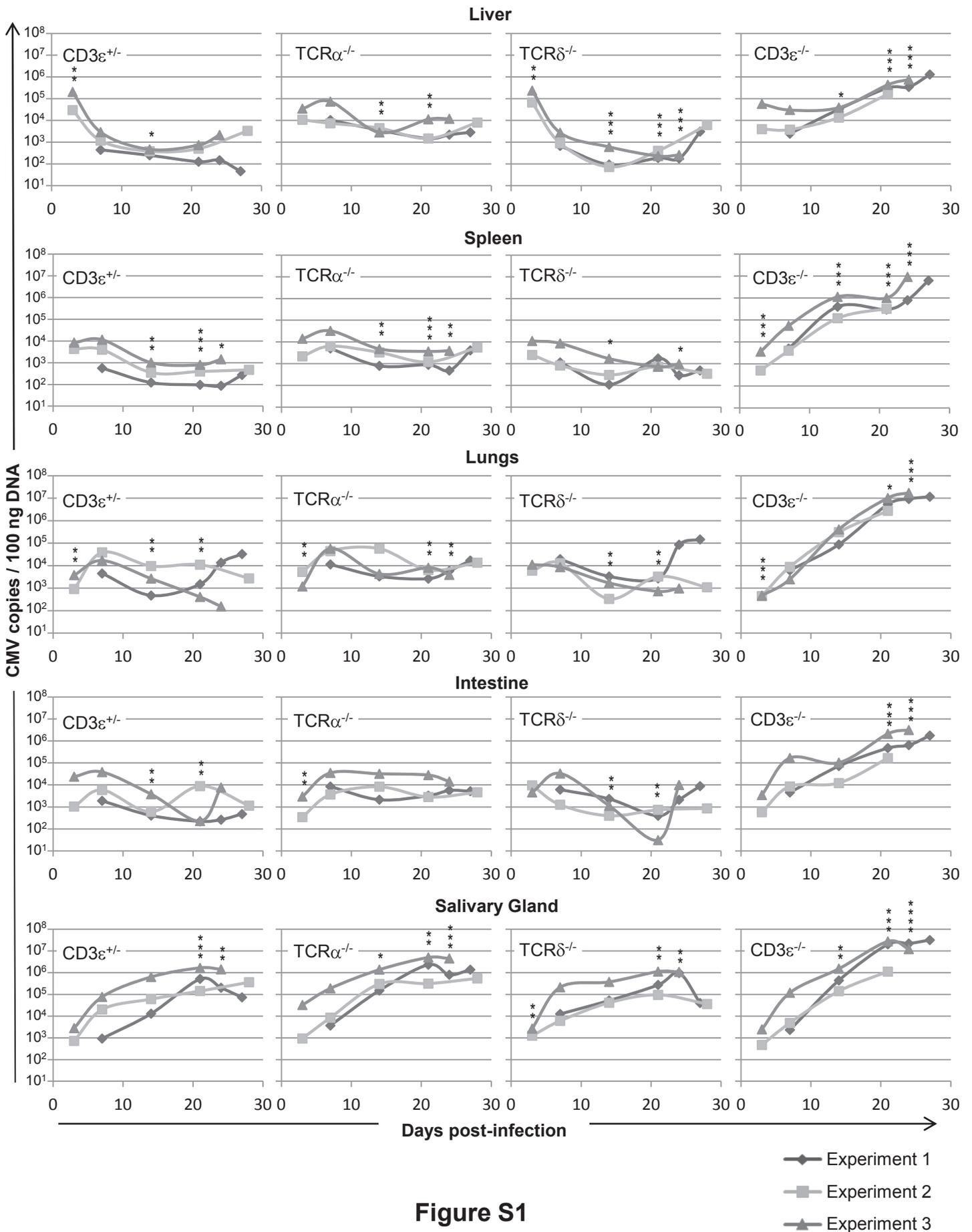
**References**

1. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, et al. (2000) Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95: 2240–2245. PMID: [10733491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10733491/)
2. Craddock C, Szydlo RM, Dazzi F, Olavarria E, Cwynarski K, et al. (2001) Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after T-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored graft-versus-host disease prophylaxis. *Br J Haematol* 112: 228–236. PMID: [11167809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11167809/)

3. Schmidt-Hieber M, Labopin M, Beelen D, Volin L, Ehninger G, et al. (2013) CMV serostatus has still an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the acute leukemia working party of EBMT. *Blood* 122: 3359–3364. doi: [10.1182/blood-2013-05-499830](https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-499830) PMID: [24037724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24037724/)
4. Crough T, Khanna R (2009) Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 22: 76–98, Table of Contents. doi: [10.1128/CMR.00034-08](https://doi.org/10.1128/CMR.00034-08) PMID: [19136435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19136435/)
5. Dechanet J, Merville P, Lim A, Retiere C, Pitard V, et al. (1999) Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 103: 1437–1449. PMID: [10330426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10330426/)
6. Ehl S, Schwarz K, Enders A, Duffner U, Pannicke U, et al. (2005) A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J Clin Invest* 115: 3140–3148. PMID: [16211094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16211094/)
7. Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, Liesnard C, Tackoen M, et al. (2010) Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med* 207: 807–821. doi: [10.1084/jem.20090348](https://doi.org/10.1084/jem.20090348) PMID: [20368575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20368575/)
8. Fornara C, Lilleri D, Revello MG, Furione M, Zavattoni M, et al. (2011) Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and gammadelta T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Clin Immunol* 31: 1054–1064. doi: [10.1007/s10875-011-9577-8](https://doi.org/10.1007/s10875-011-9577-8) PMID: [21847524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21847524/)
9. Knight A, Madrigal AJ, Grace S, Sivakumaran J, Kottaridis P, et al. (2010) The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 116: 2164–2172. doi: [10.1182/blood-2010-01-255166](https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-255166) PMID: [20576814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20576814/)
10. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, et al. (2008) Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 112: 1317–1324. doi: [10.1182/blood-2008-01-136713](https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-136713) PMID: [18539896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18539896/)
11. Roux A, Mourin G, Larsen M, Fastenackels S, Urrutia A, et al. (2013) Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the gammadelta T Cell Compartment. *J Immunol* 191: 1300–1306. doi: [10.4049/jimmunol.1202940](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202940) PMID: [23817410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23817410/)
12. Wistuba-Hamprecht K, Frasca D, Blomberg B, Pawelec G, Derhovanessian E (2013) Age-associated alterations in gammadelta T-cells are present predominantly in individuals infected with Cytomegalovirus. *Immun Ageing* 10: 26. doi: [10.1186/1742-4933-10-26](https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-26) PMID: [23822093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23822093/)
13. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, et al. (2001) Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 184: 533–541. PMID: [11494158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11494158/)
14. Couzi L, Pitard V, Netzer S, Garrigue I, Lafon ME, et al. (2009) Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* 200: 1415–1424. doi: [10.1086/644509](https://doi.org/10.1086/644509) PMID: [19780672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19780672/)
15. Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, et al. (2005) Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 201: 1567–1578. PMID: [15897274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15897274/)
16. Couzi L, Pitard V, Sicard X, Garrigue I, Hawchar O, et al. (2012) Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). *Blood* 119: 1418–1427. doi: [10.1182/blood-2011-06-363655](https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-363655) PMID: [22180442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22180442/)
17. Vantourout P, Hayday A (2013) Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 13: 88–100. doi: [10.1038/nri3384](https://doi.org/10.1038/nri3384) PMID: [23348415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23348415/)
18. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, et al. (2012) Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* 13: 872–879. doi: [10.1038/ni.2394](https://doi.org/10.1038/ni.2394) PMID: [22885985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22885985/)
19. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK (2010) Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10: 467–478. doi: [10.1038/nri2781](https://doi.org/10.1038/nri2781) PMID: [20539306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20539306/)
20. Scheper W, van Dorp S, Kersting S, Pietersma F, Lindemans C, et al. (2013) gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* 27: 1328–1338. doi: [10.1038/leu.2012.374](https://doi.org/10.1038/leu.2012.374) PMID: [23277330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23277330/)
21. Couzi L, Levailant Y, Jamai A, Pitard V, Lassalle R, et al. (2010) Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 21: 181–188. doi: [10.1681/ASN.2008101072](https://doi.org/10.1681/ASN.2008101072) PMID: [19713314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19713314/)
22. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, Park BS, Chiang KY, et al. (2007) Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially

- mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: 751–757. PMID: [17450185](#)
23. Behrendt CE, Rosenthal J, Bolotin E, Nakamura R, Zaia J, et al. (2009) Donor and recipient CMV serostatus and outcome of pediatric allogeneic HSCT for acute leukemia in the era of CMV-preemptive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 54–60. doi: [10.1016/j.bbmt.2008.10.023](#) PMID: [19135943](#)
  24. Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trenscheil R, et al. (2011) Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 118: 1402–1412. doi: [10.1182/blood-2010-08-304121](#) PMID: [21540462](#)
  25. Krmpotic A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S (2003) Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect* 5: 1263–1277. PMID: [14623023](#)
  26. Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, Hamano S, Yoshida H, et al. (2000) Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology* 99: 187–194. PMID: [10692035](#)
  27. Trgovcich J, Stimac D, Polic B, Krmpotic A, Pernjak-Pugel E, et al. (2000) Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. *Arch Virol* 145: 2601–2618. PMID: [11205107](#)
  28. Renard V, Ardouin L, Malissen M, Milon G, Lebastard M, et al. (1995) Normal development and function of natural killer cells in CD3 epsilon delta 5/delta 5 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7545–7549. PMID: [7638228](#)
  29. Heilig JS, Tonegawa S (1986) Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 322: 836–840. PMID: [2943999](#)
  30. Philpott KL, Viney JL, Kay G, Rastan S, Gardiner EM, et al. (1992) Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* 256: 1448–1452. PMID: [1604321](#)
  31. Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, et al. (2009) CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* 10: 427–436. doi: [10.1038/ni.1717](#) PMID: [19270712](#)
  32. Schmolka N, Serre K, Grosso AR, Rei M, Pennington DJ, et al. (2013) Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* 14: 1093–1100. doi: [10.1038/ni.2702](#) PMID: [23995235](#)
  33. Loh J, Chu DT, O'Guin AK, Yokoyama WM, Virgin HW (2005) Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J Virol* 79: 661–667. PMID: [15596864](#)
  34. Gardner T, Chen Q, Jin Y, Ajuebor MN (2009) Characterization of the role of TCR gammadelta in NK cell accumulation during viral liver inflammation. *Exp Mol Pathol* 86: 32–35. doi: [10.1016/j.yexmp.2008.10.005](#) PMID: [19028491](#)
  35. Dokun AO, Kim S, Smith HR, Kang HS, Chu DT, et al. (2001) Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* 2: 951–956. PMID: [11550009](#)
  36. Robbins SH, Tessmer MS, Mikayama T, Brossay L (2004) Expansion and contraction of the NK cell compartment in response to murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 173: 259–266. PMID: [15210783](#)
  37. Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, Hendricks RL, Bluestone JA (1997) T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. *J Exp Med* 185: 1969–1975. PMID: [9166426](#)
  38. Smith AL, Hayday AC (2000) An alphabeta T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by gammadelta cells. *Immunology* 101: 325–332. PMID: [11106935](#)
  39. Morgan NV, Goddard S, Cardno TS, McDonald D, Rahman F, et al. (2011) Mutation in the TCRalpha subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRalphabeta+ T cells. *J Clin Invest* 121: 695–702. doi: [10.1172/JCI41931](#) PMID: [21206088](#)
  40. Ramsburg E, Tigelaar R, Craft J, Hayday A (2003) Age-dependent requirement for gammadelta T cells in the primary but not secondary protective immune response against an intestinal parasite. *J Exp Med* 198: 1403–1414. PMID: [14597739](#)
  41. Vermijlen D, Prinz I (2014) Ontogeny of Innate T Lymphocytes—Some Innate Lymphocytes are More Innate than Others. *Front Immunol* 5: 486. doi: [10.3389/fimmu.2014.00486](#) PMID: [25346734](#)
  42. Hsu KM, Pratt JR, Akers WJ, Achilefu SI, Yokoyama WM (2009) Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol* 90: 33–43. doi: [10.1099/vir.0.006668-0](#) PMID: [19088270](#)

43. Sumaria N, van Dommelen SL, Andoniou CE, Smyth MJ, Scalzo AA, et al. (2009) The roles of interferon-gamma and perforin in antiviral immunity in mice that differ in genetically determined NK-cell-mediated antiviral activity. *Immunol Cell Biol* 87: 559–566. doi: [10.1038/icb.2009.41](https://doi.org/10.1038/icb.2009.41) PMID: [19564888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19564888/)
44. Dieli F, Ivanyi J, Marsh P, Williams A, Naylor I, et al. (2003) Characterization of lung gamma delta T cells following intranasal infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol* 170: 463–469. PMID: [12496432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496432/)
45. Kirby AC, Newton DJ, Carding SR, Kaye PM (2007) Evidence for the involvement of lung-specific gammadelta T cell subsets in local responses to *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* 37: 3404–3413. PMID: [18022862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18022862/)
46. Dodd J, Riffault S, Kodituwakku JS, Hayday AC, Openshaw PJ (2009) Pulmonary V gamma 4+ gamma delta T cells have proinflammatory and antiviral effects in viral lung disease. *J Immunol* 182: 1174–1181. PMID: [19124761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19124761/)
47. Huber SA, Graveline D, Newell MK, Born WK, O'Brien RL (2000) V gamma 1+ T cells suppress and V gamma 4+ T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Immunol* 165: 4174–4181. PMID: [11035049](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11035049/)
48. Welte T, Lamb J, Anderson JF, Born WK, O'Brien RL, et al. (2008) Role of two distinct gammadelta T cell subsets during West Nile virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 275–283. doi: [10.1111/j.1574-695X.2008.00430.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00430.x) PMID: [18513355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18513355/)
49. Sandstrom A, Scharf L, McRae G, Hawk AJ, Meredith SC, et al. (2012) gammadelta T cell receptors recognize the non-classical major histocompatibility complex (MHC) molecule T22 via conserved anchor residues in a MHC peptide-like fashion. *J Biol Chem* 287: 6035–6043. doi: [10.1074/jbc.M111.333153](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333153) PMID: [22215668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22215668/)
50. Andrew EM, Newton DJ, Dalton JE, Egan CE, Goodwin SJ, et al. (2005) Delineation of the function of a major gamma delta T cell subset during infection. *J Immunol* 175: 1741–1750. PMID: [16034115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16034115/)
51. Sheridan BS, Romagnoli PA, Pham QM, Fu HH, Alonzo F 3rd, et al. (2013) gammadelta T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues. *Immunity* 39: 184–195. doi: [10.1016/j.immuni.2013.06.015](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.015) PMID: [23890071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23890071/)
52. Murphy AG, O'Keeffe KM, Lalor SJ, Maher BM, Mills KH, et al. (2014) *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of memory gammadelta T cells that are protective against subsequent infection. *J Immunol* 192: 3697–3708. doi: [10.4049/jimmunol.1303420](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303420) PMID: [24623128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24623128/)
53. Min-Oo G, Kamimura Y, Hendricks DW, Nabekura T, Lanier LL (2013) Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol* 34: 251–258. doi: [10.1016/j.it.2013.02.005](https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.005) PMID: [23499559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23499559/)
54. Malissen M, Gillet A, Ardouin L, Bouvier G, Trucy J, et al. (1995) Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* 14: 4641–4653. PMID: [7588594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7588594/)
55. Goldman JP, Blundell MP, Lopes L, Kinnon C, Di Santo JP, et al. (1998) Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br J Haematol* 103: 335–342. PMID: [9827902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9827902/)
56. Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, Iacomini J, Nelson A, et al. (1993) T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell* 72: 337–348. PMID: [8381716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8381716/)
57. Sauer KA, Scholtes P, Karwot R, Finotto S (2006) Isolation of CD4+ T cells from murine lungs: a method to analyze ongoing immune responses in the lung. *Nat Protoc* 1: 2870–2875. PMID: [17406546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406546/)
58. Capone M, Lees RK, Finke D, Ernst B, Meerwijk JP, et al. (2003) Selective absence of CD8+ TCRalpha beta+ intestinal epithelial cells in transgenic mice expressing beta2-microglobulin-associated ligands exclusively on thymic cortical epithelium. *Eur J Immunol* 33: 1471–1477. PMID: [12778464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12778464/)
59. Robert-Richard E, Ged C, Ortet J, Santarelli X, Lamrissi-Garcia I, et al. (2006) Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. *Haematologica* 91: 1384. PMID: [17018389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17018389/)



**Figure S1**

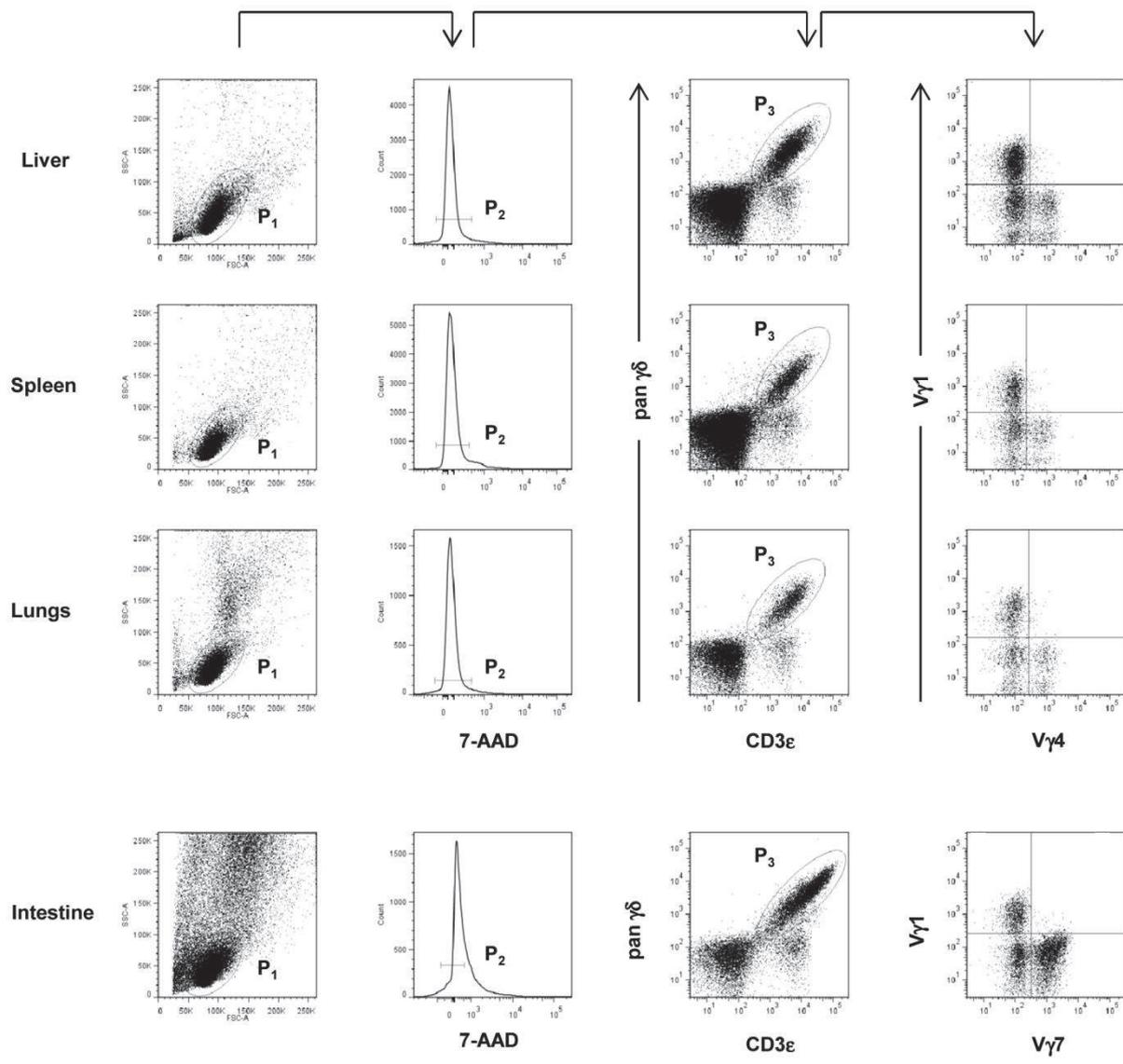
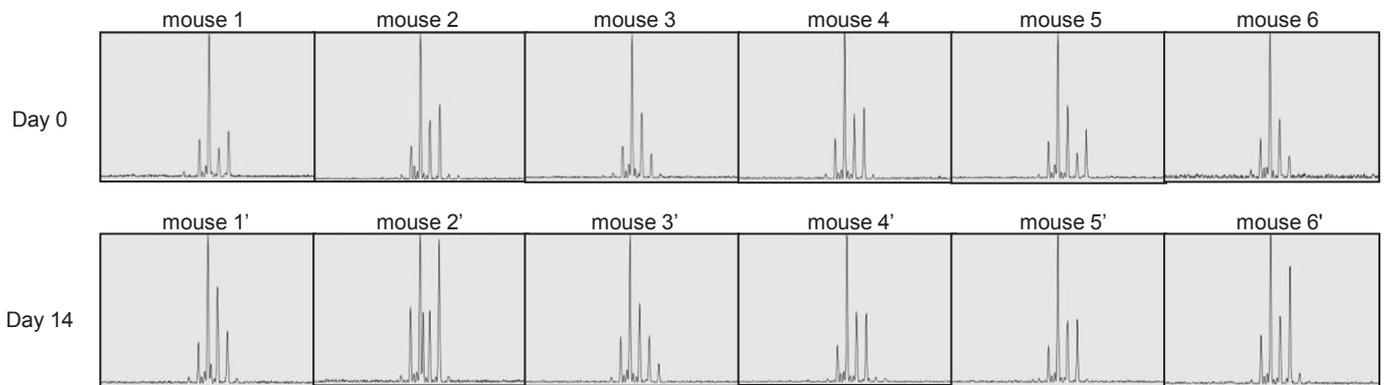


Figure S2

Liver CDR3 $\gamma$ 1



Spleen CDR3 $\gamma$ 1



Lungs CDR3 $\gamma$ 1

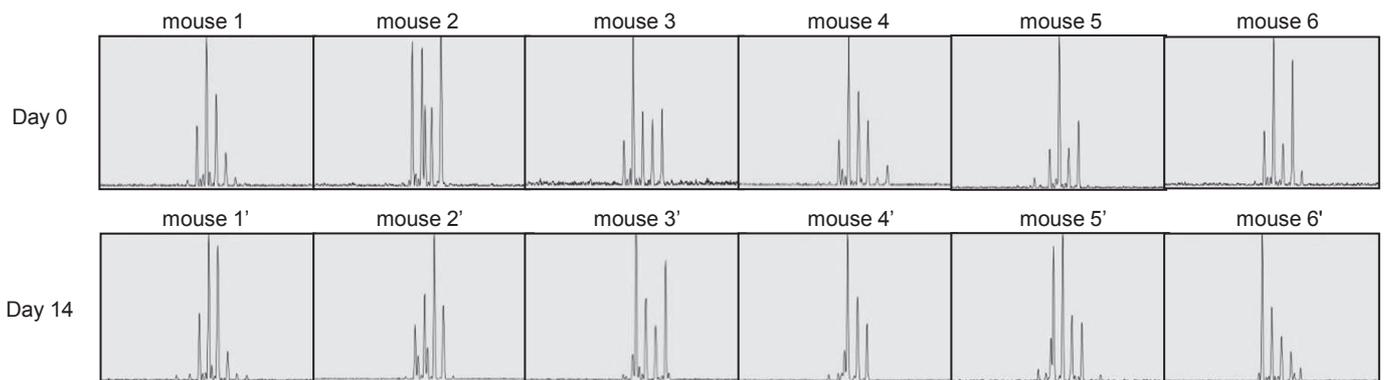
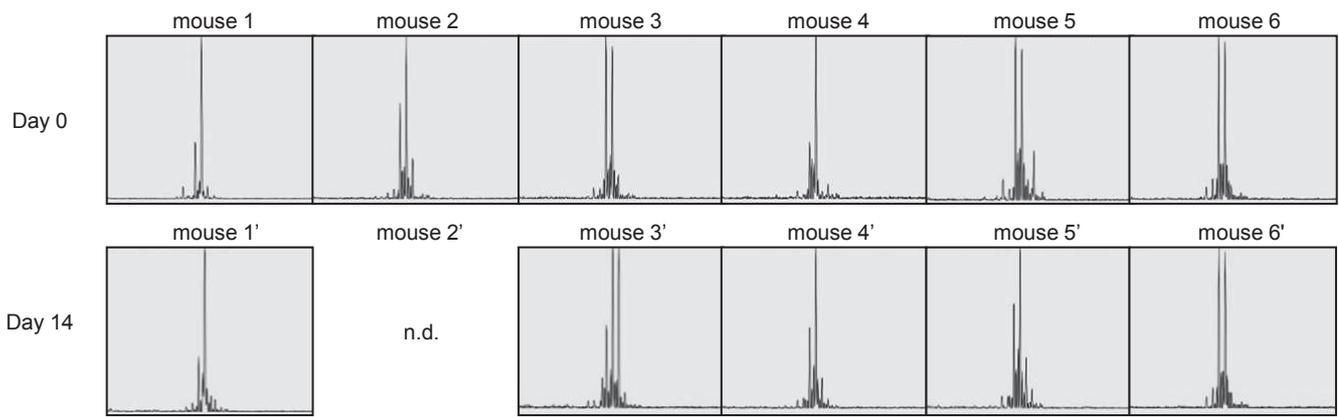
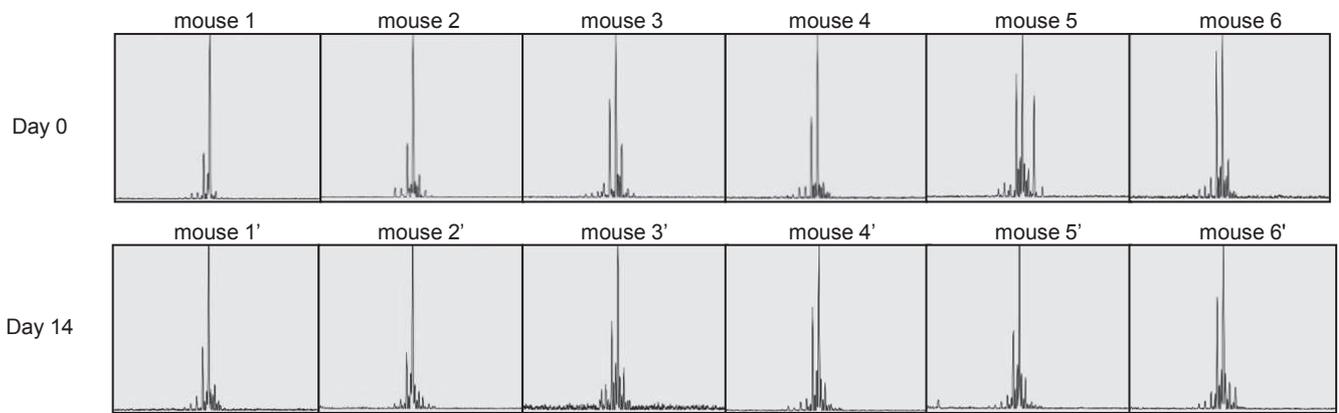


Figure S3

Liver CDR3 $\gamma$ 4



Spleen CDR3 $\gamma$ 4



Lungs CDR3 $\gamma$ 4

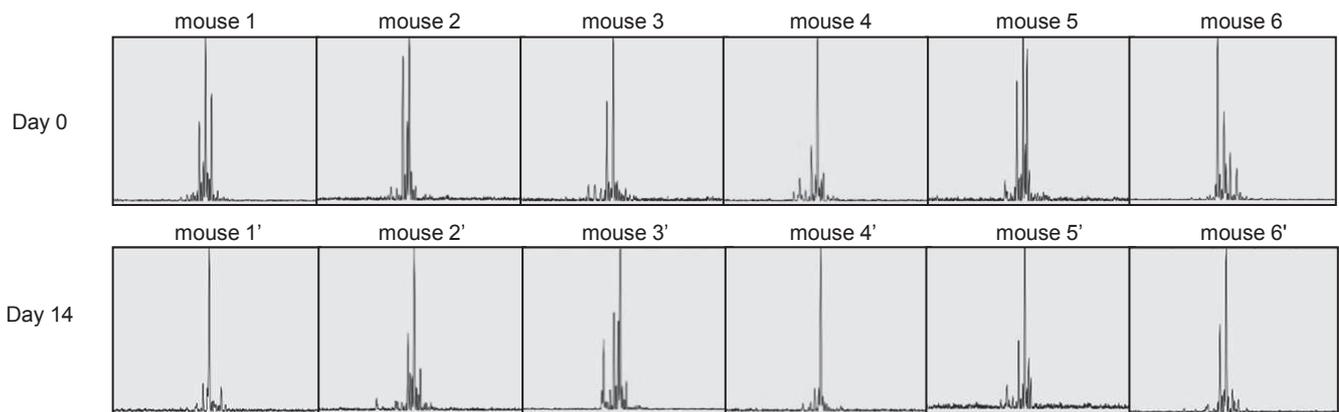
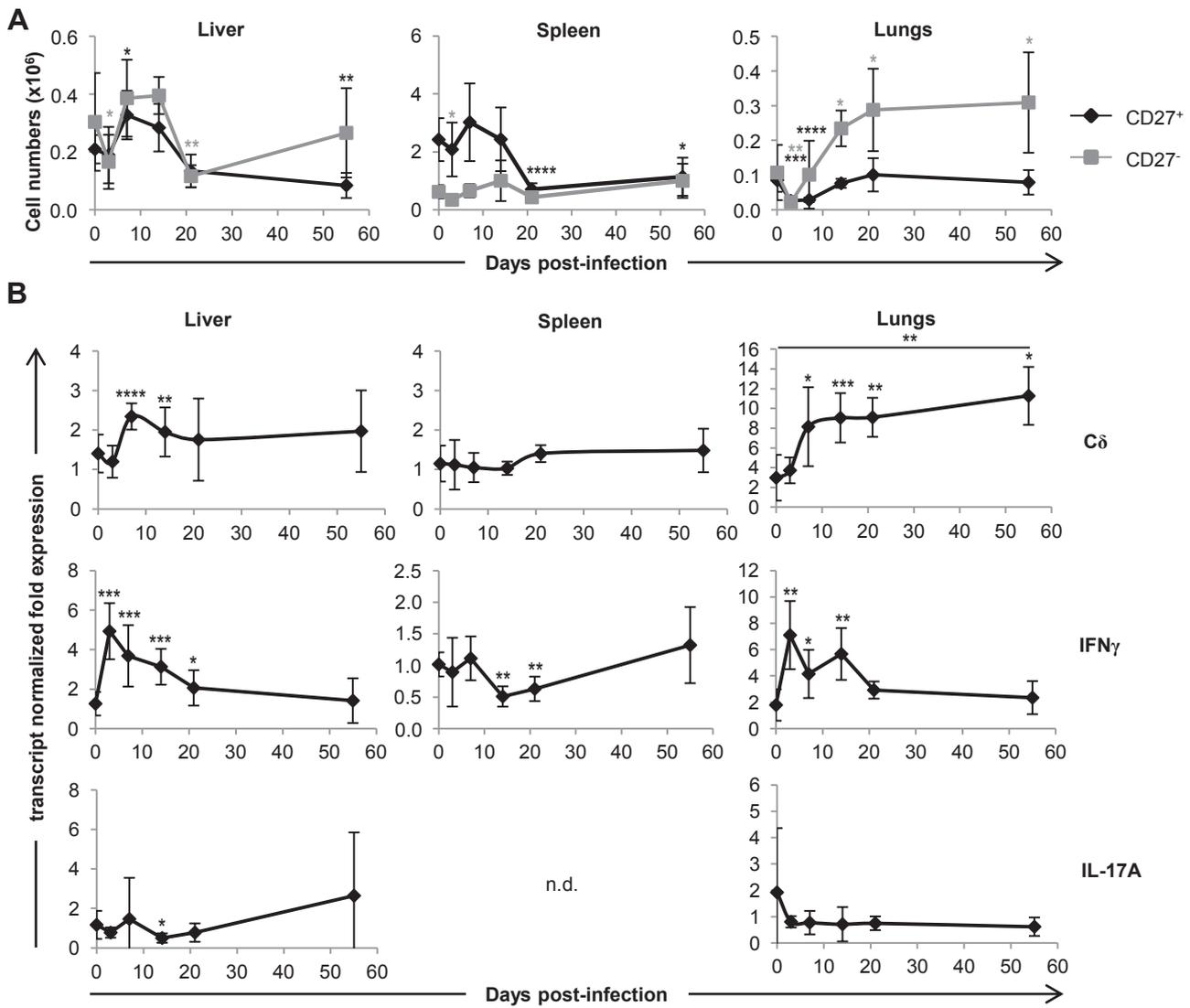
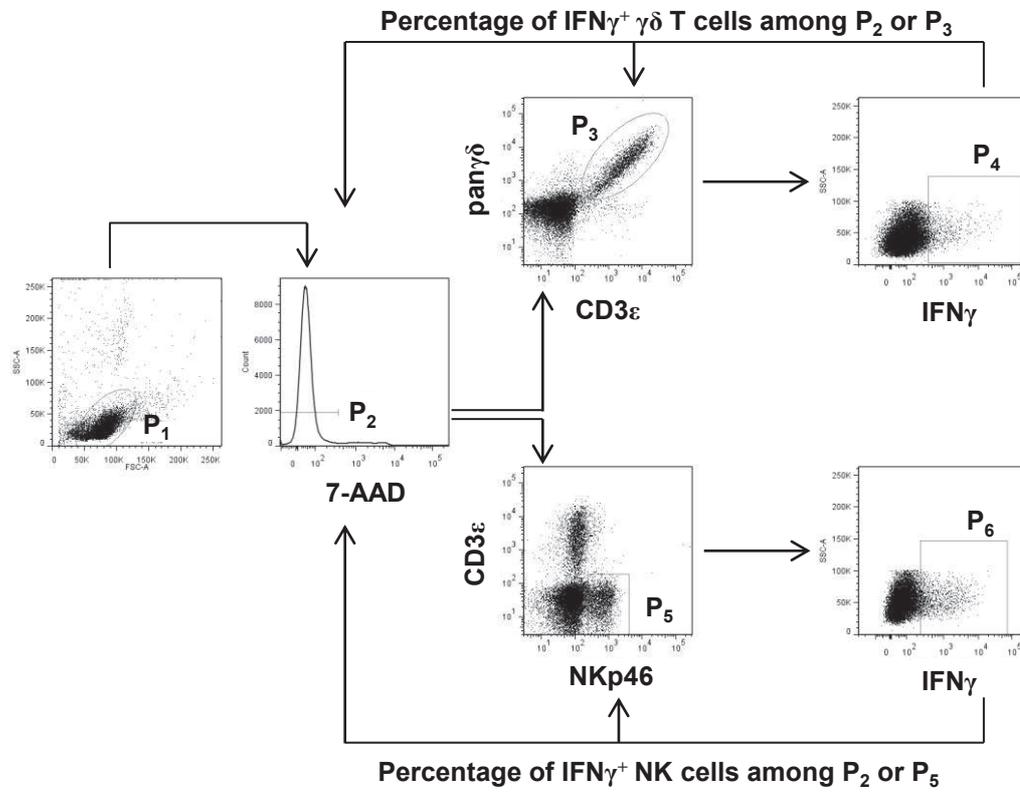


Figure S4



**Figure S5**



**Figure S6**

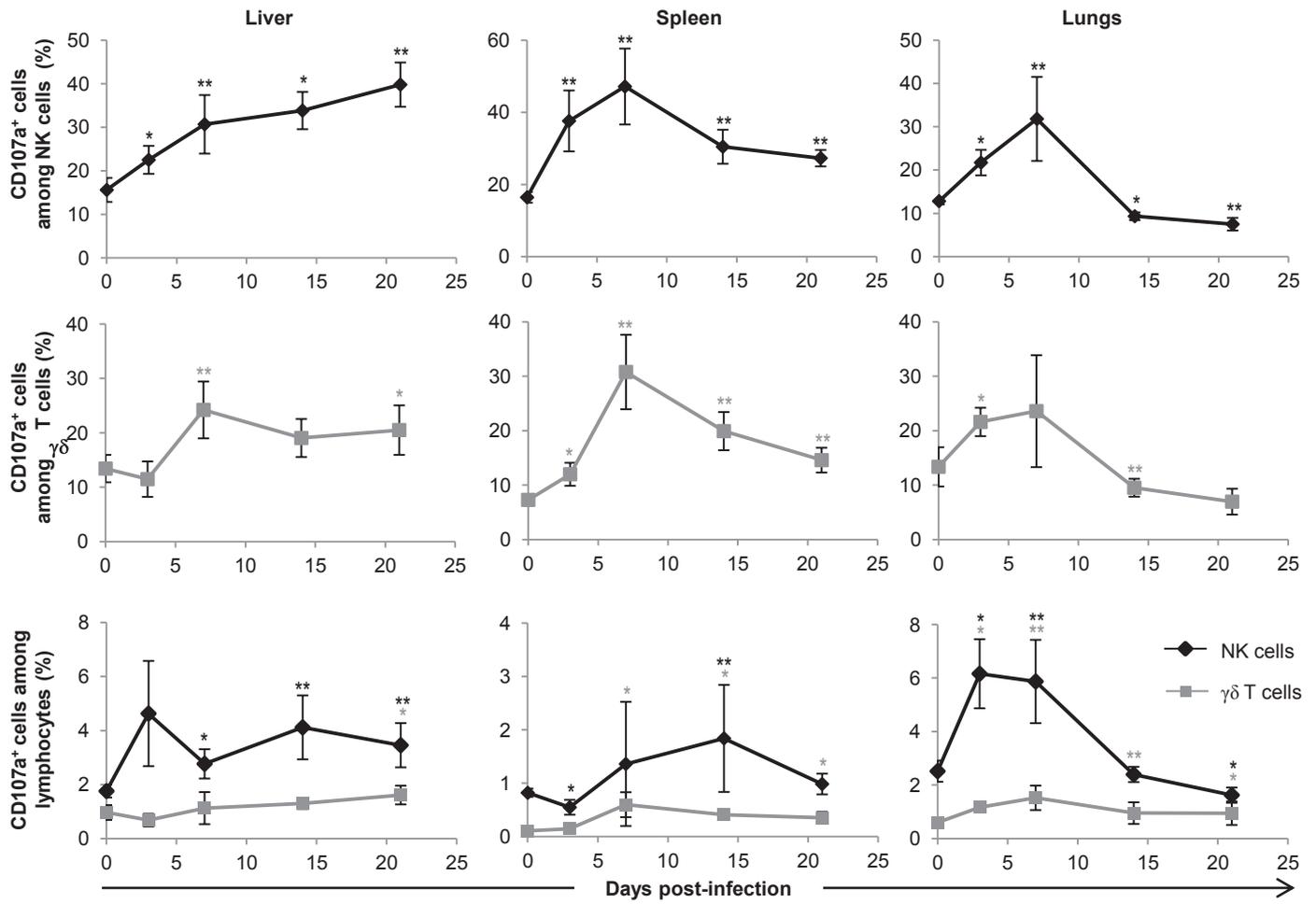
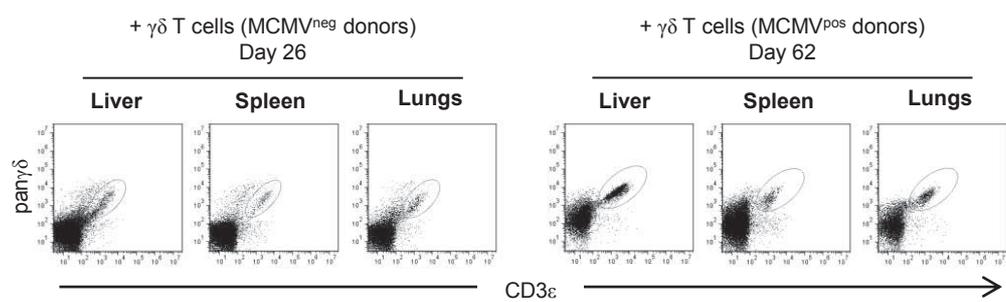


Figure S7



**Figure S8**

## B. Discussion

Notre étude a mis en évidence le rôle protecteur anti-viral des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins contre la mort induite par le CMV dans un contexte d'immunodéficience lié à l'absence des lymphocytes T  $\alpha\beta$  dans les souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  (Figure 1A), et également à l'absence de lymphocytes B, d'ILC et de NK lors de transferts de lymphocytes T  $\gamma\delta$  purifiés à des souris  $\text{Rag}^{-/-}\gamma\text{c}^{-/-}$  (Figure 8). Les résultats obtenus par Sell et collègues confirment le rôle protecteur des lymphocytes T  $\gamma\delta$  qui protègent les souris de la mort induite par le MCMV en absence d'immunité lymphocytaire T  $\alpha\beta$   $\text{CD8}^+$ , B et NK (Annexe 1) (Figure 1C - Sell et al., 2015). Ces résultats mettent en évidence l'importance que peuvent prendre les lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans des contextes où la réponse T  $\alpha\beta$  est compromise. Ils sont confortés par les observations réalisées chez des enfants SCID ou des enfants ayant une mutation TRAC (TCR $\alpha$  subunit constant gene) qui, malgré leurs déficiences, sont protégés contre le CMV ou d'autres agents infectieux, et ce probablement grâce aux lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Ehl et al., 2005)(de Villartay et al., 2005)(Morgan et al., 2011). Il serait intéressant de tester si dans des conditions d'immunosuppression induite, c'est-à-dire en traitant des souris WT par des agents immunosuppresseurs, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  seraient plus résistants que les lymphocytes T  $\alpha\beta$  vis-à-vis du traitement immunosuppresseur et/ou s'ils repeuplent plus rapidement les souris et pourraient ainsi avoir un rôle antiviral primordial. Ce modèle nous rapprocherait des conditions des patients transplantés en étant dans des conditions d'immunodéficience moins drastiques que les cas mentionnés ci-dessus, et dans lequel les lymphocytes T  $\alpha\beta$  seraient malgré tout compromis.

L'effet protecteur des lymphocytes T  $\gamma\delta$  semble être lié à leur capacité à limiter la réplication virale. En effet, nos résultats montrent que dans les souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$ , les lymphocytes T  $\gamma\delta$  contrôlent la charge virale dans les différents organes cibles du MCMV que sont le foie, la rate, les poumons et les intestins (Figure 2 et S1). Ils semblent également réduire les dommages tissulaires puisque après infection, les souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  présentent nettement moins de granulomes hépatiques et pulmonaires que les souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$ ; ce qui est probablement en relation avec le contrôle de la charge virale par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans les souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  (Figure 3). Il en est de même dans l'étude de l'équipe de M. Mach et T. Winkler où le transfert adoptif de lymphocytes T  $\gamma\delta$  à des souris  $\text{RAG}^{-/-}$  infectées est suffisant pour éliminer le virus (Annexe 1)(Figure 2D - Sell et al., 2015). La diminution de la charge virale est concomitante à l'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans différents organes cibles de l'infection. Celle-ci est observée à partir du 7<sup>ème</sup> jour d'infection et semblent même se maintenir jusqu'au jour 56 post-infection dans les poumons (Figure 4A). Cette amplification, également observée dans les expériences de Sell et collègues, est probablement due à une prolifération des cellules dans les organes comme il a été montré par l'incorporation de la bromodéoxyuridine (BrdU)(Figure 5 - Sell et al., 2015). Ces résultats montrent donc que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  s'expandent dans différents organes cibles du CMV chez la souris, et complètent les données montrant une amplification des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $\text{V}\delta 2^{\text{neg}}$  sanguins chez l'homme (Déchanet et al., 1999b)(Pitard et al., 2008). Il est donc envisageable que les

lymphocytes T  $\gamma\delta$  soient mobilisés *in situ* contre le CMV et qu'ils migrent ensuite au niveau du compartiment sanguin où ils se maintiennent à long terme.

Dans de nombreux modèles murins d'infection virales, dont des modèles d'infection par des virus herpétiques (HSV1 et 2), les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont capables de protéger les souris d'une mort liée à l'infection par la production d'IFN $\gamma$  (Sciammas et al., 1997)(Kodukula et al., 1999)(Nishimura et al., 2004). Dans notre modèle tout comme celui de Sell et collègues, les lymphocytes  $\gamma\delta$  produisent précocement (dès le jour 3) de l'IFN $\gamma$  (Figure 7A). Cependant, nous avons montré que la majeure partie de l'IFN $\gamma$  est produite par les cellules NK dans tous les organes testés (Figure 7B) et les résultats de Sell et collègues montrent que l'injection d'un anticorps neutralisant l'IFN $\gamma$  n'altère pas la protection conférée par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Figure 4B - Sell et al., 2015). L'effet protecteur de ces cellules semble ainsi reposer sur un autre mécanisme. Celui-ci pourrait dépendre de la fonction cytotoxique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  : en effet, nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules exprimant en surface le marqueur CD107a dès le 3<sup>ème</sup> jour d'infection dans différents organes, suggérant une dégranulation précoce des lymphocytes T  $\gamma\delta$  *in situ* (Figure S7). Cette activité cytotoxique a également été montrée par Sell et collègues *ex vivo* par un test de relargage du chrome 51, dans lequel l'incubation de lymphocytes T  $\gamma\delta$  induits par l'infection avec des fibroblastes murins infectés résulte en une lyse de ces derniers (Figure 2A - Sell et al., 2015). Il est donc possible que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  puissent participer directement à l'élimination des cellules infectées par le MCMV dès les premiers jours d'infection mais la relevance de cette activité cytotoxique dans la protection à long terme n'a pas été évaluée. Cependant, notre étude montre que les principaux effecteurs cytotoxiques sont les cellules NK. Il est donc envisageable que comme l'IFN $\gamma$ , la cytotoxicité ne soit pas la fonction anti-virale principale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins au cours de l'infection à MCMV. L'ensemble de ces éléments montrent donc que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins sont capables de produire de l'IFN $\gamma$  et d'avoir une activité cytotoxique au cours de l'infection à CMV, comme il a été montré pour leurs homologues humains. Ils suggèrent également que ces fonctions ne sont pas indispensables à la protection des souris, et laissent penser que l'activité anti-virale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est basée sur une autre de leurs nombreuses fonctions.

Dans notre étude, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  acquièrent de manière concomitante à leur expansion un phénotype CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>, qui est maintenu à long terme et décrit comme caractéristique des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> murins effecteurs mémoires dans l'infection à CMV et d'autres infections (Figure 4B et C)(Snyder et al., 2008)(Henao-Tamayo et al., 2010). Ce phénotype rappelle le phénotype TEMRA exprimé par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> et T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> humains induits par le CMV et suggère donc que les virus humains et murins sont capables d'activer de manière comparable ces effecteurs immunitaires et de les maintenir à long terme. Cette activation se traduit par la capacité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  isolés de souris TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> infectées depuis 14 jours et transférés à des souris CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> à protéger ces dernières de la mort induite par le CMV, contrairement aux cellules isolées de souris naïves (Figure 6C). D'autre part, chez des souris TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> infectées depuis 21 jours, les

lymphocytes T  $\gamma\delta$  induits par le MCMV sont capables de répondre rapidement lors d'une infection secondaire et d'éliminer de façon efficace le virus (Annexe 1)(Figure S4 - Sell et al., 2015), comme il a déjà été montré chez l'homme (Pitard et al., 2008). Ces résultats sont en faveur d'une réponse mémoire des lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Cependant, nous savons que dans ces souris le virus n'est pas encore complètement éliminé après 14 ou 21 jours d'infection (Figure 2). Il est donc possible que la présence du virus suffise à maintenir les lymphocytes T  $\gamma\delta$  activés et capables de contrôler très rapidement le virus, sans pour autant avoir une fonction de cellule mémoire. Un autre élément est cependant en faveur d'une réponse mémoire T  $\gamma\delta$  : le transfert de lymphocytes T  $\gamma\delta$  isolés de souris infectées depuis 6 semaines à des souris sensibles vis-à-vis du CMV est suffisant pour les protéger de l'infection (Figure 2D - Sell et al., 2015). Peu d'études décrivent la fonction mémoire des lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins et ont été réalisées dans des modèles d'infection bactériennes, où l'agent pathogène est éliminé de l'organisme avant que l'infection secondaire soit faite (Sheridan et al., 2013)(Murphy et al., 2014). Dans le cas du CMV, le virus n'est pas éliminé mais se maintient dans son hôte sans produire de particules infectieuses au cours de la phase de latence, qui semble s'établir au bout des 3 mois chez la souris. Il serait donc intéressant d'induire une réactivation du virus ou de réaliser une infection secondaire tardive, pour éviter que le virus injecté lors de la primo-infection ne continue d'activer les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et ainsi pouvoir réellement évaluer la capacité mémoire des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .

La répartition tissulaire des différentes sous-populations de lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins « innate-like » et adaptatives (dérivées de la moelle osseuse) est bien définie et différente d'un organe à l'autre (voir Introduction page 20). Les organes cibles du MCMV que nous avons étudiés contiennent tous au moins une des deux sous-populations adaptatives que sont les lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  et  $V\gamma 4^+$ . En suivant l'évolution de ces sous-populations au cours de l'infection, nous avons pu noter une expansion de la sous-population T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  surtout au niveau du foie et des poumons, et dans une moindre mesure de la sous-population T  $\gamma\delta$   $V\gamma 4^+$  (Figure 5A). Ces résultats rappellent très clairement la mobilisation de différentes sous-populations de lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\delta 2^{neg}$  chez les individus infectés, qui peuvent exprimer la chaîne  $V\delta 1$ ,  $V\delta 3$  ou  $V\delta 5$  (Déchanet et al., 1999b). L'importance des cellules T  $V\gamma 1^+$  et  $V\gamma 4^+$  murines a été évaluée en greffant de la moelle osseuse d'une souris  $TCR\alpha^{-/-}$  à une souris  $CD3\epsilon^{-/-}$ . Dans ces conditions, les lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  et  $V\gamma 4^+$  sont régénérés en majorité, les autres sous-populations n'étant produites que lors de la vie foetale (Carding et al., 2002). Les souris greffées survivent à l'infection par le MCMV montrant que les lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  et/ou  $V\gamma 4^+$  sont responsables de la protection de ces souris (Figure 6B). Bien que nous n'ayons pas vu de restriction du répertoire TCR de ces cellules à jour 14 (Figures S3 et S4), des clones exprimant des TCR  $V\gamma 1$  particuliers ont été détectés 28 jours post-infection par séquençage dans l'étude de Sell et collègues (Figure 7 - Sell et al., 2015). Cette restriction est en faveur d'une sélection antigénique de certains lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$ , mettant en évidence l'appartenance de ces cellules à l'immunité adaptative et les rapprochant des lymphocytes T  $\alpha\beta$   $CD8^+$  spécifiques du MCMV. Il est donc probable que ce soit cette sous-population T  $\gamma\delta$   $V\gamma 1^+$  qui protège les souris à long terme, ce

qui renforce et corrobore les résultats de Ninomiya et collègues (Ninomiya et al., 2001). Ces éléments rappellent l'expansion, le maintien et la restriction du répertoire des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  observés chez les individus séropositifs pour le CMV (Déchanet et al., 1999b)(Pitard et al., 2008)(Knight et al., 2010). Chez la souris, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma 1^+$  sont déjà reconnus comme pouvant protéger leur hôte contre de nombreux agents infectieux que ce soit des virus comme le WNV ou le virus de l'influenza (Wang et al., 2003)(Carding et al., 1990), ou des bactéries comme *Listeria monocytogenes* ou le bacille de Calmette et Guérin (Nakamura et al., 1999)(Inoue et al., 1991). Bien qu'aucune preuve directe n'ait été apportée, il est possible que les lymphocytes T V $\gamma 1^+$  puissent être mobilisés lors de la phase tardive d'infection et puissent protéger les souris à long terme en devenant des cellules mémoires. Il est intéressant de noter que dans notre modèle, la sous-population T  $\gamma\delta$  V $\gamma 4^+$  est également mobilisée, bien que ce soit dans une moindre mesure par rapport aux lymphocytes T V $\gamma 1^+$ . Ces deux sous-populations ont des rôles globalement opposés dans la littérature et dans le cas des infections, les lymphocytes T V $\gamma 1^+$  ont un rôle souvent protecteur contrairement à la sous-population T  $\gamma\delta$  V $\gamma 4^+$  qui est elle plutôt pathogénique (voir Introduction pages 39 et 42 à 44). Du fait de cette balance fonctionnelle, il serait intéressant de déterminer si les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma 4^+$  ont un rôle pro-MCMV dans notre modèle et, si tel était le cas, de mieux comprendre pourquoi les deux sous-populations plastiques dérivées de la moelle osseuse ne se comportent pas de la même manière dans le même environnement infectieux.

D'un point de vue général, nos résultats montrent que l'infection à MCMV déclenche une réponse lymphocytaire T  $\gamma\delta$  anti-virale protectrice. Ces cellules sont capables de suppléer à l'absence de plusieurs autres acteurs immunitaires dont l'importance contre le CMV est clairement établie, comme les lymphocytes T  $\alpha\beta$  et les NK. Les nombreuses similarités du modèle murin d'infection à CMV et de l'infection par le HCMV nous laissent envisager que l'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  est associée à un effet protecteur de ces cellules chez l'homme, comme il a été suggéré dans divers cas de déficiences immunologiques. Il est donc particulièrement important de mieux comprendre les mécanismes d'activation et de protection des cellules murines afin de savoir comment améliorer la réponse de leurs homologues humaines.

### **C. Perspectives**

La confrontation de notre étude avec celle de S. Sell et collègues montre donc de nombreux points communs et prouve sans aucun doute que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont capables de protéger leur hôte contre le CMV. Cependant, plusieurs éléments restent encore sans réponse et nécessitent des expériences supplémentaires :

- Malgré nos efforts communs pour découvrir quelle fonction des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est responsable de leur effet protecteur contre le MCMV, cette question reste encore sans réponse. Il semble bien que la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ne soit pas indispensable à leur effet protecteur. Une des possibilités que les deux études ont

commencé à explorer est l'activité cytotoxique de ces cellules. Il est donc nécessaire de déterminer si l'effet anti-viral des lymphocytes T  $\gamma\delta$  repose principalement sur cette fonction en réalisant des transferts adoptifs de cellules T  $\gamma\delta$  déficientes pour la perforine ou le granzyme ou en bloquant ces molécules par un traitement anticorps au cours de l'infection. Afin d'avoir une vue d'ensemble plus large, il serait également envisageable de réaliser une analyse transcriptionnelle ou protéique des facteurs produits par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  à différents temps d'infection dans le foie et les poumons (là où les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont le plus mobilisés), respectivement par la technique du nanostring ou par un cytokine array.

- Le phénotype et le répertoire des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est modifié suite à l'infection par le MCMV. Ces résultats rappellent le phénotype TEMRA des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> et T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> mémoires induits par le CMV et la restriction du répertoire de ces cellules chez l'homme. Il serait donc intéressant de savoir si les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins peuvent effectivement acquérir une fonction de cellules mémoires, capables de réagir très rapidement et d'éliminer efficacement le virus lors d'une réactivation ou d'une infection secondaire faite à distance de la primo-infection et de déterminer la ou les sous-population(s) impliquée(s).

En plus de l'intérêt purement fondamental porté à ces perspectives, ces différents éléments pourraient potentiellement nous permettre de mieux comprendre la biologie des lymphocytes T  $\gamma\delta$  humains au cours de l'infection à CMV et de pouvoir à long terme, utiliser ces cellules à des fins plus appliquées.

## II. Projet n°2 – Effet anti-tumoral de l'infection à HCMV dans un contexte d'immunodéficience

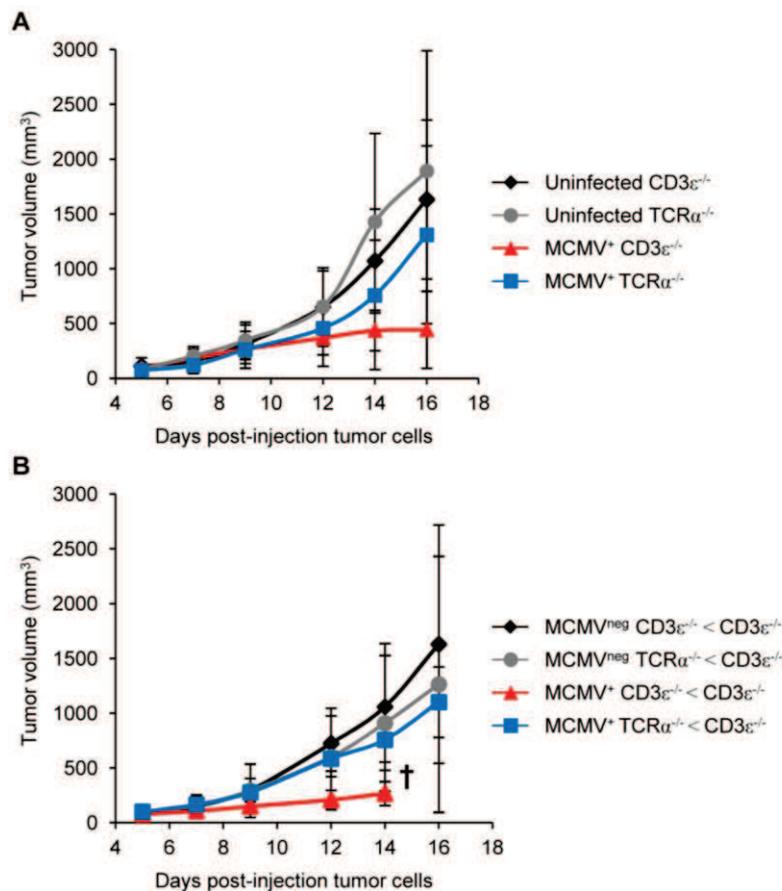
### A. Contexte de travail et problématique

Plusieurs études réalisées au laboratoire sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> humains amplifiés dans le sang des patients présentant une infection à HCMV suggèrent que ces cellules possèdent une double réactivité anti-virale et anti-tumorale : *in vitro*, ces lymphocytes sont capables de reconnaître et de lyser à la fois des fibroblastes infectés par le HCMV et différentes lignées cellulaires carcinomateuses dont les cellules tumorales d'adénocarcinome colique HT29, alors que des fibroblastes non infectés ou des cellules intestinales normales ne sont pas reconnues (Halary et al., 2005). *In vivo*, (i) le transfert adoptif de ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  HCMV-induits à des souris immunodéficientes est suffisant pour inhiber la croissance des cellules tumorales humaines HT29 et limiter le développement de métastases (Devaud et al., 2009)(Devaud et al., 2013), et (ii) chez les patients transplantés rénaux, la séropositivité au HCMV est liée à un risque réduit de cancers comparativement aux patients séronégatifs, et cette protection est corrélée à l'expansion sanguine des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> (Couzi et al., 2010). L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un rôle anti-tumoral indirect du CMV passant par l'activation d'une réponse T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> chez l'homme.

Notre but était d'utiliser le modèle murin de l'infection à CMV afin d'apporter des preuves directes concernant cette potentielle protection anti-tumorale des lymphocytes T  $\gamma\delta$  CMV-induits. Au démarrage de ce projet nous avons déjà montré que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  étaient capables de pallier à l'absence des lymphocytes T  $\alpha\beta$  (dans les souris TCR $\alpha^{-/-}$   $\alpha\beta^{neg}\gamma\delta^{+}$ ), et de protéger ces souris de la mort induite par le MCMV en s'amplifiant et en contrôlant la charge virale dans différents organes cibles du virus. De plus, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins ont été décrits comme capables de contrôler le développement de différents types de tumeurs en absence d'infection, dont des tumeurs spontanées de la prostate (Liu et al., 2008), des tumeurs cutanées induites par des carcinogènes (Girardi et al., 2001)(Matsuda et al., 2001) ou des lignées cellulaires tumorales comme la lignée de mélanome B16F10 (Gao et al., 2003)(He et al., 2010).

Pour aborder cette étude, nous avons choisi d'utiliser la lignée MC38 qui est une lignée d'adénocarcinome colique induit chez la souris C57BL/6. Le choix de cette lignée repose sur la forte réactivité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> induits par le HCMV contre des lignées d'adénocarcinomes coliques humains HT29 et Caco-2 (Halary et al., 2005), et sur leur capacité à inhiber le développement de tumeurs HT29 implantées en situation orthotopique chez la souris (Devaud et al., 2013). De plus, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont présents en forte proportion dans l'épithélium intestinal et pourraient donc participer à la surveillance de ce tissu.

Dans une première approche nous avons évalué la croissance des cellules MC38 implantées en sous-cutané à des souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  ( $\alpha\beta^{\text{neg}}\gamma\delta^+$ ) et  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  ( $\alpha\beta^{\text{neg}}\gamma\delta^{\text{neg}}$ ), préalablement infectées ou non par le MCMV. Dans ce modèle nous n'avons pas observé d'effet majeur des lymphocytes T  $\gamma\delta$  sur la croissance tumorale en absence d'infection, les souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  présentant des volumes tumoraux comparables aux souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  (Figure 22A). L'infection préalable des souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  7 jours avant l'injection des cellules tumorales ne modifie presque pas le développement des tumeurs. Par contre, de manière assez inattendue, l'infection des souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  T-déficientes résulte en une inhibition importante de la croissance tumorale (Figure 22A).



**Figure 22 – L'infection par le MCMV inhibe la croissance tumorale chez les souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$ .**

A/ 8-10 souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  et  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  ont été infectées en i.p. avec  $2.10^3$  PFU de MCMV. Après 7 jours, les souris infectées et 8-10 souris contrôle  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  et  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  ont reçu en s.c.  $5.10^5$  cellules MC38 et la croissance tumorale a été suivie ensuite tous les 2-3 jours. Les courbes représentent la moyenne et l'écartype des volumes tumoraux de chaque groupe de souris obtenus dans une expérience. B/ 10 souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  et  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  ont été infectées avec  $2.10^3$  PFU de MCMV. Après 14 jours, les souris infectées et 10 souris contrôle  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  et  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  non infectées ont été sacrifiées et les splénocytes isolés. Des souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  ont reçu en i.v.  $40.10^6$  splénocytes de souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  non infectées (nommées  $\text{MCMV}^{\text{neg}} \text{CD3}\epsilon^{-/-} < \text{CD3}\epsilon^{-/-}$ ), de souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  infectées ( $\text{MCMV}^+ \text{CD3}\epsilon^{-/-} < \text{CD3}\epsilon^{-/-}$ ), de souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  non infectées ( $\text{MCMV}^{\text{neg}} \text{TCR}\alpha^{-/-} < \text{CD3}\epsilon^{-/-}$ ) ou de souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  infectées ( $\text{MCMV}^+ \text{TCR}\alpha^{-/-} < \text{CD3}\epsilon^{-/-}$ ). Les souris receveuses ont reçu le lendemain  $5.10^5$  cellules MC38 en s.c. et la croissance tumorale a été suivie ensuite tous les 2-3 jours. Les courbes représentent la moyenne et l'écartype des volumes tumoraux de chaque groupe de souris obtenus dans une expérience représentative de 2 expériences indépendantes. † : sacrifice des souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  receveuses à cause de signes de souffrance dûs à l'infection.

Dans une seconde approche simplifiée, nous avons transféré en intraveineuse (i.v.) les splénocytes des souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  (contenant des lymphocytes T  $\gamma\delta$ ), ou en contrôle de souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$ , infectées ou non par le MCMV à des souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  naïves pour le virus ( $40.10^6$  splénocytes par receveuse). Le lendemain de l'injection,  $5.10^5$  cellules MC38 ont été implantées en sous-cutané (s.c.) au niveau du flanc droit des souris receveuses et la croissance tumorale suivie de manière comparable à la première approche. Ici encore, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (et autres cellules immunitaires) contenus dans les splénocytes des souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  infectées et non infectées ne sont pas suffisants pour inhiber la croissance tumorale en comparaison au groupe contrôle  $\text{MCMV}^{\text{neg}} \text{CD3}\epsilon^{-/-} < \text{CD3}\epsilon^{-/-}$  (Figure 22B). Par contre, une inhibition claire de la croissance tumorale est observée chez les souris transférées avec des splénocytes de  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  infectées ( $\text{MCMV}^+ \text{CD3}\epsilon^{-/-} < \text{CD3}\epsilon^{-/-}$ ), confortant les observations faites précédemment et renforçant notre hypothèse d'un probable lien entre le virus et l'effet anti-tumoral observé. Globalement ces résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  n'ont pas d'effet anti-tumoral, et ce en absence ou en présence de CMV.

L'inhibition de la croissance tumorale observée chez les souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  infectées par le MCMV ou recevant des splénocytes de souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-} \text{MCMV}^+$  est en désaccord avec la littérature puisqu'un rôle protecteur anti-tumoral du CMV a uniquement été décrit chez des individus atteints de cancers d'origine hématopoïétique (Elmaagacli et al., 2011)(Ito et al., 2013), alors qu'il possède plutôt un effet pro-tumoral chez les individus atteints de cancers solides, dans lesquels il est souvent détecté et considéré comme un facteur pronostic négatif associé à une survie à long terme moins importante des individus atteints de cancer (Harkins et al., 2002)(Taher et al., 2014). Cependant et malgré les études de plus en plus nombreuses en faveur de cette association néfaste entre le CMV et le cancer, le rôle oncomodulateur de ce virus est encore controversé faute de preuve directe le reliant au développement tumoral.

Au vu de ces éléments, nos résultats préliminaires semblaient offrir un nouveau point de vue sur ce débat en montrant que le CMV peut également exercer son activité anti-tumorale sur des tumeurs solides chez la souris. De ce fait, nous avons voulu pousser cette étude pour comprendre comment le CMV inhibe la croissance tumorale dans nos conditions expérimentales.

## B. Matériels et Méthodes

### Déclaration éthique

Toutes les procédures expérimentales impliquant des animaux ont été réalisées selon les directives de l'Union Européenne (European Directive 2010/63/UE) ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)) et approuvées par le comité éthique local *Comité d'éthique pour l'expérimentation animale de Bordeaux* (CE50), [project n° 50120197-A].

### Souris et lignées cellulaires

Nous utilisons des souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  de fond génétique C57BL/6 (Malissen et al., 1995), et TCR $\alpha^{-/-}$  (Philpott et al., 1992) provenant du CDTA (Centre de Distribution, Typage et Archivage Animal, Orléans, France) et des souris *NOD-scid gamma* (NSG) provenant des laboratoires Jackson (Shultz et al., 2005). Les souris ont été utilisées à un âge compris entre 8 et 12 semaines, hébergées dans une animalerie SPF (Animalerie A2, Université de Bordeaux, France) et gardées en conditions exemptes de pathogène. Les lignées cellulaires murines d'adénocarcinome colique MC38 et de mélanome murin B16F10, toutes deux générées sur fond C57BL/6, ont été généreusement données par le Dr B. Robert (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier) et le Dr P. Voisin (Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, Bordeaux) respectivement. Les lignées de fibroblastes murins NIH 3T3 (souris Swiss) et d'adénocarcinome colique humaines HT29 sont de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules ont été cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en milieu complet DMEM (Invitrogen Gibco) supplémenté avec 8% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (PAA Laboratories GmbH). Toutes les lignées cellulaires utilisées sont régulièrement testées pour l'absence de mycoplasme.

### Stock de virus

Le MCMV provient de l'ATCC (souche Smith, ATCC VR-194). Pour les expériences réalisées *in vivo*, le virus a été amplifié dans des souris de fond génétique BALB/c (BALBcBy/J, Laboratoire Charles Rivers, Larbresle, France) pour générer des extraits de glandes salivaires contenant le MCMV. Pour les expériences réalisées *in vitro*, le virus a été amplifié par des passages successifs sur un tapis cellulaire de NIH 3T3. Les titres des virus ont été définis par la méthode standard des plages de lyse sur monocouche de fibroblastes embryonnaires murins (MEF). La souche clinique de HCMV TB40-E (généreusement donnée par C. Sinzger, Université de Turbingen, Allemagne) a été amplifiée *in vitro* comme décrit précédemment (Halary et al., 2005).

### Implantation des cellules tumorales *in vivo* et infection des souris

Après anesthésie, les souris ont reçu en sous-cutané  $5 \cdot 10^5$  cellules MC38, B16F10 ou HT29 au niveau du flanc droit. Les souris ont été infectées le même jour par l'injection en intra-péritonéal de  $10^2$  ou  $10^4$  Plaque-Forming Units (PFU) de MCMV extrait de glandes

salivaires ou  $10^4$  PFU de HCMV. La croissance tumorale a été suivie en mesurant la longueur et la largeur des tumeurs avec un pied à coulisse trois fois par semaine. Le volume tumoral a été estimé en utilisant la formule suivante : volume tumoral ( $\text{mm}^3$ ) = [Longueur (mm) x Largeur<sup>2</sup> (mm)]/2.

#### Infection des cellules et détection des protéines virales *in vitro*

Les cellules NIH 3T3, MC38, B16F10 et HT29 sontensemencées à raison de 3000 cellules par puits en plaque 96 puits dans 100  $\mu\text{l}$  de milieu complet. Après 24h d'adhésion, les cellules sont infectées avec des multiplicités d'infection (MOI) de 0.01, 0.1, 1, 10 et 100 particules virales infectieuses par cellule. Après 48h d'incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, les cellules sont lavées en PBS. Elles sont ensuite fixées et les peroxydases endogènes inhibées avec une solution d'acétone-H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 20 min à -20°C. Les protéines virales IE1 et gB ont ensuite été marquées avec les anticorps primaires non couplés CROMA101 et CROMA7 respectivement (CapRi, Université de Rijeka, Croatie) et le kit Vectastain Universal Elite ABC R.T.U Kit (Vector Laboratories, Burlingame, États-Unis) en respectant les recommandations du fabricant. La révélation a été faite avec du 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Vector Laboratories).

#### Etude de la viabilité des cellules post-infection

La viabilité des cellules post-infection à MCMV a été évaluée par test MTT. Les cellules ont étéensemencées à raison de 500 à 2500 cellules selon la lignée cellulaire par puits en plaque 96 puits dans 100  $\mu\text{l}$  de milieu complet. Après 24h d'adhésion, les cellules sont infectées avec des multiplicités d'infection (MOI) de 0.01, 0.1, 1, 10 et 100 particules virales infectieuses par cellule dans 100  $\mu\text{l}$  de milieu complet. Après 3 jours d'infection, les cellules sont incubées pendant 2 à 4h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> avec 15  $\mu\text{l}$  par puits une solution de bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium à 5 mg/ml (Sigma Aldrich). Les cristaux de formazan formés suite à l'action des succinate déshydrogénases cellulaires, sont ensuite solubilisés par l'ajout de 105  $\mu\text{l}$  par puits d'isopropanol contenant 5% d'acide formique et la densité optique est lue à 570 nm avec un Varioskan Flash (Thermo Scientific). L'absorbance du milieu seul a ensuite été soustraite à celle des conditions testées pour évaluer l'absorbance spécifique de chaque condition.

#### Analyse de l'apoptose *in vitro* par détection de l'annexine V

Les cellules NIH 3T3, MC38, B16F10 et HT29 sontensemencées à raison de 3000 cellules par puits en plaque 96 puits dans 100  $\mu\text{l}$  de milieu complet. Après 24h d'adhésion, les cellules sont infectées avec des multiplicités d'infection (MOI) de 0.01, 0.1, 1, 10 et 100 particules virales infectieuses par cellule et incubées 72h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont lavées en PBS, décollées par un traitement à la trypsine puis laissées 30 min à température ambiante en milieu complet. L'apoptose cellulaire a été déterminée en utilisant le FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Le marquage de l'annexine V a été réalisé suivant

les instructions du fabricant. L'acquisition des cellules ainsi marquées a été faite sur un LSRFortessa (BD Biosciences) et l'analyse avec le logiciel FlowJo (Tree Star).

#### Révélation de la protéine IE1 du MCMV par immunohistochimie

Les tumeurs (B16F10, MC38 et HT29) ont été prélevées en fin de chaque expérience, pesées puis mises en cassettes et fixées en parformaldehyde 4% pendant 4 heures. Les échantillons sont ensuite transférés dans une solution d'éthanol 70% et inclus en paraffine. Les antigènes sont démasqués sur des coupes de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur par une incubation de 30 min en tampon Tris (10 mM) EDTA (1 mM) à pH9. Après inhibition des peroxydases endogènes par une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, les sites de fixation aspécifique et l'avidine sont bloquées grâce aux solutions de blocage de Vectastain Universal Elite ABC R.T.U kit et Avidin/Biotin Blocking kit respectivement (Vector Laboratories, Burlingame, États-Unis). La protéine IE1 est marquée par l'anticorps primaire non couplé CROMA101 (CapRi, Université de Rijeka, Croatie) et au Vectastain Universal Elite ABC R.T.U kit et révélée avec le Novared (Vector Laboratories). Une contre-coloration est faite en hémalum de Mayer avant l'analyse. Les lames sont scannées avec le Panoramic Scan et analysées avec Panoramic Viewer (3DHISTECH, Budapest, Hongrie).

#### Analyses statistiques

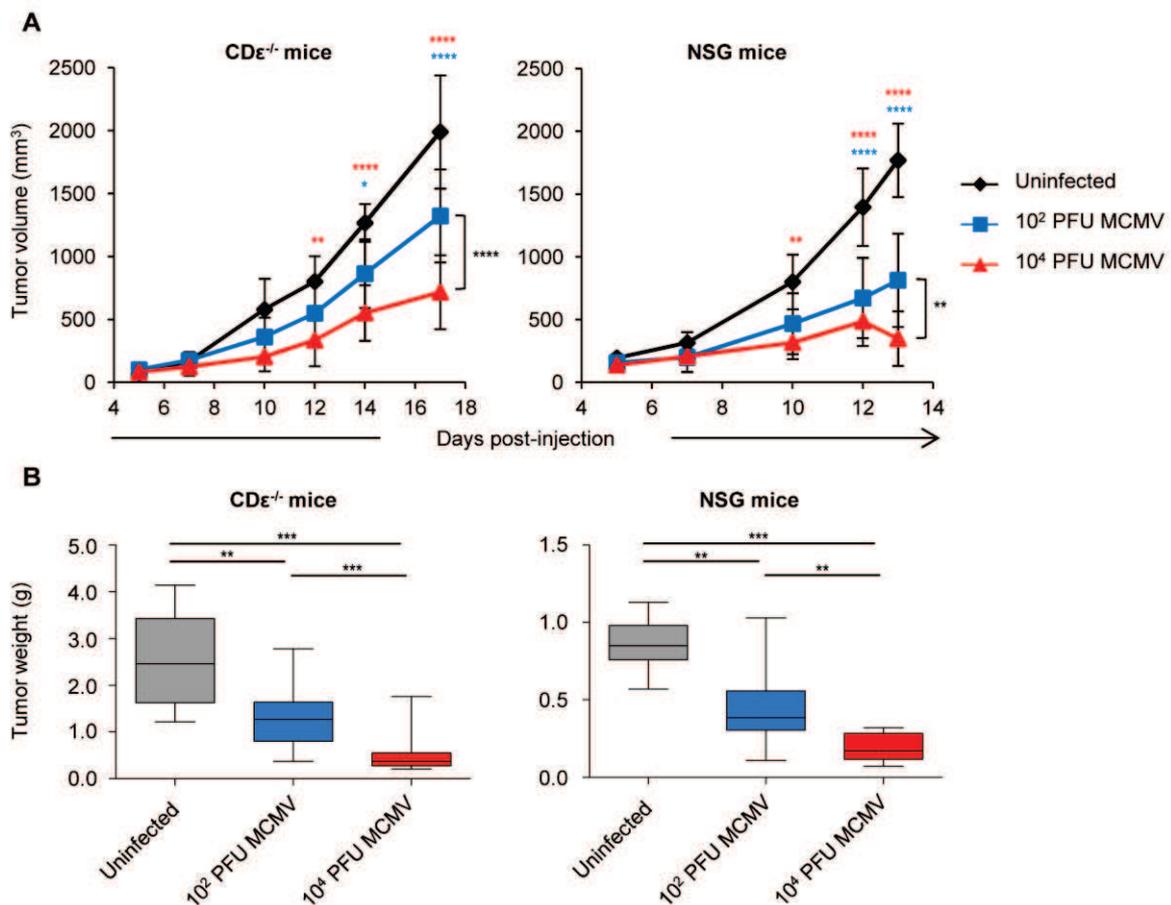
Les études statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Graphpad prism 5. Les différences de croissance tumorale mesurées *in vivo* ont été analysées par un test de two-way ANOVA. Les différences statistiques entre les poids tumoraux ont été déterminées par un test de Mann-Whitney. La significativité est notée comme suit : \* =  $p < 0.05$  ; \*\* =  $p < 0.01$  ; \*\*\* =  $p < 0.001$  ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ .

### **C. Résultats**

#### Le MCMV inhibe la croissance tumorale de manière dose-dépendante chez des souris immunodéficientes $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$

Notre étude sur le modèle murin d'infection à CMV a mis en évidence la capacité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  à protéger les souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  contre la mort induite par le virus. Cette protection est liée à un contrôle de la charge virale par les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , contrôle qui est absent chez les souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  qui présentent rapidement des charges virales importantes. Ainsi, l'inhibition de la croissance des MC38 observée dans les souris infectées  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  (Figure 22) pourrait être due à la présence d'une grande quantité de particules virales dans ces souris, contrairement aux  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  qui contrôlent l'infection. Afin de tester si l'intensité de l'effet anti-tumoral du MCMV était dépendante de la charge virale, nous avons injecté 2 doses différentes de virus aux souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$  : une dose plus faible de  $10^2$  PFU et une plus forte de  $10^4$  PFU qui ont été injectées en i.p. le même jour que les cellules tumorales. La croissance des cellules MC38 est inhibée dans les 2 lots de souris infectées, même lorsque celles-ci ne sont infectées qu'avec  $10^2$  PFU (Figure 23A, panel de gauche). Cette inhibition est dose-dépendante comme nous l'avons envisagé, avec un ralentissement de la croissance

nettement plus important à  $10^4$  PFU et une différence significative en fin d'expérience entre les groupes infectés à  $10^2$  et  $10^4$  PFU. Ces observations sont renforcées par les poids des tumeurs qui suivent la même tendance et sont statistiquement différents entre les groupes (Figure 23B). Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée B16F10, tant au niveau de la croissance que du poids des tumeurs (non montré).



**Figure 23 – Inhibition dose-dépendante de la croissance tumorale et impact de l'immunité innée sur cette réponse.**

A/ Les souris CD3ε<sup>-</sup> et NSG ont été infectées en i.p. avec  $10^2$  ou  $10^4$  PFU de MCMV. Le même jour,  $5.10^5$  cellules MC38 ont été implantées en s.c. au niveau du flanc droit de ces souris ainsi qu'à des souris contrôle non infectées. Suite à l'apparition de tumeurs visibles, la croissance tumorale a été suivie tous les 2-3 jours en évaluant le volume tumoral. Les données sont exprimées en moyenne des volumes  $\pm$  écartype de 5 à 8 souris. Chaque graphique représente une expérience représentative de 2 expériences. Les statistiques notées en bleu ou en rouge correspondent aux différences statistiques à un jour donné entre le groupe non infecté et le groupe infecté à  $10^2$  ou  $10^4$  PFU respectivement. Les statistiques notées en noir montrent les différences statistiques entre les groupes infectés avec  $10^2$  ou  $10^4$  PFU en fin d'expérience. B/ À la fin de chaque expérience, les tumeurs des différents groupes sont prélevées et pesées. Les données représentent le poids moyen des tumeurs obtenus dans les 2 expériences  $\pm$  écartype. Les statistiques entre les différents groupes sont montrées.

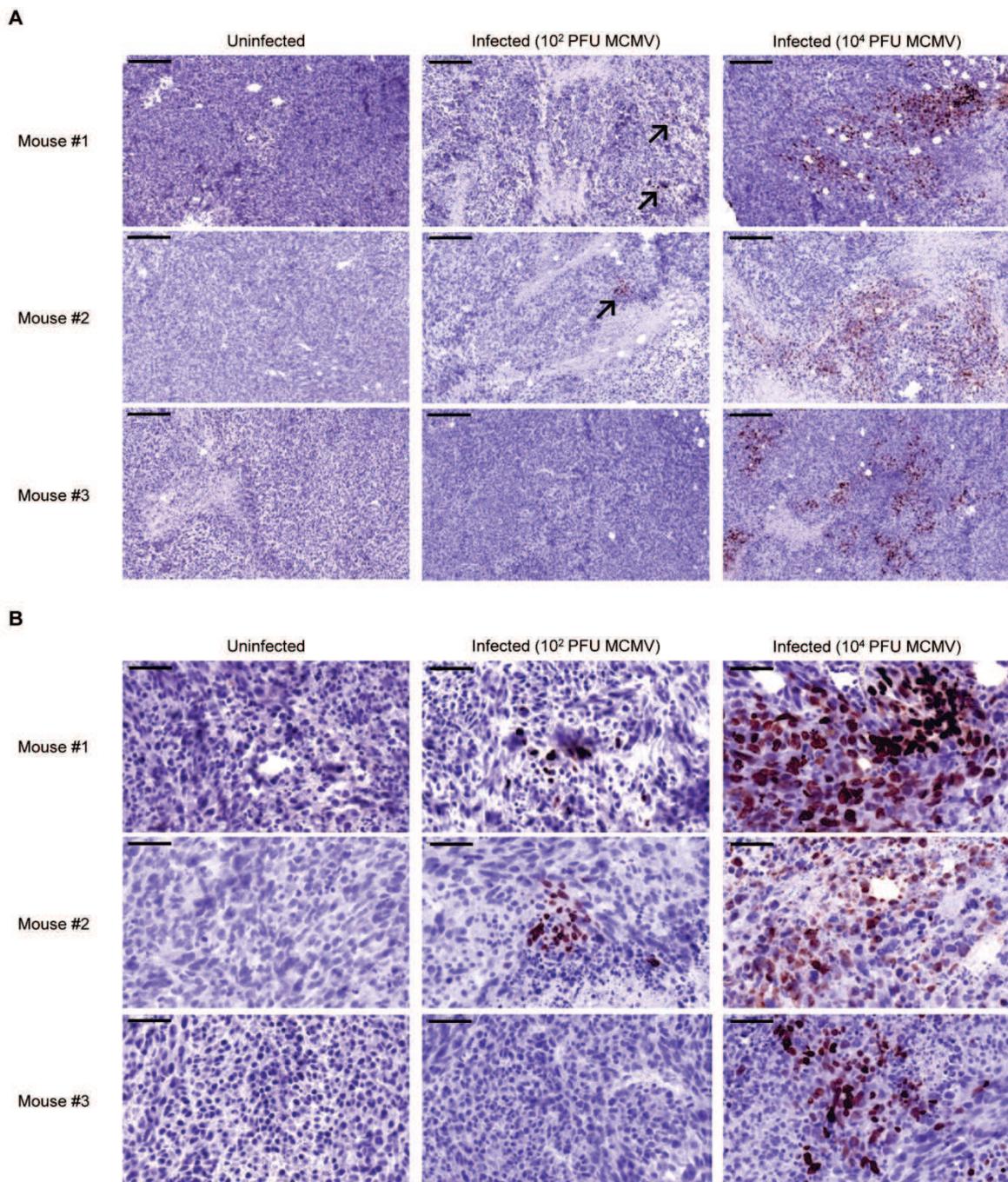
## Le MCMV inhibe la croissance tumorale indépendamment d'un effet des cellules immunitaires innées

Les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  sont déficientes en lymphocytes T mais possèdent tous les autres composants cellulaires de l'immunité, et plus particulièrement les cellules de l'immunité innée comme les cellules NK, mais ne présentent probablement pas d'anticorps du fait de l'absence des lymphocytes T. Les cellules NK jouent un rôle important dans la réponse antivirale et sont capables de contrôler, au moins partiellement, la réplication virale. Afin d'étudier directement l'effet du MCMV indépendamment du potentiel effet anti-tumoral des cellules immunitaires innées activées par l'infection, nous avons reproduit nos expériences avec des souris NSG déficientes en lymphocytes T et B, en cellules NK, en cellules lymphoïdes innées (ILCs) et qui possèdent des macrophages incapables de sécréter de l'IL-1 $\beta$  (Shultz et al., 2005). Les résultats obtenus sont globalement similaires à ceux observés chez les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ , l'infection par le MCMV résultant en une inhibition de la croissance des tumeurs MC38 (Figure 23A et B), et des tumeurs B16F10 (non montré). Cependant, nous pouvons noter que même si les tumeurs apparaissent au même moment sur les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  et NSG et que leur croissance est relativement comparable en début d'expérience, les tumeurs atteignent plus vite un volume avoisinant les 2000 mm<sup>3</sup> chez les souris NSG que les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  en absence de virus (13 jours contre 17, respectivement)(Figure 23A). Ce résultat suggère que les cellules immunitaires présentes chez les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  (dont les cellules NK) sont capables de limiter partiellement le développement tumoral en absence d'infection. D'autre part, les tumeurs sont inhibées de manière significativement plus rapide à 10<sup>4</sup> PFU dans les souris NSG (10 jours contre 12 pour les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ ) et à 10<sup>2</sup> PFU (12 jours contre 14). Une explication possible est que les cellules immunitaires des souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  puissent, en luttant contre le MCMV, bloquer son effet anti-tumoral et ainsi permettre indirectement aux tumeurs de se développer. En fin d'expérience, une différence significative est trouvée entre les groupes infectés à 10<sup>2</sup> et 10<sup>4</sup> PFU pour les deux types de souris, tant au niveau du volume tumoral que du poids des tumeurs. L'ensemble de ces éléments est donc en faveur d'un rôle anti-tumoral du CMV indépendant des cellules immunitaires effectrices T, B, NK et ILCs.

## Le MCMV est détecté par immunohistochimie au sein des tumeurs

L'effet anti-tumoral du MCMV pourrait être soit direct et donc lié à l'infection des tumeurs, soit indirect par des modifications du microenvironnement tumoral ou d'autres mécanismes. Afin d'évaluer la capacité du virus à infecter directement les cellules tumorales, nous avons recherché la présence de cellules infectées au sein des tumeurs par un marquage du facteur de transcription viral IE1. Des cellules infectées IE1<sup>+</sup> sont détectées *in situ* dans les tumeurs des souris infectées avec 10<sup>2</sup> PFU et 10<sup>4</sup> PFU (Figure 24A et B). La proportion de cellules infectées semble dépendre de la quantité de particules virales infectieuses injectées aux souris, les tumeurs des souris infectées avec 10<sup>2</sup> PFU de MCMV présentant moins de cellules IE1<sup>+</sup> que celles des souris infectées avec 10<sup>4</sup> PFU. Cependant, une analyse plus

approfondie et quantitative est nécessaire pour confirmer ce résultat et déterminer si les cellules infectées sont des cellules tumorales.



**Figure 24 – L’effet dose du MCMV sur la croissance des cellules MC38 est maintenu chez les souris immunodéficientes NSG.**

Les souris NSG de l’expérience présentée en figure 25 et portant des tumeurs MC38 ont été sacrifiées à jour 13. Les tumeurs ont été prélevées, pesées et fixées en formaldéhyde. La protéine IE1 du MCMV a été révélée par immunohistochimie. Chaque image est représentative de la tumeur d’une souris analysée à A/ faible grossissement (barre d’échelle : 200  $\mu$ m) ou à B/ fort grossissement (barre d’échelle : 50  $\mu$ m). Les 3 souris analysées pour chaque groupe sont représentées. Les flèches indiquent quelques plages de cellules IE1<sup>+</sup>.

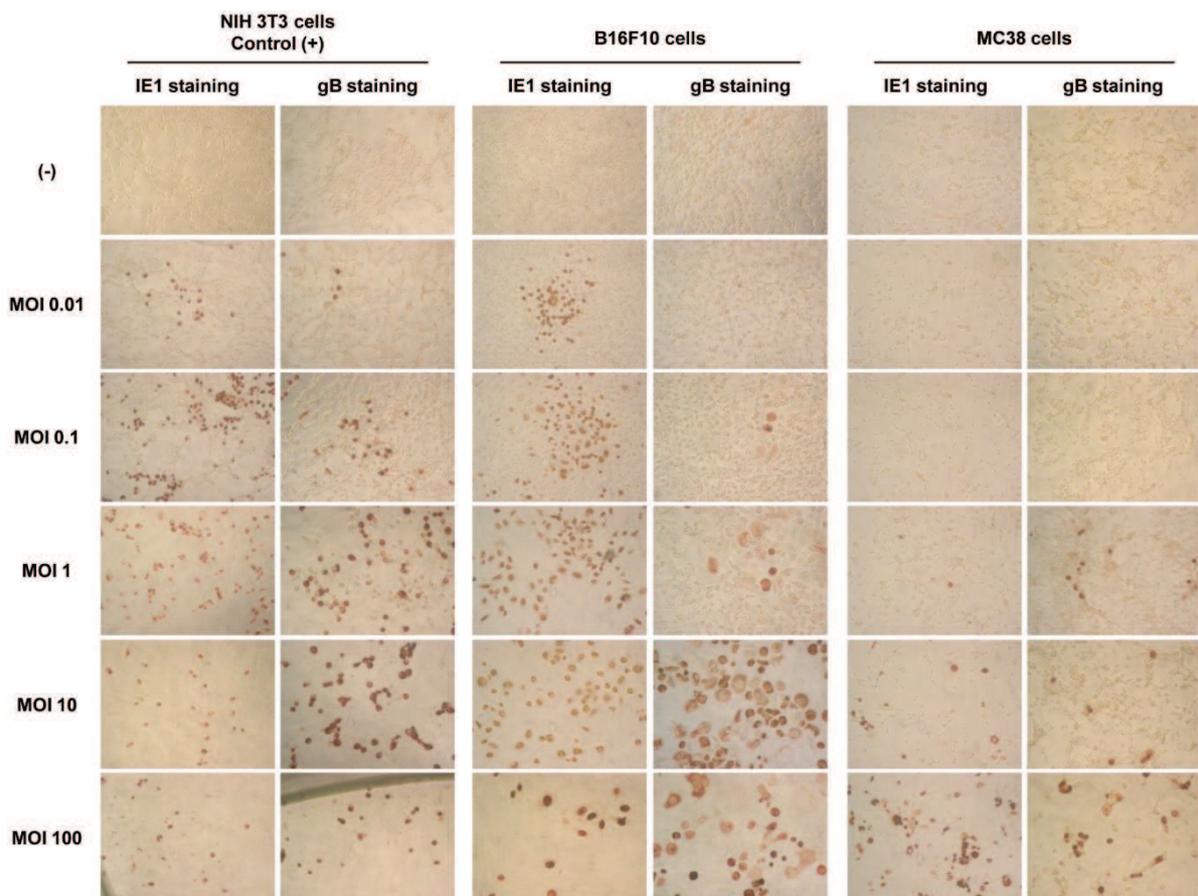
## Le MCMV infecte des lignées tumorales murines de différentes origines

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le HCMV a été détecté dans de nombreux types de cancers. Cependant, ces études ne permettent pas de savoir si le HCMV a infecté les cellules avant ou après leur transformation. Quelques études se sont intéressées à déterminer la capacité de ce virus à infecter des cellules tumorales *in vitro*. Ces études semblent globalement montrer que le HCMV est capable d'infecter des lignées tumorales humaines de différentes origines dont des lignées de tératocarcinome (Gönczöl et al., 1985), d'astrocytome ou de gliome (Cinatl et al., 1999)(Cobbs et al., 2007), ou de carcinomes coliques ou prostatiques (Jarvis et al., 1999)(Esclatine et al., 2000)(Blaheta et al., 2006). Peu d'études ont été réalisées chez la souris à ce sujet, mais il semblerait que le MCMV puisse infecter *in vivo* les cellules à l'origine de certains cancers, comme les cellules musculaires lisses dans le cas du rhabdomyosarcome (Price et al., 2012), et pourrait potentiellement se répliquer dans des cellules tumorales comme par exemple des cellules leucémiques (Pottathil et al., 1986).

Dans la plupart des études mentionnées ci-dessus, l'impact de l'infection des cellules tumorales sur le cancer n'a pas été évalué ou a été associé à un effet pro-tumoral du virus humain. En contradiction avec cette littérature, la présence de cellules IE1<sup>+</sup> au sein des tumeurs murines et l'effet anti-tumoral observé dans notre modèle suggèrent globalement un rôle direct anti-tumoral du MCMV. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc cherché à déterminer la capacité du MCMV à infecter différentes lignées tumorales murines *in vitro*. Pour cela, les fibroblastes NIH 3T3 contrôles, connus pour leur permmissivité au MCMV, les cellules MC38 et de mélanome B16F10 ont été incubées avec différentes MOI de virus et l'initiation de la réplication a ensuite été évaluée par la détection de la protéine virale IE1. Comme attendu, les cellules contrôles NIH 3T3 s'infectent et sont positives pour IE1 même à de faibles MOI (Figure 25). Concernant les lignées tumorales, nous avons pu observer que les cellules MC38 et B16F10 sont permmissives au MCMV mais ont une sensibilité différente vis-à-vis du virus (Figure 25). Les lignées tumorales murines CT26 (carcinome colique de souris BALB/c) et CMT93 (carcinome rectal de souris C57BL/6) ont également été testées et sont elles aussi permmissives au MCMV (non montré). Pour les cellules B16F10, des plages d'infection sont détectées dès la MOI 0,01 comme nous l'avons observé pour les fibroblastes contrôles. Les cellules MC38 semblent être plus résistantes face au MCMV puisque nous ne détectons des cellules IE1<sup>+</sup> qu'à partir de la MOI 1.

Des résultats concordants ont été obtenus par la détection de la glycoprotéine d'enveloppe gB (Figure 25). Cependant, l'anticorps de détection utilisé reconnaît la forme native de la protéine et pourrait, de ce fait, détecter les virions fixés à la membrane et non internalisés en plus des néo-virions produits dans les cellules. Afin de pouvoir conclure réellement sur ce point, une expérience préliminaire a été réalisée lors de laquelle les virions non internalisés ont été éliminés par des lavages en solution acide. Le transfert des

surnageants de culture de ces cellules traitées sur des fibroblastes nous a permis de voir que les cellules MC38 et B16F10, comme les NIH 3T3, produisent des particules virales infectieuses (non montré). Bien qu'une analyse quantitative soit nécessaire afin de confirmer ces observations et de pouvoir donner une conclusion définitive sur le niveau d'infectabilité de ces cellules, nos résultats suggèrent malgré tout que les cellules B16F10 et MC38 pourraient permettre au virus de faire un cycle viral complet et produire des particules virales infectieuses.



**Figure 25 – Le MCMV infecte les lignées tumorales B16F10 et MC38 mais à différentes MOI.**

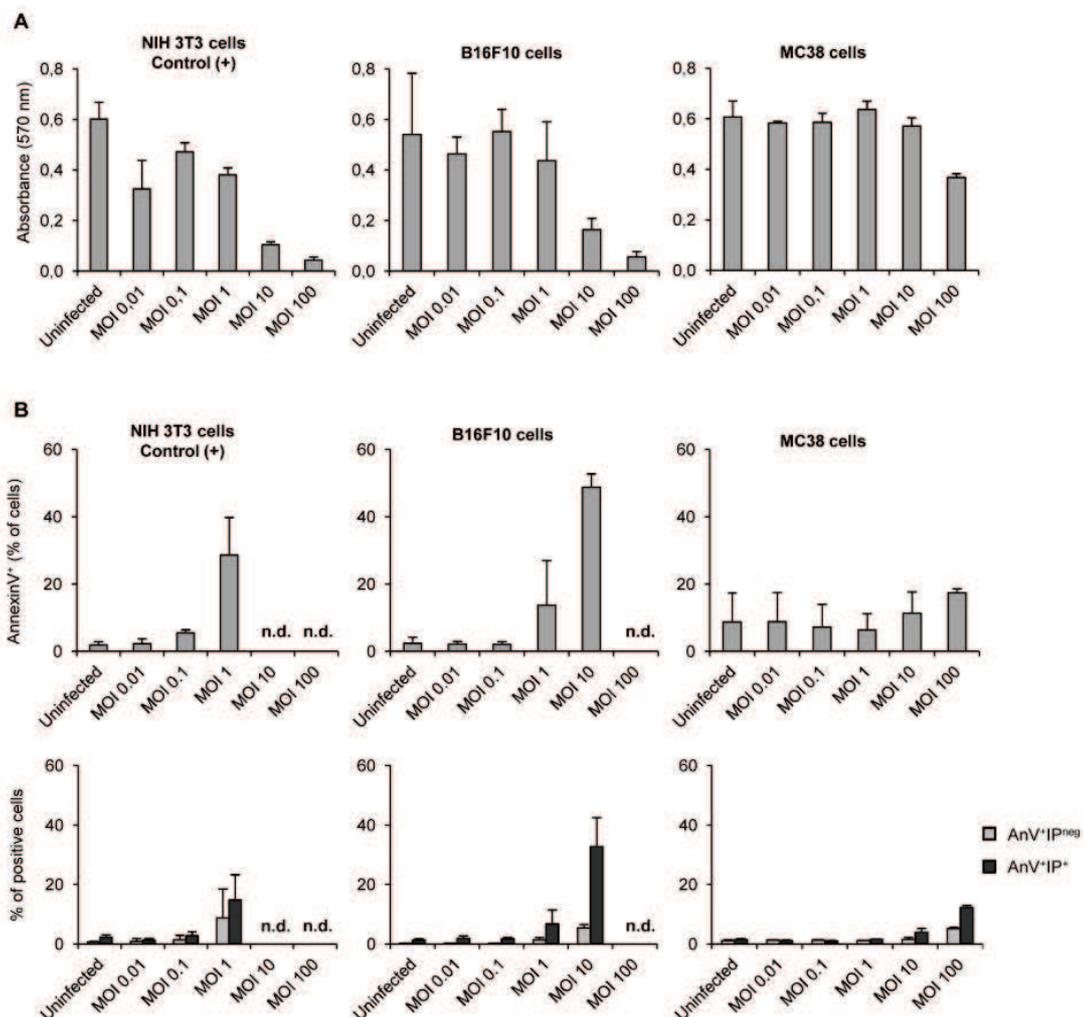
Les fibroblastes de la lignée contrôle NIH 3T3 et les cellules tumorales B16F10 et MC38 ont étéensemencées à raison de 3000 cellules par puits en plaque 96 puits. Le lendemain, les cellules ont été infectées avec différentes MOI de MCMV et incubées pendant 2 jours à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Les protéines virales IE1 et gB ont ensuite été détectées grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques. Chaque image a été prise avec un grossissement de x20, et est représentative de 2 à 3 expériences indépendantes.

#### Le MCMV induit l'apoptose des cellules B16F10 mais pas des cellules MC38

Du fait de sa capacité à infecter les cellules tumorales, le virus pourrait avoir un effet anti-tumoral direct par différents mécanismes : inhibition de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose, etc. Dans un premier temps, nous avons donc évalué la viabilité des cellules MC38 et B16F10 72h post-infection à MCMV par un test MTT. Comme attendu,

l'infection des cellules contrôle NIH 3T3 a un effet majeur sur la viabilité de ces cellules et cet effet est d'autant plus marqué que le dose de virus est importante (Figure 26A). La tendance est la même pour les cellules B16F10. L'infection des cellules MC38 ne résulte quant à elle qu'en une petite diminution de la viabilité à MOI 100 en comparaison aux deux autres lignées cellulaires (Figure 26A). Ces résultats sont assez cohérents avec la différence de permissivité virale de ces cellules (Figure 25).

Une des premières hypothèses que nous avons formulée après avoir obtenu ces résultats est que le virus pourrait induire l'apoptose des cellules infectées et ainsi expliquer la diminution de viabilité observée. Dans des conditions comparables au test MTT, nous avons donc évalué indirectement l'apoptose par cytométrie de flux en mesurant l'expression de l'annexine V (AnV) à la surface des cellules infectées et l'incorporation de l'iodure de propidium (IP). Les cellules NIH 3T3 entre en apoptose dès la MOI 1, condition à laquelle environ 30% des cellules sont AnV<sup>+</sup> (Figures 28B). Malheureusement, la faible quantité de cellules ayant supporté l'infection aux MOI 10 et 100 n'a pas permis d'analyser de manière fiable l'apoptose dans ces conditions. Comme pour les cellules NIH 3T3, l'apoptose est induite dès la MOI 1 pour les cellules B16F10 et à MOI 10, l'apoptose tardive (AnV<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>) et globale (AnV<sup>+</sup>IP<sup>+</sup> ou <sup>neg</sup>) sont estimées à environ 33% et 48% de cellules apoptotiques, respectivement (Figure 26B). Pour ces cellules également, la MOI 100 n'a pu être analysée.



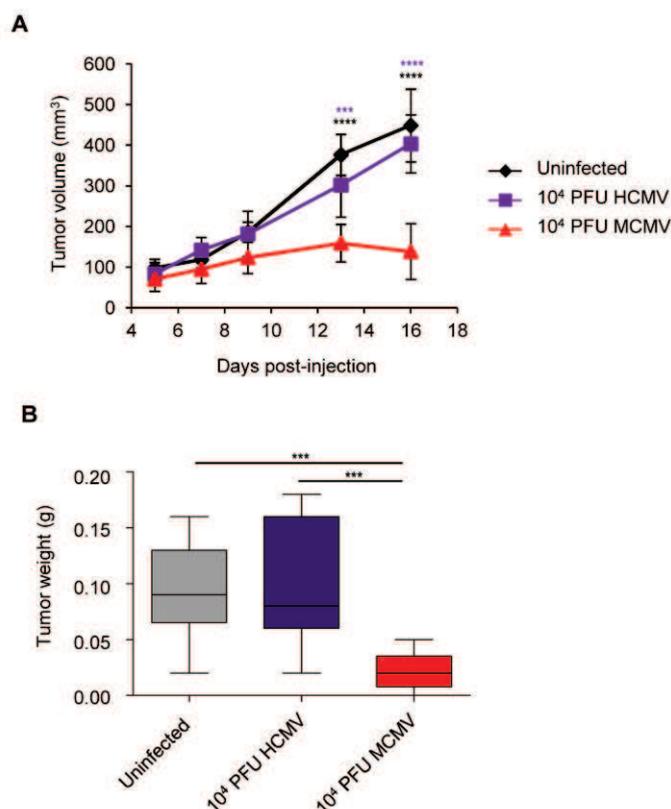
### **Figure 26 – Le MCMV induit l’apoptose des cellules NIH 3T3 et B16F10 de manière dose dépendante.**

Les cellules ont été ensemencées et infectées comme mentionné dans le Matériels et Méthodes. Après 72h d’infection, A/ la viabilité des cellules a été déterminée en mesurant la métabolisation du MTT et B/ l’apoptose (précoce AnV<sup>+</sup>IP<sup>neg</sup> et tardive AnV<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>) a été évaluée par cytométrie de flux via l’expression de l’annexine V. Les résultats montrés sont représentatifs de deux expériences indépendantes exprimés en moyenne ± écartype.

De manière intéressante, les cellules MC38 ne semblent pas entrer en apoptose après infection et ce, même à MOI 100 (Figure 26B). Ces résultats suggèrent que le MCMV peut exercer son activité anti-tumorale de manière directe par au moins deux effets : le premier reposerait sur l’induction de l’apoptose des cellules infectées comme observé pour les cellules B16F10, et le second reposerait sur un mécanisme non déterminé ici, qui pourrait être par exemple une inhibition de la prolifération des cellules MC38 à forte MOI. Il reste néanmoins possible que le MCMV exerce également un effet indirect *in vivo* sur l’environnement tumoral.

### **Le MCMV inhibe la croissance *in vivo* des cellules tumorales humaines HT29**

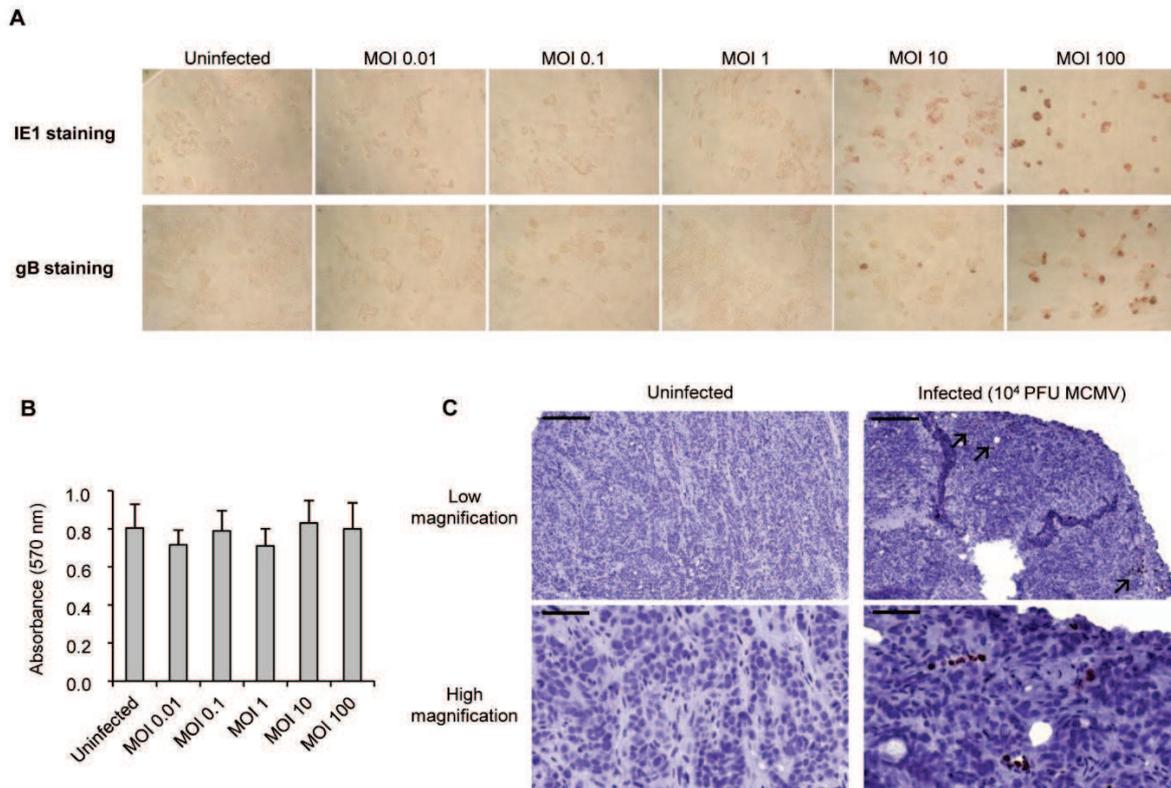
Puisque les lignées tumorales utilisées dans nos expériences sont permissives au MCMV, il nous est difficile d’évaluer la part de l’effet indirect du virus sur l’inhibition de la croissance observée *in vivo*. Nous avons ainsi déterminé l’effet du virus murin sur la croissance des cellules tumorales humaines HT29, que l’on pensait non permissives au MCMV du fait de la spécificité d’espèce du virus. Des souris NSG ont reçu en s.c.  $5 \cdot 10^5$  cellules HT29 et ont été infectées avec  $10^4$  PFU de MCMV ou de HCMV. Nous avons pu observer une forte inhibition de la croissance de ces cellules uniquement lorsque les souris ont été infectées par le MCMV et une différence significative entre les poids des tumeurs de souris MCMV<sup>+</sup> et des autres groupes (Figures 27A et B). Le HCMV n’a eu aucun effet sur la croissance ou le poids des tumeurs comme nous l’attendions puisque les cellules HT29 et les souris ne sont pas infectables par ce virus.



**Figure 27 – La croissance des cellules tumorales humaines HT29 est également inhibée en présence du MCMV mais pas du HCMV.**

A/ Les souris NSG ont été infectées en i.p. avec  $10^4$  PFU de MCMV ou de HCMV. Le même jour,  $5.10^5$  cellules HT29 ont été implantées en s.c. au niveau du flanc droit de ces souris ainsi qu'à des souris contrôles non infectées. Suite à l'apparition de tumeurs visibles, la croissance tumorale a été suivie tous les 2-3 jours. Les données sont exprimées en moyenne des volumes  $\pm$  écartype de 5 à 8 souris. Chaque graphique montre une expérience représentative de 2 expériences. Les statistiques notées en noire ou en violet correspondent aux différences statistiques entre le groupe infecté avec le MCMV et les groupes non infectés ou infectés avec le HCMV respectivement. B/ À la fin de chaque expérience, les tumeurs des différents groupes sont prélevées et pesées. Les données représentent le poids moyen des tumeurs obtenus dans les 2 expériences  $\pm$  écartype. Les statistiques entre les différents groupes sont montrées.

Malgré la spécificité d'espèce mentionnée précédemment, le MCMV a été montré comme capable d'infecter des cellules humaines (Tang et al., 2006). Nous avons donc testé si les cellules HT29 étaient infectables par le MCMV. *In vitro*, les protéines IE1 et gB ont été détectées dans les cellules infectées avec des MOI de 10 ou 100 (Figure 28A). De même *in situ*, au sein des tumeurs, quelques plages d'infection sont observées et celles-ci seraient à première vue composées d'un nombre réduit de cellules IE1<sup>+</sup> en comparaison aux cellules MC38 à la même dose de virus ( $10^4$  PFU)(Figure 28C)(Figure 24). Malgré l'infection par le MCMV, les cellules HT29 infectées métabolisent le MTT de manière comparable aux cellules non infectées, et ce quel que soit la MOI, suggérant que la viabilité et la prolifération des cellules n'est pas affectée (Figure 28B). D'autre part, ces cellules ne semblent pas produire de particules virales infectieuses contrairement aux cellules murines (non montré). Ces éléments sont donc en faveur d'un effet indirect du MCMV sur l'inhibition de croissance des cellules HT29 observée *in vivo*, qui pourrait également participer à l'effet anti-tumoral observé avec les autres lignées.



**Figure 28 – Les cellules humaines HT29 sont faiblement permmissives au MCMV mais l’infection n’affecte pas leur viabilité *in vitro*.**

A/ Les cellules tumorales HT29 ont étéensemencées à raison de 3000 cellules par puits en plaque 96 puits. Le lendemain, les cellules ont été infectées avec différentes MOI de MCMV et incubées pendant 2 jours à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Les protéines virales IE1 et gB ont ensuite été détectées grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques. Chaque image a été prise avec un grossissement de x20, et est représentative de 2 expériences indépendantes. B/ Les cellules ont étéensemencées et infectées comme mentionné dans le Matériels et Méthodes. Après 72h d’infection, la viabilité des cellules a été déterminée en mesurant la métabolisation du MTT. Les résultats montrés représentent une expérience et sont exprimés en moyenne ± écartype. C/ Les souris NSG ont été infectées en i.p. avec 10<sup>4</sup> PFU de MCMV ou de HCMV. Le même jour, 5.10<sup>5</sup> cellules HT29 ont été implantées en s.c. au niveau du flanc droit de ces souris ainsi qu’à des souris contrôle non infectées. Après 16 jours de croissance, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs prélevées et fixées en formaldéhyde. La protéine IE1 du MCMV a été révélée par immunohistochimie sur les groupes non infecté et infecté par le MCMV. Une souris représentative est montrée par groupe à faible grossissement (« Low magnification » : barre d’échelle : 200 µm) ou à fort grossissement (« High magnification » : barre d’échelle : 50 µm). Un total de 3 à 5 souris ont été analysées pour chaque groupe. Les flèches indiquent les plages de cellules IE1<sup>+</sup>.

#### D. Discussion

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sur des souris déficientes en lymphocytes T montrent une inhibition de la croissance de cellules de carcinome colique murin *in vivo* uniquement lorsque les souris étaient préalablement infectées par le MCMV. Ces observations laissent ainsi transparaître un effet anti-tumoral du CMV murin. L’objectif principal de cette étude a donc été de déterminer si et comment le MCMV pouvait avoir un rôle anti-tumoral chez des souris immunodéficientes.

Par des analyses réalisées *in vitro*, nous avons pu montrer que le MCMV est capable d'infecter différents types de lignées tumorales murines telles que des carcinomes (coliques ou rectaux) ou encore la lignée de mélanome B16F10. De plus, l'infection par le MCMV résulte en une inhibition de la croissance des lignées tumorales MC38 et B16F10 *in vivo* chez des souris CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> déficientes en lymphocytes T et des souris NSG présentant une déficience immunitaire bien plus profonde. Ces éléments renforcent donc notre idée initiale d'un potentiel lien direct entre l'infection des cellules et l'effet inhibiteur du MCMV observé *in vivo*. Nous avons pu démontrer que le virus peut diminuer la viabilité des cellules B16F10 et induire leur apoptose dès 72h post-infection *in vitro* ; il est donc envisageable que le mécanisme opère également *in vivo* pour ces cellules, bien que cela reste à confirmer *in situ*. Le MCMV pourrait également agir par d'autres mécanismes étant donné que, bien que la croissance des cellules MC38 soit inhibée *in vivo* par le virus, l'infection de ces cellules *in vitro* ne semble pas déclencher l'apoptose et n'induit qu'une diminution partielle de la viabilité cellulaire à une forte MOI. Cet effet anti-tumoral pourrait être direct en induisant un autre type de mort cellulaire que l'apoptose, ou pourrait être dû à un mécanisme impactant la prolifération des cellules.

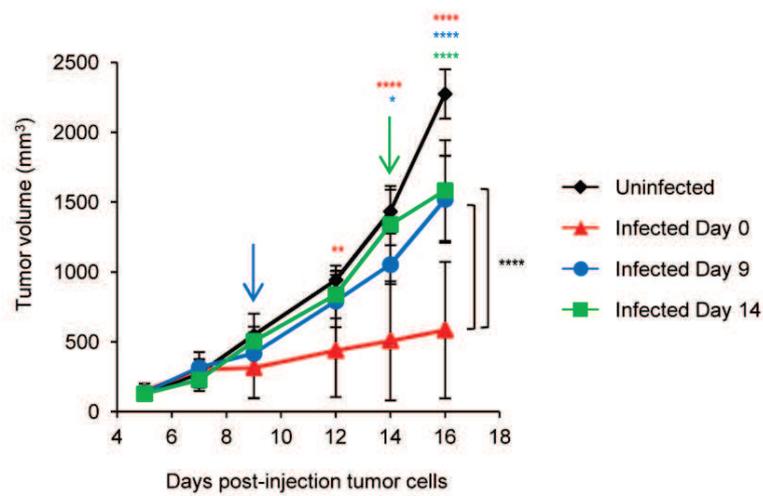
Une autre possibilité est que le virus joue un effet indirect, comme cela a été suggéré par les études d'Erlach et al. dans lesquelles le MCMV inhibe le développement d'une lignée de lymphome murin à tropisme hépatique non permissive vis-à-vis du virus (Erlach et al. 2002)(Erlach et al., 2006)(Erlach et al., 2008). Le mécanisme n'a cependant pas été déterminé mais les auteurs mentionnent que l'immunité ne semble pas impliquée dans le contrôle des tumeurs. L'existence d'une activité anti-tumorale indirecte du MCMV est difficile à étudier avec les cellules MC38 puisque, même si ces cellules semblent n'être infectables qu'à de fortes MOI *in vitro*, il est imaginable que les souris présentent des charges virales suffisamment importantes pour infecter une partie des cellules tumorales et inhiber ainsi leur croissance par un mécanisme direct. Malgré cela, l'inhibition de croissance des cellules HT29 *in vivo*, la faible permissivité de ces cellules et l'absence d'effet de l'infection sur leur viabilité *in vitro* sont globalement en faveur d'un rôle indirect du virus, peut-être en empêchant la vascularisation de la tumeur puisque les cellules endothéliales murines sont très permissives au MCMV (Brune et al., 2001). Il est également envisageable qu'il y ait à la fois une action directe et indirecte du virus dont l'effet cumulatif induirait l'inhibition de croissance observée. Bien que tous les mécanismes par lesquels le MCMV exerce son effet anti-tumoral ne soient pas caractérisés, nous pouvons conclure que l'effet de l'infection par le MCMV est différent selon la lignée cellulaire tumorale étudiée mais résulte en une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* dans nos conditions expérimentales.

À notre connaissance, notre étude est la première à montrer que le MCMV peut avoir un effet anti-tumoral en infectant directement des cellules transformées. Comme le HCMV, le MCMV est capable d'infecter des cellules tumorales *in vitro* (Blaheta et al., 2006)(Cobbs et al., 2007). Chez l'homme, l'infection par le HCMV a été associée à un effet pro-tumoral chez

des individus atteints de cancers solides (Rahbar et al., 2012)(Chen et al., 2014)(Courivaud et al., 2012), alors que le virus semble pouvoir avoir un effet anti-tumoral chez des individus atteints de cancers d'origine hématologique et recevant une greffe de cellules souches ; ces individus sont fortement immunosupprimés et peuvent donc avoir des charges virales élevées (Green et al., 2013)(Elmaagacli et al., 2011). L'effet pro- ou anti-tumoral observé chez l'homme pourrait être dû : (i) à l'origine des cancers qui est différente dans ces études, et (ii) à l'immunosuppression appliquée dans les cas de greffe de cellules souches. Notre étude a été réalisée dans des contextes d'immunodéfiance particulièrement importants (surtout pour les expériences menées sur les souris NSG) et montre un effet anti-tumoral du CMV vis-à-vis de tumeurs solides, comme observé dans les études menées sur les individus atteints de cancers hématologiques chez l'homme. Il est donc probable que les différences observées chez l'homme ne soient pas uniquement dues à l'origine du cancer mais également au traitement immunosuppresseur utilisé comme il a été suggéré par Manjappa et collègues (Manjappa et al., 2014). En effet, dans cette étude que nous avons déjà mentionnée, les patients atteints de LMA et ayant reçu un traitement myéloablatif ont un risque de rechute réduit en comparaison des patients ayant eu un conditionnement d'intensité réduite, suggérant bien que le niveau d'immunosuppression est un facteur important pour l'effet anti-tumoral du HCMV.

L'association positive entre l'immunosuppression et l'effet anti-tumoral du HCMV pourrait reposer sur deux éléments probablement liés : (i) l'immunosuppression thérapeutique réalisée chez les patients peut déclencher la réactivation du virus et donc potentiellement favoriser l'infection des cellules tumorales, et (ii) ce traitement vise à éliminer les cellules de moelle osseuse (dont les cellules tumorales) et ne laisserait qu'un nombre réduit de cellules cancéreuses chez le patient que le virus pourrait contrôler à lui seul. En effet, dans l'ensemble des études décrivant une association positive entre le HCMV et un risque réduit de rechute, le facteur primordial semble être la réactivation/réplication précoce du virus (moins de 100 jours post-greffe généralement) chez les individus immunosupprimés (Elmaagacli et al., 2011)(Ito et al., 2013)(Green et al., 2013). De ce fait, certains auteurs ont défini cette inhibition comme un effet du virus contre la leucémie (Elmaagacli et al., 2011). Il est probable que l'inhibition de croissance observée dans notre modèle puisse être elle aussi due à une grande quantité de particules virales infectieuses produites suite à la réplication du MCMV, étant donné que nous nous sommes placés dans un contexte d'infection aiguë lors de laquelle le virus est capable de se multiplier *in vivo* dans des hôtes plus ou moins immunodéficients. Dans un autre modèle murin, l'importance de la réplication virale a également été montrée pour le contrôle d'une lignée de lymphome, puisque l'injection d'un MCMV inactivé par les ultraviolets ou d'un virus atténué n'est pas capable d'inhiber l'établissement de colonies lymphomateuses dans le foie, contrairement au MCMV WT (Erlach et al., 2008). Dans ce même modèle murin, le MCMV n'est capable de contrôler que des nodules lymphomateux hépatiques de petite taille, des tumeurs plus importantes n'étant pas sensibles vis-à-vis du virus (Erlach et al., 2008). Dans une expérience préliminaire, nous avons pu montrer que l'injection de  $10^4$  PFU de MCMV à des souris NSG

plusieurs jours après l'injection s.c des cellules de carcinome colique MC38 (ici à J9 et J14) ne réduit que faiblement la croissance tumorale et, malgré l'importante quantité de virus injectée, les tumeurs continuent de croître (Figure 29). Ces éléments montrent que le HCMV peut effectivement contrôler de faibles quantités de cellules tumorales mais qu'à lui seul, il ne peut complètement inhiber la croissance de tumeurs plus importantes. Cette observation pourrait, au moins en partie, expliquer pourquoi la diminution du risque de rechute ne concerne que les individus ayant reçu un traitement myéloablatif pour des LMA et ayant donc un faible nombre de cellules tumorales pouvant être contrôlé par le HCMV lorsque celui-ci se réactive précocement.



**Figure 29 – L'infection des souris après l'apparition des tumeurs visibles inhibe faiblement la croissance tumorale.**

Les souris NSG ont reçu en s.c  $5 \cdot 10^5$  cellules MC38 et ont été infectées avec  $10^4$  PFU de HCMV à J0, J9 (flèche bleue) et J14 (flèche verte) post-injection des cellules tumorales. Suite à l'apparition de tumeurs visibles, la croissance tumorale a été suivie tous les 2-3 jours en mesurant la longueur et la largeur des tumeurs afin de déterminer le volume tumoral. Les données sont exprimées en moyenne des volumes  $\pm$  écartype de 5 à 10 souris. Les statistiques notées en rouge, bleu ou vert correspondent aux différences statistiques entre le groupe non infecté et les souris infectées à J0, J9 et J14 respectivement.

Chez les individus ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques, l'effet anti-tumoral du HCMV est lié au déclenchement d'une GVHD subséquente à la réactivation virale, et d'un effet GVL dû à l'amplification de cellules immunitaires spécifiques du virus (Jang et al., 2015)(Ito et al., 2013) (voir introduction p75-76). Dans notre modèle, aucune GVHD ne peut être induite et l'implantation de la tumeur et l'infection ont été faites de manière concomitante. Le virus n'a probablement pas eu suffisamment de temps pour activer et amplifier des cellules immunitaires pouvant avoir un effet anti-tumoral. Nos conditions expérimentales permettent ainsi de mettre en évidence un rôle anti-tumoral du HCMV indépendant de ces facteurs.

Chez l'homme, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> TEMRA sont amplifiés plusieurs semaines après la réactivation du virus chez les individus greffés avec des cellules souches (Knight et al., 2010)(Scheper et al., 2013). Ces cellules amplifiées par l'infection ont un effet anti-leucémique sans qu'il y ait déclenchement d'une GVHD, ce qui est un avantage certain pour le patient (Scheper et al., 2013). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> induits par l'infection à CMV chez les transplantés rénaux semblent également pouvoir jouer un rôle anti-tumoral dans le cadre de cancers cutanés (Couzi et al., 2010). Il est possible que l'absence de réponse des lymphocytes T  $\gamma\delta$  CMV-induits dans notre modèle soit due aux conditions expérimentales choisies, i.e. un délai trop court entre l'infection et l'implantation des tumeurs. Il serait donc intéressant de mettre en place un modèle plus proche des conditions humaines afin de pouvoir étudier plus en détails les mécanismes mis en jeu par le CMV pour activer et sélectionner des sous-populations immunitaires spécifiques (dont les lymphocytes T  $\gamma\delta$ ) et leur conférer un effet anti-tumoral à long terme.

### **E. Perspectives**

Notre étude montre que le MCMV peut avoir un effet anti-tumoral qui est indépendant de l'activation d'une réponse immunitaire effectrice. Ces résultats, en plus de ceux de Erlach et collègues, renforcent les études qui ont montré que le HCMV est un facteur significativement associé à un risque réduit de rechute en absence de GVHD chez l'homme (Green et al., 2013)(Elmaagacli et al., 2011)(Erlach et al., 2008). Il est donc possible que les virus humain et murin aient des propriétés anti-tumorales comparables. De ce fait, l'identification des mécanismes mis en place par le MCMV pourrait nous aider à mieux comprendre et potentiellement à induire les fonctions anti-tumorales du HCMV.

Nous avons pu montrer que le virus murin est capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales de la lignée B16F10 *in vitro*. Cette apoptose pourrait expliquer au moins partiellement l'inhibition de croissance observée *in vivo*. Il est donc nécessaire de vérifier que le virus est capable d'activer l'apoptose des cellules au sein même de la tumeur, en analysant l'expression de caspases actives ou la fragmentation de l'ADN par immunohistochimie. Le CMV pourrait également créer un microenvironnement favorisant l'induction de l'apoptose des cellules tumorales *in vivo*. D'autres voies de mort cellulaire pourraient être activées par l'infection à CMV. Dans un modèle murin de rétinite induite, le MCMV est en effet capable d'induire la mort des cellules par nécroptose qui est une forme de mort indépendante des caspases (Chien et al., 2012). Cette mort cellulaire est due à l'action des Receptor-interacting serine/threonine protein kinase (RIPK) 1 et 3 suite à l'activation du TNF récepteur 1 ou de différents TLR (Cho et al., 2009). Nous pourrions donc tester *in vitro* la capacité du MCMV à induire la nécroptose en ajoutant dans nos conditions la nécrostatine, qui est connue pour empêcher cette mort cellulaire (Miao and Degterev, 2009). Le MCMV peut également induire une mort inflammatoire qui est la pyroptose (Chien et al., 2012)(Rathinam et al., 2010). Cette mort est sous le contrôle de l'inflammasome AIM-2 (Absent in melanoma 2) et est particulièrement inflammatoire puisqu'elle résulte en la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 qui vont activer les cellules NK entre autres (Rathinam et al.,

2010). Il serait de ce fait intéressant de quantifier ces cytokines dans le surnageant des cellules tumorales infectées afin de déterminer si dans nos conditions, le virus induit la pyroptose des cellules tumorales.

Il est également imaginable que le MCMV puisse exercer son activité anti-tumorale sans obligatoirement tuer les cellules infectées. L'infection pourrait avoir un effet cytostatique ne menant pas à une régression de la tumeur mais uniquement à un maintien de celle-ci sans qu'il n'y ait de progression tumorale. Ce mécanisme pourrait correspondre à nos observations puisqu'aucune régression complète n'a été observée, même à de fortes doses de virus. L'effet cytostatique pourrait être dû à une inhibition de la prolifération des cellules tumorales ou à un équilibre entre le nombre de cellules tumorales tuées par l'infection et celles se multipliant, mais cette hypothèse est particulièrement difficile à montrer.

Une autre possibilité est que le MCMV pourrait agir de manière indirecte sur la croissance tumorale. On peut émettre l'hypothèse que le virus puisse bloquer la néoangiogenèse, soit en infectant et en tuant les cellules endothéliales, soit en empêchant la sécrétion de molécules pro-angiogéniques comme le VEGF ou l'angiopoïétine-2. La première hypothèse pourra être testée en faisant une colocalisation du marqueur CD31 et de la caspase-3 clivée ou de l'ADN fragmenté par un marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Enfin, le MCMV pourrait également inhiber la sécrétion de facteurs de croissance nécessaires à la tumeur comme l'Epithelial Growth Factor. Il reste donc encore de nombreuses voies à explorer avant de pouvoir donner une conclusion définitive sur les mécanismes mis en place par le MCMV pour inhiber la croissance tumorale.

Comme son homologue humain pour les cancers hématologiques, le MCMV pourrait avoir un effet de « virus contre le cancer » sur des lignées tumorales d'origine épithéliale. Afin de se rapprocher des conditions trouvées chez l'homme, il serait intéressant d'établir un modèle murin de latence virale et de voir dans ce contexte si (i) le MCMV se réactive après une immunosuppression induite par des agents thérapeutiques, (ii) l'intensité de l'immunosuppression peut influencer la réactivation du virus, et (iii) si la réactivation du MCMV peut inhiber dans ce contexte la croissance de cellules tumorales d'origine épithéliale, comme observé chez les souris immunodéficientes. Ces expériences nous permettront de déterminer l'importance de l'immunosuppression dans l'effet anti-tumoral du CMV et ainsi de clarifier les situations pouvant potentiellement induire cet effet et de comprendre pourquoi les études faites chez l'homme donnent des résultats aussi disparates.

D'autre part, les données que nous avons au démarrage de ce projet suggéraient que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins pouvaient être sélectionnés par le MCMV dès la 1<sup>ère</sup> ou la 2<sup>ème</sup> semaine d'infection. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet anti-tumoral notable chez des souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  infectées depuis 7 jours ou chez des souris ayant reçu en i.v. des splénocytes de souris  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  infectées depuis 14 jours. Avec nos données actuelles et l'étude de Sell et collègues, nous savons maintenant que le MCMV sélectionne certaines

sous-populations T  $\gamma\delta$  plus tardivement (à partir du jour 28) (Sell et al., 2015). Il serait donc intéressant de déterminer si, suite à cette sélection, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  murins possèdent une double réactivité à la fois anti-virale et anti-tumorale comme cela a été décrit pour leurs homologues humains (Halary et al., 2005). Afin d'éliminer l'effet direct du CMV sur la tumeur il serait intéressant de générer des lignées tumorales résistantes à l'infection comme dans l'étude de Erlach (Erlach et al., 2008). Si les cellules T  $\gamma\delta$  murines se comportent bel et bien comme les cellules humaines induites par l'infection à HCMV, le modèle murin d'infection à CMV nous permettrait de déterminer quels sont les mécanismes mis en jeu dans l'acquisition de cette double réactivité et surtout, comment les lymphocytes T  $\gamma\delta$  induits par l'infection protègent à long terme contre le cancer.

# BIBLIOGRAPHIE

- Adams, E. J., Y. H. Chien, et al. (2005). "Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22." *Science* **308**(5719): 227-31.
- Agerberth, B., J. Charo, et al. (2000). "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations." *Blood* **96**(9): 3086-93.
- Alexandrov, L. B., S. Nik-Zainal, et al. (2013). "Signatures of mutational processes in human cancer." *Nature* **500**(7463): 415-21.
- Allison, T. J., C. C. Winter, et al. (2001). "Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor." *Nature* **411**(6839): 820-4.
- Andoniou, C. E., S. L. van Dommelen, et al. (2005). "Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity." *Nat Immunol* **6**(10): 1011-9.
- Andrews, D. M., C. E. Andoniou, et al. (2001). "Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis." *Nat Immunol* **2**(11): 1077-84.
- Arase, H., E. S. Mocarski, et al. (2002). "Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors." *Science* **296**(5571): 1323-6.
- Arens, R., P. Wang, et al. (2008). "Cutting edge: murine cytomegalovirus induces a polyfunctional CD4 T cell response." *J Immunol* **180**(10): 6472-6.
- Asada, T. (1974). "Treatment of human cancer with mumps virus." *Cancer* **34**(6): 1907-28.
- Asarnow, D. M., W. A. Kuziel, et al. (1988). "Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells." *Cell* **55**(5): 837-47.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, et al. (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." *Nat Immunol* **2**(12): 1144-50.
- Bachem, A., S. Guttler, et al. (2010). "Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells." *J Exp Med* **207**(6): 1273-81.
- Bai, L., D. Picard, et al. (2012). "The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR." *Eur J Immunol* **42**(9): 2505-10.
- Barcy, S., S. C. De Rosa, et al. (2008). "Gamma delta+ T cells involvement in viral immune control of chronic human herpesvirus 8 infection." *J Immunol* **180**(5): 3417-25.
- Barrett, A. J. (2011). "CMV: when bad viruses turn good." *Blood* **118**(5): 1193-4.
- Beninga, J., B. Kropff, et al. (1995). "Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response." *J Gen Virol* **76** ( Pt 1): 153-60.
- Bentz, G. L. and A. D. Yurochko (2008). "Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(14): 5531-6.
- Bhagat, G., A. J. Naiyer, et al. (2008). "Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease." *J Clin Invest* **118**(1): 281-93.
- Biron, C. A., K. S. Byron, et al. (1989). "Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells." *N Engl J Med* **320**(26): 1731-5.
- Bishop, J. M. (1991). "Molecular themes in oncogenesis." *Cell* **64**(2): 235-48.
- Blaheta, R. A., W. D. Beecken, et al. (2004). "Human cytomegalovirus infection of tumor cells downregulates NCAM (CD56): a novel mechanism for virus-induced tumor invasiveness." *Neoplasia* **6**(4): 323-31.
- Blaheta, R. A., E. Weich, et al. (2006). "Human cytomegalovirus infection alters PC3 prostate carcinoma cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix." *Neoplasia*

**8(10): 807-16.**

- Blink, S. E., M. W. Caldis, et al. (2014). "gammadelta T cell subsets play opposing roles in regulating experimental autoimmune encephalomyelitis." Cell Immunol **290(1)**: 39-51.
- Bluestone, J. A., R. Q. Cron, et al. (1988). "Structure and specificity of T cell receptor gamma/delta on major histocompatibility complex antigen-specific CD3+, CD4-, CD8-T lymphocytes." J Exp Med **168(5)**: 1899-916.
- Boismenu, R., L. Feng, et al. (1996). "Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia." J Immunol **157(3)**: 985-92.
- Boismenu, R. and W. L. Havran (1994). "Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells." Science **266(5188)**: 1253-5.
- Bongers, G., D. Maussang, et al. (2010). "The cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes intestinal neoplasia in transgenic mice." J Clin Invest **120(11)**: 3969-78.
- Bonneville, M., R. L. O'Brien, et al. (2010). "Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity." Nat Rev Immunol **10(7)**: 467-78.
- Boppana, S. B., R. F. Pass, et al. (1992). "Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality." Pediatr Infect Dis J **11(2)**: 93-9.
- Born, W. K. and R. L. O'Brien (2011). "gammadelta T cells develop, respond and survive - with a little help from CD27." Eur J Immunol **41(1)**: 26-8.
- Born, W. K., Z. Yin, et al. (2010). "Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse." J Immunol **184(8)**: 4055-61.
- Botto, S., D. N. Streblow, et al. (2011). "IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin." Blood **117(1)**: 352-61.
- Boyden, L. M., J. M. Lewis, et al. (2008). "Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells." Nat Genet **40(5)**: 656-62.
- Brandes, M., K. Willimann, et al. (2009). "Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A **106(7)**: 2307-12.
- 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.
- Britt, W. J., L. Vugler, et al. (1990). "Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response." J Virol **64(3)**: 1079-85.
- Brocchieri, L., T. N. Kledal, et al. (2005). "Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice." J Virol **79(12)**: 7570-96.
- Brown, M. G., A. O. Dokun, et al. (2001). "Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection." Science **292(5518)**: 934-7.
- Bruder, J., K. Siewert, et al. (2012). "Target specificity of an autoreactive pathogenic human gammadelta-T cell receptor in myositis." J Biol Chem **287(25)**: 20986-95.
- Brune, W., C. Menard, et al. (2001). "A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism." Science **291(5502)**: 303-5.
- Bubic, I., M. Wagner, et al. (2004). "Gain of virulence caused by loss of a gene in murine

- cytomegalovirus." J Virol **78**(14): 7536-44.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, et al. (1983). "Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo." J Immunol **131**(3): 1531-8.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, et al. (1984). "Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice." J Virol **52**(1): 119-28.
- Burke, J. M., D. L. Lamm, et al. (2012). "A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer." J Urol **188**(6): 2391-7.
- Busche, A., A. C. Jirno, et al. (2013). "Priming of CD8+ T cells against cytomegalovirus-encoded antigens is dominated by cross-presentation." J Immunol **190**(6): 2767-77.
- Caccamo, N., C. La Mendola, et al. (2011). "Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells." Blood **118**(1): 129-38.
- Carding, S. R. and P. J. Egan (2002). "Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity." Nat Rev Immunol **2**(5): 336-45.
- Carding, S. R., S. Kyes, et al. (1990). "Developmentally regulated fetal thymic and extrathymic T-cell receptor gamma delta gene expression." Genes Dev **4**(8): 1304-15.
- Carmi, Y., G. Rinott, et al. (2011). "Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis." J Immunol **186**(6): 3462-71.
- Casazza, J. P., M. R. Betts, et al. (2006). "Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation." J Exp Med **203**(13): 2865-77.
- Cavanaugh, V. J., Y. Deng, et al. (2003). "Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland." J Virol **77**(3): 1703-17.
- Cekinovic, D., M. Golemac, et al. (2008). "Passive immunization reduces murine cytomegalovirus-induced brain pathology in newborn mice." J Virol **82**(24): 12172-80.
- Chan, G., E. R. Bivins-Smith, et al. (2008). "Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage." J Immunol **181**(1): 698-711.
- Chang, W. L., P. A. Barry, et al. (2009). "Human cytomegalovirus suppresses type I interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells through its interleukin 10 homolog." Virology **390**(2): 330-7.
- Chang, W. L., N. Baumgarth, et al. (2004). "Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality." J Virol **78**(16): 8720-31.
- Chen, H. P., J. K. Jiang, et al. (2014). "Tumoral presence of human cytomegalovirus is associated with shorter disease-free survival in elderly patients with colorectal cancer and higher levels of intratumoral interleukin-17." Clin Microbiol Infect **20**(7): 664-71.
- Chen, L., W. He, et al. (2007). "Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN-gamma production by gammadelta T cells." J Immunol **178**(5): 2730-6.
- Cheng, L., Y. Cui, et al. (2008). "Mouse gammadelta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells." J Neuroimmunol **203**(1): 3-11.
- Chien, H. and R. D. Dix (2012). "Evidence for multiple cell death pathways during development of experimental cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression: apoptosis, necroptosis, and pyroptosis." J Virol **86**(20): 10961-78.

- Chien, Y. H. and M. Bonneville (2006). "Gamma delta T cell receptors." Cell Mol Life Sci **63**(18): 2089-94.
- Chien, Y. H. and Y. Konigshofer (2007). "Antigen recognition by gammadelta T cells." Immunol Rev **215**: 46-58.
- Chien, Y. H., C. Meyer, et al. (2014). "gammadelta T cells: first line of defense and beyond." Annu Rev Immunol **32**: 121-55.
- Chien, Y. H., X. Zeng, et al. (2013). "The natural and the inducible: interleukin (IL)-17-producing gammadelta T cells." Trends Immunol **34**(4): 151-4.
- Cho, Y. S., S. Challa, et al. (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." Cell **137**(6): 1112-23.
- Choudhary, A., F. Davodeau, et al. (1995). "Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma." J Immunol **154**(8): 3932-40.
- Cinatl, J., Jr., R. Kotchetkov, et al. (1999). "Human cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 independent of the tumor suppressor protein p53." Am J Pathol **155**(1): 285-92.
- Cinatl, J., Jr., J. U. Vogel, et al. (2004). "Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression." FEMS Microbiol Rev **28**(1): 59-77.
- Cobbs, C., S. Khan, et al. (2014). "HCMV glycoprotein B is expressed in primary glioblastomas and enhances growth and invasiveness via PDGFR-alpha activation." Oncotarget **5**(4): 1091-100.
- Cobbs, C. S., L. Harkins, et al. (2002). "Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma." Cancer Res **62**(12): 3347-50.
- Cobbs, C. S., L. Soroceanu, et al. (2007). "Human cytomegalovirus induces cellular tyrosine kinase signaling and promotes glioma cell invasiveness." J Neurooncol **85**(3): 271-80.
- Cobbs, C. S., L. Soroceanu, et al. (2008). "Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity." Cancer Res **68**(3): 724-30.
- Cohen, P., U. Vourka-Karussis, et al. (1993). "Spontaneous and IL-2-induced anti-leukemic and anti-host effects against tumor- and host-specific alloantigens." J Immunol **151**(9): 4803-10.
- Collins, R. A., D. Werling, et al. (1998). "Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells." J Leukoc Biol **63**(6): 707-14.
- Correia, D. V., M. Fogli, et al. (2011). "Differentiation of human peripheral blood Vdelta1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells." Blood **118**(4): 992-1001.
- 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.
- Courivaud, C., J. Bamoulid, et al. (2012). "Cytomegalovirus exposure, immune exhaustion and cancer occurrence in renal transplant recipients." Transpl Int **25**(9): 948-55.
- Couzi, L., Y. Levaillant, et al. (2010). "Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation." J Am Soc Nephrol **21**(1): 181-8.
- Couzi, L., V. Pitard, et al. (2015). "Direct and Indirect Effects of Cytomegalovirus-Induced gammadelta T Cells after Kidney Transplantation." Front Immunol **6**: 3.

- Couzi, L., V. Pitard, et al. (2009). "Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients." J Infect Dis **200**(9): 1415-24.
- Couzi, L., V. Pitard, et al. (2012). "Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa)." Blood **119**(6): 1418-27.
- Crough, T. and R. Khanna (2009). "Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside." Clin Microbiol Rev **22**(1): 76-98, Table of Contents.
- Crowley, M. P., A. M. Fahrner, et al. (2000). "A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule." Science **287**(5451): 314-6.
- Crozat, K., R. Guiton, et al. (2010). "The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells." J Exp Med **207**(6): 1283-92.
- Cui, Y., H. Shao, et al. (2009). "Major role of gamma delta T cells in the generation of IL-17+ uveitogenic T cells." J Immunol **183**(1): 560-7.
- Daley-Bauer, L. P., L. J. Roback, et al. (2014). "Cytomegalovirus hijacks CX3CR1(hi) patrolling monocytes as immune-privileged vehicles for dissemination in mice." Cell Host Microbe **15**(3): 351-62.
- Dalod, M., T. Hamilton, et al. (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." J Exp Med **197**(7): 885-98.
- Dalod, M., T. P. Salazar-Mather, et al. (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." J Exp Med **195**(4): 517-28.
- 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.
- Daniels, K. A., G. Devora, et al. (2001). "Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H." J Exp Med **194**(1): 29-44.
- D'Asaro, M., C. La Mendola, et al. (2010). "V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells." J Immunol **184**(6): 3260-8.
- Davey, M. S., C. Y. Lin, et al. (2011). "Human neutrophil clearance of bacterial pathogens triggers anti-microbial gammadelta T cell responses in early infection." PLoS Pathog **7**(5): e1002040.
- Davignon, J. L., P. Castanie, et al. (1996). "Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro." J Virol **70**(4): 2162-9.
- Davis, M. M. and P. J. Bjorkman (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." Nature **334**(6181): 395-402.
- De La Barrera, S. S., M. Finiasz, et al. (2003). "Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis." Clin Exp Immunol **132**(3): 450-61.
- de Martel, C., J. Ferlay, et al. (2012). "Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis." Lancet Oncol **13**(6): 607-15.
- De Paoli, P., D. Gennari, et al. (1990). "Gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection." J Infect Dis **161**(5): 1013-6.

- De Rosa, S. C., J. P. Andrus, et al. (2004). "Ontogeny of gamma delta T cells in humans." J Immunol **172**(3): 1637-45.
- de Villartay, J. P., A. Lim, et al. (2005). "A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection." J Clin Invest **115**(11): 3291-9.
- DeBarros, A., M. Chaves-Ferreira, et al. (2011). "CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human gammadelta peripheral blood lymphocytes." Eur J Immunol **41**(1): 195-201.
- Dechanet, J., P. Merville, et al. (1999a). "Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients." J Infect Dis **179**(1): 1-8.
- Dechanet, J., P. Merville, et al. (1999b). "Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus." J Clin Invest **103**(10): 1437-49.
- Delale, T., A. Paquin, et al. (2005). "MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo." J Immunol **175**(10): 6723-32.
- Devaud, C., E. Bilhere, et al. (2009). "Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model." Cancer Res **69**(9): 3971-8.
- Devaud, C., B. Rousseau, et al. (2013). "Anti-metastatic potential of human Vdelta1(+) gammadelta T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma." Cancer Immunol Immunother **62**(7): 1199-210.
- Devilder, M. C., S. Allain, et al. (2009). "Early triggering of exclusive IFN-gamma responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **183**(6): 3625-33.
- Devilder, M. C., S. Maillet, et al. (2006). "Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation." J Immunol **176**(3): 1386-93.
- 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.
- Dieude, M., H. Striegl, et al. (2011). "Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted gammadelta T cells in the normal murine repertoire." J Immunol **186**(8): 4771-81.
- Dokun, A. O., S. Kim, et al. (2001). "Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection." Nat Immunol **2**(10): 951-6.
- Dolan, A., C. Cunningham, et al. (2004). "Genetic content of wild-type human cytomegalovirus." J Gen Virol **85**(Pt 5): 1301-12.
- Dong, P., S. Zhang, et al. (2014). "Global characterization of differential gene expression profiles in mouse Vgamma1+ and Vgamma4+ gammadelta T cells." PLoS One **9**(11): e112964.
- Doniger, J., S. Muralidhar, et al. (1999). "Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate." Clin Microbiol Rev **12**(3): 367-82.
- Dopfer, E. P., F. A. Hartl, et al. (2014). "The CD3 conformational change in the gammadelta T cell receptor is not triggered by antigens but can be enforced to enhance tumor killing." Cell Rep **7**(5): 1704-15.
- Doring, M., I. Lessin, et al. (2014). "M27 expressed by cytomegalovirus counteracts effective type I interferon induction of myeloid cells but not of plasmacytoid dendritic cells." J

- Virology **88**(23): 13638-50.
- Dudal, S., C. Turriere, et al. (2006). "Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*." J Immunol **177**(8): 5533-9.
- Dumortier, J., D. N. Streblov, et al. (2008). "Human cytomegalovirus secretome contains factors that induce angiogenesis and wound healing." J Virol **82**(13): 6524-35.
- Dunn, W., C. Chou, et al. (2003). "Functional profiling of a human cytomegalovirus genome." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14223-8.
- Dziurzynski, K., J. Wei, et al. (2011). "Glioma-associated cytomegalovirus mediates subversion of the monocyte lineage to a tumor propagating phenotype." Clin Cancer Res **17**(14): 4642-9.
- Eberl, M., G. W. Roberts, et al. (2009). "A rapid crosstalk of human gammadelta T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections." PLoS Pathog **5**(2): e1000308.
- Ehl, S., K. Schwarz, et al. (2005). "A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells." J Clin Invest **115**(11): 3140-8.
- Elmaagacli, A. H., N. K. Steckel, et al. (2011). "Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients." Blood **118**(5): 1402-12.
- El-Shinawi, M., H. T. Mohamed, et al. (2013). "Human cytomegalovirus infection enhances NF-kappaB/p65 signaling in inflammatory breast cancer patients." PLoS One **8**(2): e55755.
- Erlach, K. C., V. Bohm, et al. (2008). "Activation of hepatic natural killer cells and control of liver-adapted lymphoma in the murine model of cytomegalovirus infection." Med Microbiol Immunol **197**(2): 167-78.
- Erlach, K. C., V. Bohm, et al. (2006). "Lymphoma cell apoptosis in the liver induced by distant murine cytomegalovirus infection." J Virol **80**(10): 4801-19.
- Erlach, K. C., J. Podlech, et al. (2002). "Tumor control in a model of bone marrow transplantation and acute liver-infiltrating B-cell lymphoma: an unpredicted novel function of cytomegalovirus." J Virol **76**(6): 2857-70.
- Esclatine, A., M. Lemullois, et al. (2000). "Human cytomegalovirus infects Caco-2 intestinal epithelial cells basolaterally regardless of the differentiation state." J Virol **74**(1): 513-7.
- Falini, B., L. Flenghi, et al. (1989). "Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues." J Immunol **143**(8): 2480-8.
- Fang, H., T. Welte, et al. (2010). "gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection." FEMS Immunol Med Microbiol **59**(1): 71-80.
- Ferrick, D. A., M. D. Schrenzel, et al. (1995). "Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo." Nature **373**(6511): 255-7.
- Feurle, J., E. Espinosa, et al. (2002). "Escherichia coli produces phosphoantigens activating human gamma delta T cells." J Biol Chem **277**(1): 148-54.
- Fielding, C. A., R. Aicheler, et al. (2014). "Two novel human cytomegalovirus NK cell evasion functions target MICA for lysosomal degradation." PLoS Pathog **10**(5): e1004058.
- Fitzgerald, N. A. and G. R. Shellam (1991). "Host genetic influences on fetal susceptibility to murine cytomegalovirus after maternal or fetal infection." J Infect Dis **163**(2): 276-81.

- Floor, S. L., J. E. Dumont, et al. (2012). "Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time?" Trends Mol Med **18**(9): 509-15.
- Fodil-Cornu, N., S. H. Lee, et al. (2008). "Ly49h-deficient C57BL/6 mice: a new mouse cytomegalovirus-susceptible model remains resistant to unrelated pathogens controlled by the NK gene complex." J Immunol **181**(9): 6394-405.
- Foley, B., S. Cooley, et al. (2012). "Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C<sup>+</sup> natural killer cells with potent function." Blood **119**(11): 2665-74.
- Fornara, C., D. Lilleri, et al. (2011). "Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and gammadelta T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy." J Clin Immunol **31**(6): 1054-64.
- Forsyth, P., G. Roldan, et al. (2008). "A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas." Mol Ther **16**(3): 627-32.
- Friborg, J., Jr., W. Kong, et al. (1999). "p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death." Nature **402**(6764): 889-94.
- Fu, X., A. Rivera, et al. (2015). "An HSV-2 based oncolytic virus can function as an attractant to guide migration of adoptively transferred T cells to tumor sites." Oncotarget **6**(2): 902-14.
- Fujishima, N., M. Hirokawa, et al. (2007). "Skewed T cell receptor repertoire of Vdelta1(+) gammadelta T lymphocytes after human allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and the potential role for Epstein-Barr virus-infected B cells in clonal restriction." Clin Exp Immunol **149**(1): 70-9.
- Galanis, E., S. N. Markovic, et al. (2012). "Phase II trial of intravenous administration of Reolysin((R)) (Reovirus Serotype-3-dearing Strain) in patients with metastatic melanoma." Mol Ther **20**(10): 1998-2003.
- Gamadia, L. E., E. B. Remmerswaal, et al. (2003). "Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4<sup>+</sup> T cells in protection against CMV disease." Blood **101**(7): 2686-92.
- Gamadia, L. E., R. J. Rentenaar, et al. (2001). "Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers." Blood **98**(3): 754-61.
- Gandhi, M. K. and R. Khanna (2004). "Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments." Lancet Infect Dis **4**(12): 725-38.
- Gao, J. L. and P. M. Murphy (1994). "Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor." J Biol Chem **269**(46): 28539-42.
- Gao, Y., W. Yang, et al. (2003). "Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity." J Exp Med **198**(3): 433-42.
- Gauvrit, A., S. Brandler, et al. (2008). "Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response." Cancer Res **68**(12): 4882-92.
- Geder, K. M., R. Lausch, et al. (1976). "Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus." Science **192**(4244): 1134-7.
- Geder, L., A. M. Laychock, et al. (1978). "Alterations in biological properties of different lines of cytomegalovirus-transformed human embryo lung cells following in vitro cultivation." IARC Sci Publ(24 Pt 2): 591-601.
- Geletneky, K., J. Huesing, et al. (2012). "Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients

- with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol." BMC Cancer **12**: 99.
- Gerber, D. J., V. Azuara, et al. (1999). "IL-4-producing gamma delta T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen." J Immunol **163**(6): 3076-82.
- Gerstel, D., F. Wegwitz, et al. (2011). "CEACAM1 creates a pro-angiogenic tumor microenvironment that supports tumor vessel maturation." Oncogene **30**(41): 4275-88.
- Gertner-Dardenne, J., R. Castellano, et al. (2012). "Human Vgamma9Vdelta2 T cells specifically recognize and kill acute myeloid leukemic blasts." J Immunol **188**(9): 4701-8.
- Gibbons, D. L., S. F. Haque, et al. (2009). "Neonates harbour highly active gammadelta T cells with selective impairments in preterm infants." Eur J Immunol **39**(7): 1794-806.
- Gibson, W. (1996). "Structure and assembly of the virion." Intervirology **39**(5-6): 389-400.
- Girardi, M., E. Glusac, et al. (2003). "The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalpha+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer." J Exp Med **198**(5): 747-55.
- Girardi, M., D. E. Oppenheim, et al. (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." Science **294**(5542): 605-9.
- 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.
- Goldmacher, V. S., L. M. Bartle, et al. (1999). "A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12536-41.
- Gomes, A. Q., D. V. Correia, et al. (2010). "Identification of a panel of ten cell surface protein antigens associated with immunotargeting of leukemias and lymphomas by peripheral blood gammadelta T cells." Haematologica **95**(8): 1397-404.
- Gonczol, E., P. W. Andrews, et al. (1985). "Cytomegalovirus infection of human teratocarcinoma cells in culture." J Gen Virol **66 ( Pt 3)**: 509-15.
- Green, M. L., W. M. Leisenring, et al. (2013). "CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia." Blood **122**(7): 1316-24.
- Griffiths, P. D. and C. Baboonian (1984). "A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report." Br J Obstet Gynaecol **91**(4): 307-15.
- Grigoriadou, K., L. Boucontet, et al. (2003). "Most IL-4-producing gamma delta thymocytes of adult mice originate from fetal precursors." J Immunol **171**(5): 2413-20.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten, et al. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140**(6): 883-99.
- 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.
- Groh, V., R. Rhinehart, et al. (1999). "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6879-84.
- Groh, V., A. Steinle, et al. (1998). "Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells." Science **279**(5357): 1737-40.
- Grundy, J. E., J. S. Mackenzie, et al. (1981). "Influence of H-2 and non-H-2 genes on

- resistance to murine cytomegalovirus infection." *Infect Immun* **32**(1): 277-86.
- Guillerme, J. B., N. Boisgerault, et al. (2013). "Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells." *Clin Cancer Res* **19**(5): 1147-58.
- Guo, Y., H. K. Ziegler, et al. (1995). "Human T-cell recognition of *Listeria monocytogenes*: recognition of listeriolysin O by TcR alpha beta + and TcR gamma delta + T cells." *Infect Immun* **63**(6): 2288-94.
- Haas, J. D., F. H. Gonzalez, et al. (2009). "CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells." *Eur J Immunol* **39**(12): 3488-97.
- Haas, J. D., S. Ravens, et al. (2012). "Development of interleukin-17-producing gammadelta T cells is restricted to a functional embryonic wave." *Immunity* **37**(1): 48-59.
- Hacker, G., S. Kromer, et al. (1992). "V delta 1+ subset of human gamma delta T cells responds to ligands expressed by EBV-infected Burkitt lymphoma cells and transformed B lymphocytes." *J Immunol* **149**(12): 3984-9.
- Hahn, G., R. Jores, et al. (1998). "Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3937-42.
- Hahn, Y. S., C. Taube, et al. (2004). "Different potentials of gamma delta T cell subsets in regulating airway responsiveness: V gamma 1+ cells, but not V gamma 4+ cells, promote airway hyperreactivity, Th2 cytokines, and airway inflammation." *J Immunol* **172**(5): 2894-902.
- Haks, M. C., J. M. Lefebvre, et al. (2005). "Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage." *Immunity* **22**(5): 595-606.
- Halary, F., A. Amara, et al. (2002). "Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection." *Immunity* **17**(5): 653-64.
- Halary, F., V. Pitard, et al. (2005). "Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells." *J Exp Med* **201**(10): 1567-78.
- Hampfl, J., H. Schild, et al. (1999). "The specificity of a weak gamma delta TCR interaction can be modulated by the glycosylation of the ligand." *J Immunol* **163**(1): 288-94.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-74.
- Hanson, L. K., J. S. Slater, et al. (1999). "Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis." *J Virol* **73**(7): 5970-80.
- Hao, J., S. Dong, et al. (2011). "Regulatory role of Vgamma1 gammadelta T cells in tumor immunity through IL-4 production." *J Immunol* **187**(10): 4979-86.
- Harkins, L., A. L. Volk, et al. (2002). "Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer." *Lancet* **360**(9345): 1557-63.
- Harkins, L. E., L. A. Matlaf, et al. (2010). "Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium." *Herpesviridae* **1**(1): 8.
- Havran, W. L. and J. P. Allison (1988). "Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors." *Nature* **335**(6189): 443-5.
- Hayday, A. C. (2009). "Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response." *Immunity* **31**(2): 184-96.
- Hayes, S. M., R. M. Laird, et al. (2010). "Beyond alphabeta/gammadelta lineage commitment: TCR signal strength regulates gammadelta T cell maturation and

- effector fate." Semin Immunol **22**(4): 247-51.
- He, W., J. Hao, et al. (2010). "Naturally activated V gamma 4 gamma delta T cells play a protective role in tumor immunity through expression of eomesodermin." J Immunol **185**(1): 126-33.
- Heilig, J. S. and S. Tonegawa (1986). "Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes." Nature **322**(6082): 836-40.
- Henao-Tamayo, M. I., D. J. Ordway, et al. (2010). "Phenotypic definition of effector and memory T-lymphocyte subsets in mice chronically infected with Mycobacterium tuberculosis." Clin Vaccine Immunol **17**(4): 618-25.
- Hendricks, D. W., H. H. Balfour, Jr., et al. (2014). "Cutting edge: NKG2C(hi)CD57+ NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus." J Immunol **192**(10): 4492-6.
- Heo, J., T. Reid, et al. (2013). "Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer." Nat Med **19**(3): 329-36.
- Himoudi, N., D. A. Morgenstern, et al. (2012). "Human gammadelta T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells." J Immunol **188**(4): 1708-16.
- 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.
- Hokeness-Antonelli, K. L., M. J. Crane, et al. (2007). "IFN- $\alpha$ -mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection." J Immunol **179**(9): 6176-83.
- Holtmeier, W., M. Pfander, et al. (2001). "The TCR- $\delta$  repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR- $\delta$  repertoire in the peripheral blood." J Invest Dermatol **116**(2): 275-80.
- Hsu, K. M., J. R. Pratt, et al. (2009). "Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration." J Gen Virol **90**(Pt 1): 33-43.
- Huber, S., D. Sartini, et al. (2003). "Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis." J Immunol **170**(6): 3147-53.
- Huber, S. A., D. Graveline, et al. (2000). "V gamma 1+ T cells suppress and V gamma 4+ T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice." J Immunol **165**(8): 4174-81.
- Huber, S. A., D. Sartini, et al. (2002). "Vgamma4(+) T cells promote autoimmune CD8(+) cytolytic T-lymphocyte activation in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice: role for CD4(+) Th1 cells." J Virol **76**(21): 10785-90.
- Huber, S. A., J. E. Stone, et al. (1999). "gamma delta+ T cells regulate major histocompatibility complex class II(IA and IE)-dependent susceptibility to coxsackievirus B3-induced autoimmune myocarditis." J Virol **73**(7): 5630-6.
- Huck, S., P. Dariavach, et al. (1988). "Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes." EMBO J **7**(3): 719-26.
- Hume, A. J., J. S. Finkel, et al. (2008). "Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function." Science **320**(5877): 797-9.
- Ibanez, C. E., R. Schrier, et al. (1991). "Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages." J Virol **65**(12): 6581-8.
- Inoue, S., M. Niikura, et al. (2012). "Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing gammadelta T cells is responsible for protective immunity to Plasmodium

- parasites." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(30): 12129-34.
- Ito, K., L. Van Kaer, et al. (1990). "Recognition of the product of a novel MHC TL region gene (27b) by a mouse gamma delta T cell receptor." Cell **62**(3): 549-61.
- Ito, S., P. Pophali, et al. (2013). "CMV reactivation is associated with a lower incidence of relapse after allo-SCT for CML." Bone Marrow Transplant **48**(10): 1313-6.
- Itohara, S., A. G. Farr, et al. (1990). "Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia." Nature **343**(6260): 754-7.
- Jameson, J. and W. L. Havran (2007). "Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing." Immunol Rev **215**: 114-22.
- Jang, J. E., S. J. Kim, et al. (2015). "Early CMV replication and subsequent chronic GVHD have a significant anti-leukemic effect after allogeneic HSCT in acute myeloid leukemia." Ann Hematol **94**(2): 275-82.
- Jarvis, M. A., C. E. Wang, et al. (1999). "Human cytomegalovirus infection of caco-2 cells occurs at the basolateral membrane and is differentiation state dependent." J Virol **73**(6): 4552-60.
- Jason, J., I. Buchanan, et al. (2000). "Natural T, gammadelta, and NK cells in mycobacterial, Salmonella, and human immunodeficiency virus infections." J Infect Dis **182**(2): 474-81.
- Jensen, K. D., X. Su, et al. (2008). "Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma." Immunity **29**(1): 90-100.
- Jing, Y., M. T. Bejarano, et al. (2015). "In vivo anti-metastatic effects of uPAR retargeted measles virus in syngeneic and xenograft models of mammary cancer." Breast Cancer Res Treat **149**(1): 99-108.
- Johnson, R. M., D. W. Lancki, et al. (1992). "A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I." J Immunol **148**(4): 983-8.
- Jomaa, H., J. Feurle, et al. (1999). "Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis." FEMS Immunol Med Microbiol **25**(4): 371-8.
- Jones, T. R., L. K. Hanson, et al. (1995). "Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains." J Virol **69**(8): 4830-41.
- Jongbloed, S. L., A. J. Kassianos, et al. (2010). "Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens." J Exp Med **207**(6): 1247-60.
- Jonjic, S., W. Mutter, et al. (1989). "Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes." J Exp Med **169**(4): 1199-212.
- Jonjic, S., I. Pavic, et al. (1990). "Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes." J Virol **64**(11): 5457-64.
- Jonjic, S., I. Pavic, et al. (1994). "Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus." J Exp Med **179**(5): 1713-7.
- 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., D. Wesch, et al. (2004). "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 **173**(11): 6767-76.
- Kalejta, R. F., J. T. Bechtel, et al. (2003). "Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors." Mol Cell Biol **23**(6): 1885-95.
- Karrer, U., S. Sierro, et al. (2003). "Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time." J Immunol **170**(4): 2022-9.
- Karupiah, G., Q. W. Xie, et al. (1993). "Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase." Science **261**(5127): 1445-8.
- Kattenhorn, L. M., R. Mills, et al. (2004). "Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions." J Virol **78**(20): 11187-97.
- Kaur, I., S. D. Voss, et al. (1993). "Human peripheral gamma delta T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells." J Immunol **150**(5): 2046-55.
- Kazen, A. R. and E. J. Adams (2011). "Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(29): E332-40.
- Ke, Y., L. M. Kapp, et al. (2003). "Inhibition of tumor rejection by gammadelta T cells and IL-10." Cell Immunol **221**(2): 107-14.
- Kern, F., T. Bunde, et al. (2002). "Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals." J Infect Dis **185**(12): 1709-16.
- Kim, J. O., H. R. Cha, et al. (2012). "Pathological effect of IL-17A-producing TCRgammadelta(+) T cells in mouse genital mucosa against HSV-2 infection." Immunol Lett **147**(1-2): 34-40.
- Klenovsek, K., F. Weisel, et al. (2007). "Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells." Blood **110**(9): 3472-9.
- Knight, A., S. Mackinnon, et al. (2012). "Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells." Cytotherapy **14**(9): 1110-8.
- Knight, A., A. J. Madrigal, et al. (2010). "The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation." Blood **116**(12): 2164-72.
- Kodukula, P., T. Liu, et al. (1999). "Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system." J Immunol **162**(5): 2895-905.
- Koenecke, C., V. Chennupati, et al. (2009). "In vivo application of mAb directed against the gammadelta TCR does not deplete but generates "invisible" gammadelta T cells." Eur J Immunol **39**(2): 372-9.
- Koizumi, H., C. C. Liu, et al. (1991). "Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells." J Exp Med **173**(2): 499-502.
- Kong, Y., W. Cao, et al. (2009). "The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D." Blood **114**(2): 310-7.
- Koop, B. F., L. Rowen, et al. (1994). "The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA." Genomics **19**(3): 478-93.
- Koop, B. F., R. K. Wilson, et al. (1992). "Organization, structure, and function of 95 kb of DNA spanning the murine T-cell receptor C alpha/C delta region." Genomics **13**(4): 1209-

30.

- Kotenko, S. V., S. Sacconi, et al. (2000). "Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1695-700.
- Kovacs, A., M. L. Weber, et al. (1996). "Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells." Am J Pathol **149**(5): 1531-9.
- Kreslavsky, T., A. K. Savage, et al. (2009). "TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12453-8.
- Krmpotic, A., I. Bubic, et al. (2003). "Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection." Microbes Infect **5**(13): 1263-77.
- Krmpotic, A., D. H. Busch, et al. (2002). "MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo." Nat Immunol **3**(6): 529-35.
- Krug, A., A. R. French, et al. (2004). "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function." Immunity **21**(1): 107-19.
- Kuijpers, T. W., M. T. Vossen, et al. (2003). "Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV." J Immunol **170**(8): 4342-8.
- Kvale, E. O., J. Dalgaard, et al. (2006). "CD11c+ dendritic cells and plasmacytoid DCs are activated by human cytomegalovirus and retain efficient T cell-stimulatory capability upon infection." Blood **107**(5): 2022-9.
- Laad, A. D., M. L. Thomas, et al. (1999). "Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells." Int J Cancer **80**(5): 709-14.
- Lafarge, X., P. Merville, et al. (2001). "Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role." J Infect Dis **184**(5): 533-41.
- Lanca, T., M. F. Costa, et al. (2013). "Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds." J Immunol **190**(12): 6673-80.
- Lanier, L. L. (2008). "Evolutionary struggles between NK cells and viruses." Nat Rev Immunol **8**(4): 259-68.
- Lee, S. H., A. Zafer, et al. (2003). "Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice." J Exp Med **197**(4): 515-26.
- Lefranc, M. P. and T. H. Rabbitts (1990). "A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes." Res Immunol **141**(7): 615-8.
- Lemmermann, N. A., A. Fink, et al. (2012). "Murine cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions, and questions." Med Microbiol Immunol **201**(4): 497-512.
- Lepiller, Q., K. Aziz Khan, et al. (2011). "Cytomegalovirus and tumors: two players for one goal-immune escape." Open Virol J **5**: 60-9.
- Lewis, J. M., M. Girardi, et al. (2006). "Selection of the cutaneous intraepithelial gammadelta+ T cell repertoire by a thymic stromal determinant." Nat Immunol **7**(8): 843-50.
- Li, H., M. I. Lebedeva, et al. (1998). "Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor." Nature **391**(6666): 502-6.

- Liu, J., Y. Duan, et al. (2011). "IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **407**(2): 348-54.
- Liu, T., Q. Tang, et al. (1996). "Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection." J Virol **70**(1): 264-71.
- Liu, Z., I. E. Eltoun, et al. (2008). "Protective immunosurveillance and therapeutic antitumor activity of gammadelta T cells demonstrated in a mouse model of prostate cancer." J Immunol **180**(9): 6044-53.
- Loh, J., D. T. Chu, et al. (2005). "Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver." J Virol **79**(1): 661-7.
- Lonnqvist, B., O. Ringden, et al. (1986). "Reduced risk of recurrent leukaemia in bone marrow transplant recipients after cytomegalovirus infection." Br J Haematol **63**(4): 671-9.
- Lopez-Verges, S., J. M. Milush, et al. (2011). "Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(36): 14725-32.
- Lore, K., M. R. Betts, et al. (2003). "Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses." J Immunol **171**(8): 4320-8.
- Lu, X., A. K. Pinto, et al. (2006). "Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation contributes to the inability of CD8 T cells to control virus in the salivary gland." J Virol **80**(8): 4200-2.
- Lucas, M., W. Schachterle, et al. (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." Immunity **26**(4): 503-17.
- Luoma, A. M., C. D. Castro, et al. (2013). "Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells." Immunity **39**(6): 1032-42.
- Lussier, G. (1975). "Animal model of human disease. Cerebral calcification, cytomegalovirus infection." Am J Pathol **80**(3): 555-8.
- Ma, C., Q. Zhang, et al. (2012). "Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer." J Immunol **189**(10): 5029-36.
- Ma, S., Q. Cheng, et al. (2014). "IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma." Cancer Res **74**(7): 1969-82.
- Ma, Y., L. Aymeric, et al. (2011). "Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy." J Exp Med **208**(3): 491-503.
- Maccario, R., M. G. Revello, et al. (1993). "HLA-unrestricted killing of HSV-1-infected mononuclear cells. Involvement of either gamma/delta+ or alpha/beta+ human cytotoxic T lymphocytes." J Immunol **150**(4): 1437-45.
- MacLeod, A. S., S. Hemmers, et al. (2013). "Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function." J Clin Invest **123**(10): 4364-74.
- MacLeod, A. S., R. Rudolph, et al. (2014). "Skin-resident T cells sense ultraviolet radiation-induced injury and contribute to DNA repair." J Immunol **192**(12): 5695-702.
- MacManiman, J. D., A. Meuser, et al. (2014). "Human cytomegalovirus-encoded pUL7 is a novel CEACAM1-like molecule responsible for promotion of angiogenesis." MBio **5**(6): e02035.
- Maeurer, M. J., D. Martin, et al. (1996). "Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize

- tumor cells of epithelial origin." J Exp Med **183**(4): 1681-96.
- Malhotra, N., K. Narayan, et al. (2013). "A network of high-mobility group box transcription factors programs innate interleukin-17 production." Immunity **38**(4): 681-93.
- Malissen, M., A. Gillet, et al. (1995). "Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene." EMBO J **14**(19): 4641-53.
- Mangan, B. A., M. R. Dunne, et al. (2013). "Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells." J Immunol **191**(1): 30-4.
- Manh, T. P., Y. Alexandre, et al. (2013). "Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation." Eur J Immunol **43**(7): 1706-15.
- Manjappa, S., P. K. Bhamidipati, et al. (2014). "Protective effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients is influenced by conditioning regimen." Biol Blood Marrow Transplant **20**(1): 46-52.
- Mariotti, J., F. Maura, et al. (2014). "Impact of cytomegalovirus replication and cytomegalovirus serostatus on the outcome of patients with B cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **20**(6): 885-90.
- Martin, B., K. Hirota, et al. (2009). "Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals." Immunity **31**(2): 321-30.
- Martuza, R. L., A. Malick, et al. (1991). "Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant." Science **252**(5007): 854-6.
- Marusyk, A. and K. Polyak (2010). "Tumor heterogeneity: causes and consequences." Biochim Biophys Acta **1805**(1): 105-17.
- Mathys, S., T. Schroeder, et al. (2003). "Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation." J Infect Dis **187**(6): 988-99.
- Matis, L. A., A. M. Fry, et al. (1989). "Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer." Science **245**(4919): 746-9.
- Matsuda, S., S. Kudoh, et al. (2001). "Enhanced formation of azoxymethane-induced colorectal adenocarcinoma in gammadelta T lymphocyte-deficient mice." Jpn J Cancer Res **92**(8): 880-5.
- Maussang, D., D. Verzijl, et al. (2006). "Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13068-73.
- McHeyzer-Williams, L. J. and M. G. McHeyzer-Williams (2005). "Antigen-specific memory B cell development." Annu Rev Immunol **23**: 487-513.
- McVay, L. D. and S. R. Carding (1996). "Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development." J Immunol **157**(7): 2873-82.
- McVay, L. D., S. R. Carding, et al. (1991). "Regulated expression and structure of T cell receptor gamma/delta transcripts in human thymic ontogeny." EMBO J **10**(1): 83-91.
- McVay, L. D., S. S. Jaswal, et al. (1998). "The generation of human gammadelta T cell repertoires during fetal development." J Immunol **160**(12): 5851-60.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev **173**: 89-97.
- Melnick, M., G. Abichaker, et al. (2011). "Small molecule inhibitors of the host cell COX/AREG/EGFR/ERK pathway attenuate cytomegalovirus-induced pathogenesis." Exp Mol Pathol **91**(1): 400-10.

- Melnick, M., P. P. Sedghizadeh, et al. (2012). "Human cytomegalovirus and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: cell-specific localization of active viral and oncogenic signaling proteins is confirmatory of a causal relationship." Exp Mol Pathol **92**(1): 118-25.
- Merchant, M., R. G. Caldwell, et al. (2000). "The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo." J Virol **74**(19): 9115-24.
- Mesri, E. A., M. A. Feitelson, et al. (2014). "Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis." Cell Host Microbe **15**(3): 266-82.
- Miao, B. and A. Degterev (2009). "Methods to analyze cellular necroptosis." Methods Mol Biol **559**: 79-93.
- Miest, T. S. and R. Cattaneo (2014). "New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs." Nat Rev Microbiol **12**(1): 23-34.
- Minguet, S., M. Swamy, et al. (2007). "Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3." Immunity **26**(1): 43-54.
- Min-Oo, G., N. A. Bezman, et al. (2014a). "Proapoptotic Bim regulates antigen-specific NK cell contraction and the generation of the memory NK cell pool after cytomegalovirus infection." J Exp Med **211**(7): 1289-96.
- Min-Oo, G. and L. L. Lanier (2014b). "Cytomegalovirus generates long-lived antigen-specific NK cells with diminished bystander activation to heterologous infection." J Exp Med **211**(13): 2669-80.
- Morecki, S., E. Yacovlev, et al. (2004). "Allogeneic versus syngeneic killer splenocytes as effector cells for the induction of graft-versus-tumor effect." Biol Blood Marrow Transplant **10**(1): 40-8.
- Morgan, N. V., S. Goddard, et al. (2011). "Mutation in the TCRalpha subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRalpha $\beta$  T cells." J Clin Invest **121**(2): 695-702.
- 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.
- Munks, M. W., M. C. Gold, et al. (2006a). "Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus." J Immunol **176**(6): 3760-6.
- Munks, M. W., K. S. Cho, et al. (2006b). "Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection." J Immunol **177**(1): 450-8.
- Murphy, A. G., K. M. O'Keeffe, et al. (2014). "Staphylococcus aureus infection of mice expands a population of memory gammadelta T cells that are protective against subsequent infection." J Immunol **192**(8): 3697-708.
- Nakamura, R., M. Battiwalla, et al. (2004). "Persisting posttransplantation cytomegalovirus antigenemia correlates with poor lymphocyte proliferation to cytomegalovirus antigen and predicts for increased late relapse and treatment failure." Biol Blood Marrow Transplant **10**(1): 49-57.
- Nakamura, T., G. Matsuzaki, et al. (1999). "The protective role of T-cell receptor Vgamma1+ T cells in primary infection with Listeria monocytogenes." Immunology **96**(1): 29-34.
- Narayan, K., K. E. Sylvia, et al. (2012). "Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct gammadelta T cell subtypes." Nat Immunol **13**(5): 511-8.
- Ness-Schwickerath, K. J., C. Jin, et al. (2010). "Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells." J Immunol **184**(12): 7268-80.
- Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, et al. (2002). "Coordinated and distinct roles for IFN-

- alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection." J Immunol **169**(8): 4279-87.
- Ninomiya, T., H. Takimoto, et al. (2000). "Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma." Immunology **99**(2): 187-94.
- Nishimura, H., T. Yajima, et al. (2004). "Intraepithelial gammadelta T cells may bridge a gap between innate immunity and acquired immunity to herpes simplex virus type 2." J Virol **78**(9): 4927-30.
- O'Brien, R. L., Y. X. Fu, et al. (1992). "Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4348-52.
- Ong, H. T., K. Hasegawa, et al. (2007). "Evaluation of T cells as carriers for systemic measles virotherapy in the presence of antiviral antibodies." Gene Ther **14**(4): 324-33.
- Orange, J. S. and C. A. Biron (1996a). "Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha$ , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection." J Immunol **156**(12): 4746-56.
- Orange, J. S. and C. A. Biron (1996b). "An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- $\gamma$  production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections." J Immunol **156**(3): 1138-42.
- Orloff, D. G., C. S. Ra, et al. (1990). "Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors." Nature **347**(6289): 189-91.
- Orsini, D. L., P. C. Res, et al. (1993). "A subset of V delta 1+ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines in vitro." Scand J Immunol **38**(4): 335-40.
- Orsini, D. L., M. van Gils, et al. (1994). "Functional and molecular characterization of B cell-responsive V delta 1+ gamma delta T cells." Eur J Immunol **24**(12): 3199-204.
- Paget, C., M. T. Chow, et al. (2012). "Role of gammadelta T cells in alpha-galactosylceramide-mediated immunity." J Immunol **188**(8): 3928-39.
- Paludan, S. R., A. G. Bowie, et al. (2011). "Recognition of herpesviruses by the innate immune system." Nat Rev Immunol **11**(2): 143-54.
- Pape, K. A., J. J. Taylor, et al. (2011). "Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response." Science **331**(6021): 1203-7.
- Pardoll, D. M., B. J. Fowlkes, et al. (1988). "Thymus-dependent and thymus-independent developmental pathways for peripheral T cell receptor-gamma delta-bearing lymphocytes." J Immunol **140**(12): 4091-6.
- Pavic, I., B. Polic, et al. (1993). "Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection." J Gen Virol **74** ( Pt 10): 2215-23.
- Peng, G., H. Y. Wang, et al. (2007). "Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway." Immunity **27**(2): 334-48.
- Pereira, P. and L. Boucontet (2004). "Rates of recombination and chain pair biases greatly influence the primary gammadelta TCR repertoire in the thymus of adult mice." J Immunol **173**(5): 3261-70.
- Petrucelli, A., M. Rak, et al. (2009). "Characterization of a novel Golgi apparatus-localized latency determinant encoded by human cytomegalovirus." J Virol **83**(11): 5615-29.
- Philpott, K. L., J. L. Viney, et al. (1992). "Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells." Science **256**(5062): 1448-52.

- Pitard, V., D. Roumanes, et al. (2008). "Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection." Blood **112**(4): 1317-24.
- Pottathil, R., I. R. Pottathil, et al. (1986). "Enhanced replication of murine cytomegalovirus in murine leukemic lymphocytes." Cancer Res **46**(1): 124-6.
- Price, R. L., K. Bingmer, et al. (2012). "Cytomegalovirus infection leads to pleomorphic rhabdomyosarcomas in Trp53+/- mice." Cancer Res **72**(22): 5669-74.
- Prinz, I., B. Silva-Santos, et al. (2013a). "Functional development of gammadelta T cells." Eur J Immunol **43**(8): 1988-94.
- Prinz, I., K. Thamm, et al. (2013b). "Donor Vdelta1+ gammadelta T cells expand after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and show reactivity against CMV-infected cells but not against progressing B-CLL." Exp Hematol Oncol **2**(1): 14.
- Puig-Pey, I., F. Bohne, et al. (2010). "Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation." Transpl Int **23**(10): 1045-55.
- Pyzik, M., B. Charbonneau, et al. (2011). "Distinct MHC class I-dependent NK cell-activating receptors control cytomegalovirus infection in different mouse strains." J Exp Med **208**(5): 1105-17.
- Qiao, J., H. Wang, et al. (2008). "Loading of oncolytic vesicular stomatitis virus onto antigen-specific T cells enhances the efficacy of adoptive T-cell therapy of tumors." Gene Ther **15**(8): 604-16.
- Qin, G., H. Mao, et al. (2009). "Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses." J Infect Dis **200**(6): 858-65.
- Radkov, S. A., P. Kellam, et al. (2000). "The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells." Nat Med **6**(10): 1121-7.
- Rahbar, A., G. Stragliotto, et al. (2012). "Low levels of Human Cytomegalovirus Infection in Glioblastoma multiforme associates with patient survival; -a case-control study." Herpesviridae **3**: 3.
- Rani, M., Q. Zhang, et al. (2014). "Gamma delta T cells regulate wound myeloid cell activity after burn." Shock **42**(2): 133-41.
- Rasmussen, L., C. Matkin, et al. (1991). "Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans." J Infect Dis **164**(5): 835-42.
- Rathinam, V. A., Z. Jiang, et al. (2010). "The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses." Nat Immunol **11**(5): 395-402.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, et al. (1996). "Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus." J Virol **70**(12): 8833-49.
- Reddehase, M. J., S. Jonjic, et al. (1988). "Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors." J Virol **62**(3): 1061-5.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, et al. (2002). "Mouse models of cytomegalovirus latency: overview." J Clin Virol **25 Suppl 2**: S23-36.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, et al. (1985). "Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs." J Virol **55**(2): 264-73.

- Redpath, S., A. Angulo, et al. (1999). "Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10." J Immunol **162**(11): 6701-7.
- Reeves, M. B. and T. Compton (2011). "Inhibition of inflammatory interleukin-6 activity via extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase signaling antagonizes human cytomegalovirus reactivation from dendritic cells." J Virol **85**(23): 12750-8.
- Reeves, M. B., P. A. MacAry, et al. (2005). "Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4140-5.
- Rei, M., N. Goncalves-Sousa, et al. (2014). "Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(34): E3562-70.
- Reinhardt, B., T. Mertens, et al. (2005). "HCMV infection of human vascular smooth muscle cells leads to enhanced expression of functionally intact PDGF beta-receptor." Cardiovasc Res **67**(1): 151-60.
- Renneson, J., B. Dutta, et al. (2009). "IL-12 and type I IFN response of neonatal myeloid DC to human CMV infection." Eur J Immunol **39**(10): 2789-99.
- Rentenaar, R. J., L. E. Gamadia, et al. (2000). "Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection." J Clin Invest **105**(4): 541-8.
- Reuter, J. D., D. L. Gomez, et al. (2004). "Systemic immune deficiency necessary for cytomegalovirus invasion of the mature brain." J Virol **78**(3): 1473-87.
- Rey, J., C. Veuillen, et al. (2009). "Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors." Trends Mol Med **15**(6): 275-84.
- Ribot, J. C., M. Chaves-Ferreira, et al. (2010). "Cutting edge: adaptive versus innate receptor signals selectively control the pool sizes of murine IFN-gamma- or IL-17-producing gammadelta T cells upon infection." J Immunol **185**(11): 6421-5.
- Ribot, J. C., A. deBarros, et al. (2009). "CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets." Nat Immunol **10**(4): 427-36.
- Ribot, J. C., S. T. Ribeiro, et al. (2014). "Human gammadelta thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling." J Immunol **192**(5): 2237-43.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, et al. (1992). "Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones." Science **257**(5067): 238-41.
- Riond, J., S. Rodriguez, et al. (2009). "In vivo major histocompatibility complex class I (MHCI) expression on MHCIIlow tumor cells is regulated by gammadelta T and NK cells during the early steps of tumor growth." Cancer Immun **9**: 10.
- Roark, C. L., J. D. French, et al. (2007). "Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells." J Immunol **179**(8): 5576-83.
- Roark, C. L., Y. Huang, et al. (2013). "A canonical Vgamma4Vdelta4+ gammadelta T cell population with distinct stimulation requirements which promotes the Th17 response." Immunol Res **55**(1-3): 217-30.
- Rock, E. P., P. R. Sibbald, et al. (1994). "CDR3 length in antigen-specific immune receptors." J Exp Med **179**(1): 323-8.
- Romani, L., F. Fallarino, et al. (2008). "Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease." Nature **451**(7175): 211-5.

- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2002). "Innate immunity against hematological malignancies." Cytotherapy **4**(4): 343-6.
- Ruggeri, L., A. Mancusi, et al. (2008). "NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Blood Cells Mol Dis **40**(1): 84-90.
- Russano, A. M., G. Bassotti, et al. (2007). "CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta+ T lymphocytes." J Immunol **178**(6): 3620-6.
- Russell, S. J., K. W. Peng, et al. (2012). "Oncolytic virotherapy." Nat Biotechnol **30**(7): 658-70.
- Saito, H., D. M. Kranz, et al. (1984). "A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes." Nature **312**(5989): 36-40.
- Samanta, M., L. Harkins, et al. (2003). "High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma." J Urol **170**(3): 998-1002.
- Sandstrom, A., C. M. Peigne, et al. (2014). "The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells." Immunity **40**(4): 490-500.
- Sandstrom, A., L. Scharf, et al. (2012). "gammadelta T cell receptors recognize the non-classical major histocompatibility complex (MHC) molecule T22 via conserved anchor residues in a MHC peptide-like fashion." J Biol Chem **287**(8): 6035-43.
- Scalzo, A. A., N. A. Fitzgerald, et al. (1992). "The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells." J Immunol **149**(2): 581-9.
- Scheper, W., S. van Dorp, et al. (2013). "gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia." Leukemia **27**(6): 1328-38.
- Scheurer, M. E., M. L. Bondy, et al. (2008). "Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas." Acta Neuropathol **116**(1): 79-86.
- Schild, H., N. Mavaddat, et al. (1994). "The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells." Cell **76**(1): 29-37.
- Schleiss, M. R. (2013). "Cytomegalovirus in the neonate: immune correlates of infection and protection." Clin Dev Immunol **2013**: 501801.
- Schmolka, N., K. Serre, et al. (2013). "Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory gammadelta T cell subsets." Nat Immunol **14**(10): 1093-100.
- Schneider, K., A. Loewendorf, et al. (2008). "Lymphotoxin-mediated crosstalk between B cells and splenic stroma promotes the initial type I interferon response to cytomegalovirus." Cell Host Microbe **3**(2): 67-76.
- Sciammas, R. and J. A. Bluestone (1998). "HSV-1 glycoprotein I-reactive TCR gamma delta cells directly recognize the peptide backbone in a conformationally dependent manner." J Immunol **161**(10): 5187-92.
- Sciammas, R., R. M. Johnson, et al. (1994). "Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell." J Immunol **152**(11): 5392-7.
- Sciammas, R., P. Kodukula, et al. (1997). "T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis." J Exp Med **185**(11): 1969-75.
- Seidel, E., V. T. Le, et al. (2015). "Dynamic Co-evolution of Host and Pathogen: HCMV Downregulates the Prevalent Allele MICA \*008 to Escape Elimination by NK Cells." Cell Rep.
- Seki, S., T. Abo, et al. (1990). "Identification of activated T cell receptor gamma delta lymphocytes in the liver of tumor-bearing hosts." J Clin Invest **86**(2): 409-15.

- Sell, S., M. Dietz, et al. (2015). "Control of Murine Cytomegalovirus Infection by gammadelta T Cells." *PLoS Pathog* **11**(2): e1004481.
- Senzer, N. N., H. L. Kaufman, et al. (2009). "Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma." *J Clin Oncol* **27**(34): 5763-71.
- Seo, N. and Y. Tokura (1999). "Downregulation of innate and acquired antitumor immunity by bystander gammadelta and alphabeta T lymphocytes with Th2 or Tr1 cytokine profiles." *J Interferon Cytokine Res* **19**(6): 555-61.
- Seo, N., Y. Tokura, et al. (1998). "Down-regulation of tumoricidal NK and NK T cell activities by MHC Kb molecules expressed on Th2-type gammadelta T and alphabeta T cells coinfiltrating in early B16 melanoma lesions." *J Immunol* **161**(8): 4138-45.
- Shanley, J. D., E. L. Pesanti, et al. (1982). "The pathogenesis of pneumonitis due to murine cytomegalovirus." *J Infect Dis* **146**(3): 388-96.
- Shen, Y., H. Zhu, et al. (1997). "Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3341-5.
- Sheridan, B. S., P. A. Romagnoli, et al. (2013). "gammadelta T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues." *Immunity* **39**(1): 184-95.
- Shibata, K., H. Yamada, et al. (2007). "Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production." *J Immunol* **178**(7): 4466-72.
- Shibata, K., H. Yamada, et al. (2011). "Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing gammadelta T cells." *Blood* **118**(3): 586-93.
- Shin, S., R. El-Diwany, et al. (2005). "Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors." *Science* **308**(5719): 252-5.
- Shultz, L. D., B. L. Lyons, et al. (2005). "Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells." *J Immunol* **174**(10): 6477-89.
- Siegers, G. M., H. Dhamko, et al. (2011). "Human Vdelta1 gammadelta T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells." *Cytotherapy* **13**(6): 753-64.
- Sierro, S., R. Rothkopf, et al. (2005). "Evolution of diverse antiviral CD8+ T cell populations after murine cytomegalovirus infection." *Eur J Immunol* **35**(4): 1113-23.
- Sinclair, J. (2008). "Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage." *J Clin Virol* **41**(3): 180-5.
- Sinclair, J. and P. Sissons (1996). "Latent and persistent infections of monocytes and macrophages." *Intervirology* **39**(5-6): 293-301.
- Sinzger, C., B. Plachter, et al. (1996). "Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo." *J Infect Dis* **173**(1): 240-5.
- Sissons, J. G., M. Bain, et al. (2002). "Latency and reactivation of human cytomegalovirus." *J Infect* **44**(2): 73-7.
- Skaletskaya, A., L. M. Bartle, et al. (2001). "A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14): 7829-34.
- Smith, H. R., J. W. Heusel, et al. (2002). "Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8826-31.
- Smith, M. S., G. L. Bentz, et al. (2004). "Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence." *J Virol*

**78**(9): 4444-53.

- Snyder, C. M., J. E. Allan, et al. (2010). "Cross-presentation of a spread-defective MCMV is sufficient to prime the majority of virus-specific CD8+ T cells." *PLoS One* **5**(3): e9681.
- Snyder, C. M., K. S. Cho, et al. (2008). "Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells." *Immunity* **29**(4): 650-9.
- Soares, H., H. Waechter, et al. (2007). "A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo." *J Exp Med* **204**(5): 1095-106.
- Soroceanu, L., A. Akhavan, et al. (2008). "Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection." *Nature* **455**(7211): 391-5.
- Soroceanu, L., L. Matlaf, et al. (2011). "Human cytomegalovirus US28 found in glioblastoma promotes an invasive and angiogenic phenotype." *Cancer Res* **71**(21): 6643-53.
- Spada, F. M., E. P. Grant, et al. (2000). "Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity." *J Exp Med* **191**(6): 937-48.
- Spencer, C. T., G. Abate, et al. (2008). "Only a subset of phosphoantigen-responsive gamma9delta2 T cells mediate protective tuberculosis immunity." *J Immunol* **181**(7): 4471-84.
- Spencer, J. V., K. M. Lockridge, et al. (2002). "Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10." *J Virol* **76**(3): 1285-92.
- Stagno, S., R. F. Pass, et al. (1986). "Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome." *JAMA* **256**(14): 1904-8.
- Stanic, A. K., R. Shashidharamurthy, et al. (2003). "Another view of T cell antigen recognition: cooperative engagement of glycolipid antigens by Va14Ja18 natural T(iNKT) cell receptor [corrected]." *J Immunol* **171**(9): 4539-51.
- Storek, J., M. A. Dawson, et al. (2001). "Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation." *Blood* **97**(11): 3380-9.
- Street, S. E., Y. Hayakawa, et al. (2004). "Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells." *J Exp Med* **199**(6): 879-84.
- Strid, J., S. J. Roberts, et al. (2008). "Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis." *Nat Immunol* **9**(2): 146-54.
- Sugita, M. and M. B. Brenner (2000). "T lymphocyte recognition of human group 1 CD1 molecules: implications for innate and acquired immunity." *Semin Immunol* **12**(6): 511-6.
- Sun, J. C., J. N. Beilke, et al. (2009). "Adaptive immune features of natural killer cells." *Nature* **457**(7229): 557-61.
- Sun, J. C., S. Madera, et al. (2012). "Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory." *J Exp Med* **209**(5): 947-54.
- Sutton, C. E., S. J. Lalor, et al. (2009). "Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity." *Immunity* **31**(2): 331-41.
- Swiecki, M., S. Gilfillan, et al. (2010). "Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual." *Immunity* **33**(6): 955-66.

- Sylwester, A. W., B. L. Mitchell, et al. (2005). "Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects." J Exp Med **202**(5): 673-85.
- Tabeta, K., P. Georgel, et al. (2004). "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3516-21.
- Taher, C., J. de Boniface, et al. (2013). "High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes." PLoS One **8**(2): e56795.
- Taher, C., G. Frisk, et al. (2014). "High prevalence of human cytomegalovirus in brain metastases of patients with primary breast and colorectal cancers." Transl Oncol **7**(6): 732-40.
- Tang, Q. and G. G. Maul (2006). "Mouse cytomegalovirus crosses the species barrier with help from a few human cytomegalovirus proteins." J Virol **80**(15): 7510-21.
- Tay, C. H. and R. M. Welsh (1997). "Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells." J Virol **71**(1): 267-75.
- Thedre, A., C. Sabourin, et al. (2007). "Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue?" Immunol Rev **215**: 123-35.
- Tomasec, P., V. M. Braud, et al. (2000). "Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40." Science **287**(5455): 1031.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-81.
- Toulon, A., L. Breton, et al. (2009). "A role for human skin-resident T cells in wound healing." J Exp Med **206**(4): 743-50.
- Tramonti, D., K. Rhodes, et al. (2008). "gammadeltaT cell-mediated regulation of chemokine producing macrophages during *Listeria monocytogenes* infection-induced inflammation." J Pathol **216**(2): 262-70.
- Trgovcich, J., D. Stimac, et al. (2000). "Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus." Arch Virol **145**(12): 2601-18.
- Tsuji, M., S. Kawano, et al. (1998). "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells." Cell **93**(5): 705-16.
- Turchinovich, G. and A. C. Hayday (2011). "Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells." Immunity **35**(1): 59-68.
- Tyznik, A. J., S. Verma, et al. (2014). "Distinct requirements for activation of NKT and NK cells during viral infection." J Immunol **192**(8): 3676-85.
- Uchida, H., M. Marzulli, et al. (2013). "Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus." Mol Ther **21**(3): 561-9.
- Uldrich, A. P., J. Le Nours, et al. (2013). "CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR." Nat Immunol **14**(11): 1137-45.
- Ullrich, R., H. L. Schieferdecker, et al. (1990). "gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium." Cell Immunol **128**(2): 619-27.
- Van Laethem, F., S. D. Sarafova, et al. (2007). "Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC." Immunity **27**(5): 735-50.

- van Leeuwen, E. M., E. B. Remmerswaal, et al. (2004). "Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection." J Immunol **173**(3): 1834-41.
- Vantourout, P. and A. Hayday (2013). "Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology." Nat Rev Immunol **13**(2): 88-100.
- Varnum, S. M., D. N. Streblov, et al. (2004). "Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome." J Virol **78**(20): 10960-6.
- Vavassori, S., A. Kumar, et al. (2013). "Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells." Nat Immunol **14**(9): 908-16.
- Vermijlen, D., M. Brouwer, et al. (2010). "Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero." J Exp Med **207**(4): 807-21.
- Vermijlen, D., P. Ellis, et al. (2007). "Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy." J Immunol **178**(7): 4304-14.
- Vincent, M. S., K. Roessner, et al. (1998). "Lyme arthritis synovial gamma delta T cells respond to *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and lipidated hexapeptides." J Immunol **161**(10): 5762-71.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." Trends Genet **9**(4): 138-41.
- Wagner, M., A. Gutermann, et al. (2002). "Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus." J Exp Med **196**(6): 805-16.
- Wakita, D., K. Sumida, et al. (2010). "Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis." Eur J Immunol **40**(7): 1927-37.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, et al. (1995). "Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor." N Engl J Med **333**(16): 1038-44.
- Walton, S. M., S. Mandaric, et al. (2011). "Absence of cross-presenting cells in the salivary gland and viral immune evasion confine cytomegalovirus immune control to effector CD4 T cells." PLoS Pathog **7**(8): e1002214.
- Wang, H., Z. Fang, et al. (2010). "Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs." J Immunol **184**(11): 6209-22.
- Wang, H., O. Henry, et al. (2013). "Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells." J Immunol **191**(3): 1029-42.
- Wang, T., Y. Gao, et al. (2006). "Gamma delta T cells facilitate adaptive immunity against West Nile virus infection in mice." J Immunol **177**(3): 1825-32.
- Wang, T., D. Qian, et al. (2014). "Human cytomegalovirus inhibits apoptosis by regulating the activating transcription factor 5 signaling pathway in human malignant glioma cells." Oncol Lett **8**(3): 1051-1057.
- Wang, T., E. Scully, et al. (2003). "IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection." J Immunol **171**(5): 2524-31.
- Wang, T., T. Town, et al. (2004). "Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis." Nat Med **10**(12): 1366-73.
- Weintraub, B. C., M. R. Jackson, et al. (1994). "Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides." J Immunol

- 153(7):** 3051-8.
- Weiss, L., S. Reich, et al. (1999). "Allogeneic cell therapy in murine B-cell leukemia (BCL1): 2. The role of non-activated and rIL-2-activated CD4+ and CD8+ T cells in immunotherapy for leukemia." Cytokines Cell Mol Ther **5(3)**: 153-8.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, et al. (1960). "Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease." Virology **12**: 130-2.
- Welte, T., J. Aronson, et al. (2011). "Vgamma4+ T cells regulate host immune response to West Nile virus infection." FEMS Immunol Med Microbiol **63(2)**: 183-92.
- Welte, T., J. Lamb, et al. (2008). "Role of two distinct gammadelta T cell subsets during West Nile virus infection." FEMS Immunol Med Microbiol **53(2)**: 275-83.
- Wen, L., W. Pao, et al. (1996). "Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells." J Exp Med **183(5)**: 2271-82.
- Wencker, M., G. Turchinovich, et al. (2014). "Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness." Nat Immunol **15(1)**: 80-7.
- Wesch, D., A. Glatzel, et al. (2001). "Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype." Cell Immunol **212(2)**: 110-7.
- Wesch, D., C. Peters, et al. (2011). "Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands." Cell Mol Life Sci **68(14)**: 2357-70.
- Wiesel, M., S. Walton, et al. (2009). "Virus-specific CD8 T cells: activation, differentiation and memory formation." APMIS **117(5-6)**: 356-81.
- Willcox, C. R., V. Pitard, et al. (2012). "Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor." Nat Immunol **13(9)**: 872-9.
- Witherden, D. A. and W. L. Havran (2012). "EPCR: a stress trigger for gammadelta T cells." Nat Immunol **13(9)**: 812-4.
- Wrobel, P., H. Shojaei, et al. (2007). "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 **66(2-3)**: 320-8.
- Wu, A., J. Wei, et al. (2010). "Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia." Neuro Oncol **12(11)**: 1113-25.
- Wu, J., V. Groh, et al. (2002). "T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells." J Immunol **169(3)**: 1236-40.
- Wu, P., D. Wu, et al. (2014). "gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer." Immunity **40(5)**: 785-800.
- Wu, Y., W. Wu, et al. (2009). "Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis." J Immunol **183(9)**: 5622-9.
- Xi, X., X. Han, et al. (2013). "Identification of a new tuberculosis antigen recognized by gammadelta T cell receptor." Clin Vaccine Immunol **20(4)**: 530-9.
- Xiang, Z., Y. Liu, et al. (2014). "Targeted activation of human Vgamma9Vdelta2-T cells controls epstein-barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease." Cancer Cell **26(4)**: 565-76.
- Xiong, N., C. Kang, et al. (2002). "Redundant and unique roles of two enhancer elements in the TCRgamma locus in gene regulation and gammadelta T cell development." Immunity **16(3)**: 453-63.

- Xiong, N., C. Kang, et al. (2004). "Positive selection of dendritic epidermal gammadelta T cell precursors in the fetal thymus determines expression of skin-homing receptors." Immunity **21**(1): 121-31.
- Xu, B., J. C. Pizarro, et al. (2011). "Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(6): 2414-9.
- Ye, J., C. Ma, et al. (2013). "Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence." J Immunol **190**(5): 2403-14.
- Yin, Z., C. Chen, et al. (2002). "T-Bet expression and failure of GATA-3 cross-regulation lead to default production of IFN-gamma by gammadelta T cells." J Immunol **168**(4): 1566-71.
- Zeng, X., C. Meyer, et al. (2014). "Gamma delta T cells recognize haptens and mount a hapten-specific response." Elife **3**: e03609.
- Zeng, X., Y. L. Wei, et al. (2012). "gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response." Immunity **37**(3): 524-34.
- Zhang, J., J. Wang, et al. (2014). "The co-stimulatory effects of MyD88-dependent Toll-like receptor signaling on activation of murine gammadelta T cells." PLoS One **9**(9): e108156.
- Zheng, B., E. Marinova, et al. (2003). "Cutting edge: gamma delta T cells provide help to B cells with altered clonotypes and are capable of inducing Ig gene hypermutation." J Immunol **171**(10): 4979-83.
- Zucchini, N., G. Bessou, et al. (2008a). "Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection." J Immunol **180**(9): 5799-803.
- Zucchini, N., G. Bessou, et al. (2008b). "Individual plasmacytoid dendritic cells are major contributors to the production of multiple innate cytokines in an organ-specific manner during viral infection." Int Immunol **20**(1): 45-56.
- Zuo, A., D. Liang, et al. (2012). "In vivo priming of IL-17(+) uveitogenic T cells is enhanced by Toll ligand receptor (TLR)2 and TLR4 agonists via gammadelta T cell activation." Mol Immunol **50**(3): 125-33.
- zur Hausen, H. (2009). "The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture)." Angew Chem Int Ed Engl **48**(32): 5798-808.

# ANNEXES

## **Annexe 1**

"Control of Murine Cytomegalovirus Infection by gammadelta T Cells."  
Sell, S., M. Dietz, et al. (2015).  
PLoS Pathog **11**(2): e1004481.

RESEARCH ARTICLE

# Control of Murine Cytomegalovirus Infection by $\gamma\delta$ T Cells

Sabrina Sell<sup>1‡</sup>, Monika Dietz<sup>2‡</sup>, Andrea Schneider<sup>1</sup>, Rafaela Holtappels<sup>3</sup>, Michael Mach<sup>2‡</sup>, Thomas H. Winkler<sup>1‡\*</sup>

**1** Nikolaus-Fiebiger-Zentrum für Molekulare Medizin, Department Biologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany, **2** Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany, **3** Institut für Virologie und Forschungszentrum für Immuntherapie (FZI), Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Germany

‡ SS and MD contributed equally to this work. MM and THW also contributed equally to this work.

\* [thomas.winkler@fau.de](mailto:thomas.winkler@fau.de)



## Abstract

Infections with cytomegalovirus (CMV) can cause severe disease in immunosuppressed patients and infected newborns. Innate as well as cellular and humoral adaptive immune effector functions contribute to the control of CMV in immunocompetent individuals. None of the innate or adaptive immune functions are essential for virus control, however. Expansion of  $\gamma\delta$  T cells has been observed during human CMV (HCMV) infection in the fetus and in transplant patients with HCMV reactivation but the protective function of  $\gamma\delta$  T cells under these conditions remains unclear. Here we show for murine CMV (MCMV) infections that mice that lack CD8 and CD4  $\alpha\beta$ -T cells as well as B lymphocytes can control a MCMV infection that is lethal in RAG-1<sup>-/-</sup> mice lacking any T- and B-cells.  $\gamma\delta$  T cells, isolated from infected mice can kill MCMV infected target cells *in vitro* and, importantly, provide long-term protection in infected RAG-1<sup>-/-</sup> mice after adoptive transfer.  $\gamma\delta$  T cells in MCMV infected hosts undergo a prominent and long-lasting phenotypic change most compatible with the view that the majority of the  $\gamma\delta$  T cell population persists in an effector/memory state even after resolution of the acute phase of the infection. A clonotypically focused V $\gamma$ 1 and V $\gamma$ 2 repertoire was observed at later stages of the infection in the organs where MCMV persists. These findings add  $\gamma\delta$  T cells as yet another protective component to the anti-CMV immune response. Our data provide clear evidence that  $\gamma\delta$  T cells can provide an effective control mechanism of acute CMV infections, particularly when conventional adaptive immune mechanisms are insufficient or absent, like in transplant patient or in the developing immune system *in utero*. The findings have implications in the stem cell transplant setting, as antigen recognition by  $\gamma\delta$  T cells is not MHC-restricted and dual reactivity against CMV and tumors has been described.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Sell S, Dietz M, Schneider A, Holtappels R, Mach M, Winkler TH (2015) Control of Murine Cytomegalovirus Infection by  $\gamma\delta$  T Cells. PLoS Pathog 11(2): e1004481. doi:10.1371/journal.ppat.1004481

**Editor:** Stephen C Jameson, University of Minnesota Medical School, UNITED STATES

**Received:** December 2, 2013

**Accepted:** September 18, 2014

**Published:** February 6, 2015

**Copyright:** © 2015 Sell et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG GRK1071 and GRK1660 and NIH RO1AI089956. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Author Summary

Cytomegalovirus is a clinically important pathogen. While infection in hosts with a functional immune system is usually asymptomatic, the virus can cause significant morbidity and mortality in individuals with an immature or suppressed immune system. The virus causes severe clinical complication in transplant recipients and congenital CMV infections are the most common infectious cause of neurological disorders in children. Multiple layers of innate and adoptive immunity are involved in the control of CMV and single deficiencies of one immune cell type can be compensated by other immune cells. Expansions of  $\gamma\delta$  T lymphocytes, which are regarded as innate-like cells with adaptive-like potential, have been shown to be associated with CMV infections in human transplant patients and neonates. Their role in protective immunity against CMV has been unclear, however. Here we show direct evidence in the murine CMV model (MCMV) that  $\gamma\delta$  T lymphocytes can provide protection against a lethal MCMV infection in the absence of any other cells of the adoptive immune system. Upon infection,  $\gamma\delta$  T lymphocytes undergo a significant expansion and a prominent and long-lasting phenotypic change. These findings have implications for the development of new cellular therapy regimens in CMV infections in the transplant setting that should be evaluated in the future.

## Introduction

Cytomegaloviruses (CMV) and their respective hosts have co-evolved over long periods of time. During this co-evolution the virus adapted perfectly to the respective host defense systems and vice versa. As a result, virus replication during primary infection is effectively controlled by a multilayered, in large parts redundant, innate as well as adaptive immune response and development of symptoms or disease is prevented [1–3].

In contrast, in individuals with a compromised or immature immune system human CMV (HCMV) remains as a significant pathogen. Congenital HCMV infection, for example, is the leading infectious cause of brain damage and sensorineural hearing loss in children [4]. Primary and recurrent HCMV infection also causes significant morbidity and mortality in transplant patients e.g. following hematopoietic cell transplantation [5].

During primary infection of immunocompetent hosts the virus evokes a strong innate and adaptive immune response, which ultimately leads to control of viral replication and establishment of latency [6]. In the adaptive cellular immune response CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells are involved. Activation of antiviral CD8<sup>+</sup> T cells is considered to be particularly important in this respect. Work with MCMV has shown that antiviral CD8<sup>+</sup> T cells can control a primary infection [7] and prevent disease after adoptive transfer in immunocompromised animals [8]. The concept of adoptive transfer of CMV specific CD8<sup>+</sup> T cells to prevent CMV-related disease was successfully introduced into clinical management of transplant patients [9].

The role of CD4<sup>+</sup> T cells in protection from CMV infection is less clear. In the MCMV system, CD4<sup>+</sup> T cells have been shown to be essential for viral clearance from the salivary gland, an important anatomical site for prolonged CMV shedding and transmission [10]. The antiviral effect is most probably mediated by IFN- $\gamma$  secretion of activated CD4<sup>+</sup> T cells [11]. In transplant patients a multifunctional effect of CD4<sup>+</sup> T cells has been shown. They provide essential support for CD8<sup>+</sup> T cell memory, secrete various cytokines and even kill infected cells [12].

Lastly, the adaptive humoral immune response is also involved in control of viral replication.

Immunodeficient  $RAG^{-/-}$  mice are protected against MCMV infection by passive transfer of polyclonal or monoclonal antibodies from infected donors or MCMV specific memory B cells [13–16].

Despite the large body of literature on protective capacity of individual immune effector functions that contribute to the control of CMV, none of the innate or adaptive immune functions seems to be essential for virus control. For example, in the MCMV model, long-term depletion of  $CD8^{+}$  T cells showed that  $CD8^{+}$  T cells are not required for clearance of a primary CMV infection and viral latency was initiated with similar kinetics in animals lacking  $CD8^{+}$  T cells [17]. Similar results were obtained following depletion of the  $CD4^{+}$  T-cell subset [10]. Likewise, the course of the primary CMV infection is similar in fully immunocompetent mice and mice lacking antibody [15]. On the other hand,  $RAG^{-/-}$  or SCID mice succumb rapidly to the infection, demonstrating that the complete lack of an adaptive immune response is incompatible with virus control [14, 18].

It is unclear whether the redundancy in immunological control of CMV is universal, i.e. the loss of any antiviral immune effector function can be compensated by others or whether the redundancy is restricted to a certain set of immune cells or antiviral effector function. The definition of critical components of the immune response that cannot be compensated for by others will be important to understand the complex immune control of this virus and may be valuable for the clinical management of the infection in situations where the immune system is not fully functional.

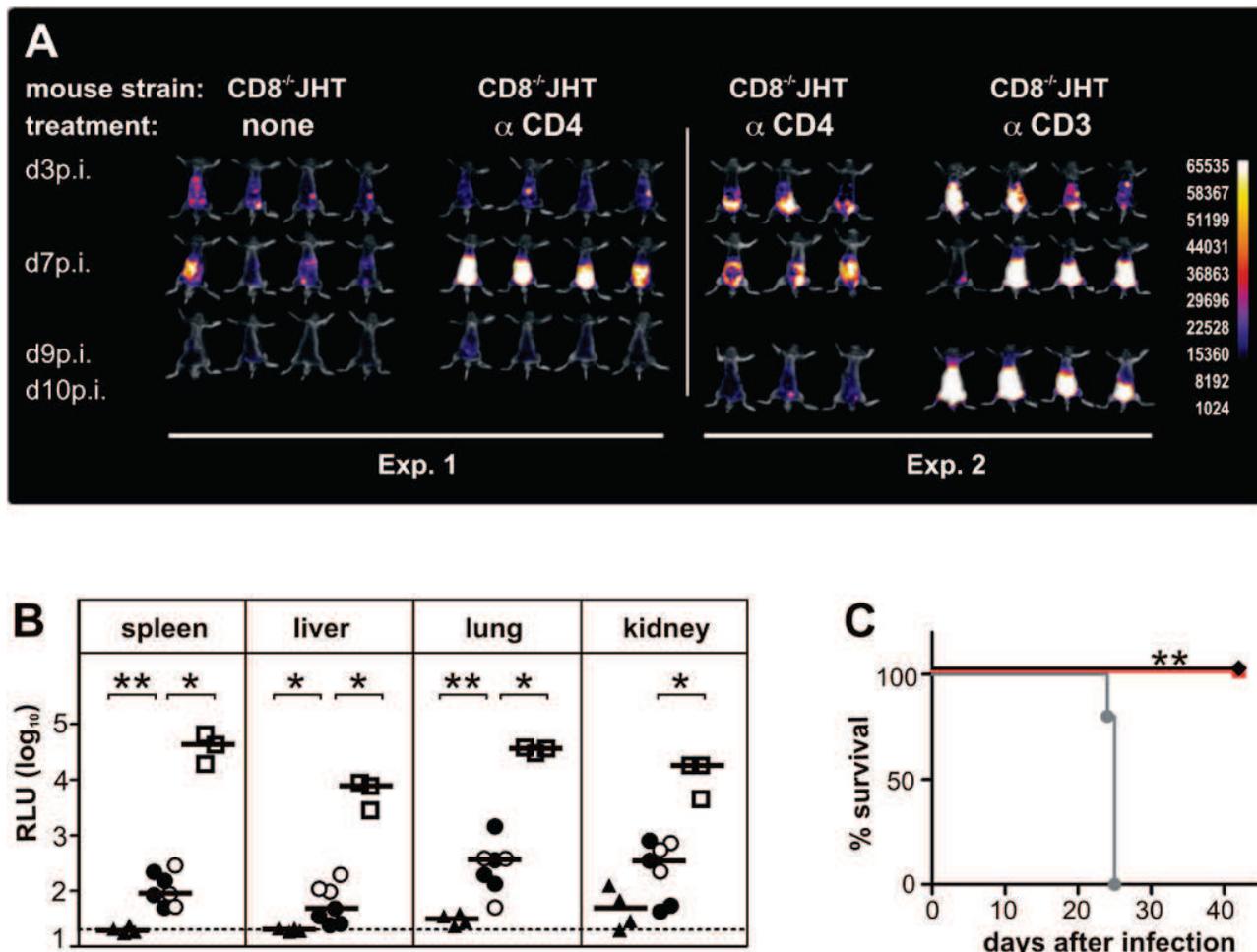
Here we systematically explored the contribution of individual cell types of the adaptive immune system to virus control. Surprisingly, our data showed that mice lacking  $CD4^{+}$  and  $CD8^{+}$  T cells as well as B cells still can control the virus for long periods of time. Protection in these animals was found to rely on  $CD3^{+}CD8^{-}CD4^{-}$   $\gamma\delta$  T cells. Depletion of  $CD3^{+}$  T cells in mice lacking B cells abolished protection from CMV infection and most importantly adoptive transfer of  $\gamma\delta$  T cells into  $RAG^{-/-}$  mice provided long term protection from the otherwise lethal course of the infection. The identification of  $\gamma\delta$  T cells as a protective component in the anti-CMV response adds another layer to the complex immune control of this virus which may have clinical implications in the transplant setting since the function of  $\gamma\delta$  T cells is not restricted by the MHC complex.

## Results

### Mice without $CD8^{+}$ and $CD4^{+}$ T cells as well as B cells but not without $CD3^{+}$ T cells control CMV infection

In a first set of experiments we analyzed the potential effect of a combined absence of  $CD8^{+}$  T cells as well as antibodies for the course of a primary MCMV infection. To this end  $CD8^{-/-}$ JHT mice (S1 Fig. and S1 Table) were infected with  $1 \times 10^5$  pfu of a luciferase-expressing MCMV suitable for *in vivo* detection of virus infected cells [14]. In  $CD8^{-/-}$ JHT mice, luciferase activity was detected at day 3 post infection (p.i.) and day 7 p.i. which fell to background levels at day 9 p.i. (Fig. 1A). In these mice, the course of acute infection was slightly prolonged as compared to animals in which either cell type was lacking individually or as compared to immunocompetent C57BL/6 animals [14]. Thus, in mice with a combined lack of  $CD8^{+}$  T cells and B cells acute MCMV infection can be controlled.

To analyze a potential contribution of  $CD4^{+}$  T cells in animals lacking  $CD8^{+}$  T cells and B cells for the course of the infection,  $CD8^{-/-}$ JHT animals were treated with 250  $\mu$ g of mab YTS 191 on day -1, 3 and 8 p.i. [15]. Absence of  $CD4^{+}$  T cells was confirmed by flow cytometry (S2 Fig.). Following infection, the mice showed a markedly higher bioluminescence signal



**Figure 1. CD3<sup>+</sup> T cells control MCMV infection in mice depleted of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes and B cells.** (A) In two separate experiments CD8<sup>-/-</sup>JHT mice either untreated or treated with antibodies against CD4 or CD3 were infected with 10<sup>5</sup> pfu MCMV. *In vivo* imaging was performed on the days indicated. Images were obtained from a 120 sec acquisition. The pseudocolor scale shows relative photon flux for each image. Representative data from 3 individual experiments. (B) Viral load per 30  $\mu$ g organ was determined at day 13 p.i. by a luciferase-based assay. Each value in the graph corresponds to an individual animal, one animal died before day 13 p.i. triangles: CD8<sup>-/-</sup>JHT; circles: anti-CD4 treated CD8<sup>-/-</sup>JHT; squares: anti-CD3 treated CD8<sup>-/-</sup>JHT. Data in open or closed symbols were obtained in two separate experiments from mice displayed in Fig. 1A. Horizontal bars represent the median, dotted lines mark the background. RLU: relative light units. P < 0.05; Mann-Whitney test. Representative data from 3 individual experiments. (C) Survival of CD8<sup>-/-</sup>JHT (black), anti-CD4 treated CD8<sup>-/-</sup>JHT (red) and RAG<sup>-/-</sup> mice (grey) (n = 5; P < 0.005; Mantel-Cox Test). Representative data from 2 independent experiments.

doi:10.1371/journal.ppat.1004481.g001

compared to CD8<sup>-/-</sup>JHT animals at day 7 p.i. (Fig. 1A). However, at day 9 p.i. the signal was greatly reduced indicating control of virus replication in the animals.

The control of infection in animals lacking both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells as well as B cells was surprising given the fact that RAG<sup>-/-</sup> animals, which do not contain functional T and B cells, are not capable of controlling MCMV [14, 18]. Potential T cell subsets responsible for protection would include CD3<sup>+</sup> NKT cells, CD4/CD8-double negative (DN)  $\alpha\beta$  T cells or  $\gamma\delta$  T cells.

To test whether DN T cells were involved in control of MCMV infection, CD3<sup>+</sup> cells were depleted in CD8<sup>-/-</sup>JHT animals. Depletion was confirmed by flow cytometry (S2 Fig.). Following infection, anti-CD3 antibody treated animals showed markedly enhanced bioluminescence compared to untreated or anti-CD4 antibody treated CD8<sup>-/-</sup>JHT mice at days 7 and 9 p.i.,

indicating loss of control of virus replication (Fig. 1A). The bioluminescence signals from anti-CD3 treated animals were comparable to infected RAG<sup>-/-</sup> mice which exhibit a continuously increasing bioluminescence signal during the first 10 days p.i. ([14] and Fig. 2B).

To correlate the *in vivo* bioluminescence data with virus titers in individual organs, animals were sacrificed at day 13 p.i. and the virus load was determined in selected organs, using a luciferase-based assay. Viral organ titers supported the data from the *in vivo* imaging. Very low levels of viral titers were observed in CD8<sup>-/-</sup>JHT mice (Fig. 1B). In CD4<sup>+</sup> T cell-depleted animals, the viral titers in organs were slightly elevated at day 13 p.i. compared to CD8<sup>-/-</sup>JHT animals, indicating that the control of the infection during simultaneous absence of CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and B cells is not as effective as in CD8<sup>-/-</sup>JHT mice (Fig. 1B). Viral titers in CD3-depleted CD8<sup>-/-</sup>JHT mice were significantly increased and comparable to titers obtained in RAG<sup>-/-</sup> animals (Fig. 1B and Fig. 2C).

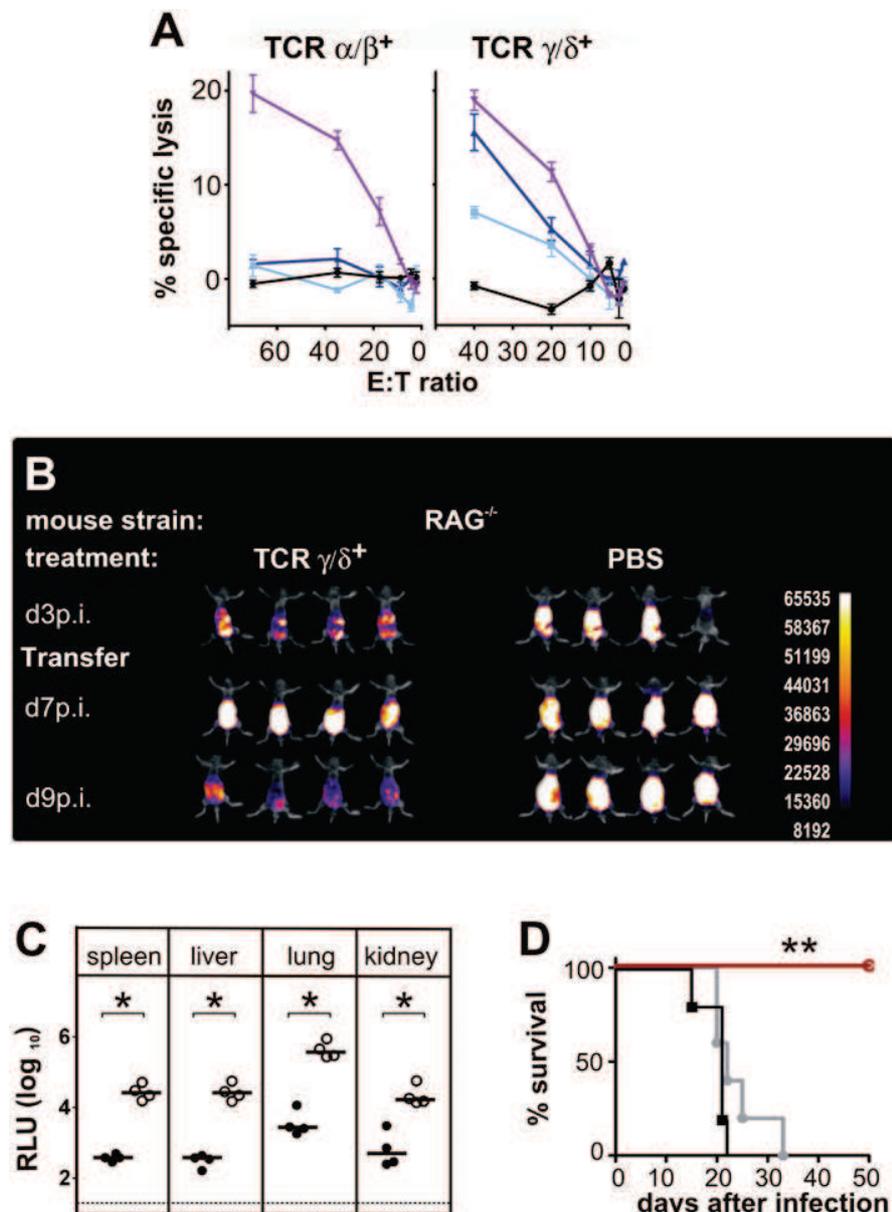
In survival experiments, CD8<sup>-/-</sup>JHT mice either in the presence or absence of CD4<sup>+</sup> T cells exhibited long-term control of the infection further indicating efficient virus control in the absence of CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells as well as B cells (Fig. 1C). In contrast, and in accordance with our previous results [14], RAG<sup>-/-</sup> animals succumbed to the infection between days 21–25 (Fig. 1C).

Taken together, the results indicated that mice lacking B cells, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells are still able to control a primary MCMV infection. The protecting cell type in these animals most probably exhibits a CD3<sup>+</sup> DN phenotype since protection was lost following depletion of CD3<sup>+</sup> T cells.

### Functional activity of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> T cells

To test whether DN T cells have direct antiviral activity, a standard *in vitro* cytotoxicity assay was performed with  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  positive DN T cells in a functional chromium release assay *ex vivo* without restimulation of cells. To this end, DN TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T cells were purified from spleen and lymph nodes of infected CD8<sup>-/-</sup>JHT mice 4 weeks after infection and tested for their cytolytic activity. The results shown in Fig. 2A revealed that both cell types were capable of mediating cytotoxicity in a CD3 $\epsilon$ -redirected cytotoxicity assay [19]. DN TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T cells showed negligible lysis of both early and late infected mouse fibroblast target cells (MEF). In contrast, the  $\gamma\delta$  T cell fraction specifically lysed both types of MCMV infected MEF (Fig. 2A). Early infected target cells were lysed to a higher degree than late infected target cells, indicating that infected cells express antigens that are target of  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity during all stages of infection but especially in the early phase after infection.

To analyze whether the ability of  $\gamma\delta$  T cells to kill infected targets *in vitro* correlates to a protective potential of these cells *in vivo*, an adoptive cell transfer approach was used. To this end  $\gamma\delta$  T cells were purified from MCMV infected CD8<sup>-/-</sup>JHT donor animals. Purity assessed by flow cytometry reached >99%. In the experiment shown in Fig. 2B 800,000 cells/animal were infused into RAG<sup>-/-</sup> recipients that had been infected three days before. Animals that received  $\gamma\delta$  T cells 3 days after infection, exhibited increased bioluminescence signals between day 3 and day 7 p.i. that was comparable to the control group of mice that received no T cells. However, while in the control group the signal intensity further increased between day 3 and day 7 p.i., the bioluminescence was markedly reduced in  $\gamma\delta$  T cell treated mice at day 9 p.i., indicating control of virus replication. When the viral load in organs was assessed at day 12 p.i.,  $\gamma\delta$  T cell-substituted mice showed a significantly lower viral titer compared to untreated RAG<sup>-/-</sup> animals (Fig. 2C). In a number of independent experiments using  $\gamma\delta$  T cell numbers for adoptive transfer ranging from 200,000 to 800,000 per recipient significant reductions of viral load in all organs analyzed were observed. The absence of CD4<sup>+</sup> T cells in the recipient animals 12 days



**Figure 2. Functional activity of CD3<sup>+</sup>DN T cells.** (A) CD3<sup>+</sup>DN TCR $\alpha\beta^+$  or TCR $\gamma\delta^+$  effector cells were isolated from CD8<sup>-/-</sup> JHT mice 4 weeks after ip infection and were titrated in log<sub>2</sub> steps. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were infected with MCMV Smith and used as target cells in a standard <sup>51</sup>Cr-release assay. Lysis of target cells was assayed at the effector-cell-to-target-cell (E/T) ratios indicated. The mean percentage of specific lysis of target cells is shown, calculated from triplicate assay cultures. Black: uninfected MEF, light blue: late phase-infected MEF, dark blue: early phase-infected MEF, purple: TCR-independent stimulation of T cells by the CD3 $\epsilon$ -producing hybridoma cell line 145–2C11. Representative data from 2 individual experiments. (B) RAG<sup>-/-</sup> mice were transferred 3 days after infection with 800,000  $\gamma\delta$  T cells from infected CD8<sup>-/-</sup> JHT donor mice. *In vivo* images were obtained as in Fig. 1. Representative data from 4 experiments are shown. (C) Viral load per 30  $\mu$ g organ was determined at day 12 p.i. Each value in the graphs corresponds to an individual animal (closed circles:  $\gamma\delta$  T-cell transferred animals; open circles: PBS controls); horizontal bars represent the median. Dotted lines mark the background. ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney Test). Representative data from 4 individual experiments. (D) Survival of RAG<sup>-/-</sup> mice adoptively transferred with 200,000  $\gamma\delta$  T cells from naive (black) or infected (red) donors or PBS treated (grey) ( $P < 0.005$ ; Mantel-Cox Test). Representative data from 4 experiments.

doi:10.1371/journal.ppat.1004481.g002

after infection was confirmed by flow cytometry (S2 Fig.), strongly suggesting that the antiviral effect of the adoptively transferred cell population rests on  $\gamma\delta$  T cells.  $\gamma\delta$  T cells provided long-term protection, as RAG<sup>-/-</sup> mice that received 200,000  $\gamma\delta$  T cells from MCMV-immune donors survived the infection for at least 50 days (Fig. 2D). In contrast, control RAG<sup>-/-</sup> animals showed a significantly shorter survival after infection (mean survival time 22 days). Interestingly,  $\gamma\delta$  T cells that were isolated from naive animals were not able to protect the animals from the lethal course of the infection (Fig. 2D).

To extend this finding and to investigate whether  $\gamma\delta$  T cells from wildtype C57Bl/6 mice can protect from MCMV infection after adoptive transfer we transferred 400,000  $\gamma\delta$  T cells obtained from the spleen of C57Bl/6 mice that were infected with MCMV at least 4 weeks before or from uninfected C57Bl/6 mice. The protective capacity of  $\gamma\delta$  T cells from infected and uninfected wildtype mice was much more variable, presumably due to the extended time needed for the cell purification from a large number of donor animals. The results show that  $\gamma\delta$  T cells from infected wildtype mice could clearly reduce the virus load after adoptive transfer into RAG<sup>-/-</sup> mice and that they provided better protection than  $\gamma\delta$  T cells from naïve donor mice. The results reached significance only for the lung, however (S3 Fig.).

In addition we performed infections with TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice that completely lack  $\alpha\beta$  T cells. In these experiments we used MCMV157luc in which the MCK-2 mutation was repaired [20] and 10<sup>6</sup> pfu virus was injected i.v. This virus and infection dose and route caused an even more severe infection in RAG-1<sup>-/-</sup> mice and infected mice had to be euthanized 12 days after infection (S4 Fig.). TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice, however, were able to control virus infection within 2 weeks with only residual virus infection detectable in the salivary glands (S4 Fig.). The protection of TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice was long-lasting as infected mice survived for more than 5 months without any signs of sickness.

In addition we analyzed whether a response after a secondary high dose infection with MCMV is improved in TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice. When mice received a second infection at day 21 after the primary infection with 10<sup>6</sup> pfu MCMV157luc i.v., virus spread was controlled immediately and efficiently as hardly any increase of bioluminescence was detectable at 10 days after the second infection (S5 Fig.).

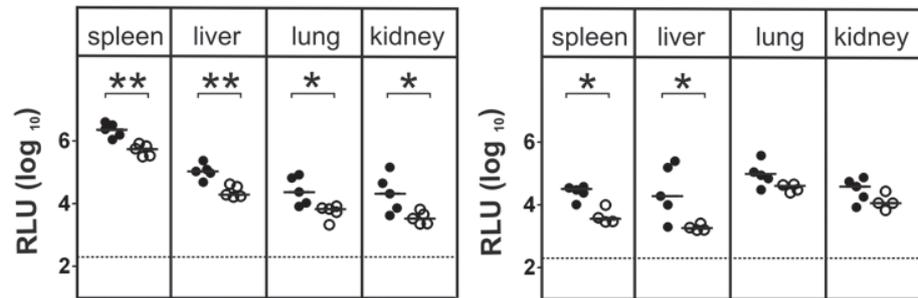
Taken together, the results show that  $\gamma\delta$  T cells are capable of controlling a primary MCMV infection in the absence of additional cells from the adaptive immune system.

## Relevance of $\gamma\delta$ T cells for MCMV infection in immunocompetent mice

The results so far indicated a protective capacity of  $\gamma\delta$  T cells in the absence of additional components of the cellular and humoral immune response. The question arises, whether  $\gamma\delta$  T cells have also a role in the antiviral response in fully immunocompetent hosts. We addressed this question by using TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> mice. Three days after MCMV-infection, TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> mice showed significantly higher viral titers in all tested organs as compared to C57BL/6 mice (Fig. 3). Five days after infection, the difference was less pronounced, being significant only in spleen and liver. These data indicated that during the early phase of infection, the lack of  $\alpha\beta$  T cells in otherwise fully immunocompetent animals results in higher viral titers.

## Cytokine production of $\gamma\delta$ T cells and their functional relevance after MCMV- infection

As the production of interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and interleukin 17 (IL-17) by  $\gamma\delta$  T cells can influence the outcome of an immune response [21] we analyzed the intracellular IFN $\gamma$  and IL-17 production during infection in spleen, liver and lung of CD8<sup>-/-</sup>JHT mice by flow cytometry. As shown in Fig. 4A a high frequency of IFN $\gamma$ -producing  $\gamma\delta$  T cells was observed that remained relatively



**Figure 3.  $\gamma\delta$  T cells contribute to virus control in immunocompetent animals.** Viral load in the organs of TCR $\delta^{-/-}$  (closed circles) and C57BL/6 wt (open circles) mice was determined at day 3 p.i. (left) and day 5 p.i. (right). Each value in the graphs corresponds to an individual animal; horizontal bars represent the median ( $P < 0.05$ , Mann Whitney Test). Representative data from 2 individual experiments.

doi:10.1371/journal.ppat.1004481.g003

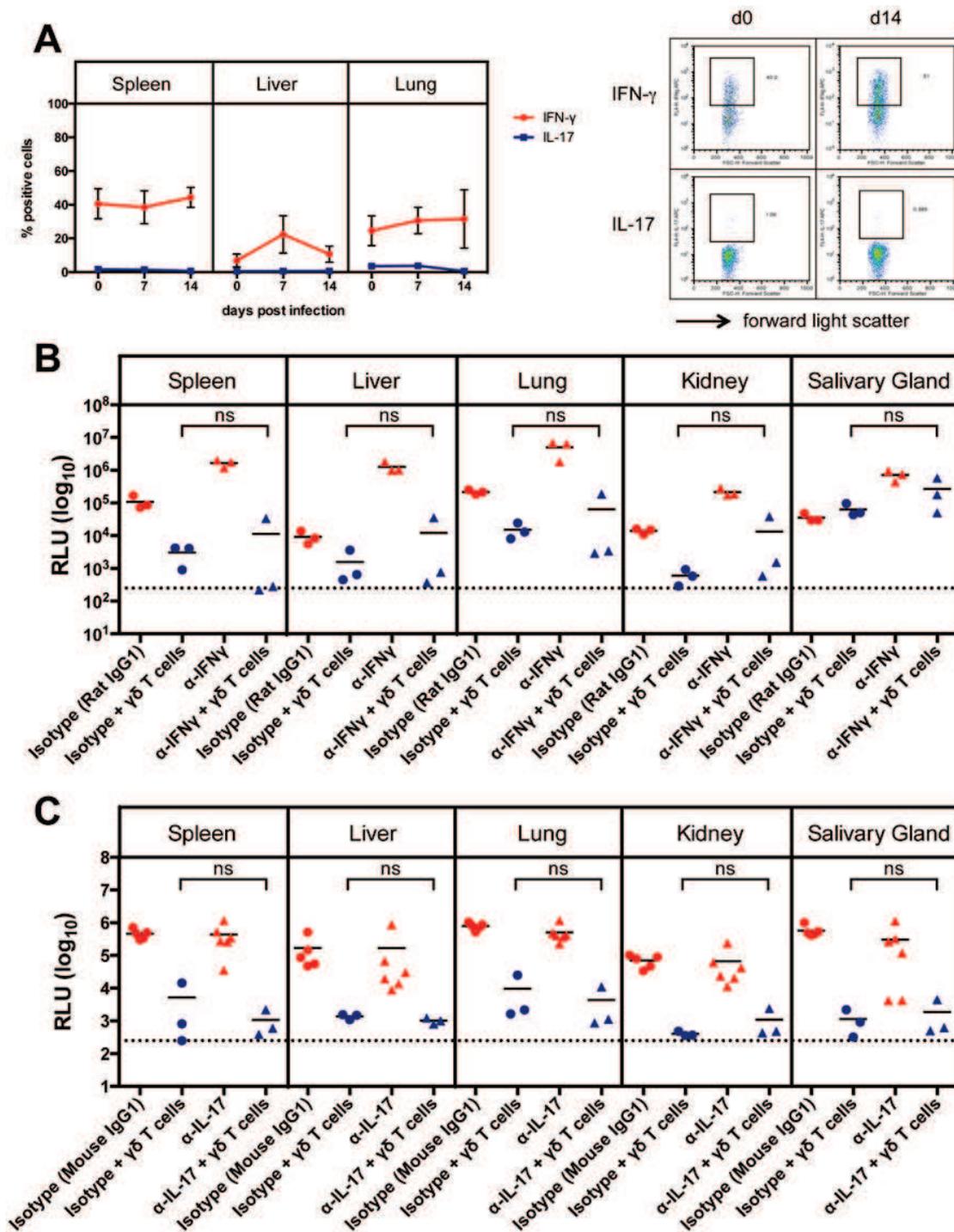
constant in spleen and liver during the infection. In the liver on day 7 after infection a transient increase of IFN $\gamma$ -producing  $\gamma\delta$  T cells was observed. IL-17 producing  $\gamma\delta$  T cells were very rare in these organs, as described before [22], and the frequency did not change during MCMV infection (Fig. 4A).

To examine whether IFN $\gamma$  or IL-17 play a role in viral control, we performed adoptive transfer experiments as described above using RAG $^{-/-}$  recipients and sorted  $\gamma\delta$  T cells from previously infected CD8 $^{-/-}$ JHT mice. Neutralizing antibodies against IFN $\gamma$  or IL-17 or isotype control antibodies were given to the animals before and during the time course of the infection. Neutralizing anti-IFN $\gamma$  antibodies significantly elevated the viral load in RAG $^{-/-}$  control animals that did not receive  $\gamma\delta$  T cells presumably because NK cell-derived IFN $\gamma$ , which provided some protection effect, was blocked (Fig. 4B, red symbols). Importantly, however, the protective capacity of  $\gamma\delta$  T cells was not significantly influenced by neutralizing anti-IFN $\gamma$  antibodies (Fig. 4B, blue symbols). Neutralizing IL-17 antibodies had no effect on the viral load in RAG $^{-/-}$  mice and did not influence the protective capacity of adoptively transferred  $\gamma\delta$  T cells (Fig. 4C).

### Numerical and phenotypic changes of $\gamma\delta$ T cells after MCMV- infection

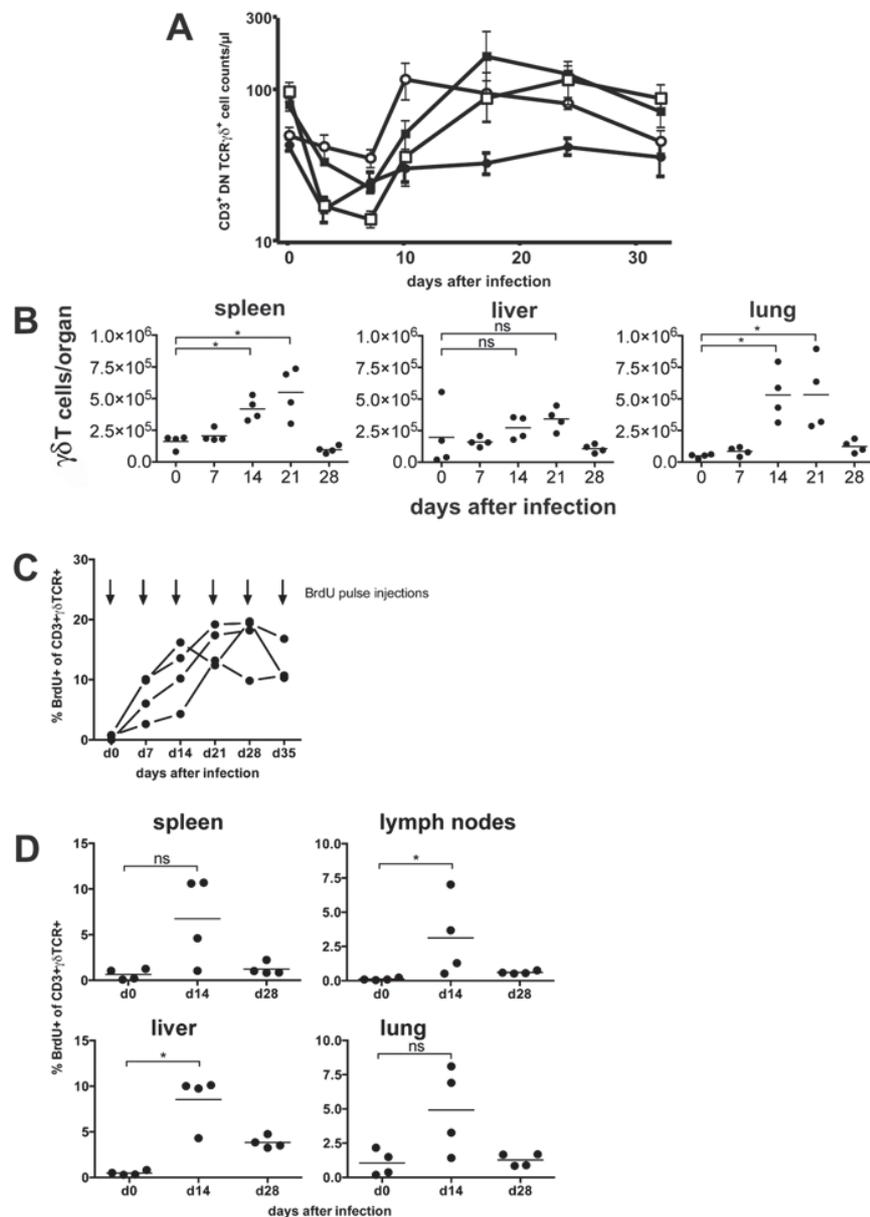
The fact that adoptively transferred  $\gamma\delta$  T cells were able to reduce the viral load in different organs indicated that the protective fraction of the  $\gamma\delta$  T cells is widely distributed in the organism, most probably via the bloodstream. In the blood and secondary lymphoid system  $\gamma\delta$  T cells represent only a minor proportion of lymphocytes but they are much more frequent in epithelial-rich organs [23].

$\gamma\delta$  T-cell populations were analyzed in peripheral blood, spleen, liver and lung of CD8 $^{-/-}$ JHT mice after MCMV infection. Blood samples were taken from different mouse strains on days 0, 3, 7, 10, 17, 24 and 32 p.i. and stained for CD3/4/8, TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$ . Absolute cell counts of  $\gamma\delta$  T cells were quantified by flow cytometry (Fig. 5A). Between the tested mouse strains, namely C57BL/6, CD8 $^{-/-}$ , CD8 $^{-/-}$ JHT and anti-CD4 treated CD8 $^{-/-}$ JHT no substantial differences could be detected.  $\gamma\delta$  T-cell counts were reduced substantially on days 3 and 7 after infection in all strains. Following this general lymphopenia, most likely caused by the early production of type I interferon upon virus infection [24], the population started to recover to preinfection levels 10 days p.i. and remained relatively constant until the end of the experiment at day 32. Within spleen, liver and lung the numbers of  $\gamma\delta$  T cells moderately increased at day 14 and 21 after infection and returned to preinfection levels on day 28 (Fig. 5B).



**Figure 4. Cytokine production of  $\gamma\delta$  T cells after MCMV infection.** (A) Intracellular cytokine production of  $\gamma\delta$  T cells during MCMV infection in CD8<sup>-/-</sup>JHT mice. The mean and SD values of the percentages of positive  $\gamma\delta$  T cells for IFN $\gamma$  and IL-17 are displayed (n = 5). A representative FACS plot is shown on the right. (B) Influence of neutralizing anti-IFN $\gamma$  monoclonal antibodies on the protective capacity of adoptively transferred  $\gamma\delta$  T cells in RAG<sup>-/-</sup> mice. Viral load per 30  $\mu$ g organ was determined at day 18 p.i. Lines represent mean values. Horizontal bars represent the mean values (ns: not significant, Mann Whitney Test). Representative data from 2 experiments. (C) Influence of neutralizing anti-IL-17 monoclonal antibodies on the protective capacity of adoptively transferred  $\gamma\delta$  T cells in RAG<sup>-/-</sup> mice. Viral load per 30  $\mu$ g organ was determined at day 18 p.i. Lines represent mean values (ns: not significant, Mann Whitney Test).

doi:10.1371/journal.ppat.1004481.g004

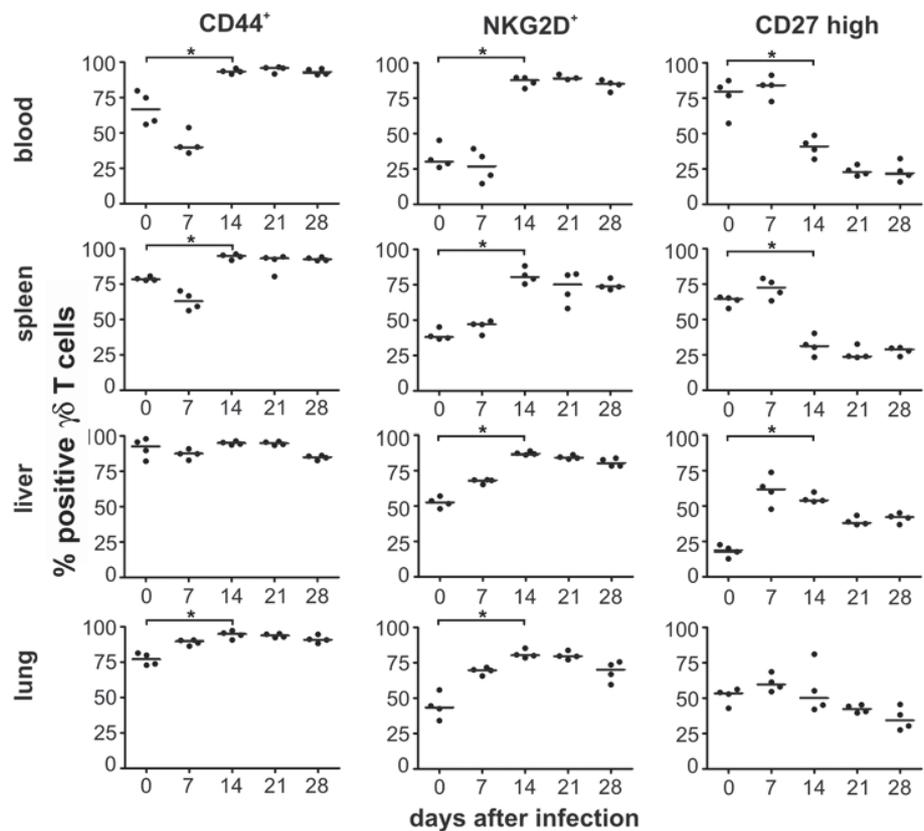


**Figure 5.  $\gamma\delta$  T cells proliferate in the peripheral blood and in target organs after infection.** (A) Mice ( $n = 4$ ) from different mouse strains were infected with  $10^5$  pfu MCMV. Blood samples were taken from all animals on the days indicated, stained with fluorescence conjugated anti-CD3, anti-CD4, anti-TCR and anti-TCR $\gamma\delta$  antibodies and quantified by flow cytometry using counting beads. Values represent mean values  $\pm$ SEM. (filled circles: C57BL/6; open circles: CD8<sup>-/-</sup>; filled squares: CD8<sup>-/-</sup>JHT; open squares: anti-CD4 treated CD8<sup>-/-</sup>JHT). Representative data from 2 individual experiments are shown. (B) Spleen, liver and lung tissue was obtained from infected mice ( $n = 4$ ). TCR $\gamma\delta$  positive cells were quantified by flow cytometry using counting beads. Absolute numbers of CD3<sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells per organ from individual animals (dots) and medians (bars) are shown. Data from one experiment are shown (\*  $p < 0.05$ , Mann Whitney Test). (C) CD8<sup>-/-</sup>JHT mice ( $n = 4$ ) were pulse labeled by weekly BrdU injections and BrdU uptake was analyzed 6 hours after pulse BrdU injections in the peripheral blood. The percentage of BrdU-positive peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells was determined by flow cytometry. (D) CD8<sup>-/-</sup>JHT mice ( $n = 4$ ) were pulse labeled by BrdU injections before infection or 2 weeks and 4 after infection. BrdU uptake was analyzed 6 hours after BrdU injections. The percentage of BrdU-positive  $\gamma\delta$  T cells was determined by flow cytometry for the different organs labeled in the graphs (\*  $p < 0.05$ , Mann Whitney Test).

doi:10.1371/journal.ppat.1004481.g005

To analyze whether  $\gamma\delta$  T cells proliferate *in vivo* after MCMV infection, short-term BrdU pulse experiments were performed at different time points after infection of CD8<sup>-/-</sup>JHT mice. Six hours after BrdU injection less than 1% of  $\gamma\delta$  T cells in the peripheral blood incorporated BrdU in uninfected mice, showing that the vast majority of  $\gamma\delta$  T cells are non-cycling *in vivo* (Fig. 5C). In mice that were infected with MCMV a significant fraction of  $\gamma\delta$  T cells present in the peripheral blood incorporated BrdU 6 hours after injection showing that up to 20% of  $\gamma\delta$  T cells proliferated *in vivo* in response to MCMV infection. In the organs of infected mice  $\gamma\delta$  T cells also showed significant proliferation 2 weeks after infection in lymphnodes and liver. Whereas proliferation normalized 4 weeks after infection in spleen, lung and peripheral lymphnodes, in the liver elevated percentages of proliferating  $\gamma\delta$  T cells are noticeable (Fig. 5D). These data clearly showed that a significant fraction of  $\gamma\delta$  T cells proliferate in response to MCMV infection *in vivo*.

To phenotypically characterize the  $\gamma\delta$  T-cell population after infection we determined several known markers for  $\gamma\delta$  T cells in blood, spleen, liver and lung. As depicted in Fig. 6, the frequency of CD44<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells increased in all organs 14 days after infection, suggesting considerable and long lasting activation of  $\gamma\delta$  T cells in infected animals. The increased frequency of CD44<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells coincided with a switch in the expression pattern of NKG2D, a lectin-like stimulatory receptor originally identified in NK cells [25] and CD27, a costimulatory



**Figure 6. Phenotypical changes of  $\gamma\delta$  T cells after infection.** Blood samples and mononuclear cells from organs of infected CD8<sup>-/-</sup>JHT mice were stained with anti-CD3, anti-TCR $\gamma\delta$ , anti-CD44, anti-NKG2D and anti-CD27 antibodies. The percentage of total CD3<sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells of individual animals (dots) and medians (bars) are shown. Representative data from 3 individual experiments (\* p<0.05, Mann Whitney Test).

doi:10.1371/journal.ppat.1004481.g006

receptor of the TNF-receptor superfamily [26], on the majority of  $\gamma\delta$  T cells in all organs analyzed (Fig. 6). Whereas before infection and during the early phase after infection (days 0–7 p.i.) the majority of  $\gamma\delta$  T cells were NKG2D<sup>-</sup> and CD27<sup>high</sup> a switch to NKG2D<sup>+</sup> CD27<sup>low</sup> was observed at later times after infection in the majority of cells (Fig. 6 and S6 Fig.). This switch of the phenotype remained constant during the observation period until day 28 p.i., when MCMV infection was undetectable by bioluminescence. Thus, MCMV infection induced a significant and long-lasting activation and change in the phenotype of the majority of  $\gamma\delta$  T cells in secondary lymphoid organs and tissues in which MCMV infection is prominent.

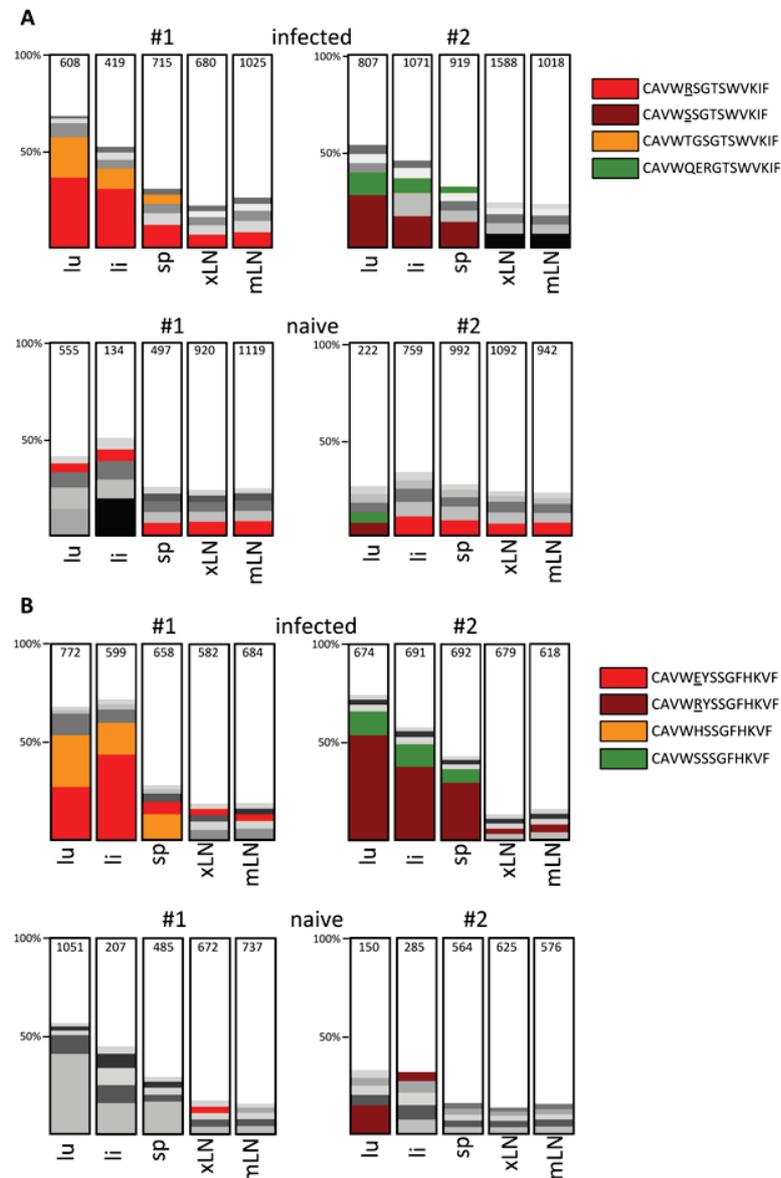
### Clonotypic expansion of V $\gamma$ 1 and V $\gamma$ 2 cells in target organs of persistent MCMV infection

To determine whether in MCMV infected mice subpopulations of clonally restricted  $\gamma\delta$  T cells expand, as it has been described for human  $\gamma\delta$  T cell subpopulations [27] we first determined the V $\gamma$  usage by flow cytometry using currently available antibodies. As expected V $\gamma$ 1 and V $\gamma$ 4 cells (according to the nomenclature of Heilig et al. [28]) contributed to over 80% of  $\gamma\delta$  T cells in spleen, lymph nodes, lung and liver whereas V $\gamma$ 5 and V $\gamma$ 7 cells were hardly detectable in these organs. The only major change in the relative contribution of TCR $\gamma$  subpopulations was an increase of V $\gamma$ 1 cells from approximately 50% to up to 80% of all  $\gamma\delta$  T cells particularly in liver and lung of infected mice at 21 and 28 days after infection in CD8<sup>-/-</sup>JHT and TCR $\alpha^{-/-}$  mice.

To evaluate in detail whether the long-lasting activation and phenotypic change of  $\gamma\delta$  T cells correlates with a more focused V $\gamma$  usage we determined the V $\gamma$  repertoire in 5 different organs of two infected (d28) and two uninfected CD8-JHT mice by 454 sequencing of V $\gamma$ -C $\gamma$  amplicons obtained from cDNA from sorted  $\gamma\delta$  T cells. As expected, sufficient numbers of reads from lung, liver and lymphoid tissues were obtained only for V $\gamma$ 1, V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 4 and V $\gamma$ 6 recombinations. When all amplicons were analyzed for recurrent recombinations we found one major CDR3 clonotype for V $\gamma$ 4 and V $\gamma$ 6 present in all organs, constituting up to 60% and 90% of the respective V $\gamma$ 4 and V $\gamma$ 6 genes. Importantly, no major difference was observed between infected and uninfected mice (S7 Fig.). Within V $\gamma$ 1- and V $\gamma$ 2-products we observed much more diversity particularly in lymphoid organs of uninfected mice. The five most prominent CDR3 clonotypes constitute less than 25% of the whole repertoire (Fig. 7). For the infected mice, however, a clear expansion of V $\gamma$ 1- and V $\gamma$ 2- clonotypes was found particularly in lung and liver (Fig. 7). In both mice 2 dominant clonotypes were found expanded in lung and liver and to a lesser extent these clonotypes can also be detected in the spleen of the same animal. In peripheral and mesenteric lymph nodes these clonotypes were not particularly expanded, however. Together, these results suggest a long lasting and focused accumulation of clonotypically related V $\gamma$ 1- and V $\gamma$ 2 cells after MCMV infection in the organs of virus persistence and latency [29].

### Discussion

The control of CMV infections relies on multiple and redundant immune effector functions from the innate and the adaptive immune system [3]. In this report, we provide the first direct evidence that  $\gamma\delta$  T cells, which are regarded as innate-like cells with adaptive-like potential [30], can provide protection against MCMV infection in the absence of other effector cells of the adaptive immune system, i.e. conventional  $\alpha\beta$  T cells or B cells. The protection against lethal infection conferred by  $\gamma\delta$  T cells after adoptive transfer into RAG<sup>-/-</sup> mice clearly showed some adoptive-like elements as only  $\gamma\delta$  T cells from MCMV-infected donors could provide protection whereas equal numbers of  $\gamma\delta$  T cells from uninfected animals were unable to



**Figure 7. Analysis of the Vy1 and Vy2 repertoire by high throughput 454 sequencing.** Analysis of expanded Vy1 (A) and Vy2 (B) clonotypes in infected (d28 post infection) and uninfected CD8<sup>-/-</sup>JHT mice. The representations of the five most abundant clonotypes as defined by identical CDR3 regions are depicted for lung (lu), liver (li), spleen (sp), peripheral lymph nodes (xLN) and mesenteric lymph nodes (mLN) in 2 individual mice for each group in the bar graph. Clonotypes found in different organs and mice are represented with the same color and the CDR3 sequences are displayed in the legend. The total numbers of sequence reads obtained for each organ and Vy gene is presented in the bars.

doi:10.1371/journal.ppat.1004481.g007

provide significant protection in the RAG<sup>-/-</sup> mice. The fast and efficient control of MCMV after a high dose secondary infection in TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice can be regarded as an additional evidence for an adaptive and memory-like response of  $\gamma\delta$  T cells, which shares features to the NK cell response after secondary MCMV infection [31]. Whereas in the case of NK cells the invariant “innate” Ly49H receptor is accountable for the response, our data regarding a focusing of the Vy1 and Vy2 repertoire particularly in organs where MCMV is persisting suggest the

establishment of a response that is selected for by antigen through the  $\gamma\delta$  antigen receptor formed by VDJ-recombination. It will be interesting to isolate and identify these receptors from infected mice and to generate transgenic mice to study those  $\gamma\delta$  T cells in a defined way during infection, similar as it has been done for virus specific  $\alpha\beta$  T cells and B cells.

NKG2D is a C-type lectin found on NK cells and a fraction of  $\gamma\delta$  T cells and CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells. The markedly elevated frequency of NKG2D-positive  $\gamma\delta$  T cells that remained for several weeks after infection in the MCMV-infected animals could suggest an expansion of a subpopulation of NKG2D-positive  $\gamma\delta$  T cells that is present in relative low frequency in uninfected animals. An alternative explanation for the increased frequency of NKG2D-positive  $\gamma\delta$  T cells after infection is that it is merely a reflection of the activated state of the entire  $\gamma\delta$  T-cell population. It has been shown that NKG2D-expression is upregulated on all CD8<sup>+</sup> T cells upon activation after anti-TCR stimulation and on the majority of antigen-specific CD8<sup>+</sup> cells after virus infection [25]. The concomitant downregulation of CD27 on NKG2D-positive  $\gamma\delta$  T cells as well as the upregulation of CD44 further supports the view that the majority of the  $\gamma\delta$  T-cell population persists in an effector/memory state even after resolution of the acute phase of the infection. CD27-low/negative V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 cells have been shown to belong to the memory and effector/memory compartment in humans [32, 33].

During MCMV infection  $\gamma\delta$  T cells contribute to protection as early as three days after infection as described here for wildtype mice. This goes hand in hand with the description as pre-activated and pre-programmed cells that offer a first line of defense [21]. We also saw activation of  $\gamma\delta$  T cells at much later timepoints during the infection corresponding to the second and later response of  $\gamma\delta$  T cells observed during murine influenza A infection [34]. Interestingly, also in the case of influenza infection, V $\gamma$ 1<sup>+</sup> T cells, which are normally localized to lymphoid tissues, dominate the later response. In addition, MCMV as a persisting virus might provide constant stimulation of  $\gamma\delta$  T cells particularly in the major target organs, causing an increase in cell numbers and phenotypic alterations. In this context it is remarkable that a certain  $\gamma\delta$  T-cell subpopulation expands in healthy aged HCMV carriers [35].

In general, the antigen specificity of the  $\gamma\delta$  T-cell receptor (TCR) recognition remains still enigmatic except for a few cases where clear biochemical binding data have been obtained [21]. In the context of recognition of herpes virus infected cells, early studies with  $\gamma\delta$  T-cell clones suggested specific recognition of a herpes virus glycoprotein I on infected target cells. Very recent data showed that a  $\gamma\delta$  T-cell clone with dual reactivity towards HCMV infected cells and epithelial tumors binds to a stress-regulated self-antigen, the endothelial protein C receptor [36].

Whereas only two reports so far established a potential function of  $\gamma\delta$  T cells in rodent CMV infection [37, 38], numerous publications associated  $\gamma\delta$  T cells with HCMV infections, particularly in renal allograft patients [27, 39, 40], allogeneic stem cell transplantation [41] and during HCMV infections of the fetus *in utero* [42]. However, a causal relationship between  $\gamma\delta$  T-cell responses and protection from CMV disease has not been established. The data presented in this report strongly argue that  $\gamma\delta$  T cells can provide an effective control mechanism of acute CMV infections, particularly when conventional adaptive immune mechanisms are insufficient or absent. These could include the developing fetus and the period following organ- or allogeneic stem cell transplantation. Recent developments in graft engineering of allogeneic stem cells for transplantation suggest that depletion of TCR $\alpha\beta$  positive cells may have advantages over anti-CD3 depletion [43]. In addition to an anti-tumor effect that might be exerted by  $\gamma\delta$  T cells [36, 44], our findings strongly suggest that the anti-HCMV activities of  $\gamma\delta$  T lymphocytes could be of benefit for stem cell transplant recipients as suggested previously [41]. Because  $\gamma\delta$  T lymphocytes are not MHC restricted, adoptive transfer of these lymphocytes from the donor might well represent a new cellular immune-intervention strategy for allogeneic stem cell transplant patients at risk for HCMV infection and reactivation.

## Materials and Methods

### Mice

C57BL/6 mice were obtained from Charles River. C57BL/6 RAG-1<sup>-/-</sup> (RAG<sup>-/-</sup>) mice were obtained from Irmgard Förster (University Munich) and JHT mice [45] were a gift from Hans-Martin Jäck (Division of Molecular Immunology, University Erlangen-Nürnberg). To obtain CD8<sup>-/-</sup>JHT double knockout mice, CD8 $\alpha$ <sup>-/-</sup> (CD8<sup>-/-</sup>) mice [46] were obtained from The Jackson Laboratory and crossed with JHT mice and double-homozygous offspring were selected.

TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> and TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice backcrossed to C57BL/6 were obtained from The Jackson Laboratory. All mice were bred and maintained in the animal facility at the Franz-Penzoldt-Zentrum, University Erlangen under specific pathogen-free environment.

### Viruses

MCMV157luc was described before [14]. Additional viruses were used either containing a repaired mutation in MCK-2 [20] or a deletion of *m126-m129*. The three viruses showed no differences in replication *in vitro* or in experimental outcome. Virus was propagated and purified as described [47]. Virus titer was determined by end-point titration using indirect immunofluorescence on mouse embryonic fibroblasts (MEF) as described [14]. Individual mice were infected intraperitoneally (ip) with  $1 \times 10^5$  plaque forming units (pfu). In the experiment with TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice infection was done intravenously (i.v.) with  $1 \times 10^6$  pfu of MCMV157luc in which the MCK-2 mutation was repaired as reported by Jordan et al. [20]. *In vivo* bioluminescence imaging and measurement of organ luciferase activity was done exactly as described [14].

### Antibodies and flow cytometry

After perfusion spleens, lymph nodes, livers and lungs were harvested. Livers and lungs were digested with 2 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 100  $\mu$ g/ml DNaseI (Roche Diagnostics) for 60 min at 37°C prior to single-cell suspension. Blood was collected in tubes containing Na heparin (Ratiopharm). After erythrocyte lysis (5 min in 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.02 M HEPES, 0.1 mM EDTA for organs or 10 min in BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences) for blood) and Fc $\gamma$ R blocking (5  $\mu$ g/ml rat anti-mouse CD16/CD32; clone 93, eBioscience), cells were incubated in PBS, 2% FCS, 2 mM EDTA for 30 min at 4°C with varying combinations of the following antibodies: CD3-PE (17A2), CD4-PE (GK1.5), TCR $\gamma\delta$ -FITC (GL3, BD Biosciences), TCR $\beta$ -PE-Cy7 (H57-597, Biolegend, San Diego, CA), CD3-APC (145-2C11), CD4-Alexa Fluor 700 (GK1.5), CD8-Alexa Fluor 700 (53-6.7), CD27-FITC (LG.7F9), NKG2D-PE (CX5), TCR $\gamma\delta$ -PerCPeFluor 710 (GL3, eBioscience) and V $\gamma$ 3/5-FITC (536, BD Biosciences). Antibodies V $\gamma$ 1-FITC (2.11), V $\gamma$ 4-FITC (49.2) and V $\gamma$ 7-FITC (F2.67) were a kind gift from P. Pereira. To determine absolute cell numbers Trucount Beads (BD Biosciences) were added.

FACS analysis was performed on LSRII or FACSCalibur machines (Becton Dickinson) running CellQuest software and analyzed with FACSDiva software or FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

### Intracellular cytokine staining and *in vivo* neutralization of cytokines

For intracellular cytokine staining single cell suspensions were prepared and cells were incubated with the Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors, eBioscience) diluted 1:500 in cell culture medium for 4 hours at 37°C. After stimulation cell surface markers were stained as described before. For fixation and permeabilization the Fix&Perm Cell

Permeabilization Kit (An Der Grub Bio Research GmbH) was used according to the manufacturer's specifications. Intracellular cytokines were stained with anti-IFN $\gamma$ -APC (clone XMG1.2) or anti-IL-17-APC (clone eBio17B7) (eBioscience) diluted 1:100 in reagent B of the kit.

For the *in vivo* neutralization of cytokines,  $\gamma\delta$  T cell transfers were conducted as described above. In addition neutralizing antibodies against IFN $\gamma$  (clone XMG1.2), IL-17 (clone 17F3) or their isotype controls (rat IgG1 and mouse IgG1 respectively) were administered. All *in vivo* antibodies were purchased from BioXCell. Mice were injected i.p. with 500  $\mu$ g of antibody in 200  $\mu$ l PBS every third day during the course of the experiment, starting one day before the  $\gamma\delta$  T cell transfer (day 2 after infection).

### Cell depletion

For *in vivo* depletion of CD4<sup>+</sup> T cells, mice were injected ip with 250  $\mu$ g of the monoclonal antibody YTS 191 [48] on day -1, 3 and 8 after infection; for long term depletion with 300  $\mu$ g antibody on day -1, 3, 7, 17 and 27 after infection. For depletion of CD3<sup>+</sup> T cells 300  $\mu$ g of YTS 191 were injected on day -4 and 250  $\mu$ g of the monoclonal antibody 145–2C11 were injected on day -1 and 2 after infection (BioXcell);

For analysis of whole blood lymphocytes 2 drops of blood were taken from the tail vein in heparinized tubes (Greiner bio-one). Equal volumes of whole blood and buffer (PBS, 2% FCS) containing 2,500 Truecount counting beads (BD Biosciences) and staining antibodies were mixed. BD FACS Lysing solution (BD Biosciences) was added. The mixture was analyzed by flow cytometry.

### Chromium release assay

Purified TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> or TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> effector cells were cultured overnight in RPMI-1640 medium with glutamine, penicillin 100 U/ml, streptomycin 0.1 mg/ml, 5  $\mu$ M  $\beta$ -ME, 10 mM HEPES, 7.5% FCS and 20U/ml interleukin-2. Cytolytic activity was measured by a standard 4-h <sup>51</sup>Cr release assay with graded numbers of effector cells and with 1,000 target cells per 0.2-ml microwell. Target cells were <sup>51</sup>Cr-labeled MEF infected with centrifugal enhancement with 0.2 pfu of MCMV per cell in the presence or absence of phosphonoacetic acid for 22 h. CD3 $\epsilon$  producing B cell hybridoma cells (145–2C11) were used as targets to measure the total cytolytic potential of an effector cell population by antigen-independent polyclonal signaling via the TCR-CD3 complex [19].

### Cell sorting and adoptive transfer of lymphocytes

Single-cell suspensions of spleens and lymph nodes from at least 6 weeks infected CD8<sup>-/-</sup>JHT mice were stained with antibodies against CD3, CD4, TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$  (see above). CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> or TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells respectively were isolated by fluorescence activated cell sorting using a MoFlo cell sorter (Cytomation) and analyzed for purity. Purity >99% was achieved. Purified cells were either used for chromium release assay or adoptively transferred into the tail or ocular vein of RAG<sup>-/-</sup> mice 3 days after infection. Absence of contaminating TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells was confirmed by flow cytometry in all animals analyzed for organ titer or survival. Mice with detectable contaminations of TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells were excluded from the analyses.

### BrdU incorporation

Mice were given i.p. injections of 1 mg BrdU. 6 hours after BrdU injections peripheral blood, or cells from spleen, peripheral lymphnodes, liver and lung were harvested and the incorporation of BrdU into the dividing cells' DNA was determined by the manufacturer's protocol (FITC BrdU Flow Kit, BD Pharmingen) after surface staining for CD3 and  $\gamma\delta$ TCR.

## High throughput 454 sequencing of V $\gamma$ C $\gamma$ amplicons from sorted $\gamma\delta$ T cells

For high throughput 454 sequencing,  $\gamma\delta$  T cells from spleen, peripheral (inguinal, brachial, axillary, superficial) lymph nodes, mesenteric lymph nodes, liver and lung of individual mice were sorted by FACS. Two naive mice and two mice four weeks after infection were compared. RNA of  $\gamma\delta$  T cells from separate organs was isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) after homogenizing cells with QIA shredder columns (Qiagen). Before cDNA synthesis with the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (version 6.0, Roche) volume of the samples was reduced through centrifugation in a SpeedVac centrifuge (Eppendorf). cDNA of individual organs was used for polymerase chain reactions. Primers are listed in [S2 Table](#). For each organ sample five PCRs were carried out and products of every organ were tagged with a specific barcode (multiplex identifier, MID) during PCRs. Reactions contained 4  $\mu$ l of cDNA template, 3  $\mu$ l RediLoad (Invitrogen), 1  $\mu$ l of a 5  $\mu$ M stock of each primer, 12  $\mu$ l 5-Prime polymerase mix 2,5x (5 PRIME GmbH) and 9  $\mu$ l water to obtain a reaction volume of 30  $\mu$ l.

After heating the reaction mixture for 7 min at 94°C, 38 circles under following conditions were performed: 60 sec at 94°C, 60 sec at 54°C and 30 sec at 72°C. 5 min at 72°C after the last circle allowed final elongation.

10  $\mu$ l of each reaction were analyzed on an agarose gel and 20  $\mu$ l were purified with QIA-quick columns (PCR purification kit, Qiagen) after pooling the five reactions of one organ. Pools of different organs were adjusted to the same DNA concentration and combined. To reduce the volume, DNA was precipitated with ethanol. Next Generation Sequencing was performed on the Roche 454 platform by MWG eurofins.

After sorting for MID tags for the different samples, individual FASTA files for each individual tissue sample containing 1.000–6.000 high quality reads were analyzed on the IMGT/HighV-QUEST platform [49]. Output files were imported in Microsoft Excel and the V $\gamma$  gene usage, CDR3 length and amino acid composition was analyzed for the different samples filtered for sequence reads that contain functional recombinations using the PivotTable function of Excel.

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Prism 6 (Graph-Pad Software, Inc.). The Mann-Whitney test for the comparison of two groups was used. For the analyses of survival data the Mantel-Cox logrank test was used.

## Ethics statement

The study was performed in strict accordance with German law (Tierschutzgesetz). The protocol was approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments at the Bavarian Government (Az. 54–2532.1–57/12 and Az. 54–2532.2–3/08). All efforts were made to minimize animal suffering.

## Supporting Information

**S1 Fig. CD8<sup>-/-</sup>JHT mice are devoid of CD8<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cells.** Blood of C57BL/6 (left) and CD8<sup>-/-</sup>JHT mice (right) was stained with antibodies against CD8 and CD19 and analyzed by flow cytometry. Cells within the lymphocyte gate are shown. (TIF)

**S2 Fig. Administration of antibodies in CD8<sup>-/-</sup>JHT mice and control by flow cytometry.** (A) Experimental schedule. Upper row: 250  $\mu$ g of anti-CD4 antibody YTS 191 were administered

at days -1, 3 and 8 p.i. (blue); Lower row: for depletion of CD3 cells 250  $\mu$ g anti-CD4 antibody was given day -4 p.i. and 250  $\mu$ g anti-CD3 antibody 145–2C11 was given day -1 and 2 p.i. (green). Days of imaging are marked with an open circle and times of flow cytometric analysis with a red arrow (first experiment: upper row; second experiment: lower row). (B) Representative data at day 13 p.i. obtained by blood cell staining with antibodies against CD4, TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$  followed by flow cytometry (gated on lymphocytes): after anti-CD4 treatment with mab YTS 191 no binding of anti-CD4 antibody GK1.5 to lymphocytes was detected in blood. In blood of CD3-depleted animals no TCR $\alpha\beta^+$  or TCR $\gamma\delta^+$  lymphocytes were detected. (C) Deletion of  $\gamma\delta$  T cells in blood of adoptively transferred animals day 12 p.i. (TIF)

**S3 Fig. Protective capacity of  $\gamma\delta$  T cells from naïve and infected wildtype C57Bl/6 mice.**

Groups of RAG $^{-/-}$  mice were infected with  $10^5$  pfu of MCMV157luc and on day 3 of infection 400,000 sorted  $\gamma\delta$  T cells from the spleen of C57Bl/6 mice were adoptively transferred. Organs were collected on day 18 after infection and viral load per 30  $\mu$ g organ was determined. The data summarize two independent experiments and are presented as the percentage of virus load compared to a group of RAG $^{-/-}$  mice that received PBS instead of  $\gamma\delta$  T cells. Box plots represent the median, 25th to 75th percentiles and minimum and maximum values. (TIF)

**S4 Fig. Efficient control of MCMV infection in TCR $\alpha^{-/-}$  mice.** Groups of RAG $^{-/-}$  and TCR $\alpha^{-/-}$  mice were infected i.v. with  $10^6$  pfu of MCMV157luc in which the MCK-2 mutation was repaired. *In vivo* imaging was performed on the days indicated. Images were obtained from a 120sec acquisition. On day 12 after infection Rag-1 $^{-/-}$  mice had to be euthanized because of severe sickness. (TIF)

**S5 Fig. Efficient control of a secondary MCMV infection in TCR $\alpha^{-/-}$  mice.** *In vivo* bioluminescence imaging during a primary (left) and secondary (right) infection. Secondary infection was given 21 days after the primary infection. Mice were infected i.v. with  $10^6$  pfu of MCMV157luc in which the MCK-2 mutation was repaired. *In vivo* imaging was performed on the days indicated. Images were obtained from a 120 sec acquisition. (TIF)

**S6 Fig. Expression pattern of NKG2D and CD27 on  $\gamma\delta$  T cells in uninfected mice and 14 days after MCMV infection.** CD3 $^+$  TCR $\gamma\delta^+$  cells from peripheral blood are gated and analyzed for the surface expression of NKG2D and CD27 by flow cytometry. (TIF)

**S7 Fig. Analysis of the V $\gamma$ 4 and V $\gamma$ 6 repertoire by high throughput 454 sequencing.** Analysis of expanded V $\gamma$ 4 (left) and V $\gamma$ 6 (right) clonotypes in infected (d28 post infection, solid bars) and uninfected (open bars) CD8 $^{-/-}$ JHT mice. The frequency of the most abundant clonotype as defined by identical CDR3 regions is depicted for lung, liver, spleen, peripheral lymph nodes (XLN) and mesenteric lymph nodes (MLN) in 2 individual mice for each group. The CDR3 sequences are presented in the header. A minimum of 125 sequence reads was obtained for all organs and V $\gamma$  amplicons. (TIF)

**S1 Table. Characteristics of  $\gamma\delta$  T cells of wild type and CD8 $^{-/-}$ JHT mice under steady state conditions.** (DOCX)

**S2 Table. Nucleotide sequences of PCR primers used for V $\gamma$ -C $\gamma$  amplicon generation and 454 high throughput sequencing.**  
(XLSX)

## Acknowledgments

The authors thank Uwe Appelt and Markus Mroz (Nikolaus-Fiebiger-Zentrum, Erlangen) for expert cell sorting, Doris Thomas (Institut für Virologie, Mainz) for expert technical help and Barbara Kropff for generation of the MCMV157lucMCK+ virus. We thank Bill Britt, University of Alabama at Birmingham, for critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

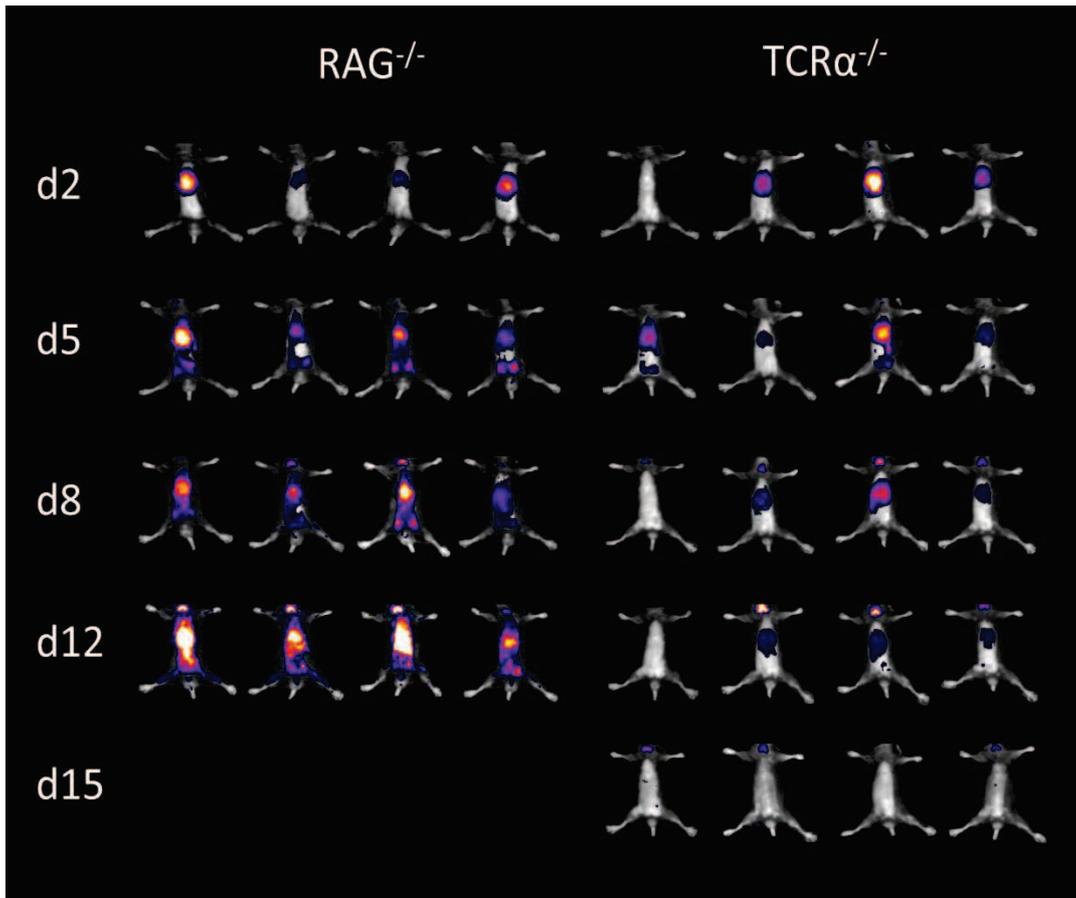
Conceived and designed the experiments: MM THW. Performed the experiments: SS MD AS RH THW. Analyzed the data: SS MD RH MM THW. Wrote the paper: MM THW.

## References

1. Mach M, Wiegers A-K, Spindler N, Winkler T (2013) Protective Humoral Immunity. In: Reddehase MJ, editor. Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention. 1. edition ed: Caister Academic Press.
2. Reddehase MJ (2002) Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2: 831–844. doi: [10.1038/nri932](https://doi.org/10.1038/nri932) PMID: [12415307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12415307/)
3. Polić B, Hengel H, Krmpotić A, Trgovcich J, Pavić I, et al. (1998) Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 188: 1047–1054. doi: [10.1084/jem.188.6.1047](https://doi.org/10.1084/jem.188.6.1047) PMID: [9743523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9743523/)
4. Boeckh M, Geballe AP (2011) Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* 121: 1673–1680. doi: [10.1172/JCI45449](https://doi.org/10.1172/JCI45449) PMID: [21659716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21659716/)
5. Boeckh M, Ljungman P (2009) How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 113: 5711–5719. doi: [10.1182/blood-2008-10-143560](https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-143560) PMID: [19299333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19299333/)
6. Kurz S, Steffens HP, Mayer A, Harris JR, Reddehase MJ (1997) Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J Virol* 71: 2980–2987. PMID: [9060657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9060657/)
7. Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Bühring HJ, Koszinowski UH (1987) CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 61: 3102–3108. PMID: [3041033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3041033/)
8. Reddehase MJ, Jonjic S, Weiland F, Mutter W, Koszinowski UH (1988) Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* 62: 1061–1065. PMID: [2828654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2828654/)
9. Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, Topp MS, Schuster FR, et al. (2010) Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 116: 4360–4367. doi: [10.1182/blood-2010-01-262089](https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-262089) PMID: [20625005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20625005/)
10. Jonjic S, Mutter W, Weiland F, Reddehase MJ, Koszinowski UH (1989) Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *J Exp Med* 169: 1199–1212. doi: [10.1084/jem.169.4.1199](https://doi.org/10.1084/jem.169.4.1199) PMID: [2564415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2564415/)
11. Walton SM, Mandaric S, Torti N, Zimmermann A, Hengel H, et al. (2011) Absence of cross-presenting cells in the salivary gland and viral immune evasion confine cytomegalovirus immune control to effector CD4 T cells. *PLoS Pathog* 7: e1002214. doi: [10.1371/journal.ppat.1002214](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002214) PMID: [21901102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21901102/)
12. Hammoud B, Schmuck M, Fischer AM, Fuehrer H, Park S-J, et al. (2013) HCMV-specific T-cell therapy: do not forget supply of help. *J Immunother* 36: 93–101. doi: [10.1097/CJI.0b013e31827b87cc](https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31827b87cc) PMID: [23377662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23377662/)
13. Wirtz N, Schader SI, Holtappels R, Simon CO, Lemmermann NAW, et al. (2008) Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *Med Microbiol Immunol* 197: 151–158. doi: [10.1007/s00430-008-0095-0](https://doi.org/10.1007/s00430-008-0095-0) PMID: [18365251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18365251/)

14. Klenovsek K, Weisel F, Schneider A, Appelt U, Jonjic S, et al. (2007) Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* 110: 3472–3479. doi: [10.1182/blood-2007-06-095414](https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-095414) PMID: [17656648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17656648/)
15. Jonjic S, Pavić I, Polić B, Crnković I, Lucin P, et al. (1994) Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* 179: 1713–1717. doi: [10.1084/jem.179.5.1713](https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1713) PMID: [8163949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8163949/)
16. Farrell HE, Shellam GR (1991) Protection against murine cytomegalovirus infection by passive transfer of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 72 (Pt 1): 149–156. doi: [10.1099/0022-1317-72-1-149](https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-1-149) PMID: [1846643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1846643/)
17. Jonjic S, Pavić I, Lucin P, Rukavina D, Koszinowski UH (1990) Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol* 64: 5457–5464. PMID: [1976821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1976821/)
18. French AR, Pingel JT, Wagner M, Bubic I, Yang L, et al. (2004) Escape of mutant double-stranded DNA virus from innate immune control. *Immunity* 20: 747–756. doi: [10.1016/j.immuni.2004.05.006](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.006) PMID: [15189739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15189739/)
19. Holtappels R, Podlech J, Grzimek NK, Thomas D, Pahl-Seibert MF, et al. (2001) Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *J Virol* 75: 6584–6600. doi: [10.1128/JVI.75.14.6584-6600.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6584-6600.2001) PMID: [11413326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11413326/)
20. Jordan S, Krause J, Prager A, Mitrovic M, Jonjic S, et al. (2011) Virus Progeny of Murine Cytomegalovirus Bacterial Artificial Chromosome pSM3fr Show Reduced Growth in Salivary Glands due to a Fixed Mutation of MCK-2. *J Virol* 85: 10346–10353. doi: [10.1128/JVI.00545-11](https://doi.org/10.1128/JVI.00545-11) PMID: [21813614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21813614/)
21. Vantourout P, Hayday A (2013) Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 13: 88–100. doi: [10.1038/nri3384](https://doi.org/10.1038/nri3384) PMID: [23348415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23348415/)
22. Ribot JC, Debarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, et al. (2009) CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* 10: 427–436. doi: [10.1038/ni.1717](https://doi.org/10.1038/ni.1717) PMID: [19270712](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19270712/)
23. Carding SR, Egan PJ (2002) Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2: 336–345. doi: [10.1038/nri797](https://doi.org/10.1038/nri797) PMID: [12033739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12033739/)
24. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Förster R, Kalinke U (2006) Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 108: 3253–3261. doi: [10.1182/blood-2006-06-027599](https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-027599) PMID: [16868248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16868248/)
25. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, et al. (2002) The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17: 19–29. doi: [10.1016/S1074-7613\(02\)00333-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00333-3) PMID: [12150888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12150888/)
26. Gravestain LA, Nieland JD, Kruisbeek AM, Borst J (1995) Novel mAbs reveal potent co-stimulatory activity of murine CD27. *Int Immunol* 7: 551–557. doi: [10.1093/intimm/7.4.551](https://doi.org/10.1093/intimm/7.4.551) PMID: [7547681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7547681/)
27. Déchanet J, Merville P, Lim A, Retière C, Pitard V, et al. (1999) Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 103: 1437–1449. doi: [10.1172/JCI5409](https://doi.org/10.1172/JCI5409) PMID: [10330426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10330426/)
28. Heilig JS, Tonegawa S (1986) Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* 322: 836–840. doi: [10.1038/322836a0](https://doi.org/10.1038/322836a0) PMID: [2943999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2943999/)
29. Balthesen M, Messerle M, Reddehase MJ (1993) Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J Virol* 67: 5360–5366. PMID: [8394453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8394453/)
30. Turchinovich G, Pennington DJ (2011) T cell receptor signalling in  $\gamma\delta$  cell development: strength isn't everything. *Trends Immunol* 32: 567–573. doi: [10.1016/j.it.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.it.2011.09.005) PMID: [22056207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22056207/)
31. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL (2009) Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457: 557–561. doi: [10.1038/nature07665](https://doi.org/10.1038/nature07665) PMID: [19136945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19136945/)
32. Scheper W, van Dorp S, Kersting S, Pietersma F, Lindemans C, et al. (2013)  $\gamma\delta$ T cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* 27: 1328–1338. doi: [10.1038/leu.2012.374](https://doi.org/10.1038/leu.2012.374) PMID: [23277330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23277330/)
33. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, et al. (2003) Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* 198: 391–397. doi: [10.1084/jem.20030235](https://doi.org/10.1084/jem.20030235) PMID: [12900516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12900516/)
34. Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, et al. (1990) Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. *J Exp Med* 172: 1225–1231. doi: [10.1084/jem.172.4.1225](https://doi.org/10.1084/jem.172.4.1225) PMID: [2145388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2145388/)
35. Alejenez A, Pachnio A, Halawi M, Christmas SE, Moss PA, et al. (2014) Cytomegalovirus drives Vdelta2neg gammadelta T cell inflation in many healthy virus carriers with increasing age. *Clin Exp Immunol* 176: 418–428. doi: [10.1111/cei.12297](https://doi.org/10.1111/cei.12297) PMID: [24547915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24547915/)

36. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, et al. (2012) Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human  $\gamma\delta$  T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* 13: 872–879. doi: [10.1038/ni.2394](https://doi.org/10.1038/ni.2394) PMID: [22885985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22885985/)
37. Dyugovskaya L, Hirsh M, Ginsburg H (2003) Phenotypic profile and functional characterization of rat lymph node-derived gammadelta T cells: implication in the immune response to cytomegalovirus. *Immunology* 108: 129–136. doi: [10.1046/j.1365-2567.2003.01568.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01568.x) PMID: [12562320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12562320/)
38. Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, Hamano S, Yoshida H, et al. (2000) Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology* 99: 187–194. doi: [10.1046/j.1365-2567.2000.00938.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00938.x) PMID: [10692035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692035/)
39. Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, et al. (2005) Shared reactivity of Vdelta2neg gamma delta T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 201: 1567–1578. doi: [10.1084/jem.20041851](https://doi.org/10.1084/jem.20041851) PMID: [15897274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15897274/)
40. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Bergé F, Potaux L, et al. (2001) Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 184: 533–541. doi: [10.1086/322843](https://doi.org/10.1086/322843) PMID: [11494158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11494158/)
41. Knight A, Madrigal AJ, Grace S, Sivakumaran J, Kottaridis P, et al. (2010) The role of V $\delta$ 2-negative  $\gamma\delta$  T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 116: 2164–2172. doi: [10.1182/blood-2010-01-255166](https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-255166) PMID: [20576814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20576814/)
42. Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, Liesnard C, Tackoen M, et al. (2010) Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med* 207: 807–821. doi: [10.1084/jem.20090348](https://doi.org/10.1084/jem.20090348) PMID: [20368575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20368575/)
43. Handgretinger R (2012) Negative depletion of CD3(+) and TcR $\alpha\beta$ (+) T cells. *Curr Opin Hematol* 19: 434–439. doi: [10.1097/MOH.0b013e3283582340](https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283582340) PMID: [22914586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22914586/)
44. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, Park BS, Chiang K-Y, et al. (2007) Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: 751–757. doi: [10.1038/sj.bmt.1705650](https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705650) PMID: [17450185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17450185/)
45. Chen J, Trounstein M, Alt FW, Young F, Kurahara C, et al. (1993) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol* 5: 647–656. doi: [10.1093/intimm/5.6.647](https://doi.org/10.1093/intimm/5.6.647) PMID: [8347558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8347558/)
46. Fung-Leung WP, Schilham MW, Rahemtulla A, Kündig TM, Vollenweider M, et al. (1991) CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65: 443–449. doi: [10.1016/0092-8674\(91\)90462-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90462-8) PMID: [1673361](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1673361/)
47. Podlech J, Holtappels R, Grzimek NKA, Reddehase MJ (2002) Animal models: Murine cytomegalovirus. In: Stefan H. E KDK, editor. *Methods in Microbiology*: Academic Press. pp. 493–525.
48. Cobbold SP, Jayasuriya A, Nash A, Prospero TD, Waldmann H (1984) Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 312: 548–551. doi: [10.1038/312548a0](https://doi.org/10.1038/312548a0) PMID: [6150440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6150440/)
49. Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V (2012) IMGT((R)) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol* 882: 569–604. doi: [10.1007/978-1-61779-842-9\\_32](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_32) PMID: [22665256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665256/)



S4 Figure – Sell et al., 2015



## Annexe 2

### *Publications*

- Khairallah C, Netzer S, Villacreces A, Juzan M, Rousseau B, Dulanto S, Giese A, Costet P, Praloran V, Moreau JF, Dubus P, Vermijlen D, Dechanet-Merville J, Capone M.  
 ***$\gamma\delta$  T Cells Confer Protection against Murine Cytomegalovirus (MCMV).***  
PLoS Pathog. 2015 doi: 10.1371/journal.ppat.1004702
- Chriment D, Dubus P, Chambonnier L, Hocès de la Guardia A, Sifré E, Giese A, Capone M, Khairallah C, Costet P, Rousseau B, Hubert C, Burlen-Defranoux O, Varon C, Bandeira A, Mégraud F, Lehours P.  
***Neonatal Thymectomy Favors Helicobacter pylori-Promoted Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Lesions in BALB/c Mice.***  
Am J Pathol. 2014 Jun 5. pii: S0002-9440(14)00264-8. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.04.008.
- Devaud C, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Paroissin C, Khairallah C, Costet P, Moreau JF, Couillaud F, Dechanet-Merville J, Capone M.  
***Anti-metastatic potential of human V $\delta$ 1(+)  $\gamma\delta$  T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma.***  
Cancer Immunol Immunother. 2013 Jul;62(7):1199-210. doi: 10.1007/s00262-013-1402-1

### *Communications orales*

- *Congrès internationaux*

Camille Khairallah, Sonia Netzer, Arnaud Villacreces, Marina Juzan, Vincent Praloran, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville and Myriam Capone

#### ***Gamma delta T cells in CMV infection***

Oral presentation at the International Gamma Delta T Cell Conference, Chicago, USA, 16 May - 18 May, 2014

Camille Khairallah, Sonia Netzer, Arnaud Villacreces, Marina Juzan, Vincent Praloran, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville and Myriam Capone

#### ***Implication of gamma delta T cells in the immune response against murine CMV***

Front. Immunol. doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00948

Oral presentation at the 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (ICI), Milan, Italy, 22 Aug - 27 Aug, 2013

– *Autres*

***Les cellules T gamma delta protègent du cytomégalo­virus murin (MCMV)***

Réseau Hôte – Pathogène, Bordeaux, 27 Novembre 2014

***$\gamma\delta$  T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV)***

Journée des Jeunes Chercheurs de la FR TransBioMed, Bordeaux, 19 Juin 2014

2<sup>ème</sup> prix communication orale

*Posters*

***Implication of gamma delta T cells in the immune response against murine CMV***

Journée de l'École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Palais des Congrès  
(Arcachon), 10 Avril 2013

1<sup>er</sup> prix poster

