

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 Juillet 2010

Par Lionel Couzi

Né(e) le 09/12/1974 à Bergerac (Dordogne)

Intégration des Lymphocytes T Gamma Delta à la Réponse anti-Cytomégalovirus en Transplantation d'Organe

Membres du Jury

Mr le Dr Marc Bonneville, DR, INSERMPrésident
Mme le Pr Laurence Zitvogel, PU-PH, Université Paris XIRapporteur
Mr le Pr Gilles Blancho, PU-PH – Université NantesRapporteur
Mr le Pr Christophe Legendre, PU-PH, Université Paris VExaminateur
Mr le Pr Pierre Merville, PU-PH, Université Bordeaux 2Examinateur
Mme le Dr Julie Déchanet-Merville, DR, CNRS.....Directrice de Thèse

A Bérengère,

A Oriane et Héloïse,

A ma grand-mère,

A mes parents et à mon frère,

A mes proches Carine, Elodie, Isabelle, Laurence, David, Eric, Nicolas, et Thierry

Remerciements

Je remercie très chaleureusement le **Docteur Julie Déchanet-Merville** pour son encadrement, sa formation, et son extrême disponibilité. J'ai été particulièrement impressionné par la quasi-exhaustivité de tes connaissances sur le sujet. J'ai essayé d'en tirer le maximum, même si je n'ai pas réussi à tout intégrer. J'ai en tout cas beaucoup apprécié ta pédagogie. Je te remercie aussi infiniment de m'avoir appris à dépasser les difficultés et l'ingratitude du quotidien scientifique. Bref au-delà du domaine scientifique, j'ai réappris l'optimisme à tes côtés. Merci.

Je remercie infiniment le **Professeur Pierre Merville** de m'avoir fait découvrir la transplantation rénale et le monde passionnant de l'immunologie. Je n'aurai bien évidemment jamais initié ce travail sans toi. Merci pour ton soutien sans faille depuis 10 ans. J'espère être à la hauteur de ce que tu es.

Je remercie le **Docteur Marc Bonneville** pour avoir accepté de présider cette thèse.
Je remercie très sincèrement le **Professeur Laurence Zitvogel** le **Professeur Gilles Blancho** d'avoir pris sur leur temps pour être les rapporteurs de ce travail.
Je remercie enfin le **Professeur Christophe Legendre** d'avoir accepté de juger cette thèse.
Je suis extrêmement honoré de pouvoir bénéficier de votre expertise dans le domaine de l'immunologie et/ou de la transplantation.

Je remercie le **Professeur Jean-François Moreau** pour son accueil, et ses conseils avisés qui ont été plus que déterminants. Merci de m'avoir fait profiter de vos connaissances « abyssales » et « encyclopédiques » en immunologie. Sachez aussi que le laboratoire que vous avez bâti est un endroit formidable à tout point de vue.

Je remercie **Vincent Pitard**, l'ami, l'expert technique, et le confident. Ce travail est aussi le tien, à bien des égards.

Remerciements (suite)

Je remercie **Xavier Sicard** pour son aide précieuse et la qualité de son travail. Merci à toi de subir le quotidien, mais ce travail est une forme de reconnaissance où tu sauras retrouver ton investissement.

Je remercie **Isabelle Guarrigue**, pour sa gentillesse, sa compétence et son dynamisme. Merci de nous avoir ouvert les portes du laboratoire de virologie et d'avoir contribué à une partie de ces travaux.

Je remercie **Giulia Costa et Christel Devaux**, mes deux « inoubliables » compagnes de thèse et **Severine Loizon** pour leur soutien et pour leur gentillesse. Vous avez toutes mon affection. J'espère que l'avenir nous réunira à nouveau.

Je remercie **Charlotte Behr** pour ses conseils toujours avisés et pertinents. Je n'oublierai pas ton aide et tes encouragements. Je te suis très reconnaissant de m'avoir fait partager ton expérience.

Je remercie **Patrick Legembre** de m'avoir sollicité pour travailler à ses coté sur un de ces projets. Cette collaboration avec toi fut très enrichissante. Je suis heureux d'avoir pu profiter de ton expertise scientifique et de ton approche de la science. Merci à toi.

J'ai aussi une pensée pour **Sonia Netzer, Myriam Capone, Omar Hawchar, Sophie Daburon et Mathieu Pizon**. Ce fut un vrai plaisir de travailler à vos coté et d'avoir pu profiter de vos conseils souvent précieux. Merci à vous.

Je remercie aussi **Thomas Bachelet** pour son aide bibliographique. Ta connaissance du sujet et nos discussions m'ont été très utile.

Je remercie l'équipe soignante de néphrologie pour son implication et son aide. Merci à **Christelle Gruet, Ghislaine Canton, Marie-Adelaide Cruz, Marie-Agnes Sarrazin, Sandrine Dumartin, Sandrine Zanoni**. Je remercie tout particulièrement **Catherine Rio** pour son aide et sa participation à ce travail.

Je remercie enfin tous les patients sans qui ces travaux n'auraient pas pu être menés...

... et mon VAIO VGN SZ3VP.

TABLES DES MATIERES

ABBREVIATIONS.....	7
RESUME.....	8
PREAMBULE.....	9
INTRODUCTION : PLACE DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA DANS LE CONTEXTE DE LA TRANSPLANTATION D'ORGANE.....	10
1. Le Lymphocyte T gamma delta V δ 2 ^{neg} en Physiologique Humaine: Un Acteur Multifonctionnel.....	13
1.1 Génétique et Structure de leur récepteur à l'antigène	13
1.2 Localisation	14
1.3 Ontogénie des lymphocytes T gamma delta V δ 2 ^{neg}	15
1.4 Place des lymphocytes T gamma delta V δ 2 ^{neg} dans la réponse immunitaire : Le concept de la réponse lymphocytaire aux antigènes de stress.	17
1.5 Fonctions effectrices antivirales et anti-tumorales des lymphocytes T gamma delta V δ 2 ^{neg}	19
1.6 Autres fonctions immunologiques des lymphocytes T gamma delta V δ 2 ^{neg}	29
2. Conséquences sur le Virus et sur l'Hôte de la Réponse Immunologique contre le Cytomégalovirus en Transplantation d'Organe	32
2.1 Epidémiologie de l'infection à Cytomégalovirus à l'ère des traitements prophylactiques et préventifs en transplantation d'organe :.....	32
2.2 Le virus en bref	34
2.3 Entrée, dissémination et Latence du CMV :	36
2.4 Rôle des cellules endothéliales.....	37
2.5 Rôle des monocytes.....	38
2.6 Rôle des cellules dendritiques	39
2.7 Rôle des cellules NK	40
2.8 La réponse adaptative humorale.....	41
2.9 La réponse adaptative cellulaire T alpha beta CD8+	42
2.10 La réponse adaptative cellulaire T alpha beta CD4+	50
2.11 La réponse T gamma delta : émergence d'un nouvel acteur.....	53
2.12 Un équilibre entre contrôle immunologique et évasion immunitaire	59
2.13 Effets indirects de l'infection à Cytomégalovirus.....	61
2.14 Comment suivre la réponse immunologique anti-CMV du patient transplanté ? ...	63
ARTICLES GENERES AU COURS DE LA THESE.....	68
Article 1 : Long-term expansion of effector/memory V δ 2 ^{neg} gamma delta T cells is a specific blood signature of CMV infection	68
Article 2 : Common Features of gamma delta T Cells and CD8+ alpha beta T Cells Responding to Human Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients	78
Article 3 : Recognition of Tumor-specific T Cell Receptor Antigenic Ligands by Cytomegalovirus-induced V δ 2 ^{neg} $\gamma\delta$ T Cells	89
Article 4 : A new CD16-dependent anti-cytomegalovirus function of gamma delta T cells	118
Article 5 : Cytomegalovirus-Induced gamma delta T Cells Associate with Reduced Cancer Risk after Kidney Transplantation	155
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES.....	164
BIBLIOGRAPHIE	167
CURRICULUM VITAE	191

ABBREVIATIONS

Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)

Antigène leucocytaire cutané (CLA)

Cellules Natural Killer (NK)

Cytomégalovirus (CMV),

Epstein Barr Virus (EBV)

Herpes simplex virus (HSV) -1 ou -2

Herpès Virus Humain numéro 8 (HHV8),

Insulin-like growth factor (IGF-1)

Interleukine (IL)

Lymphocytes T gamma delta V δ 1, V δ 3 et/ou V δ 5 (Lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg})

Lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Phytohémagglutinine (PHA)

Recombination activating gene 1 (RAG1)

Récepteur à l'antigène ou T-Cell Receptor (TCR)

Toll-like Receptor (TLR)

Tumor Growth Factor-beta1 (TGF-beta1)

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

Virus de l'Hépatite C (VHC),

Virus de la Varicelle et du Zona (VZV),

Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH),

RESUME

Le cytomégalovirus (CMV) est l'agent responsable de l'infection opportuniste la plus fréquemment rencontré en transplantation d'organe. Chez les receveurs séronégatifs qui reçoivent un rein provenant d'un donneur séropositif, 50 % de ces patients peuvent développer une virémie, et 30 % une maladie. A court terme, malgré les traitements anti-viraux, elle est responsable d'une morbidité non négligeable. A long terme, le CMV est associé à une augmentation de la fréquence des sténoses artérielles, plus d'infections associées, plus de rejet aigu, plus de lésions de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire, une moins bonne survie des greffons et des patients. La cohabitation et la coévolution du CMV depuis des milliers d'années ont aboutie à un état d'équilibre entre le virus et l'homme. Le virus s'est profondément adapté à son hôte afin d'échapper à la réponse immune. En réponse à cela, la réponse immunitaire anti-CMV occupe une part importante, unique et majeure au sein de la réponse immune de l'hôte. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV représentent par exemple 10.2% des lymphocytes T CD8+ mémoires. Avec l'âge, ils s'accumulent et peuvent représenter jusqu'à 30% du pool total de lymphocyte T CD8+. Le système immunitaire sous la contrainte du virus s'est donc re façonné de façon à garder le contrôle du virus. Depuis 1999, un nouvel acteur de cette réponse immunitaire a été identifié : les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}. Ces cellules sont impliquées habituellement dans la lutte contre les différents stress d'origine microbien et non microbien (tumeur). Elles interviennent plutôt localement (dans les épithéliums) par différents mécanismes et sont désormais considérées comme des effecteurs intermédiaires entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Leur expansion dans le sang est associée à la guérison de la maladie et à la résolution de l'infection à CMV. Elles ont par ailleurs in vitro une réactivité croisée contre des cellules infectées par le CMV et des cellules tumorales. Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} sont donc une représentation supplémentaire de l'énorme impact du CMV sur le système immunitaire de l'hôte. Dans ce travail, nous avons pu étendre et approfondir leur rôle en transplantation d'organe. Nous avons tout d'abord décrit que les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} avaient un phénotype et une cinétique d'expansion exactement superposable aux lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV in vivo. Nous avons ensuite observé que l'expansion des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits pas l'infection à CMV s'associait à une survenue moindre de cancer à long terme chez les patients transplantés rénaux. Nous avons pu montrer que leur activation était sous la dépendance d'une interaction entre leur TCR et un ligand. Enfin, une autre voie d'activation dépendante du CD16, faisant intervenir les complexes immuns CMV-IgG anti-CMV a aussi été identifiée. Nos travaux depuis 10 ans ont donc démontré que les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} occupaient une place majeure dans la réponse immune anti-CMV au même titre que les lymphocytes T CD8+. L'intégration de ces cellules à l'immunologie anti-CMV devrait permettre de mieux comprendre certains effets indirects induits par le virus, et pourrait être utile dans le suivi de la réponse immune anti-CMV en transplantation d'organe. L'identification de leur ligand pourrait permettre enfin de tester assez rapidement de nouveaux protocoles d'immunothérapie préventifs ou curatifs visant à activer ces cellules afin de stimuler l'immunité anti-virale ou anti-tumorale des individus.

PREAMBULE

Dans le but de rendre la lecture de ce travail un peu moins austère, nous nous sommes permis de prendre quelques libertés avec le format habituellement consacré à ce type d'exercice. La section « Introduction » devient donc une revue sur les lymphocytes T gamma delta dans le contexte de la transplantation d'organe. Les travaux produits au cours de cette thèse y ont été insérés avec à chaque fois un renvoi à chaque article. Les sections « Matériels et Méthodes », « Résultats » et « Discussion » fusionnent pour regrouper l'ensemble des articles acceptés ou soumis, générés au cours de cette thèse. Nous espérons que cette approche conviendra au lecteur et au juge. Il nous a semblé que ce format moins académique servirait un peu mieux le contenu scientifique de ce travail.

INTRODUCTION : PLACE DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA DANS LE CONTEXTE DE LA TRANSPLANTATION D'ORGANE

Depuis 1959 et les premières transplantations allogéniques réussies entre jumeaux non identiques à Boston (Murray, Merrill et Harrison) et à l'Hôpital Necker (Vaysse, Auvert, Chevrier et Hamburger) (Lacombe, 2002), la compréhension du système immunitaire et la connaissance de l'activation des lymphocytes T ont considérablement évoluées, grâce à ce modèle expérimental humain. La situation est maintenant inversée puisque c'est désormais la transplantation d'organe qui bénéficie des progrès de l'immunologie. Grâce à cela, la transplantation rénale représente à ce jour le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale (Wolfe et al., 1999). Pourtant, l'introduction d'alloantigènes dans un organisme a pour conséquence une stimulation massive du système immunitaire de l'hôte. Cette réponse allogénique mobilise en effet près de 10% du répertoire T alpha beta afin d'éliminer les cellules et l'organe transplanté (Whitelegg and Barber, 2004). Un traitement immunosuppresseur est donc nécessaire et indispensable afin de minimiser, ralentir et parfois même éviter le rejet d'un organe transplanté. Seuls quelques patients que l'on qualifie de « tolérants opérationnels » gardent un greffon parfaitement fonctionnel en l'absence de toute prise médicamenteuse. Pour les autres en revanche (c'est à dire la très grande majorité), le maintien d'un traitement immunosuppresseur est indispensable tout le long de la durée de vie du greffon. Ce traitement au long cours engendre deux grands types de complications : Une augmentation de l'incidence des infections et des néoplasies.

Le risque infectieux en transplantation d'organe évolue avec le temps. Ce risque est difficilement quantifiable, car aucun test ne permet à ce jour de l'évaluer. Il dépend du niveau de risque de rejet du patient, du délai de greffe, de l'intensité de l'immunosuppression, de l'environnement du patient et de ses antécédents infectieux. On classe ce risque infectieux en quatre grandes catégories: Les infections transmises par le donneur, les infections par réactivation, les infections nosocomiales et les infections communautaires. Les principales infections en post-transplantation sont listées dans la **Figure 1** (Fishman, 2007). Parmi ces infections, celle secondaire au cytomégalovirus (CMV) occupe une place à part. Elle peut être transmise par le donneur ou être la conséquence d'une réactivation du virus endogène. Elle est surtout très fréquente notamment chez les receveurs séronégatifs qui reçoivent un organe provenant d'un donneur séropositif, où même après un traitement préventif, 50 % de ces patients peuvent développer une virémie, et 30 % une maladie (Paya et al., 2004). A court terme, malgré les traitements anti-viraux, elle est responsable d'une morbidité non négligeable. A long terme, la maladie à CMV est associée à une moins bonne survie des greffons et des patients par le biais d'effets indirects responsables d'une sur immunosuppression, d'une inflammation et d'une activation des cellules endothéliales (Freeman, 2009).

L'incidence des cancers après transplantation d'organes est globalement estimée entre 2 et 30%, bien que le manque de recul de la plupart des études sous-estime ces chiffres. Quand on le compare à la population générale, le risque de cancer de novo est multiplié par 5 chez le transplanté. Plus préoccupant, le cancer est dans certaines régions du monde (en particulier en Océanie) au premier rang des causes de décès chez les transplantés rénaux (Registre ANZDATA 2006) (**Figure 2**) (Dantal and Pohanka, 2007).

En résumé, dans le contexte de la transplantation d'organe, une nouvelle homéostasie immunologique apparaît entre « réponse allogénique » et « pression continue d'une immunosuppression médicamenteuse ». L'émergence de la relation hôte-greffon redéfinie

ainsi dans le même temps les relations hôtes-pathogènes et hôtes-tumeurs dans un univers distinct de l'univers physiologique. Le rôle de certaines sous-populations lymphocytaires, habituellement minoritaires dans le sang périphérique et méconnues, il y a encore quelques années, est apparu. L'intérêt s'accroît désormais autour des acteurs moins classiques, moins fréquents et moins conventionnels du système immunitaire comme les cellules NK, NKT ou les cellules T régulatrices. Dans ce contexte les lymphocytes T gamma delta ont été longtemps négligés car ils n'étaient pas alloréactifs. Il s'agit cependant d'un acteur intéressant car polyréactif, et peut-être moins sensible à l'immunosuppression. L'histoire de ces cellules remonte à 1984, date à laquelle la chaîne gamma a été identifiée génétiquement sous la forme d'un gène réarrangé dans un clone T alpha Beta (Saito et al., 1984). Le locus delta a ensuite été identifié à l'intérieur du locus alpha (Chien et al., 1987). Initialement considérée comme un acteur de la réponse immunitaire innée, cette sous-population lymphocytaire T gamma delta est impliquée dans la lutte contre les différents stress d'origine microbien et non microbien (Hayday, 2009). Ces cellules interviennent localement par différents mécanismes et sont désormais considérées comme des effecteurs intermédiaires entre l'immunité innée et l'immunité adaptative dont elles partagent certaines caractéristiques. Probablement parce qu'elles sont moins nombreuses et donc moins « visibles », ces cellules T gamma delta sont beaucoup moins étudiées que les lymphocytes T alpha beta. Pourtant, dans toutes les espèces, les lymphocytes gamma delta sont les premières cellules T à se développer dans le thymus (Hayday, 2000). Leur rôle, leur fonction et leur importance en transplantation d'organe sont en train d'être clarifiés. L'introduction qui va suivre va essayer de relocaliser leur action contre le cytomégalo virus et contre les tumeurs dans ce contexte si particulier.

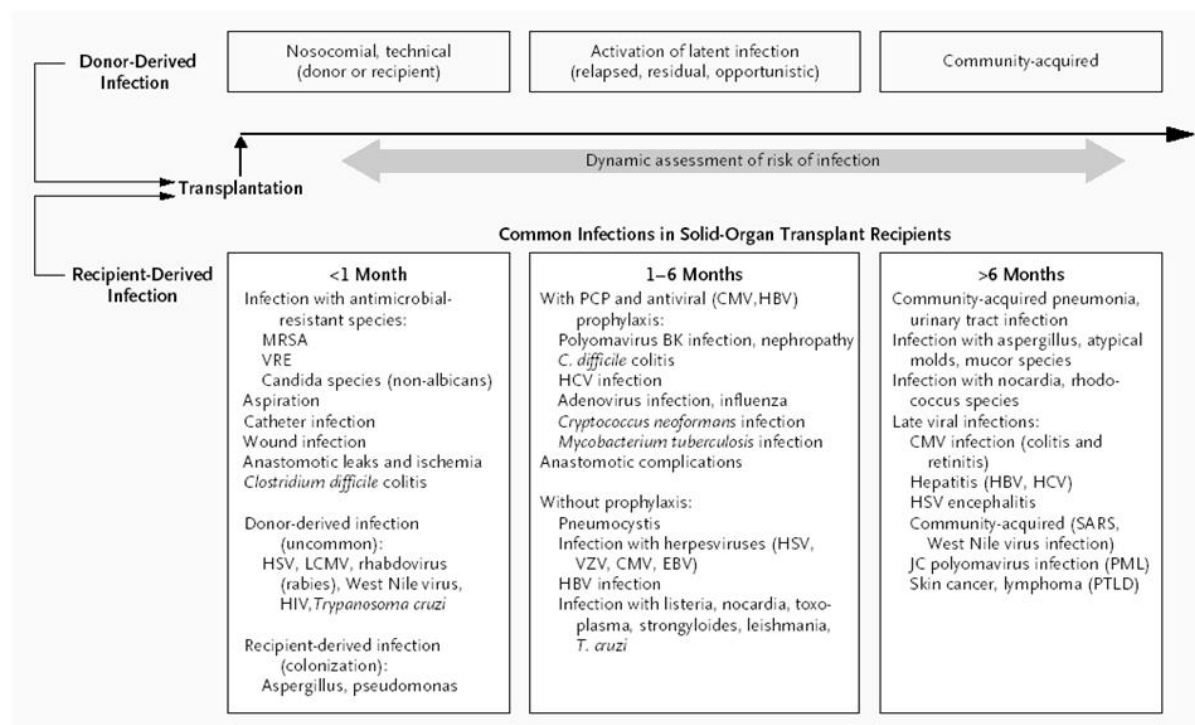


Figure 1 : Risque infectieux en Transplantation d'organe au cours du temps (Fishman, 2007).

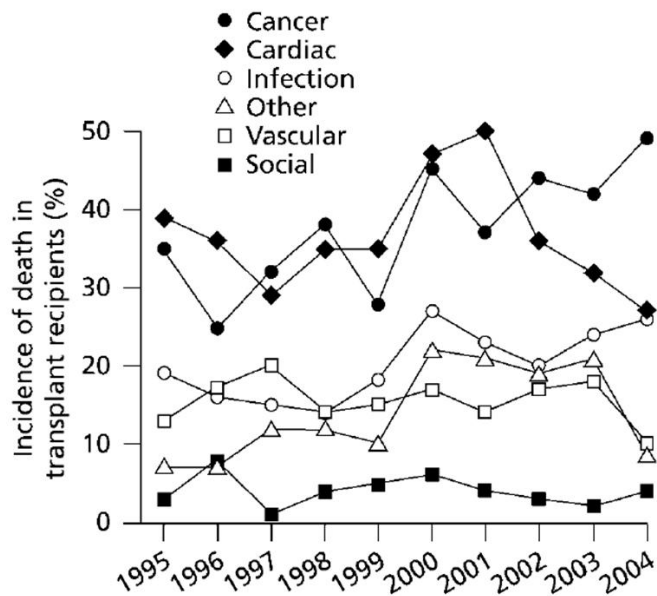


Figure 2 : Incidence et causes de décès des patients transplantés rénaux en Océanie (Registre ANZDATA) (Dantal and Pohanka, 2007).

1. Le Lymphocyte T gamma delta Vδ2^{neg} en Physiologie Humaine: Un Acteur Multifonctionnel

1.1 Génétique et Structure de leur récepteur à l'antigène

Le TCR gamma delta comprend une chaîne gamma (γ) et une chaîne delta (δ) qui s'assemblent en un récepteur hétérodimérique comprenant 2 chaînes polypeptidiques contenant chacune 2 domaines Ig-like (caractéristique des immunoglobulines) avec un domaine amino-terminal (NH₂) V et un domaine carboxyterminal (COOH) C (Allison et al., 2001). Les protéines constituant ces chaînes sont codées par des gènes réarrangés au niveau somatique à partir d'un pool de segments variables (V), de diversité (D), de jonction (J) et constant (C), lors de la maturation intrathymique des cellules T. Les gènes codant pour la chaîne δ du TCR s'assemblent via un réarrangement V-D-J alors que ceux codant pour la chaîne γ s'assemblent via un réarrangement V-J (Brenner et al., 1988), (Cai and Tucker, 2001). Chez l'homme, la famille de gènes codant pour la chaîne γ (environ 160kb) est située sur le chromosome 7. Au niveau de ce locus, γ il a été décrit 14 gènes variables (V) dont 6 sont fonctionnels (V γ 2, 3, 4, 5, 8 de la famille V γ 1 et V γ 9 de la famille V γ 2), 5 éléments jonctionnels (JP1, JP, J1, JP2 et J2) et enfin 2 gènes codant pour la région constante (C γ 1 et C γ 2) (Lefranc and Rabbitts, 1990). Le locus δ (1000kb) est situé sur le chromosome 14, à l'intérieur du locus codant pour la chaîne α du TCR alpha beta, entre des segments V α et J α . Il contient 8 segments variables dont 5 peuvent potentiellement se réarranger avec la région constante α , 4 éléments de jonctions J (TCRDJ 1 à 4), 3 segments de diversité D (TCRD 1 à 3) et une unique région constante C (TCRDC).

La structure de la chaîne delta du TCR définit deux types de sous-population gamma delta. Une sous-population qui exprime la chaîne chaîne Vδ2 et une autre qui exprime les chaînes Vδ1, Vδ3 et Vδ5 (ou Vδ2^{neg}). Ces deux sous-populations ont non seulement des localisations différentes, mais aussi des ligands, et des fonctions bien distinctes. **Cette revue s'intéressera plus particulièrement aux populations T gamma delta qui expriment les chaînes Vδ1, Vδ3 et Vδ5 (c'est-à-dire Vδ2^{neg}), car ce sont ces sous-populations qui ont un rôle potentiel en transplantation d'organe.**

Les TCR des lymphocytes T gamma delta sont générés en utilisant moins de régions V, que les TCR alpha beta et que la plupart des immunoglobulines. Cela limite la diversité combinatoire des TCR gamma delta. En effet, la diversité calculée générée par la combinaison des régions V est approximativement de 70 pour les lymphocytes T gamma delta, 2500 pour les lymphocytes T alpha beta et 10^4 - 10^5 pour les immunoglobulines (Chien and Konigshofer, 2007). Dans l'évolution des espèces, il est généralement accepté que la multiplicité des gènes V confère des avantages au système immunitaire. Cependant, le problème est peu plus complexe. En effet, les sites de reconnaissances des antigènes sont portés par des régions appelées *complementarity-determining region* (CDR). Alors que les régions CDR1 et CDR2 sont codées par des segments de gènes V, la région CDR3 est codée par une recombinaison V-(D)-J. La chaîne δ a la plus grosse diversité potentielle de sa région CDR3 (approximativement 10^{16} combinaisons), parmi tous les récepteurs à l'antigène, car de nombreux segments de gènes D peuvent se joindre ensemble, tous les segments de gènes D peuvent être lus, et des mécanismes d'excisions et d'additions aléatoires de nucléotides au niveau des régions jonctionnelles sont possibles lors des réarrangements géniques V, D et J. Malgré la diversité limitée de la recombinaison des segments V-J de la chaîne γ du TCR (approximativement 10^2 combinaisons), la diversité potentielle générée par les recombinaisons aux jonctions des CDR3 des TCR gamma delta (approximativement 10^{18} combinaisons) est encore plus importante que celle des lymphocytes T alpha beta et des

immunoglobulines. Sur ces bases là, les TCR gamma delta ne seraient finalement pas désavantagés dans leur potentiel à reconnaître une grande variété d'antigènes. Cependant, on peut aussi penser que la plus grande partie de la diversité des TCR gamma delta ne servirait pas à reconnaître d'innombrables antigènes avec une même affinité, mais au contraire, peu d'antigènes avec d'innombrables niveaux d'affinité (Chien and Konigshofer, 2007).

1.2 Localisation

A la fin des années 80, l'apparition des anticorps dirigés contre le TCR gamma delta a permis à plusieurs équipes d'analyser la distribution tissulaire chez l'homme des lymphocytes T gamma delta en utilisant des techniques d'immuno-histochimie et de cytométrie en flux (Falini et al., 1989), (Groh et al., 1989), (Bucy et al., 1989). La fréquence respective de ces cellules dans les différents organes est résumée dans le **tableau 1**.

Dans le sang, elles représentent en moyenne 10% des cellules mononuclées, et sont principalement composées de la sous-population exprimant la chaîne V δ 2 (Groh et al., 1989).

Dans le thymus, les cellules T gamma delta sont principalement localisées dans la zone médullaire et à la jonction cortico-médullaire et sont principalement composées de la sous-population exprimant la chaîne V δ 1 (65% des cellules gamma delta) (Lanier et al., 1988). Dans les amygdales, on les retrouve dans la zone interfolliculaire où elles ont souvent l'aspect de cellules dendritiques. Elles sont principalement composées de la sous-population exprimant la chaîne V δ 2 (Falini et al., 1989). Dans la rate, on les retrouve en grand nombre dans la pulpe rouge (Bordessoule et al., 1990). Elles sont principalement composées de la sous-population exprimant la chaîne V δ 1 (70%).

Les analyses phénotypiques du foie normal montrent que les lymphocytes T gamma delta sont principalement localisés au sein des espaces portes (portal tracts) et dans le parenchyme et qu'ils expriment la chaîne V δ 2 associée à la chaîne V γ 9 (Seki et al., 1990), (Hata et al., 1990), (Norris et al., 1998).

Dans la peau humaine normale, les lymphocytes T gamma delta sont dispersés dans l'épiderme au niveau de la couche basale de keratinocytes ainsi que dans le derme (Groh et al., 1989), (Alaibac et al., 1992). Ils représentent 7 à 9 % des cellules T CD3+ du derme papillaire et 18 à 29% des lymphocytes T CD3+ de l'épiderme (Bos et al., 1990). Leur TCR est composé de la chaîne V δ 1 (Ebert et al., 2006). Comme très peu de cellules T sont observées dans l'épiderme (moins de 5% des lymphocytes T de la peau humaine normale), il n'y a finalement que de très rares et éparses lymphocytes T gamma delta présents dans la peau humaine normale. Il faut noter que cette situation est très différente de celle observée chez la souris, où il existe au niveau de l'épiderme une quantité significative de lymphocyte T V γ 5V δ 1, appelés cellules T dendritiques épidermiques (DECT) (Jameson and Havran, 2007).

Dans le tube digestif, ces cellules sont retrouvées au sein des épithéliums près de la membrane basale et à l'intérieur de la lamina propria. Une large fraction des lymphocytes intra-épithéliaux sont effectivement des lymphocytes T gamma delta (37%), alors qu'ils sont plus minoritaire dans la lamina propria (4.6%). Ceci démontre une accumulation sélective des cellules T gamma delta au sein de l'épithélium du gros intestin chez l'homme (Deusch et al., 1991), (Ullrich et al., 1990), (Jarry et al., 1990). Comme dans la peau, leur TCR est composé le plus souvent de la chaîne V δ 1 (Deusch et al., 1991), (Maeurer et al., 1996). Cependant, environ 18% des lymphocytes T gamma delta intestinaux intra-épithéliaux ont un TCR exprimant la chaîne V δ 3 (Peyrat et al., 1995). Il est probable que ces lymphocytes T ayant un TCR composés des chaînes V δ 1 ou V δ 3 soient spécialisés pour reconnaître des antigènes

spécifiquement exprimés dans les épithéliums. Le répertoire de ces lymphocytes T gamma delta intestinaux exprimant la chaîne Vδ1 est compartimentalisé. Il apparaît différent du répertoire des lymphocytes T gamma delta du sang périphérique exprimant la chaîne Vδ1 (Chowers et al., 1994), (Holtmeier et al., 1995). Ceci est un argument fort pour penser que dans le sang, la population T gamma delta Vδ1 a une fonction différente de la population observée dans la muqueuse digestive. La distribution et le nombre de cellules T gamma delta dans les plaques de Peyer sont identiques à celles retrouvés dans les ganglions et les amygdales.

Dans le tissu gingival normal, les cellules T gamma delta exprimant la chaîne Vδ1 représentent aussi environ 30% des leucocytes isolés et sont localisées à proximité des nombreuses cellules de langerhans et des kératinocytes qui expriment une molécule appartenant à la famille des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, le CD1 (Lundqvist and Hammarstrom, 1993).

Dans tous ces tissus, les cellules T gamma delta ne sont pas présentes en grande quantité. Elles apparaissent dispersées souvent isolées ou en petit groupe de deux à cinq cellules. La présence de ces cellules au sein des épithéliums gingivaux et digestifs suggère qu'ils constituent une première ligne de défense contre les pathogènes potentiels qui pénètrent la cavité buccale puis la lumière digestive.

Tableau 1 : Localisation des lymphocytes T gamma delta chez l'homme en dehors des situations pathologiques.

	Fallini	Groh	Bucy	Bordessoule	Deusch	Ulrich	Jarry	Norris	Hata	Bos
	γδ	γδ	γδ	γδ	γδ (Vδ1)	γδ	γδ	γδ	γδ	γδ
	Per CD3	Per CD3	per CD3	per CD3	per IEL	per CD3	per IEL	per CD3	per LIL	per CD3
PBL	9%	0.5-16.3%	7%							
Thymus cortex	0.5%	Few								
Thymus medulla	0.8-2%	0.5-16%								
Tonsil	3.1%	1-15%								
Spleen	22.7%	0.5-15%	15%	6-22%						
Gut	6%	1-15%	5-10%		Epith: 37% LPL: 4.6%	Epith: 39% LPL: 3%	13%			
Skin	Occasional	1-15%	Rare							Epid: 18-29% Dermis: 7-9%
Liver	Occasional							13%	4.4%	
Kidney	Occasional									
Lung		No cells								

Epid: epidermis, Epith: Epithelium, IEL: intra epithelial lymphocytes, LIL: liver infiltrating lymphocytes, LPL: lamina propria lymphocytes

1.3 Ontogénie des lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg}

L'équipe de Roederer à Stanford, grâce à des techniques de cytométrie en flux, a pu analyser l'évolution quantitative et phénotypique (naïf versus mémoire) des lymphocytes T gamma delta Vδ1 du sang chez l'homme (De Rosa et al., 2004). Ils ont confirmé que les lymphocytes T gamma delta Vδ1 au cours de la période fœtale et au début de la vie était plus nombreux que les lymphocytes T gamma delta Vδ2, cette situation étant totalement inversée ensuite chez l'adulte (**Figure 3A**). Par ailleurs, ces cellules sont caractérisées par un phénotype naïf (CD45RO^{neg} CD27^{bright} CD11a^{dull}) en début de vie juste après la période

foetale, exprimé par environ 80% de la sous-population V δ 1. Après les deux premières années de vie, pendant que le nombre de ces cellules diminue de façon importante dans le sang périphérique, la moitié d'entre elles perdent leur phénotype et seulement 40% de ces cellules en moyenne restent naïves. Cependant il existe une grande variabilité du pourcentage de cellules naïves entre les nourrissons qui pourrait être expliqué par un stimulus extérieur rencontré par une partie seulement de ces jeunes enfants (**Figure 3B et 3C**). Après 20 ans tandis que la valeur absolue des lymphocytes T gamma delta V δ 1 augmente dans le sang périphérique, il existe une nouvelle diminution significative et progressive du pourcentage moyen de lymphocytes T gamma delta V δ 1 naïfs (environ 10%), ce qui une nouvelle fois est en faveur d'une stimulation massive de cette sous-population à la fin de l'adolescence par un ou plusieurs facteurs environnementaux. A ce stade il est assez intrigant de noter que les deux pics d'infection à CMV interviennent à 0-2 ans et 14-18 ans (Kuijpers et al., 2003). Les lymphocytes T gamma delta V δ 1 effecteurs générés au cours de cette évolution produisent de l'interféron- γ et produisent massivement la perforine en réponse à une stimulation polyclonale. Cette évolution est très proche de celle observée chez les lymphocytes T alpha beta CD8+ (**Figure 3**). Elle est en revanche très différente de celle des lymphocytes T gamma delta V δ 2 qui dès la naissance (c'est-à-dire avant toute exposition à l'environnement) puis au cours des deux premières années de vie perdent quasiment tous leur phénotype naïf. Ceci suggère une stimulation de ces cellules par des antigènes du soi in utéro puis une activation par des antigènes environnementaux très répandus pendant la petite enfance.

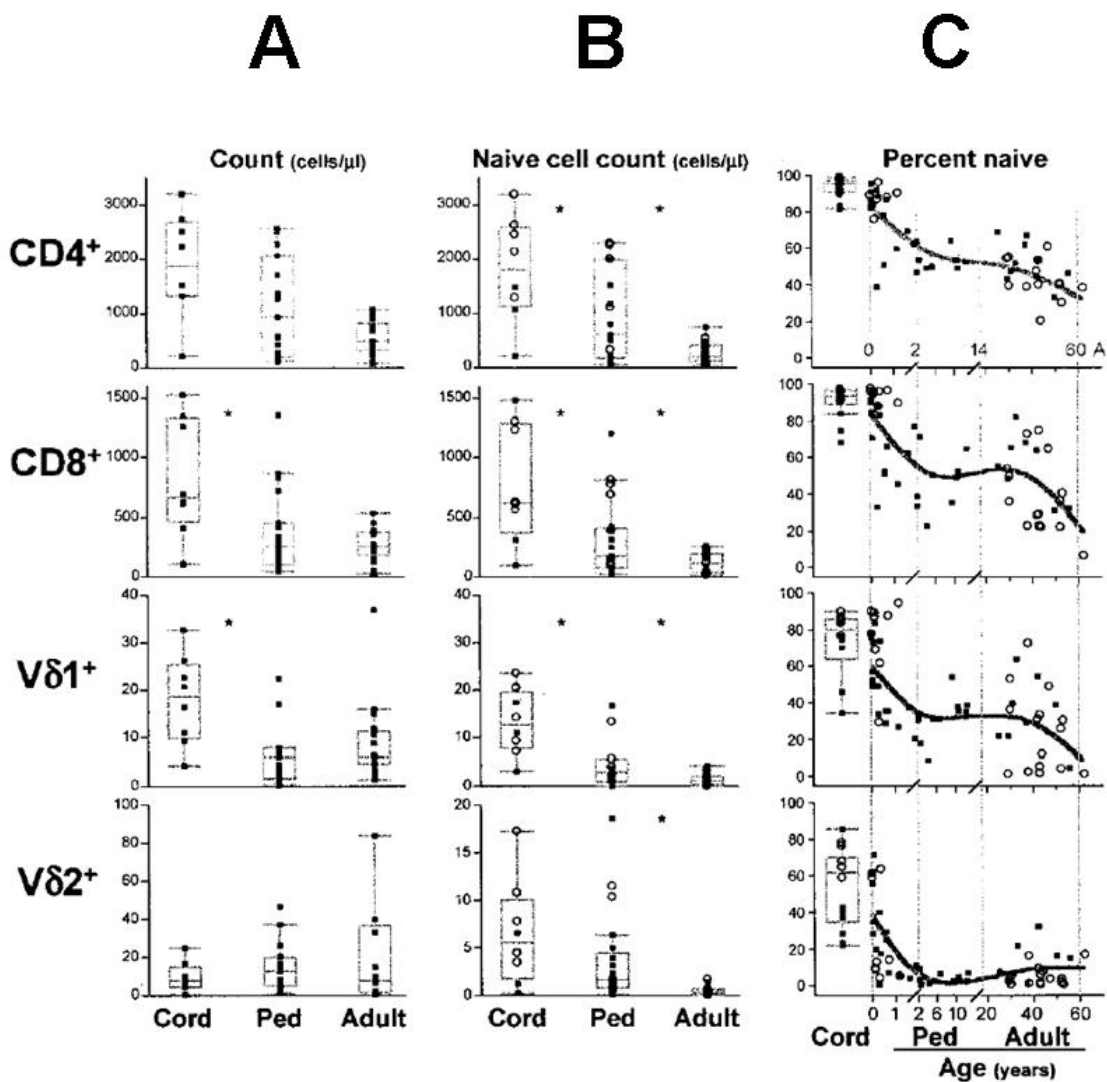


Figure 3 : Evolution du phénotype naïf des sous-populations lymphocytaires T chez l'homme (d'après (De Rosa et al., 2004)). The percentages and absolute counts of alpha beta and gamma delta T cells that are naive drop early in life. Data for CD4 (*upper row*), CD8 (*second row*), Vdelta1 (*third row*), and Vdelta2 (*lower row*) T cells are shown. Subsets have been gated as CD3+, EMA+ (live), scatter-gated lymphocytes. Naive cells have been additionally gated by two markers in some subjects (CD45RO- CD11a^{dull}, squares), or by three markers in other subjects (CD45RO- CD11a^{dull}, CD27^{bright}, Round). The absolute counts for the overall subset (*left panels*) and the naive subsets (*middle*) are plotted for the cord, pediatric, and adult blood samples. Absolute counts have been calculated by multiplying the subset frequency relative to lymphocytes by the absolute lymphocyte count determined from the complete blood count. An asterisk indicates a significant difference ($p=0.05$) between adjacent groups. The graphs on the *right* indicate the percentage of cells within the indicated subset that is naive plotted vs age. The age axis is displayed with three scales (0–2, 2–14, above 14 years) so that the infant and pediatric scales are expanded. The percentage of cord blood cells that are naive is grouped on the *left side* in these graphs.

1.4 Place des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} dans la réponse immune : Le concept de la réponse lymphocytaire aux antigènes de stress.

Une question intrigante reste pour l'instant sans réponse : pourquoi le système immunitaire a-t-il choisi de maintenir deux types différents de TCR au cours de l'évolution puisqu'en termes de fonction effectrice, il n'y a pas de différences majeures entre les lymphocytes T alpha beta et gamma delta ?

La réponse immunitaire conventionnelle mise en œuvre contre un agent infectieux fait intervenir en premier lieu des acteurs de l'immunité innée (cellules dendritiques, monocytes et macrophages) qui vont stimuler et mobiliser ensuite des lymphocytes T alpha beta spécifique des antigènes infectieux. Dans ce modèle d'activation, les cellules dendritiques sont la charnière entre immunité innée et immunité acquise. Elles sont postées dans la plupart des organes et agissent comme des sentinelles capables de détecter les signaux de dangers. Après avoir capturé les antigènes protéiques microbiens ou tumoraux par leurs récepteurs spécifiques, elles ont la capacité de les présenter sous forme de petits peptides au sein de leur molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, de stimuler et de faire proliférer des cellules T naïves spécifiques de ces antigènes. Cela permet de générer des cellules effectrices et un pool de cellules mémoires capables de répondre plus rapidement et plus efficacement à une nouvelle stimulation (Coquerelle and Moser, 2010). Ce mécanisme très efficace qui a pour finalité de générer des lymphocytes T alpha beta spécifique d'antigène peptidique (**Figure 4**, « *conventional myeloid cell-mediated response* ») est extrêmement performant pour éradiquer la plupart des pathogènes, mais sa mise en œuvre nécessite du temps (Hayday, 2009).

Une cellule « stressée », c'est-à-dire transformée ou bien infectée subit un certain nombre de modification. Ses modifications phénotypiques ne sont pas toujours perçues comme des signaux de danger par les cellules dendritiques et d'autres systèmes doivent être initiés rapidement pour éliminer ces cellules. Chez la souris, par exemple, certaines molécules de stress comme la molécule RAE-1 ont été identifiées. Elles sont surexprimées à la surface des cellules tumorales, infectées ou dans une situation d'inflammation (Girardi et al., 2001). Elles peuvent être reconnues par les lymphocytes T gamma delta qui ont ensuite la capacité d'initier très rapidement une réponse immunitaire effectrice face à ces signaux de stress membranaire, sans passer par les phases d'expansion clonale et de différenciation (**Figure 4**,

« *Lymphoid stress-surveillance response* ») (Strid et al., 2008). Bien qu'incapable d'éradiquer complètement et à eux seuls les cellules stressées tumorales ou infectées, les lymphocytes T gamma delta peuvent en limiter la dissémination, et maintenir l'intégrité tissulaire faisant ainsi un lien entre l'immunité innée et la mise en place de l'immunité adaptative (Hayday, 2009). Les fonctions effectrices de cette réponse lymphocytaire de type Th1 contre des antigènes de stress sera développé dans le chapitre suivant. D'autres fonctions ont été décrites, comme les lymphocytes T gamma delta régulateurs (Peng et al., 2007), (Bhagat et al., 2008) ou Th17 (Shibata et al., 2008), (Hamada et al., 2008b), (Hamada et al., 2008a).

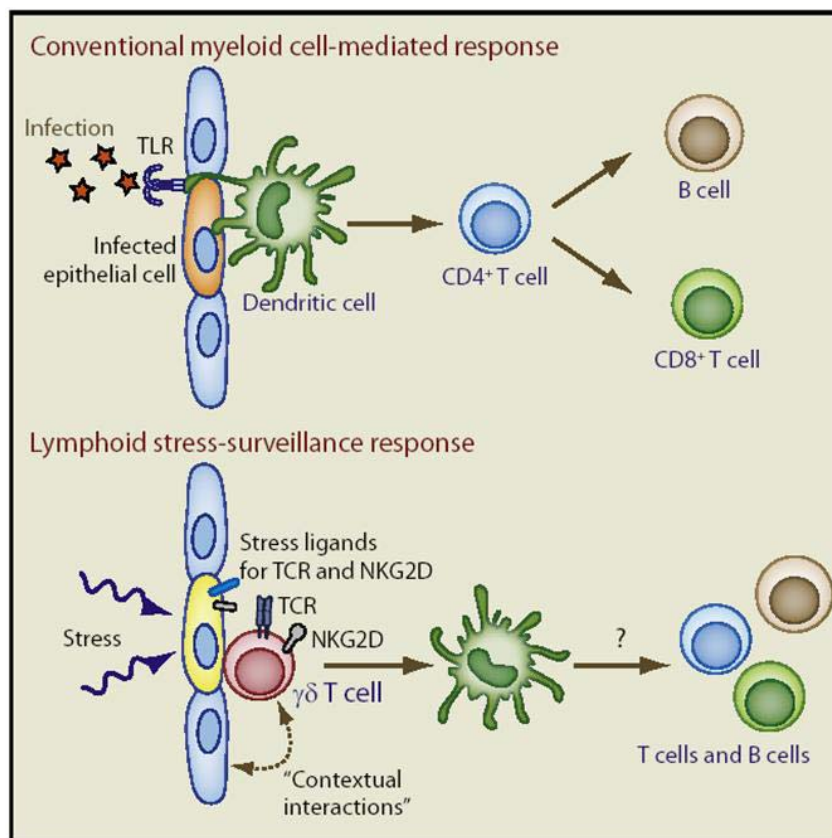


Figure 4: Tissue Stress Surveillance (Hayday, 2009).

(Top) Conventional, microbe-initiated activation of the local, myeloid cell-mediated innate response and its communication of information to the adaptive T and B cell compartments. (Bottom) The lymphoid stress-surveillance response is initiated by many forms of nonmicrobial as well as microbial stress that upregulate surface expression of ligands for TCR gamma delta or for NKG2D, to which the T cells are competent to respond because of other receptor-ligand “context interactions”. The question mark denotes that the full scope of this stress-surveillance response has yet to be determined.

Bien que le modèle proposé par A Hayday fasse jouer un rôle relativement direct aux lymphocytes T gamma delta face à leurs cibles, des interactions entre cellules dendritiques et lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{\text{neg}}$ ont cependant été décrites. En effet, quelques lignées de lymphocytes T gamma delta $V\delta 1$ prolifèrent au contact de cellules dendritiques exprimant le CD1c, grâce à une interaction spécifique entre le TCR gamma delta et la molécule CD1c. Ceci a été démontré grâce à des expériences de transfert de TCR, permettant ainsi d'identifier un des deux ligands connus du TCR gamma delta $V\delta 1$ (Spada et al., 2000). Les molécules CD1 sont des molécules non-polymorphiques proches des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Cinq molécules différentes sont connues (a, b, c, d, e) et sont codées par des gènes localisés sur le chromosome 1. Ces molécules sont présentes à la surfaces des thymocytes, des cellules de Langerhans, des cellules dendritiques, des cellules

interdigitées, des lymphocytes, des histiocytes et dans certains épithéliums (Strominger, 2010). Elles sont impliquées habituellement dans la présentation d'antigènes lipidiques et glycolipidiques aux cellules NKT (Spada et al., 1998). L'activation et la prolifération des quelques lignées de lymphocytes T gamma delta V δ 1 n'est en revanche pas sous la dépendance d'un lipide exogène, et dépend donc soit de la molécule CD1c seule soit du CD1c chargé avec un peptide du soi (Spada et al., 2000). Cette interaction CD1c-TCR est probablement sous la contrainte de mécanismes de régulation pour l'instant méconnus mais indispensables, afin d'éviter la mise en place d'une réaction auto-immune. Le CD1c n'est pas la seule molécule CD1 à pouvoir activer les lymphocytes T gamma delta V δ 1. L'inhibition de la prolifération de lymphocytes T gamma delta V δ 1 intra-épithéliaux (duodénum) au contact de cellules dendritiques autologues stimulées par des antigènes phospholipidiques naturels ou synthétiques, peut être obtenue avec des anticorps anti-CD1a, CD1c, CD1d et anti-gamma delta. Cela suggère une interaction entre le TCR gamma delta et le CD1, cette fois-ci dépendante d'antigènes lipidiques exogènes (pollen et soja), qui pourraient intervenir dans des réactions allergiques (Russano et al., 2007).

L'interaction entre le CD1 et le TCR gamma delta n'est pas formellement démontré par des expériences de transfert de TCR, à l'exception de l'interaction CD1c-TCR (Spada et al., 2000). Par ailleurs ce phénomène n'a été observé qu'avec seulement quelques lignées lymphocytaire T gamma delta. La finalité de cette interaction reste aussi à déterminer, car sa relevance physiologique n'est pas claire. Deux hypothèses opposées peuvent cependant être élaborées : 1/ Les lymphocytes gamma delta pourraient jouer un rôle de régulation positive sur la maturation des cellules dendritiques, permettant d'amplifier et de maintenir une réponse immunitaire adaptative. En effet, les lymphocytes T gamma delta V δ 1 activés par des cellules dendritiques immatures via une interaction CD1c-TCR produisent du TNF- α . Sous l'effet du TNF- α , les cellules dendritiques mûrissent, produisent de l'IL-12 et deviennent capables d'activer des cellules T naïves CD4+ en les orientant sur un profil Th1 (Leslie et al., 2002). 2 / Les lymphocytes gamma delta pourraient à l'inverse jouer un rôle de régulation négative sur les cellules dendritiques et bloquer la mise en place d'une réponse adaptative. Des lignées et des clones de lymphocytes T gamma delta V δ 1 issu du duodénum produisent de l'interféron- γ et peuvent exercer une cytotoxicité dépendante de Fas et de la perforine contre des cellules dendritiques exprimant le CD1c (Spada et al., 2000), (Russano et al., 2007).

1.5 Fonctions effectrices antivirales et anti-tumorales des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}

Bien que leur activation et leur implication aient été observées dans certaines infections bactériennes comme la lèpre (Modlin et al., 1989), (Uyemura et al., 1991) la maladie de Lyme avec *Borrelia Burgdorferi* (Collins et al., 2005), (Collins et al., 2008) ou bien des maladies auto-immunes comme la maladie de Crohn (Giacomelli et al., 1994), (Soderstrom et al., 1996), la sclérodermie (Giacomelli et al., 1998), les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} retiennent surtout l'attention pour leurs fonctions antivirales et anti-tumorales.

1.5.1 Fonctions antivirales des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}

Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} sont impliqués dans la réponse immunologique contre deux herpes virus (virus à ADN) : le Cytomégalo virus (CMV) et l'Herpès Virus Humain numéro 8 (HHV8) et deux virus à ARN (le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et le Virus de l'Hépatite C (VHC)).

Lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} et CMV

Notre groupe a observé sur une grosse cohorte de sujets sains (n=186) que les sujets séropositifs pour le CMV ont dans le sang périphérique (ainsi que dans la rate, site de réplication important du virus – données personnelles non publiées) plus de lymphocytes T gamma delta V δ 1 et V δ 3 que les sujets séronégatifs (Pitard et al., 2008) **ARTICLE 1**. Aucune valeur discriminante de lymphocyte T gamma delta n'a pu être mise en évidence pour séparer avec certitude les sujets séropositifs des sujets séronégatifs. Une restriction de clonalité de ces lymphocytes est observée uniquement chez les patients séropositifs pour le CMV mais pas chez ceux séropositifs pour l'Herpes Simplex Virus (HSV), le Virus de la Varicelle et du Zona (VZV), et l'EBV. Cela suggère que le répertoire est restreint spécifiquement par des antigènes induits par le CMV. L'analyse phénotypique ex-vivo des lymphocytes T gamma delta V δ 1 et V δ 3 provenant de sujet séropositifs pour le CMV montre un remaniement extrêmement frappant du stade de différenciation de ces cellules. Il s'agit très majoritairement de cellules CD57+, effectrices mémoires TEMRA CD45RA+ / CD27- / CD28- / CD62L-, alors qu'un phénotype naïf est retrouvé majoritairement chez les patients séronégatifs pour le CMV. Chez les sujets séropositifs pour le CMV, elles expriment des marqueurs de cytotoxicité lymphocytaire comme la perforine et le granzyme B, mais aussi des marqueur d'activation plus classiquement retrouvés sur les lymphocytes NK comme le CD16, NKG2C-CD94, NKP80 et CD158. In vitro, ces lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} provenant de sujets séropositifs pour le CMV ont une réactivité contre des fibroblastes infectés par la CMV, évaluée par la surexpression membranaire de CD107a (marqueur de dégranulation lymphocytaire) (Pitard et al., 2008). Leur augmentation spécifique et leur restriction de clonalité démontrent qu'ils sont directement liés à cette infection et qu'ils représentent une véritable signature cellulaire d'un contact avec le CMV. Leur phénotype effecteur orienté vers la cytotoxicité et leur capacité in vitro à répondre à un antigène induit par le CMV suggère qu'ils pourraient participer à la lyse des cellules infectées.

Très récemment, il a été observé que les nouveaux nés infectés par le CMV in utero avaient dans leur sang de cordon une augmentation importante de leurs lymphocytes T gamma delta V γ 9^{neg}, V δ 1, V δ 2 ou V δ 3. Ces lymphocytes sont activés (HLA-DR+), prolifèrent (Ki-67+), sont CD27- / CD28-, expriment des marqueurs de cytotoxicité lymphocytaire comme la perforine et le granzyme A, des marqueurs d'activation comme NKG2C-CD94, CD158, NKG2D et KLRG1 et produisent de l'interféron- γ . L'infection à CMV in utero entraîne de façon quasi-systématique chez les nouveaux nés, l'apparition de clones T porteurs d'un TCR public V δ 1-V γ 8. Ces clones sont capables de produire de l'interféron- γ et de lyser des cellules infectées par le CMV, par une activation de leur TCR. Ces nouvelles données démontrent l'implication des lymphocytes T gamma delta V δ 1-V γ 8 dans le contrôle dans la réponse immune anti-CMV chez le fœtus (Vermijlen et al. , 2010) et renforcent ce qui avait déjà été démontré chez les adultes.

Il est intéressant de noter que ce lien entre CMV et lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} est très largement amplifié chez certains enfants ayant un phénotype SCID, secondaire à différentes mutations récessives hypomorphiques du gène de recombinaison RAG1 (recombination activating gene 1). Ce phénotype particulier est caractérisé par une infection à CMV persistante, une anémie hémolytique, une neutropénie auto-immune, et une lymphopénie T alpha beta et B. Il touche des enfants homozygotes pour la mutation. Ces patients ont une expansion majeure de leurs lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} (70% des lymphocytes T) dans le sang avec un répertoire oligoclonal et un phénotype effecteur un peu différent de celui observé chez les sujets sains séropositifs pour le CMV : CD45RO+, CD45RA-, CD27-, CD28- (de Villartay et al., 2005). In vitro, des clones

lymphocytaires T gamma delta V δ 3 issu d'un de ces patients produisent du TNF- α en présence de cellules infectées par le CMV (Ehl et al., 2005).

Ces données sont appuyées par quelques études de modèles murins (BALB-c) d'infection à CMV (M-CMV). En effet, le nombre de lymphocytes T gamma delta augmente dans le foie et la cavité péritonéale à partir du troisième jour pour atteindre un pic au cinquième jour après une infection intra-péritonéale à M-CMV. Dans cette étude, l'augmentation est très spectaculaire dans les glandes salivaires (x30) où leur nombre absolu est quasiment identique à celui des lymphocytes T CD4+ et CD8+, 14 et 28 jours après l'infection, résultats que nous n'avons pas reproduits (données non publiées) (Cavanaugh et al., 2003). Chez le rat Sprague-Dawley, ils augmentent dès le deuxième jour dans les ganglions drainant le site d'infection et prolifèrent en réponse à l'interleukine-2 (IL-2) (Dyugovskaya et al., 2003). Les cellules T gamma delta murine expriment la chaîne V γ 1 et ont un phénotype activé (CD25+, CD69+). La déplétion en lymphocyte T gamma delta a pour conséquence une augmentation significative de la charge virale et une diminution de l'interféron- γ hépatique trois jours après l'infection. Cinq jours après, l'absence de différence de charge virale entre les souris déplétées en lymphocyte T gamma delta et les souris contrôles suggère un rôle très précoce des lymphocytes T gamma delta dans le contrôle du M-CMV. In vitro, ces lymphocytes T gamma delta murins induits par le M-CMV produisent de l'interféron- γ et du TNF- α en réponse à HSP65, qui est exprimé à la surface des cellules infectées par le CMV. Il est intéressant de noter que cette production d'interféron- γ est très largement augmentée en présence d'interleukine 12 (IL-12) (Ninomiya et al., 2000) et qu'elle inhibe l'infection à CMV in vitro (Dyugovskaya et al., 2003). Chez le rat Sprague-Dawley, ils sont capables de cytotoxicité contre les fibroblastes infectés par le CMV. Bien qu'intéressantes ces données murines mériteraient cependant d'être confirmées en comparant par exemple les niveaux d'infections à CMV de souris knock-out pour le TCR gamma delta avec ceux de souris knock-out pour le TCR alpha beta.

Lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} et HHV8

Sur un plus petit effectif (12 patients), il a aussi été observé que les lymphocytes T gamma delta V δ 1 étaient augmentés dans le sang périphérique des patients séropositifs pour HHV-8 (herpes virus impliqué dans le sarcome de Kaposi, des lymphomes B agressifs et la maladie de Castleman). Bien qu'un éventuel lien avec le CMV n'ait pas été recherché, ils présentent un phénotype identique à celui décrits chez les patients séropositifs pour le CMV, CD57+ / C45RO-. Cependant ils sont capables de s'amplifier quand on les stimule avec des particules virales d'HHV-8. Face à des cellules infectées par HHV-8 ou bien stimulés par des protéines recombinantes d'HHV-8, les lymphocytes T gamma delta V δ 1 provenant des sujets séropositifs pour HHV-8 produisent de l'interféron- γ et du TNF- α , alors que ceux provenant des sujets séronégatifs pour HHV-8 n'en produisent pas. Cette production d'interféron- γ par ces lymphocytes T gamma delta V δ 1 bloque in vitro le relarguage d'HHV-8 par les cellules infectées (Barcy et al., 2008).

On peut aussi garder en mémoire que l'Herpès Virus Humain numéro 6 (HHV6) est capable d'infecter des lymphocytes T gamma delta activées, de leur faire exprimer le CD4 et de les rendre permissifs au VIH (Lusso et al., 1995). Cependant il n'est pas précisé dans cette étude la sous-population gamma delta en cause. Enfin, les lymphocytes T gamma delta V δ 1 peuvent proliférer au contact des cellules lymphoblastoïdes B transformées par l'EBV. Cette activation n'est cependant pas spécifique de l'EBV, car on l'observe contre des cellules B activées non infectées par l'EBV (Orsini et al., 1994), (Orsini et al., 1993) et bien qu'on note une augmentation significative des lymphocytes T gamma delta dans le sang périphérique à la phase aiguë d'une infection par l'EBV, celle-ci n'intéresse

que la sous-population V δ 2 (De Paoli et al., 1990). Ces données semblent exclure tout lien entre l'EBV et les lymphocytes T gamma delta V δ 1 ou V δ 3.

Lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} et VIH

Au cours de l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), les lymphocytes T gamma delta ont été largement étudiés, car on observe une augmentation du pourcentage et/ou de la valeur absolue du nombre des lymphocytes T gamma delta V δ 1 dans le sang périphérique (Autran et al., 1989), (De Maria et al., 1992), (De Paoli et al., 1991), la moelle osseuse (Rossol et al., 1998) et la muqueuse rectale de certains patients (Poles et al., 2003). En revanche aucune corrélation n'a pas été mise en évidence entre le taux de lymphocytes T gamma delta V δ 1 et les différents stades de la maladie, le niveau de charge virale, le niveau de lymphocytes T CD4+, et le traitement antirétroviral (HAART pour highly active antiretroviral therapy). Cette expansion de lymphocytes T gamma delta V δ 1 est mise en lumière en partie par la diminution en nombre des lymphocytes T gamma delta V δ 2 au cours de l'infection (Poles et al., 2003), (Poccia et al., 2005). Cette augmentation n'étant liée ni à une primo-infection ou à une réactivation du CMV, ni à l'EBV, ni à HSV-1 ou 2, elle est attribuée au VIH, mais aucune association avec une sérologie positive du CMV n'a été recherchée. Il est important de noter que l'analyse de la diversité des TCR des lymphocytes T V δ 1 des patients séropositifs pour le VIH, montre un profil de clonalité du segment CDR3 identique à celui observé chez les sujets sains non VIH. L'expansion des lymphocytes T gamma delta V δ 1 et donc l'émergence de clones T V δ 1 dans le sang des patients séropositifs pour le VIH pourrait donc ne pas être la conséquence directe du VIH (Boullier et al., 1995). Les lymphocytes T gamma delta V δ 1 pourraient par exemple participer au contrôle des infections opportunistes, comme cela a été démontré avec l'infection à *Candida albicans* (Fenoglio et al., 2009).

Dans le sang, leur phénotype se rapproche de celui rencontré chez les sujets séropositifs pour le CMV, et pourrait résulter d'une activation chronique (CD8+ / CD28- / HLA-DR+ / CD94-NKG2C +, CD158a/h+ et CD158b/j +), mais ils n'expriment ni le CD16 ni le CD56 (De Paoli et al., 1991), (Rossol et al., 1998), (Wesch and Kabelitz, 2003), (Fausther-Bovendo et al., 2008). Certains observent qu'elles expriment préférentiellement le CD45RA, comme chez les sujets séropositifs pour le CMV (De Paoli et al., 1991), d'autres le CD45RO (Rossol et al., 1998), (Wesch and Kabelitz, 2003), ce qui peut être compatible dans les deux cas avec un profil effecteur. Ils expriment la perforine, sont capables de cytotoxicité et produisent *in vivo* de l'interféron- γ et du TNF- α (Boullier et al., 1997). Dans le sang, ils expriment cependant un phénotype particulier marqué par une augmentation de l'expression du CD103 et de CCR9 (Poles et al., 2003). Cela pourrait suggérer que ces cellules T gamma delta V δ 1 proviennent de l'intestin, mais les longueurs et les séquences des CDR3 sont très différentes entre les lymphocytes T gamma delta V δ 1 de la muqueuse digestive et ceux du sang, définissant ainsi deux populations distinctes, une digestive et une sanguine (Poles et al., 2003). Ce point reste à éclaircir, car il est bien démontré que leur site d'activation spécifique n'est pas dans les ganglions, où la distribution des tailles des régions CDR3 des cellules T gamma delta V δ 1 a un profil gaussien, sans restriction de clonalité (Boullier et al., 1997).

Si il est avéré qu'il existe réellement un lien direct entre le HIV et les lymphocytes T gamma delta V δ 1 indépendant du CMV, l'hypothèse suivante pourrait être dégagée : La dysfonction de la barrière digestive secondaire à la déplétion en lymphocytes T alpha beta CD4+ chez les patients VIH a pour conséquence une translocation bactérienne à travers l'épithélium endommagé (Brenchley et al., 2006). Cela pourrait être la cause de l'expansion et de la migration de certains lymphocytes T gamma delta V δ 1 digestifs vers le

sang périphérique et d'autres compartiments tissulaires (Ismail et al., 2009). Il faut de toute façon noter que ces lymphocytes T gamma delta V δ 1 provenant des sujets infectés par le VIH sont capable de cytotoxicité contre les cellules T alpha beta CD4+ autologues ou allogéniques infectées, mais aussi non infectées par le VIH (Sindhu et al., 2003), (Fausther-Bovendo et al., 2008). Cette action anti-lymphocytaire T CD4+ directe est non spécifique du VIH. Elle pourrait en partie contribuer à la lymphopénie T CD4+ caractéristique de cette maladie mais remet aussi en cause le lien direct entre le VIH et l'expansion des lymphocytes T gamma delta V δ 1.

Lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} et VHC

Les lymphocytes T gamma delta V δ 1 ne sont significativement pas amplifié dans le sang périphérique des patients infectés par le VHC par rapport à celui des sujets sains (Rossol et al., 1998), (Agrati et al., 2001a). En revanche, dans un foie infecté par le VHC, on retrouve une augmentation de leur pourcentage, qui est corrélée au degré d'inflammation et au score d'activité hépatique (Yonekura et al., 2000). Comme dans le sang périphérique des sujets séropositifs pour le CMV, ils y deviennent majoritaire au dépend des lymphocytes T gamma delta V δ 2, expriment un phénotype activé effecteur/mémoire (CD45RO+ / CD62L- / HLA-DR+) et ont la capacité de produire de l'interféron- γ (Agrati et al., 2001a), (Agrati et al., 2001b). Des lignées cellulaires de lymphocytes T gamma delta V δ 1 hépatiques provenant de patients infectés par le VHC sont capables de tuer in vitro des hépatocytes primaires ainsi que d'autres cibles cellulaires. Cependant leur activation ne semble pas spécifique du VHC, car ils n'ont pas d'activité cytotoxique contre d'autres cellules infectées par un VHC recombinant (Agrati et al., 2002), (Poccia et al., 2005).

1.5.2 Fonctions anti-tumorales des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}

Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} sont aussi impliqués dans la réponse anti-tumorale car on les retrouve parmi les « lymphocytes infiltrant les tumeurs » (ou TIL) au sein de nombreux cancers (**tableau 2**) (Ferrarini et al., 2002), (Kabelitz et al., 2007). En effet, les lymphocytes T gamma delta V δ 1 représente en moyenne 63 % des lymphocytes T gamma infiltrant les tumeurs qui expriment MICA ou MICB (Molécules de stress apparentée au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) (Groh et al., 1999). Cette co-localisation suggère un lien direct entre les molécules MICA ou MICB et l'activation des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} issus de ces tumeurs le plus souvent épithéliales.

Bien que les lymphocytes T gamma delta ne représentent en moyenne que 5% des lymphocytes T CD3+ infiltrant les tumeurs in vivo, des lignées ou des clones de lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} amplifiés à partir des TIL exercent in vitro une cytotoxicité contre les cellules tumorales autologues mais aussi le plus souvent contre une grande variété d'autres tumeurs. Ainsi, des lignées issues de cancers de l'ovaire, du poumon et du sein produisent de l'interféron- γ et tuent des lignées tumorales provenant de carcinomes ovarien, prostatique, colique, hépatique, et utérin (Groh et al., 1999), (Ferrarini et al., 2002). Cette réactivité est spécifique des cellules transformées. Dans le cas du gliome, les lymphocytes T gamma delta V δ 1 tuent spécifiquement des lignées de gliomes alors qu'ils n'ont aucune réactivité contre des astrocytomes primaires (Bryant et al., 2009).

Ceci a été aussi bien démontré dans le cancer colorectal où les lignées de lymphocytes T gamma delta V δ 1 générées à partir de TIL coliques produisent de l'interféron- γ et tuent des lignées tumorales de cancers colique, pancréatique, rénal et la lignée K652

(lignée de leucémie myéloïde chronique). Elles ont un phénotype qui peut correspondre au phénotype TEMRA activateur : CD8+, CD45RA+, CD45RO-, CD11a+ et CD69+ (Maeurer et al., 1996).

Tableau 2 : Tumeurs où a été retrouvée la présence de lymphocytes T gamma delta Vδ1

Site tumoral	Références
Colon	(Maeurer et al., 1996), (Groh et al., 1999)
Ovaire	(Groh et al., 1999)
Peau	(Alaibac et al., 1992), (Bachelez et al., 1992), (Bialasiewicz et al., 1999), (Nanno et al., 1992), (Ebert et al., 2006), (Girardi et al., 2001)
Poumon	(Zocchi et al., 1990), (Zocchi et al., 1994), (Ferrarini et al., 1996), (Groh et al., 1999), (Ferrarini et al., 2002)
Prostate	(Groh et al., 1999)
Rein	(Choudhary et al., 1995), (Groh et al., 1999)
Sein	(Groh et al., 1999)
LLC	(Poggi et al., 2004), (Hacker et al., 1992), (Catellani et al., 2007)

* LLC : Leucémie lymphoïde chronique

Dans les carcinomes cutanés (spino-cellulaire et baso-cellulaire), les lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} ne représentent pas plus de 5% des lymphocytes T CD3+ (**Figure 5**) (données personnelles non publiées) et (Alaibac et al., 1992). Dans le mélanome, les lymphocytes T gamma delta Vδ1 apparaissent en plus grande quantité car ils représentent entre 15 et 25 % des TIL et sont retrouvés dans 53% des mélanomes nécrotiques choroïdiens (Bachelez et al., 1992), (Bialasiewicz et al., 1999). Ils expriment la perforine et exercent une cytotoxicité contre des tumeurs autologues, des lignées de mélanomes et contre la lignée K562 (Ebert et al., 2006), (Bachelez et al., 1992), (Nanno et al., 1992). A la différence des lymphocytes T gamma delta Vδ1 du sang, on retrouve à leur surface les récepteurs CLA et CCR8, qui orientent leur migration vers la peau (Ebert et al., 2006). In vivo, leur présence au sein de mélanomes nécrotiques choroïdiens est un facteur indépendant associé à la survie des patients (Bialasiewicz et al., 1999). Enfin chez la souris dépourvues de lymphocytes T gamma delta, on observe une augmentation du nombre de cancer cutanés induits (Girardi et al., 2001).

Des lignées et des clones lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} générés à partir de TIL pulmonaires sont capables de tuer in vitro des cellules tumorales pulmonaires autologues (Zocchi et al., 1990), (Zocchi et al., 1994), (Ferrarini et al., 1996), mais aucune quantification de ces cellules sur le site tumoral n'a été effectuée.

Bien que les lymphocytes T gamma delta Vδ2 aient été largement impliqués dans l'immunologie anti-tumorale du cancer du rein, leur rôle reste incertain (Viey et al., 2005b), (Viey et al., 2005a). Il en est de même pour les lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg}. A titre anecdotique, un clone T gamma delta Vδ1Vγ3 réactif contre les cellules tumorales autologues, a été identifié chez un même patient avec un cancer du rein récidivant et métastatique, au sein de trois sites tumoraux distincts en quantité importante (Choudhary et al., 1995). Cependant une très grande étude (portant sur 248 carcinomes rénaux à cellules claires) démontre clairement que les lymphocytes T gamma delta sont extrêmement peu

représentés au sein de ce type de tumeur (2.6 cellules/mm³, soit 1% des lymphocytes T CD3+). Leur pourcentage diminue même quand le nombre de lymphocytes T CD3+ augmente en intra-tumoral. A l'inverse de ce qui a été démontré dans le mélanome rétinien, leur quantité n'est pas associé au pronostic du patient (Inman et al., 2008). En conclusion, les lymphocytes T gamma delta ne semblent impliqués dans la réponse anti-tumorale des cancers des reins que dans des cas exceptionnels.

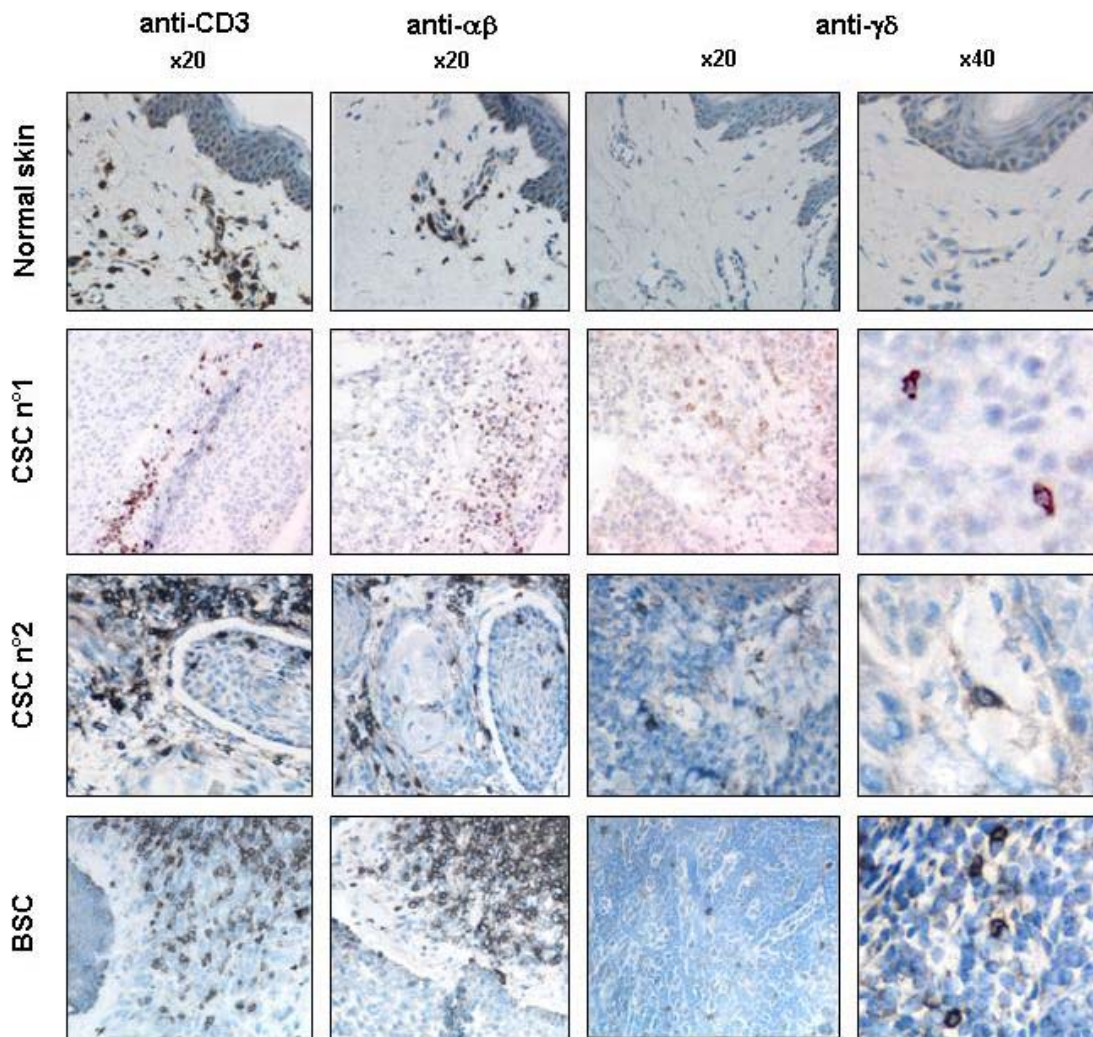


Figure 5: Immunohistologic analysis of squamous cell carcinoma. Very rare $\gamma\delta$ T cells were present in normal skin. The majority of skin sections contained no $\gamma\delta$ T cells. More $\gamma\delta$ T cells have been seen within squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BSC) of patients. However, they represented less than 5% of the cutaneous CD3+ T cells (unpublished personal data).

Enfin, les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique stable ont plus de lymphocytes T gamma delta V δ 1 dans le sang périphérique que les sujets sains et cette présence est associé à une non progression de la maladie. En culture avec des cellules mononucléées autologues et préalablement activées du sang, ces lymphocytes T gamma delta V δ 1 prolifèrent, produisent de grandes quantités de TNF- α et d'interféron- γ , et tuent des cellules B autologues préalablement activées de leucémie lymphoïde chronique CD20+/CD5+ (Poggi et al., 2004).

1.5.3 Molécules membranaires impliquées dans l'activation des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} effecteurs

Les lymphocytes T gamma delta partagent avec les lymphocytes T alpha beta un mécanisme d'activation complexe, faisant intervenir plusieurs signaux. Les cibles qu'ils reconnaissent sont en revanche différentes. Il s'agit de métabolites et/ou d'antigènes non vus par les lymphocytes T alpha beta, via une reconnaissance indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (Morita et al., 1995). Ils jouent un rôle fondamental et non redondant et fournissent par ce biais là une voie supplémentaire et essentielle d'activation rapide pour la surveillance locale contre les cellules infectées ou tumorales, comme le montre l'analyse de leurs récepteurs activateurs et de leurs ligands qui est développée ci-dessous (Kabelitz et al., 2007).

Le TCR gamma delta fait la spécificité et définit cette sous-population cellulaire. Il est tout naturellement impliqué dans la reconnaissance des ligands activateurs. Si on se réfère uniquement au blocage de la réactivité par des anticorps bloquants anti-TCR, on peut retenir qu'une grande partie des activations des lymphocytes T gamma delta V δ 1 sont sous sa dépendance : la réactivité anti-HHV-8 (Barcy et al., 2008), la prolifération au contact de lignées cellulaires lymphoblastoïdes B transformées par l'EBV (Orsini et al., 1993), la cytotoxicité contre des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques (Sindhu et al., 2003) ou des cellules tumorales coliques (Maeurer et al., 1996), (Choudhary et al., 1995). Mais seule l'étude de Spada a formellement démontré l'interaction TRC gamma delta V δ 1-CD1c grâce à un transfert de spécificité du TCR (Spada et al., 2000). Par ailleurs, aucune interaction moléculaire entre le TCR V δ 1 et un ligand n'a pu être mise en évidence par la technique biacore. La reconnaissance d'une très grande variété de tumeurs et de cellules différentes par une seule et unique population lymphocytes T gamma delta V δ 1 suggère la présence d'un ligand ou de ligands proches communs et partagés. Grâce à des anticorps bloquants, des tétramères et des cellules transfectées avec le TCR gamma delta V δ 1, une molécule de stress apparentée au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I a été identifiée comme un ligand de certains TCR gamma delta V δ 1 : Il s'agit des molécules MICA et MICB qui sont surexprimées à la surface de certaines cellules tumorales ou infectées. Elles sont co-localisées préférentiellement avec des lymphocytes T gamma delta V δ 1 dans ces mêmes tumeurs. Les deux chaînes gamma delta du TCR sont nécessaires à la reconnaissance des domaines α 1 et α 2 de MICA/B et cette reconnaissance ne nécessite pas de chargement de peptide (Groh et al., 1999), (Groh et al., 1998), (Wu et al., 2002). A ce jour, MICA/B et CD1c sont les deux seuls ligands identifiés et connus du TCR gamma delta V δ 1. Mais, les ligands des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} sont probablement multiples et seuls les ligands de quelques clones ont été identifiés. Beaucoup d'autres restent à découvrir et seule l'identification d'un nombre suffisant de ligands permettra d'avoir une idée plus précise sur les conditions d'activation et de sélection de ces cellules.

A côté du TCR, des récepteurs habituellement présents sur les cellules NK sont aussi impliqués dans la réactivité des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}, comme le récepteur NKG2D et l'hétéro-dimère NKG2C-CD94. Le récepteur NKG2D est aussi le ligand des molécules MICA/B chez l'homme (Bauer et al., 1999) et RAE-1 chez la souris (Girardi et al., 2001). Il est hautement probable qu'une double stimulation par le TCR et par NKG2D puisse entraîner une activation des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} dans certains contextes (Wu et al., 2002). Mais NKG2D reconnaît aussi les protéines ULBP, qui sont d'autres molécules apparentées au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. A titre d'exemple, les lymphocytes T gamma delta V δ 1 tuent des cellules B autologues de leucémie lymphoïde chronique via une interaction de NKG2D avec ULBP-3 qui est surexprimée après

activation des cellules B (Poggi et al., 2004). L'hétérodimère NKG2C-CD94 pourrait être impliqué dans l'infection par le VIH, où la cytotoxicité contre des lymphocytes T alpha beta CD4+ infectés pourrait naître de l'engagement de NKG2C (sur les lymphocytes T gamma delta Vδ1) avec son ligand HLA-E. Cette hypothèse est sous-tendue par l'augmentation de l'expression d'HLA-E sur les lymphocytes T alpha beta CD4+ infectés par le VIH (Fausther-Bovendo et al., 2008).

La réactivité anti tumorale des lymphocytes T gamma delta Vδ2 est sous la dépendance de molécules de co-stimulation comme LFA-1/ICAM1 (Corvaisier et al., 2005). La même chose est observée avec les lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg}, puisque la prolifération des lymphocytes T gamma delta Vδ1 isolés à partir de liquide synovial ou du sang périphérique, en contact avec de lignées cellulaires lymphoblastoïdes B transformées par l'EBV, est bloquée par un anticorps anti-LFA1 (Orsini et al., 1993). L'ajout d'anticorps anti-fibronectine, anti-Beta2 integrine et anti-Beta7 integrine inhibe aussi significativement la cytotoxicité des lymphocytes T gamma delta Vδ1 issu de TIL colique contre des cellules tumorales coliques (Maeurer et al., 1996). Enfin, le récepteur de la laminine est exprimé sur les cellules endothéliales, les cellules épithéliales. Il est surexprimé sur les cellules tumorales. Le blocage de son interaction avec un ligand inconnu (qui n'est pas le TCR) à la surface des lymphocytes T gamma delta Vδ1 issu de TIL pulmonaire inhibe leur cytotoxicité dirigée contre des cellules tumorales pulmonaires autologues (Ferrarini et al., 1996).

1.5.4 Comment pourraient s'activer et s'amplifier les lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} naïfs ?

La localisation, le répertoire, le développement ou les fonctions effectrices des lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} ont été bien étudiés. En revanche, une question fondamentale reste en suspens : Comment sont activés puis amplifiés les lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} naïfs, et comment deviennent-ils dans les tissus des cellules effectrices capables de reconnaître rapidement des antigènes de stress ? Aucune réponse définitive n'est disponible mais plusieurs éléments de réponses peuvent être donnés. Par analogie avec les cellules NKT (Brigl and Brenner), on peut imaginer trois scénarios.

Les gamma-delta pourraient reconnaître un antigène exogène et seraient activés efficacement via leur TCR. Les cellules dendritiques qui sont les cellules professionnelles présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T alpha beta pourraient jouer un rôle dans ce mécanisme d'activation. Elles ne présentent pas d'antigènes peptidiques par leur complexe majeur d'histocompatibilité aux cellules T gamma delta. En revanche, elles expriment les molécules CD1. Ces molécules CD1 sont impliquées habituellement dans la présentation d'antigènes lipidiques et glycolipidiques, comme par exemple l'acide mycolique qui est un lipide issu de la paroi des mycobactéries. 40% de la membrane cellulaire des mycobactéries est composée de lipides. Beaucoup des lipides présentés viennent de pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi* ou *Leishmania* (Strominger). L'hypothèse d'une présentation d'antigènes lipidiques exogènes provenant de certains pathogènes par le CD1 au TCR des lymphocytes T gamma delta peut donc être formulée (Russano et al., 2007), mais reste à être démontrée. Les cellules dendritiques qui expriment le CD1 sont en tout cas nécessaire à l'activation de certains clones de lymphocytes T gamma delta Vδ1, bien que l'antigène présenté soient inconnus (Das et al., 2004).

Les gamma-delta pourraient aussi reconnaître par leur TCR un auto-antigène ou du soi modifié (Spada et al., 2000), mais ils auraient besoin dans cette situation de co-signaux indispensable à leur activation (Das et al., 2004). En effet, la co-stimulation dans cette hypothèse serait capitale car elle représenterait l'élément permettant d'éviter l'auto-

immunité. In vitro, les cellules dendritiques induisent la prolifération de certains clones de lymphocytes T gamma delta V δ 1 après engagement de leur TCR, grâce à l'intervention indispensable de corécepteur et de molécules d'adhésion (LFA-3/CD2, LFA-1/ICAM-1, MICA-B/NKG2D), et grâce à la production d'IL-12 (Figure 6) (Das et al., 2004), (Wu et al., 2002).

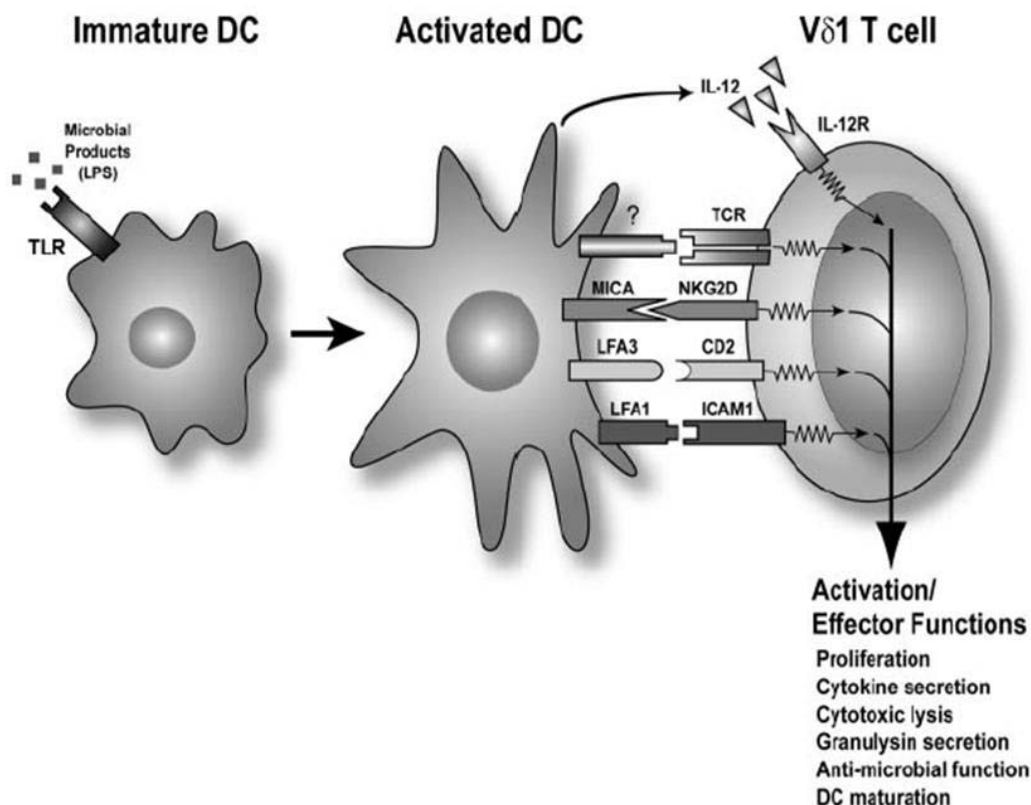


Figure 6: Possible model of molecular interactions in V δ 1 T cell activation by Gram-negative microbial products. Monocyte-derived dendritic cells may be activated by exposure to Gram-negative bacterial lipid components, such as LPS, which activates dendritic cells through Toll-like receptors (TLRs) and results in secretion of IL-12. Microbial Ags or self-Ags expressed by dendritic cells might also activate V δ 1 TCR. During co-culture, interaction takes place between various adhesion and costimulatory molecules present in both T cells (CD2, ICAM-1, and NKG2D) and dendritic cells (LFA-3, LFA-1, and MICA). Together these signals stimulate proliferation, cytokine secretion, cytotoxic lysis, granulysin secretion, and other gamma delta T cell effector functions (Das et al., 2004).

Enfin, les lymphocytes T gamma-delta pourraient être activés directement par des signaux indépendamment de toute intervention du TCR. Récemment, TLR-2 a été impliqué dans cette activation dans un modèle murin. La stimulation des cellules T gamma delta naïves par des pathogènes peut aboutir à la production d'IL-17. De façon très surprenante, et à l'inverse de ce qui est décrit pour les lymphocytes T alpha beta, elles s'amplifient vers un profil Th17 après infection par un pathogène sans stimulation de leur TCR gamma delta. Cette amplification de lymphocytes T gamma delta Th17 apparait après activation directe du TLR-2 ou de la dectin-1 par le pathogène (Martin et al., 2009) et est renforcée par l'IL23 et l'IL-1, deux cytokines produites par les cellules dendritiques activées par le pathogène (Sutton et al., 2009). Cette activation et cette amplification non spécifique, traduisent une réponse immunitaire innée vis-à-vis d'un pathogène, indépendante du TCR, et

dépendante des TLR présents dans les cellules T gamma delta et les cellules dendritiques voisines.

Le site d'activation des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} naïfs n'est pas non plus défini. Dans l'infection par le VIH où cela été étudié, il ne semble être ni dans les ganglions, ni dans l'intestin (Poles et al., 2003), (Boullier et al., 1997). Il reste l'hypothèse d'une maturation et d'une amplification dans le thymus où les antigènes de stress leur seraient présentés dans un environnement favorisant. Une prédétermination thymique de leur future polarisation a tout de même été démontrée dans un modèle murin. Les cellules CD27+ durant la maturation thymique évoluent vers un profil Th1 produisant de l'interféron- γ tandis que les cellules CD27- évoluent vers un profil Th17 (Ribot et al., 2009). Ces données ne sont pas nécessairement applicable à l'homme, où à l'inverse les cellules T gamma delta effectrices CD27- produisent de l'interféron- γ (Angelini et al., 2004).

En conclusion, il existe probablement plusieurs populations de lymphocytes T gamma delta V δ 1 effecteurs avec des ligands différents en fonction de leur localisation. Un point commun entre les différentes populations gamma delta V δ 1 est probablement la dissociation qui existe entre le facteur stimulant la prolifération, spécifique et probablement dépendant du TCR et les facteurs activateurs des fonctions effectrices qui peuvent être bien sur spécifiques (via le TCR) mais qui sont aussi non spécifiques (via les récepteurs NK). Ce panel de récepteurs activateurs permet une activation rapide et explique en partie la réactivité multiple de ces cellules effectrices/mémoires contre des cellules infectées par le CMV bien sur, mais aussi contre des cellules tumorales. La réactivité croisée peut aussi être expliquée par la présence d'antigènes communs aux cellules infectées et tumorales. Mais leur faible nombre dans les tissus et dans le sang pose la question de la réelle efficacité de leurs fonctions effectrices. Dans les expériences de cytotoxicité in vitro, elles sont toujours mises en excès face à leur cible pour démontrer cet effet. En revanche in vivo, la situation est systématiquement inversée quand on regarde des coupes d'immunohistochimie. La seule façon de relier ces deux observations est d'imaginer qu'elles jouent un rôle très précoce de surveillance et de sentinelle, afin d'éliminer les cellules infectées ou tumorales émergentes qui se mettraient à sur exprimer des antigènes de stress comme MICA/B (Strid et al., 2008). Cette large littérature a fait naître l'idée que les fonctions effectrices anti-tumorales et anti-virales de ces cellules pourraient être un jour être exploitées pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cancer et contre les infections.

1.6 Autres fonctions immunologiques des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}

Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} peuvent cependant avoir d'autres fonctions, et se comporter comme des cellules T régulatrices ou comme des cellules favorisant la cicatrisation cutanée.

1.6.1 Fonctions régulatrices lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}

Chez l'homme, des lymphocytes T gamma delta V δ 1 CD8 $\alpha\alpha$ générés à partir de TIL mammaires produisent de l'interféron- γ et du GM-CSF en présence des cellules tumorales autologues issues d'un cancer du sein, via une activation dépendante du TCR. D'une façon surprenante et à l'inverse de ce qui avait été démontré jusqu'alors en immunologie anti-tumorale, ces lymphocytes T gamma delta CD25- Foxp3- sont incapable d'inhiber in vitro la prolifération des cellules tumorale. Ils exercent en revanche une activité

suppressives sur des cellules T naïves, sur des lignées T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de tumeurs et sur les cellules dendritiques, via une action indépendante de l'IL-10 et du TGF-beta. Les cellules dendritiques perdent aussi sous leur influence, leur capacité à maturer et deviennent incapables de stimuler des cellules T CD4⁺ naïves. Ces lymphocytes T gamma delta Vδ1 représentent environ 30% des TIL issus de cancer mammaires, après stimulation ex vivo (IL-2), une fréquence remarquablement élevée qui reste à confirmer sur des coupes d'immunohistochimie (Peng et al., 2007).

Dans la maladie cœliaque, la réponse adaptative est sous la dépendance des lymphocytes T alpha beta CD4⁺ spécifiques de la gliadine. Ils reconnaissent des peptides immunogéniques issus de la gliadine présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-DQ2 ou HLA-DQ8. Paradoxalement, les lymphocytes T alpha beta CD8⁺ participent à la réponse immune innée dans l'épithélium digestif. Les peptides de la gliadine induisent la production d'IL-15 par les cellules épithéliales digestives et par les cellules présentatrices d'antigène. L'IL-15 stimule ensuite l'expression de MICA/B sur les entérocytes et entraîne l'activation et la prolifération des lymphocytes T alpha beta CD8⁺ intra-épithéliaux. La reprogrammation de ces cellules effectrices par cette activation cytokinique non spécifique est un élément important, car *in fine*, l'interaction de NKG2D et/ou de NKG2C-CD94 (à la surface des lymphocytes T alpha beta CD8⁺ intra-épithéliaux) avec leurs ligands respectifs MICA/B et HLA-E (sur les entérocytes) entraîne une production d'interféron- γ , de perforine et de granzyme B qui aboutit à la cytolysse des entérocytes et aux lésions de la muqueuse digestive (Green and Jabri, 2006), (Meresse et al., 2004), (Hue et al., 2004), (Merese et al., 2006). Les patients ayant un régime sans gluten ont plus de lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} intra-épithéliaux dans la muqueuse jéjunale que les patients avec une maladie cœliaque active. Ils inhibent la production d'interféron- γ et de perforine ainsi que l'expression de NKG2D des lymphocytes T alpha beta CD8⁺ intra-épithéliaux activés par l'IL-15 même si ils sont 5 fois moins nombreux que les lymphocytes alpha beta effecteurs. La suppression de la cytotoxicité des lymphocytes T alpha beta CD8⁺ intra-épithéliaux qui expriment (comme les entérocytes dans la maladie cœliaque active) HLA-E passe par l'engagement d'HLA-E avec son ligand NKG2A-CD94 qui est présent à la surface des lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} intra-épithéliaux des patients avec une maladie cœliaque. La suppression du programme cytotoxique des lymphocytes T alpha beta CD8⁺ intra-épithéliaux passe par la production du Tumor Growth Factor-beta1 (TGF-beta1) (mais pas l'IL-10) par les lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} intra-épithéliaux, via une interaction entre HLA-E et NKG2A-CD94 et est majoré par une co-activation dépendante du TCR gamma delta. Les lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg} intra-épithéliaux peuvent donc jouer un rôle de rétrocontrôle négatif sur les lymphocytes T alpha beta CD8⁺ intra-épithéliaux (Bhagat et al., 2008).

Vu le faible pourcentage de ces cellules *in vivo* et donc d'un point de vue strictement quantitatif, la fonction suppressive apparaît plus convaincante que la fonction effectrice. Les données fonctionnelles *in vitro* confortent cette impression car même en minorité, elles assurent une fonction suppressive, ce qui n'est pas le cas des tests de cytotoxicité. On peut aussi noter que « l'habit ne fait pas nécessairement le moine » car dans le modèle du cancer mammaire et de la maladie cœliaque, elles produisent ou expriment majoritairement de l'interféron- γ , de la perforine et du granzyme B, des attributs classiquement dédiés aux cellules effectrices. On pourrait aussi considérer la possibilité que les cellules T gamma-delta aient une double activité effectrice et régulatrice qui interviendrait à des moments différents de la réponse : précocement pour l'activité effectrice et tardivement pour éteindre la réponse pour l'activité régulatrice.

Quoi qu'il en soit, in vitro, leur rôle effecteur existe sans l'ombre d'un doute. Il faut donc voir cette cellule comme multifonctionnelle et polarisée en fonction du contexte. Il a été démontré que la fonction suppressive des lymphocytes T alpha beta CD4⁺ CD25⁺ pouvait être inhibée par une signalisation via TLR-8 (Peng et al., 2005). Ce signal indépendant des cellules dendritiques nécessite l'activation de la voie TLR8-MyD88-IRAK4, alors que TLR-2 joue un rôle majeur dans le maintien de la fonction de suppression des lymphocytes T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ murines (Sutmuller et al., 2006a), (Sutmuller et al., 2006b). In vivo et ex vivo, la fonction suppressive des lymphocytes T gamma delta Vδ1 CD8αα issus des TIL mammaires est elle aussi réversible après un traitement par la Poly-G3, un ligand de TLR-8. Alors qu'elles expriment les TLR-1, TLR-7 et TLR-9, seul le TLR-8 semble être impliqué dans ce contrôle de leur fonction suppressive (Peng et al., 2007). Cet exemple est un début d'explication à la multifonctionnalité de ces cellules, qui doit pouvoir varier en fonction des conditions d'activation et de leur localisation. Les cellules dendritiques peuvent dans certaines situations activer des clones de lymphocytes T gamma delta Vδ1 issu du duodénum. Quand ils sont activés par des cellules dendritiques CD1⁺ stimulées par des antigènes phospholipidiques, les lymphocytes T gamma delta Vδ1 produisent de grandes quantité de TGF-beta1 (Russano et al., 2007). Ils pourraient ainsi jouer un rôle supprimeur sur les nombreux lymphocytes T alpha beta intra-épithéliaux et jouer un rôle régulateur dans l'épithélium intestinal en intervenant peut-être dans la tolérance orale. Enfin, il peut aussi y avoir une régulation thymique de la fonction des lymphocytes T gamma delta. En effet, on ne détecte pas de Foxp3 dans les lymphocytes T gamma delta murin. En revanche les souris knock-out pour la chaîne beta du TCR, ont des progéniteurs T doubles positifs CD4⁺ CD8⁺ qui ont une capacité limitée à influencer le développement des progéniteurs T gamma delta. Chez ces souris, les lymphocytes T gamma delta ainsi que leur splénocytes acquièrent un phénotype régulateur et expriment Foxp3 (Pennington et al., 2006). Autrement dit, la fonction des lymphocytes T gamma delta est déjà orientée dans le thymus sous l'influence de progéniteurs alpha beta par des voies qui restent à explorer.

1.6.2 Fonctions réparatrices des lymphocytes T gamma delta Vδ2^{neg}

Chez la souris, il existe une population importante de cellules T gamma delta, les cellules T dendritiques épidermiques (DECT). Elles ont un TCR invariant canonique composé des chaînes Vgamma3-Jgamma1-Cgamma1 et Vdelta1-Ddelta2-Jdelta2-Cdelta et sont dépendante de l'IL-7 et l'IL-15. Elles interagissent avec les kératinocytes et jouent un rôle important dans la réparation épithéliale après une lésion cutanée, via la production d'IGF-1 (Insulin-like growth factor) et du keratinocyte growth factor (Jameson and Havran, 2007). Chez l'homme, il existe une population de cellules T gamma delta Vδ1 dans le derme et l'épiderme humain (voir localisation). Ces cellules expriment le CLA (antigène leucocytaire cutané) dont le ligand est l'E-selectine et produisent après activation comme les DECT, de l'IGF-1 qui régule le remodelage et migration des kératinocytes lors de la re-épithélialisation après une plaie cutanée. La réparation de la plaie cutanée et la cicatrisation est améliorée après l'activation des cellules T gamma delta par leur TCR, via cette production d'IGF1. In vivo, les patient avec des plaies chroniques ont des cellules T gamma delta non réactives qui ne produisent plus d'IGF-1 (Toulon et al., 2009). Ce rôle joué par les lymphocytes T gamma delta Vδ1 présent près des couches basales de l'épiderme est très original mais le ligand activateur du TCR de ces populations reste à découvrir.

2. Conséquences sur le Virus et sur l'Hôte de la Réponse Immunologique contre le Cytomégalovirus en Transplantation d'Organe

2.1 Epidémiologie de l'infection à Cytomégalovirus à l'ère des traitements prophylactiques et préventifs en transplantation d'organe :

Le CMV infecte une large proportion de la population, dès le plus jeune âge. La séroprévalence varie de 30 à 90% dans le monde. En Europe de l'Ouest, elle avoisine les 50% à 50 ans (Krech, 1973), (Crough and Khanna, 2009). Elle suit une distribution bimodale avec un premier pic pendant la petite enfance et un second chez le jeune adulte. Le premier résulte de la transmission mère-enfant du virus (Numazaki and Chiba, 1997), (Soderberg-Naucler, 2006) et de la transmission horizontale, particulièrement fréquente entre enfants, qui excrètent du virus dans les urines, la salive et les sécrétions respiratoires durant une période prolongée (Hutto et al., 1986). En Europe, environ 25% des enfants de 2 ans sont déjà infectés (Kuijpers et al., 2003). Le second pic est probablement largement dû à une transmission sexuelle. Entre 14 et 18 ans, environ 60% des jeunes adultes sont ainsi contaminés (Kuijpers et al., 2003). Chez les sujets immunocompétents, l'infection est le plus souvent bénigne et spontanément résolutive après la mise en place d'une réponse immune spécifique.

En transplantation d'organes solides, le CMV peut être responsable : 1/ d'une primo-infection chez les patients séronégatifs pour le CMV recevant un rein provenant d'un donneur séropositifs (D+R-), 2/ d'une réactivation chez les patients séropositifs pour le CMV (R+) ou 3/ d'une surinfection chez les patients séropositifs pour le CMV recevant un rein provenant d'un donneur séropositifs (D+R+). Dans le contexte de la transplantation d'organes, le virus est associé à une morbidité significative et parfois à une plus grande mortalité. L'Association Américaine de Transplantation définit ainsi l'infection active à CMV et la maladie à CMV (Humar and Michaels, 2006). L'infection est définie par la détection de la pp65 (ppUL83) virale, réalisée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques, dans le noyau des polynucléaires circulants ou bien par la détection de l'ADN viral par des techniques moléculaires (PCR CMV). La maladie à CMV regroupe deux entités : 1/ Le syndrome viral à CMV qui regroupe une infection associée à une fièvre, des malaises, une leucopénie, une thrombopénie ou une cytolysé hépatique, et 2/ la maladie à CMV invasive qui est définie par une atteinte d'organe et par la mise en évidence du virus dans cet organe par des techniques de biologie moléculaire ou d'immunohistochimie le plus souvent (**Tableau 3**).

Depuis 10 ans, l'avènement des techniques diagnostiques de biologie moléculaire et l'émergence de traitements antiviraux efficaces per os tels que le gancyclovir, le valacyclovir et le valgancyclovir ont délimités deux stratégies de prises en charges des patients vis-à-vis de cette infection et ont redéfinies ainsi l'épidémiologie du CMV en transplantation d'organes. Certaines équipes proposent à leurs patients de recevoir un traitement préventif pendant 3 mois. D'autres en revanche, propose une stratégie préemptive basée sur un dépistage hebdomadaire du virus dans le sang par une PCR CMV dans les premiers mois post transplantation, avec mise en route d'un traitement seulement si une infection apparaît. L'incidence des infections et des maladies au sein de la population à risque (tous les patients à l'exception des D-R-) est donc différente en fonction de la stratégie choisie (**Tableau 4**).

Le risque d'infection varie bien sûr en fonction de la sérologie CMV à la greffe du donneur et du receveur. En l'absence de traitement préventif, l'infection à CMV survient chez 60 à 80 % des patients transplantés D+R- pour le CMV recevant un organe solide (Fishman and Rubin, 1998). Son incidence baisse sous traitement préventif à 50 % environ (Paya et al.,

2004), (Kliem et al., 2008), (Khoury et al., 2006) et si ce traitement est prolongé pendant 6 mois l'incidence de l'infection à CMV chute encore à 37% (Humar et al.). Chez les patients D+R+, l'infection à CMV survient chez 50 à 60 % des patients transplantés. L'impact du traitement préventif est aussi important en faisant baisser le taux d'infection entre 10 et 20%. Chez les D-R+, les choses sont moins claires car le taux de réactivation se situe dans une fourchette large entre 25 et 75% et diminue sous traitement préventif entre 0 et 27 % (Khoury et al., 2006), (Kliem et al., 2008). Globalement les infections surviennent dans les trois premiers mois avec la stratégie préemptive, et après le troisième mois avec la stratégie préventive. En effet, seulement 3 à 9% des patients développent une virémie sous traitement préventif (Reischig et al., 2008), (Paya et al., 2004).

Tableau 3 : Définition de la maladie à CMV d'après l'Association Américaine de Transplantation (d'après (Humar and Michaels, 2006))

Disease type	Probable	Definite
CMV syndrome	One or more of the following: 1. Fever >38°C for at least 2 days 2. New or increased malaise 3. Leukopenia 4. ≥5% atypical lymphocytes 5. Thrombocytopenia 6. Elevation of hepatic transaminases (ALT or AST) to 2 × upper limit of normal (applicable to nonliver transplant recipients) plus evidence of CMV in blood by viral culture, antigenemia or a DNA/RNA-based assay	Clinical and laboratory findings as in 'probable' case and no other cause of symptoms/signs identified
Pneumonia ¹	Signs and/or symptoms of pulmonary disease in the absence of other documented cause plus evidence of CMV in blood and/or ³ bronchoalveolar lavage (BAL) fluid by viral culture, antigenemia or a DNA/RNA-based assay	Signs and/or symptoms of pulmonary disease plus detection of CMV in lung tissue by culture, immunohistochemical analysis or <i>in situ</i> hybridization ⁴ with or without evidence of CMV in blood or BAL fluid by viral culture, antigenemia (BAL) or a DNA/RNA-based assay
Gastrointestinal disease	Symptoms of upper or lower gastrointestinal disease plus macroscopic mucosal lesions on endoscopy plus evidence of CMV in blood or biopsy tissue by viral culture, antigenemia or an RNA/DNA-based assay	Symptoms or signs of upper or lower gastrointestinal disease plus detection of CMV in gastrointestinal tissue by culture, immunohistochemical analysis or <i>in situ</i> hybridization ⁴
Hepatitis	Elevation of bilirubin and/or hepatic enzymes in the absence of other documented cause of hepatitis ² plus evidence of CMV in blood by anti-genemia or a DNR/RNA-based assay	Elevation of bilirubin and/or hepatic enzymes plus detection of CMV in liver tissue by culture, immunohistochemical analysis or <i>in situ</i> hybridization ⁴
CNS disease	CNS symptoms in the absence of other documented cause plus evidence for CMV in CSF samples by viral culture or DNA-based assay	CNS symptoms plus detection of CMV in CNS tissue by culture, immuno-histochemical analysis or <i>in situ</i> hybridization ⁴
Retinitis	Not applicable	Lesions typical of CMV retinitis must be confirmed by an ophthalmologist
Other tissue invasive disease (nephritis, cystitis, myocarditis, pancreatitis, etc.)	Evidence of organ dysfunction in the absence of other documented cause ² plus evidence of CMV in blood by viral culture, antigenemia or DNA/RNA-based assay	Symptoms/signs of organ dysfunction plus detection of CMV in affected tissue by culture, immunohistochemical analysis or <i>in situ</i> hybridization ⁴

¹ Superinfection or coinfection with other pathogens may occur and should be noted when present.

² If affected organ is the allograft, acute rejection must be excluded as a cause for the clinical symptoms.

³ The detection of CMV in both BAL and peripheral blood strengthens the evidence for probable CMV pneumonitis.

⁴ Although, immunohistochemistry and *in situ* hybridization techniques are more sensitive for the detection of CMV-infected cells than morphologic examination, the presence of typical cytomegalovirus inclusions should be considered evidence of definite disease.

Tableau 4: Incidence des infections et des maladies à CMV au sein de la population de transplantés rénaux à risque (tous les patients à l'exception des D-R-)

	Infection à CMV		Maladie à CMV		Suivi
	Préventif	Préemptif	Préventif	Préemptif	
(Khoury et al., 2006)	29%	59%*	8%	2%	12 mois
(Reischig et al., 2008)	59%	92%*	9%	6%	12 mois
(Kliem et al., 2008)	18%	51%*	5%	26%*	12 mois
(Sun et al., 2008)		36%	9.9%	2.6%	Variable

* p<0.05

Le taux de maladie à CMV dans la population à risque est faible quel que soit la stratégie antivirale utilisée (**Tableau 4**). Sans traitement à la fin des années 90, il était de 50% dans le sous-groupe de patients D+R- (Lowance et al., 1999), et de 20% chez les R+ (Sagedal et al., 2000). Le sous-groupe des D+R- est donc celui qui a bénéficié le plus de l'utilisation d'antiviraux en prophylaxie (Lowance et al., 1999). Avec un traitement préventif de 3 mois, le risque de maladie à CMV est d'environ 30% au cours de la première année (Paya et al., 2004). Ces maladies à CMV surviennent toutes après 3 mois (Sun et al., 2008). 70% de ces maladies tardives surviennent entre 3 et 6 mois et 25% entre 6 mois et 1 an (Humar et al., 2005). Pour diminuer leurs incidences, un traitement préventif pendant 6 mois est maintenant proposé. Avec cette stratégie prolongée, le taux de maladie à CMV observée au cours des 12 premiers post transplantation diminue encore à 15% (Humar et al., 2010).

2.2 Le virus en bref

Le cytomégalovirus humain (CMV), tient son nom de Weller *et al.* (Weller et al., 1960) qui l'ont ainsi qualifié pour l'effet cytopathique qu'il induit et son rôle dans la maladie des inclusions cytomégales du nouveau-né (**Figure 7**) (pour revue (Britt and Boppana, 2004)). Il appartient aux *Betaherpesvirinae*, et co-évolue avec l'homme, son réservoir unique depuis des milliers d'années. Le CMV est un virus complexe à ADN codant environ 200 cadres de lectures (open reading frame ou ORF). Il possède l'un des plus grands génomes des virus humains connus (230 à 250kpb). Le génome est composé de 2 séquences uniques, longue et courte (UL et US). Les ORF sont numérotés de façon séquentielle et sont nommés selon leur localisation sur les régions UL et US. Les fonctions des différents gènes sont établies d'après les séquences homologues retrouvées chez d'autres herpesvirus et les études réalisées *in vitro*. Certaines ont été élucidées suite à des délétions spontanées au cours de la culture d'autres après mutagenèse dirigée (Chee et al., 1990), (Dolan et al., 2004), (Dunn et al., 2003).

La capside est composée d'au moins 7 protéines dont : la Major Capsid Protein (MCP, pUL86), la minor Capsid Protein (mCP, pUL85), la minor Capsid Binding Protein (mC-BP, pUL46), la Smallest Capsid Protein (SCP, UL48-49) (Borst et al., 2001) et UL80 qui code un précurseur protéique de 708 aa, qui donne naissance à trois protéines (Varnum et al., 2004).

Le tégument est une structure amorphe et fibrillaire qui recouvre la capside et contribue à la morphologie du virion en maintenant la cohésion entre capside et enveloppe. Il

contient au moins 25 protéines (Gibson, 1996) qui permettent de créer un environnement cellulaire favorable à la production virale, et qui modulent la réponse cellulaire de l'hôte contre le CMV afin d'en atténuer les effets (évasion immune). Les plus importantes sont pp65 (UL83), pp150 (UL32), pp28 (UL99), pp71 (UL82) et ppUL48. Elles sont toutes phosphorylées et fortement immunogènes. Les protéines présentes dans le tégument vont pouvoir exercer une activité alors qu'elles ne sont ni synthétisées, ni exprimées à la surface (Varnum et al., 2004), (Crough and Khanna, 2009).

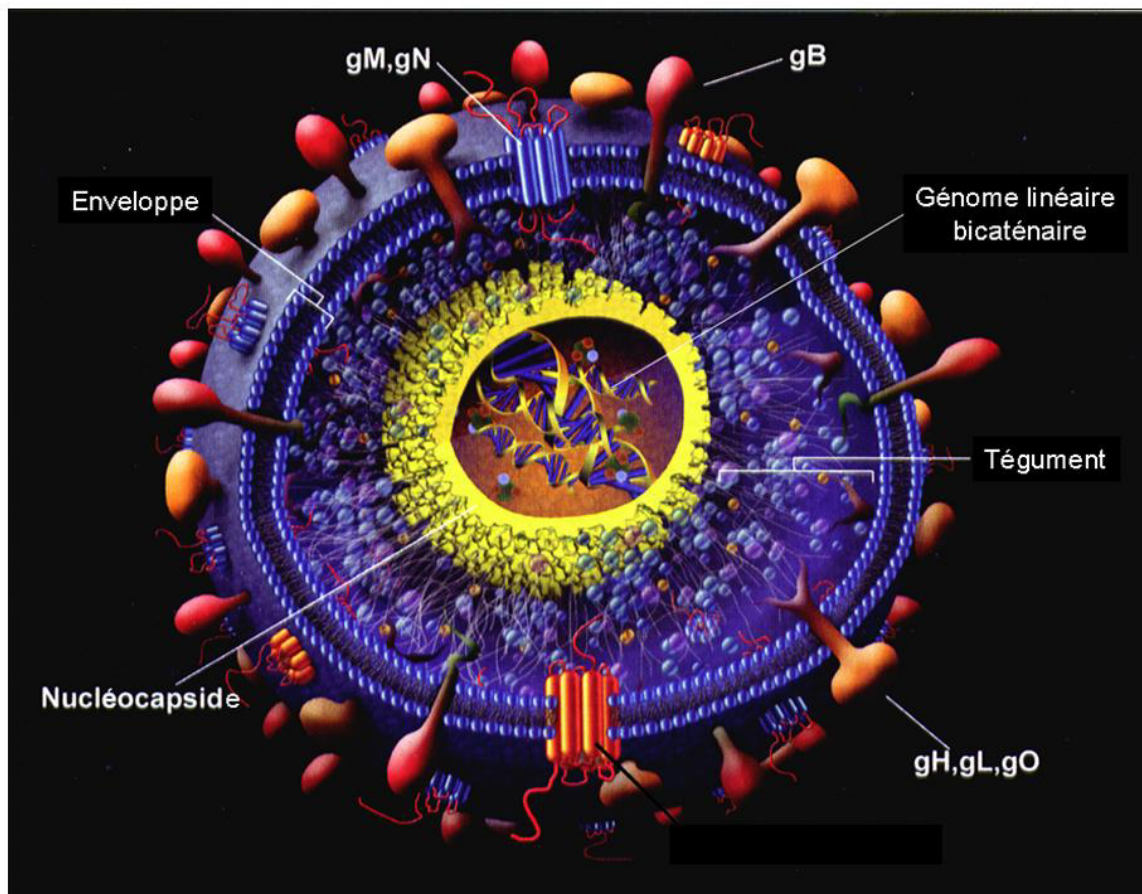


Figure 7: Représentation de la structure du cytomégalovirus humain (d'après Cytomegaloviruses Molecular Biology and Immunology, Reddehase, 2006) (g : glycoprotéine).

L'enveloppe est dérivée des membranes intra-cellulaires nucléaire et cytoplasmique : elle est composée d'une bi-couche lipidique dans laquelle sont enchassées des glycoprotéines virales. Parmi les *Herpesviridae*, le génome du CMV présente la particularité de coder potentiellement 60 glycoprotéines présentables sur l'enveloppe virale. Ces glycoprotéines sont des cibles importantes de l'immunité humorale. Trois complexes protéiques sont décrits : gCI composé de dimères de glycoprotéine B (gB) codée par UL55, gCII composé de gM (UL100) et gN (UL73) (Varnum et al., 2004) et gCIII regroupant gH (UL75), gL (UL115) et gO (UL74). La gB est le constituant majeur de l'enveloppe et est présente sur la membrane de la cellule infectée (Sanchez et al., 2000). D'autres protéines d'enveloppe, constituants mineurs, ne sont pas associées aux complexes, gp48 et gp39 par exemple.

La multiplication virale s'articule autour d'une cascade ordonnée de phases successives : très précoce (ou IE pour Immediate Early, 0 à 2 heures), précoce (E, early, <24 heures), tardive (L, late, >24 heures), chaque étape contrôlant la progression vers l'étape suivante. Schématiquement, les protéines IE sont responsables de la régulation positive et négative de gènes viraux et cellulaires et contrôlent leur propre expression. Les protéines E

sont indispensables à la réplication du génome. L'ADN est alors répliqué et pendant la phase tardive, les protéines structurales sont synthétisées. L'encapsidation a lieu dans le noyau, les protéines du tégment s'associent au virion, certaines dans le compartiment nucléaire, d'autres lorsqu'il est en progression dans le cytoplasme (Sampaio et al., 2005). Enfin l'enveloppe et les glycoprotéines virales sont acquises au niveau de l'ergastoplasme et/ou de l'appareil de Golgi. Le virion néo-formé sort de la cellule par exocytose. Le cycle de réplication du CMV est lent ; dans des fibroblastes humains infectés, la libération des nouveaux virions commence au mieux après 48 à 72h. La quantité libérée est maximale à partir de 72 à 96 heures. La production virale se poursuit pendant plusieurs jours à un niveau élevé. Plusieurs milliers de copies de génomes sont produits dans la cellule infectée et les virions sont libérés sur une période de 24 à 48 heures (Penfold and Mocarski, 1997). La cellule peut mourir après 4 ou 5 jours.

Trois types de particules virales sont retrouvées dans les cellules infectées : les virions complets infectieux, les particules enveloppées non infectieuses (dépourvues d'ADN) et les corps denses, particules riches en protéines du tégment et recouvertes d'une enveloppe dérivée du cytoplasme (Gibson, 1996). Ces différentes formes sont retrouvées en proportions variables selon la souche utilisée pour l'infection *in vitro* et la charge virale d'infection.

2.3 Entrée, dissémination et Latence du CMV :

L'entrée du CMV dans la cellule se fait par une fixation non spécifique qui fait d'abord intervenir l'héparan-sulfate et l'annexine II à la surface cellulaire ; puis les glycoprotéines virales, gB, gH et complexe gM/gN, se fixent spécifiquement sur les récepteurs membranaires (Compton et al., 1993). Les récepteurs cellulaires sont probablement multiples mais pas encore caractérisés de façon sûre. L'EGFR (epidermal growth factor receptor) semble être nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule (Wang et al., 2003) mais cette donnée a été récemment contestée (Isaacson et al., 2007). DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin, molécule présente sur les cellules dendritiques) seraient un autre récepteurs potentiels qui interagirait avec la gB (Halary et al., 2002). Le CMV humain a un tropisme très large, et a la capacité d'infecter tous les organes. Le génome du CMV est en effet détectable dans plusieurs types cellulaires comme les cellules fibroblastiques, endothéliales, épithéliales, les monocytes/macrophages, les lymphocytes les cellules musculaires lisses, les progéniteurs médullaires, les granulocytes, les cellules dendritiques (Rice et al., 1984), (Sinzger et al., 1995), (Gerna et al., 2000), (Sissons et al., 2002), (Crough and Khanna, 2009). La présence d'ADN du CMV dans certaines cellules ne reflète pas nécessairement la présence d'une réplication virale. En effet, la réplication du virus est possible dans les cellules différenciées, alors qu'elle ne l'est pas dans les cellules immatures indifférenciées (Sissons et al., 2002). *In vivo* et *in vitro*, la réplication virale dans les monocytes est le plus souvent bloquée, alors qu'elle est tout à fait possible dans les macrophages différenciés. Par ailleurs *in vitro*, la réplication virale est beaucoup moins importante dans les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les épithéliales que dans les fibroblastes (Soderberg-Naucler, 2006).

En revanche les cellules non permissives ont la capacité de jouer un rôle dans la dissémination du virus. Les cellules endothéliales et monocytaires contribuent largement à la diffusion du virus par voie hématogène notamment dans les infections sévères (Percivalle et al., 1993), (Crough and Khanna, 2009), (Grefte et al., 1993).

Après la primo-infection, le génome viral reste présent dans l'organisme au cours d'une phase dite de latence, dans les cellules monocytaires (Sinclair and Sissons, 1996), les cellules dendritiques (Reeves et al., 2005), les cellules endothéliales et les progéniteurs

CD34+ à l'origine des lignées granuleuse, macrophagique et dendritique (Hahn et al., 1998), (Mendelson et al., 1996). De l'ADN viral est ainsi détectable dans les cellules mononucléées issues de sang périphérique ou de moelle de donneurs sains séropositifs pour le CMV, en l'absence de production de particules virales infectieuses. En phase de latence, le génome du CMV est retrouvé dans 0.004% à 0.01% des cellules mononucléées issues du sang périphérique ou de la moelle des patients séropositifs pour le CMV (Slobedman and Mocarski, 1999). Plusieurs études supportent l'idée que le CMV exprime transitoirement un ensemble de gènes spécifiques et nécessaires à cette phase de latence (Cheung et al., 2006), (Goodrum et al., 2002), (Goodrum et al., 2007). Par intermittence et à fréquence variable, la multiplication virale peut reprendre : ces réactivations sont généralement inapparentes et sans conséquence pour le patient immunocompétent. Les mécanismes conduisant à la réactivation ne sont pas bien élucidés. La baisse de l'immunité cellulaire conduit bien évidemment à une réactivation. Cela a été bien observé et décrits chez l'homme au cours de l'infection par le VIH au stade SIDA, en transplantation d'organe, et au cours de certains déficits rares de l'immunité congénitaux. Mais on sait aussi depuis longtemps que la stimulation allogénique des cellules mononucléées du sang favorise la réactivation du CMV (Soderberg-Naucler et al., 1997b). La réactivation du CMV peut en réalité être détectée en réponse à une inflammation, un stress ou une infection. Un des médiateur clé de cette réactivation est le TNF- α qui après avoir engagé son récepteur active la Protéine Kinase C et le NF- κ B pour entraîner la transcription des gènes IE du CMV et déclencher sa réplication. Des catécholamines et des prostaglandines pro-inflammatoires peuvent aussi entraîner la réplication du CMV (Crough and Khanna, 2009), (Soderberg-Naucler, 2006), (Grefte et al., 1993), (Percivalle et al., 1993).

2.4 Rôle des cellules endothéliales

In vitro, toutes les souches virales du CMV n'ont pas un tropisme endothélial. Cette caractéristique est prédéterminée dans le génome viral (Gerna et al., 2006b). L'entrée du virus dans ces cellules fait intervenir un complexe protéique caractéristique. Les produits des gènes UL131A-UL128 du CMV forment un complexe avec les glycoprotéines H (gH) and L (gL) qui abouti à la formation du complexe gH/gL/UL131A-UL128. Ce complexe protéique est nécessaire à l'entrée du CMV dans les cellules endothéliales et épithéliales. Au contraire l'entrée du virus dans les fibroblastes ne nécessite que le complexe gH/gL/gO (ou gH/gL).

Le CMV persiste à l'état de latence dans les cellules endothéliales et peut s'y répliquer (Jarvis and Nelson, 2002). Mais des cellules endothéliales géantes infectées peuvent être détectées dans le sang périphérique lors d'infection systémique sévère chez les patients transplantés ou infectés par le VIH. Ces cellules circulantes participent ainsi à la dissémination du virus à tout l'organisme (Percivalle et al., 1993), (Grefte et al., 1993).

Par ailleurs des études in vitro montrent clairement que les cellules endothéliales humaines infectées par le CMV ont une réponse pro-angiogénique (Bentz and Yurochko, 2008). Les protéines retrouvées dans le surnagent de culture des cellules infectées par les CMV accélèrent l'angiogénèse en stabilisant les cellules endothéliales (Dumortier et al., 2008). Une fois infectées, elles prolifèrent et peuvent migrer afin de former de nouveaux capillaires (van de Berg et al.). Elles sur-expriment aussi des molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Bruggeman and van Dam-Mieras, 1991), (Sedmak et al., 1994), (Shahgasempour et al., 1997), (Burns et al., 1999). Etant donné que le CMV induit la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (Zhou et al., 1999), (Lemstrom et al., 1993a), (Lemstrom et al., 1993b) et augmente la consommation par les cellules musculaires lisses de LDL-cholestérol (Zhou et al., 1996a), ce virus pourrait induire des lésions vasculaires (Soderberg-Naucler, 2006). Dans un modèle murin de souris avec une hyper LDL-cholestérolémie (knockout pour l'ApoE), l'infection à CMV accélère l'apparition des lésions d'athérosclérose, via la

production systémique d'interféron- γ et de TNF- α (Vliegen et al., 2004). Chez l'homme, la séroposivité pour le CMV est aussi associée à plus de lésions coronariennes d'athérosclérose (Speir et al., 1994), (Zhou et al., 1996b), (McDonald et al., 1989). Cette pathologie vasculaire complexe est multifactorielle et influencée par des facteurs environnementaux. L'infection à CMV n'y jouerait pas un rôle déclencheur mais plutôt une action potentiellement accélératrice sur ces lésions.

2.5 Rôle des monocytes

Les monocytes sont les premières cellules infiltrant les organes infectés par le CMV (Pulliam, 1991), (Booss et al., 1989). Chez les sujets sains, le CMV est détecté à l'état latent dans les monocytes (Taylor-Wiedeman et al., 1991), (Jarvis and Nelson, 2002). Mais in vitro, les monocytes ne sont pas le siège d'une répllication virale (Ibanez et al., 1991). Le CMV peut en revanche se répliquer dans les macrophages différenciés à partir des monocytes, in vitro et in vivo (Ibanez et al., 1991), (Pulliam et al., 1995), (Sinzger et al., 1995), (Sinzger et al., 1996).

Il est proposé que les monocytes soient responsables de la dissémination du virus. Les monocytes infectés expriment plus de cytokines et de chimiokines, adhèrent aux cellules endothéliales sont capable de migrer au travers de l'endothélium (**Figure 8**) (Smith et al., 2004). Après infection, ils évoluent vers un phénotype macrophagique ce qui leur confèrent une durée de vie plus longue favorable à cette dissémination. Ce phénotype est proche du phénotype macrophagique de type 1 (M1) décrit par Martinez (Martinez et al., 2006), et est caractérisé par la production d'IL-12, d'interféron- α , d'IL-1, d'IL6 et de TNF- α (Chan et al., 2008). Le CMV entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-8 via la stimulation de TLR-2 et du CD14 dans les monocytes (Compton et al., 2003).

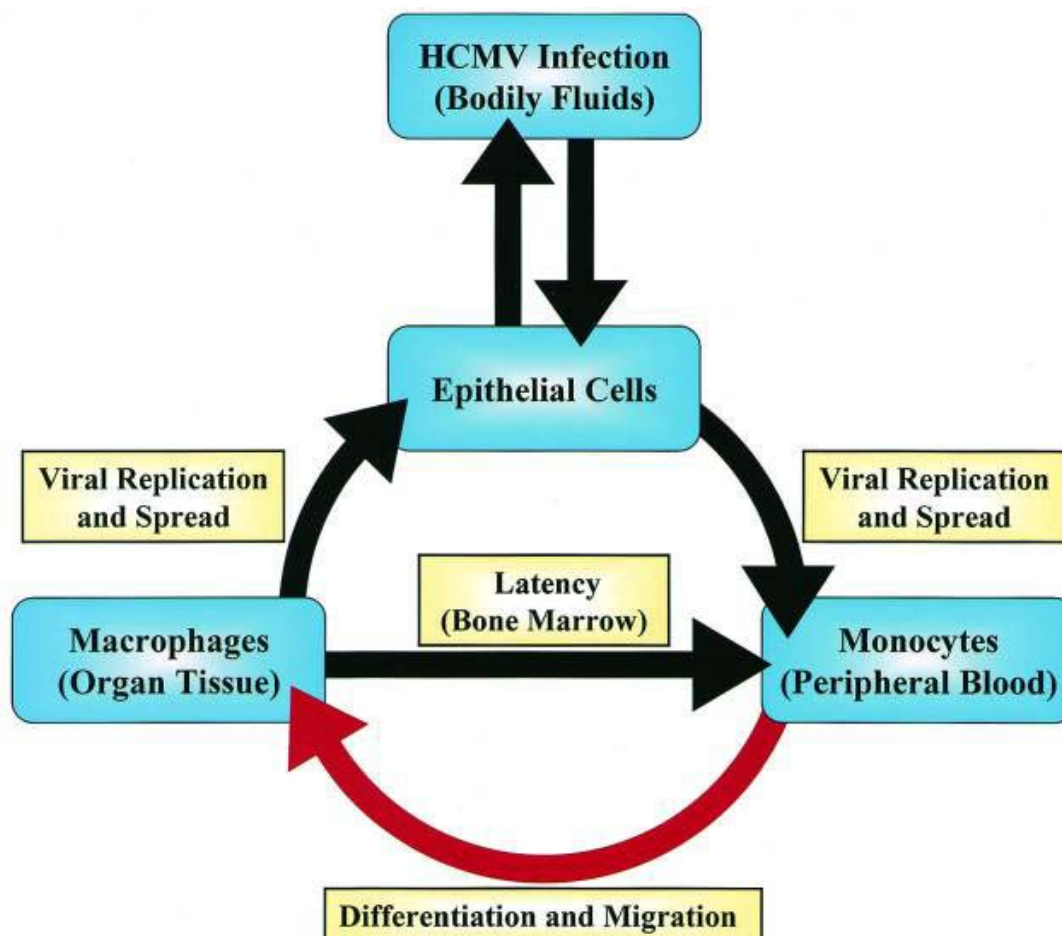


Figure 8: Model for HCMV infection and dissemination in the host. Epithelial cells of the host are infected by contact with HCMV-containing bodily fluids. HCMV then replicates and spreads to monocytes in the peripheral blood by an unknown mechanism. As indicated by the red arrow, our data suggest that primary infection of monocytes promotes both their migration into host organ tissue and their differentiation into permissive macrophages. These macrophages could become sites of persistent infection in the host tissue. The possibility also exists that HCMV-induced macrophages could migrate into the bone marrow and infect myeloid progenitor cells, which are believed to be sites of HCMV latency (d'après (Smith et al., 2004)).

Une fois infectés par le CMV, les macrophages ont la capacité de présenter des peptides du CMV grâce à leurs molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, de stimuler et d'activer des lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV en leur faisant produire de grandes quantités d'interféron- γ (Sinzger et al., 2006).

La réplication dans les macrophages qui se différencient des monocytes est aussi sous la dépendance de cytokines comme le GM-CSF (Santin et al., 1999), l'interféron- γ et le TNF- α (Pulliam et al., 1995), (Soderberg-Naucler et al., 1997a), (Soderberg-Naucler et al., 2001). Le TNF- α active le promoteur des gènes IE du CMV dans les cellules de la lignée myéloïde, ce qui permet d'augmenter la réplication du virus (Stein et al., 1993), (Soderberg-Naucler, 2006). Cependant les mécanismes moléculaires conduisant à la réactivation du CMV dans les cellules macrophages plus différenciés restent mal compris. Le fait que cette réplication dans les macrophages soit sous la dépendance de cytokines comme l'interféron- γ et le TNF- α , deux cytokines produites par les lymphocytes T, peut expliquer les réactivations cliniques du CMV observées au cours de pathologies où les lymphocytes T sont activés, comme dans le rejet aigu de greffe (Koskinen et al., 1993a) ou certains sepsis (Kutza et al., 1998), (Freeman, 2009).

2.6 Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des régulateurs clés du système immunitaire, capable d'activer les cellules T naïves. Elles assurent un pont entre immunité innée et immunité adaptative. Leur fonction principale est de sonder et de capturer les antigènes dans les différents tissus de l'organisme afin de les présenter dans les ganglions aux cellules du système adaptatif.

Les cellules dendritiques dérivées des monocytes en GM-CSF et IL-4, comme les monocytes d'ailleurs, sont permissives aux souches virales endothéliotropes, alors qu'elles ne le sont pas avec des souches adaptées aux fibroblastes. Cette infection altère significativement leurs capacités à activer et à faire proliférer les lymphocytes T (Moutaftsi et al., 2002), (Beck et al., 2003), en leur faisant produire un facteur soluble immunosuppresseur, le CD83 (Senechal et al., 2004). Elle altère aussi leur capacité à présenter les antigènes au sein de leurs complexes majeurs d'histocompatibilité, l'expression des molécules de costimulation ainsi que leur capacité à produire des cytokines comme l'IL-12. Cette cytokine semble pourtant produite par les cellules dendritiques au cours de l'infection à CMV dans des modèles murins (Dalod et al., 2002), mais aussi chez l'homme (Renneson et al., 2009) et pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection (Hoffmann et al., 2008). Malgré cela, l'infection par le CMV des cellules dendritiques dérivées des monocytes, permet d'obtenir une présentation des peptides et d'activer les lymphocytes T CD4+ et CD8 spécifiques du CMV en les orientant vers une production de cytokines de type Th1 (Lozza et al., 2005), (Gerna et al., 2006a).

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les cellules dendritiques CD11c+ CD123- isolés à partir du sang périphérique sont activées et produisent de l'interféron- α après contact avec le CMV, mais seules les cellules dendritiques CD11c+ CD123- peuvent être infectées par le virus. A la différence des cellules dendritiques dérivées des monocytes, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les cellules dendritiques CD11c+ CD123- au contact du CMV ont une augmentation de l'expression membranaires des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II et gardent la capacité à activer les lymphocytes T (Kvale et al., 2006). Ces cellules dendritiques ont donc la capacité d'initier une réponse adaptative anti-CMV efficace chez l'homme. Leur diminution dans le sang des patients transplantés rénaux explique en partie la susceptibilité des ces patients vis-à-vis de l'infection par ce virus (Kvale et al., 2006).

2.7 Rôle des cellules NK

Chez les souris déficientes en cellules B, la déplétion seule en lymphocytes NK n'est pas suffisante pour entraîner la réactivation d'une infection à CMV. La déplétion en lymphocytes T alpha beta CD4+ et CD8+ entraîne une réactivation du CMV dans les glandes salivaires et les poumons des souris, mais pas dans la rate. Les lymphocytes NK jouent donc un rôle exclusif anti-CMV dans la rate (Polic et al., 1998). Par ailleurs, le transfert adoptif de cellules NK dans d'autres modèles de souris fournit une protection contre l'infection à CMV (Bukowski et al., 1985).

Chez l'homme, l'action des cellules NK reste beaucoup moins évidente. Il a déjà été rapporté qu'un déficit en cellules NK était associé avec des infections à herpes virus dont une maladie à CMV (Biron et al., 1989), et que le nombre de cellules NK diminuait au cours de l'infection à CMV dans le sang périphérique (Fildes et al., 2008). En transplantation rénale, l'activité NK (mesurée grossièrement par leur capacité à lyser les cellules K562) augmente au cours de l'infection à CMV et est corrélée au taux circulant de cellules NK (Venema et al., 1994). Traditionnellement classées dans l'immunité innée, il a été très récemment démontré qu'elles avaient des propriétés de mémoires caractéristiques de l'immunité adaptative (Sun et al., 2009).

L'action des cellules NK contre les cellules infectées par le CMV fait intervenir un panel de récepteurs qui vont moduler l'action de ces cellules. Ces récepteurs sont composés de KIR (pour killer cell immunoglobulin-like receptors) activateurs et inhibiteurs et de récepteurs appartenant à la famille des lectines de type C (NKG2D et NKDC). La sommation de tous ces signaux activateurs et inhibiteurs dirige la cellule NK vers une action effectrice ou au contraire vers une inhibition de cette action. Par exemple, HLA-E est surexprimé à la surface des cellules infectées sous l'action du CMV (UL40) ce qui aboutit à l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK via l'engagement du récepteur inhibiteur CD94-CKG2A (Tomasec et al., 2000). En transplantation rénale les cellules NK ne semblent pas affectées par l'immunosuppression (Wai et al., 2008). La protection vis-à-vis d'une infection à CMV augmente d'ailleurs avec le nombre de récepteurs KIR activateurs présents chez les receveurs (Stern et al., 2008). L'absence d'HLA-C et la présence de KIR activateurs chez les receveurs sont donc associés à moins d'infection à CMV. Par ailleurs, au cours de l'infection à CMV, les cellules NK sur-expriment les récepteurs activateurs NKG2D et NKG2C (Hadaya et al., 2008). Cette expansion est induite probablement par l'IL15 et par les cellules infectées elle-même (Guma et al., 2006) et participe probablement au contrôle de l'infection par les cellules NK.

Enfin, les cellules NK ont la capacité à développer une cytotoxicité dépendante d'anticorps fixés sur les cellules cibles (ADCC). Cette propriété repose sur l'expression à leur

membrane de la molécule CD16 (FcγRIIIA), qui est présente aussi sur les monocytes. Ce récepteur de basse affinité pour le fragment de Fc des immunoglobulines de type G, a la capacité d'activer les cellules NK, via la chaîne CD3-ζ, quand les immunoglobulines de type G sont fixés sur leur cible antigénique (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Chez la souris, une ADCC contre les cellules infectées par le CMV peut être mise en œuvre par les cellules NK (Quinnan and Manischewitz, 1979). Chez l'homme, une ADCC par des cellules NK dirigée contre des fibroblastes infectés par le CMV a pu être démontrée in vitro mais cette cytotoxicité paraît assez modérée et nécessite la présence d'IL-2 ou d'IL-15 (Lang et al., 2004), (Forthal et al., 2001).

2.8 La réponse adaptative humorale

La place de la réponse humorale et des IgG anti-CMV dans le contrôle au long cours de l'infection à CMV n'est pas fondamentale, car des souris sans lymphocytes B sont capables de guérir d'une infection à CMV très rapidement sans développer par la suite de réactivation virale (Polic et al., 1998). Par ailleurs en transplantation rénale, le traitement par immunoglobulines G spécifique du CMV n'a pas fait preuve d'une grande efficacité dans le contrôle de l'infection, bien qu'elles puissent la prévenir si elles sont administrées dans les premiers mois post-greffe (Snydman et al., 1987).

Les immunoglobulines de type G anti-CMV peuvent être détectées dans le sang après une primo-infection à CMV environ 15 jours après l'apparition d'une virémie (Gamadia et al., 2003). La présence d'immunoglobulines de type G anti-CMV est très bien corrélée à la réponse cellulaire T CD4+ spécifique du CMV (Sester et al., 2003). Il existe cependant une mauvaise corrélation entre le taux d'immunoglobulines de type G anti-CMV détecté par ELISA et le taux d'immunoglobulines de type G anti-CMV réellement neutralisantes. En effet, un quart des individus ayant des taux élevés d'anticorps, n'ont en fait aucun anticorps neutralisants (Leogrande et al., 1992). Ceci explique peut-être pourquoi certains patients ont des infections plus sévères que d'autres. En transplantation d'organes solides après la mise en place d'un traitement préventif de 100 jours chez des patients D+R- pour le CMV, on observe une séroconversion d'immunoglobulines de type M anti-CMV chez 8% des patients à M3, 42% à M6 et 55% à M12. La séroconversion d'immunoglobulines de type G anti-CMV apparaît chez 27% des patients à M3, 63% à M6 et 75% à M12. (**Figure 9**). La moitié de ces patients développe des anticorps dans la première année de greffe, sans faire de maladie et/ou d'infection. Un tiers de ces patients ne font ni maladie ni séroconversion (Humar et al., 2005).

Le rôle principal des immunoglobulines de type G anti-CMV semble être de limiter la dissémination du virus (Jonjic et al., 1994). La cible principale de ces immunoglobulines G neutralisantes est la gB, qui est la cible de 40 à 70 % des immunoglobulines spécifiques du CMV (Marshall et al., 1992), (Britt et al., 1990). Une autre cible plus mineure des immunoglobulines spécifiques du CMV est la gH (détectée chez environ 10% des individus) (Rasmussen et al., 1991). Ces anticorps inhibent effectivement l'entrée du virus dans les cellules mais comme le virus peut se propager de cellules à cellules par les jonctions serrées sans passer par le milieu extracellulaire, il est protégé de l'effet neutralisant des anticorps par les épithéliums. Au cours d'une primo-infection à CMV, la réponse humorale neutralisant l'infection des cellules endothéliales est efficace. Elle apparaît très rapidement et est dirigée directement contre les produits des gènes UL131A-128. Au contraire la réponse humorale contre l'infection des fibroblastes apparaît tardivement et est relativement faible (Gerna et al., 2008), (Revello and Gerna, 2010), (Macagno et al., 2010).

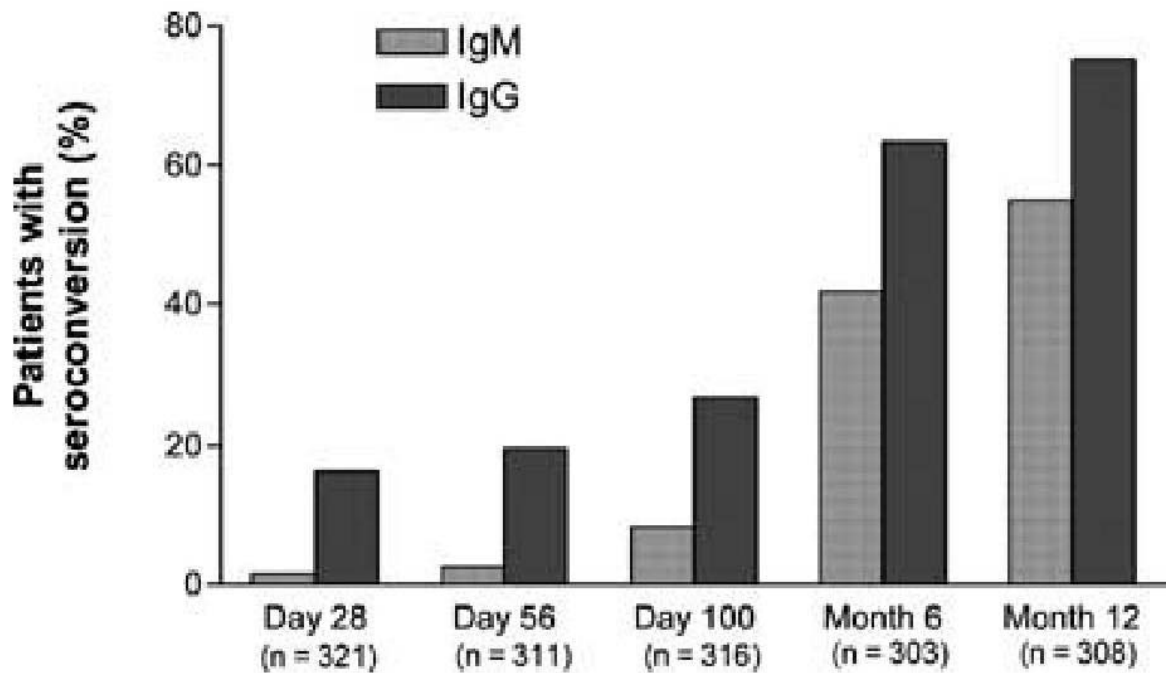


Figure 9: Cinétique de séroconversion des immunoglobulines de type M (IgM) et G (IgG) en transplantation d'organes solides chez des patients D+/R- recevant un traitement préventifs (D'après (Humar et al., 2005)).

2.9 La réponse adaptative cellulaire T alpha beta CD8+

Le rôle essentiel des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection à cytomégalovirus est connu depuis longtemps (Mutter et al., 1988). Mais il existe une redondance entre les différents acteurs de l'immunité cellulaire qui peuvent se substituer l'un à l'autre pour contrôler le virus. Chez la souris, la déplétion seule en lymphocytes T CD8+ n'est pas suffisante pour entraîner la réactivation d'une infection à CMV. En revanche, en l'absence de cellules NK, la déplétion en lymphocytes T CD8+ entraîne de façon quasi-systématique une réactivation du CMV dans les glandes salivaires et les poumons des souris, alors que la déplétion en lymphocytes T CD4+ entraîne une infection dans seulement 25% des cas (Polic et al., 1998). Au sein de l'immunité adaptative, le lymphocyte T CD8+ occupe donc une place centrale et majeure dans le contrôle de cette infection. Chez l'homme, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8+ spécifique du CMV permet de contrôler des infections actives à CMV, en particulier chez les patients ayant reçu une allogreffe de moelle. Ces expériences de thérapies cellulaires démontrent clairement et directement le rôle fondamental du lymphocyte T CD8+ dans l'immunologie adaptative anti-CMV (Riddell et al., 1992), (Walter et al., 1995), (Cobbold et al., 2005). Ce type de traitement est aussi en train d'émerger en transplantation d'organe solide chez les patients résistants aux anti-viraux (Brestrich et al., 2009).

2.9.1 Cibles virales et réponse oligoclonale

L'analyse exhaustive de la réponse cellulaire contre le CMV a été effectuée en 2005 grâce à 13687 peptides chevauchants de 15 acides aminés correspondant aux 215 ORF du génome du CMV. Elle montre que les lymphocytes T CD8+ reconnaissent 50.2% des ORF du génome du CMV. Les ORF suivants (UL48, UL83, UL123) sont reconnus par plus de la moitié des individus (**Figure 10**).

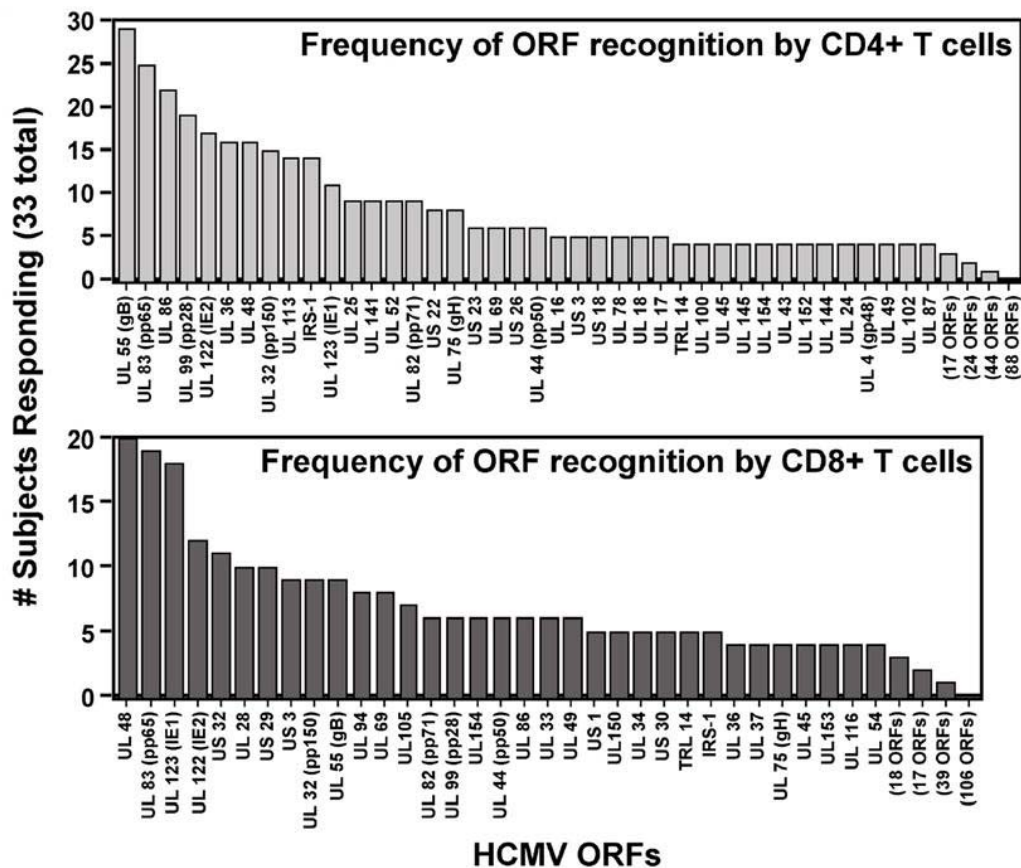


Figure 10: Reconnaissance des ORF du génome du CMV par les lymphocytes T CD8+ et CD4+ chez 33 sujets sains (D'après (Sylwester et al., 2005)).

Chez des transplantés cardiaques et pulmonaires, la présence de lymphocytes T CD8+ spécifique de IE-1 (UL123) est associée à moins de maladie à CMV par réactivation (Bunde et al., 2005). Les protéines issues d'UL123 sont les premières à être exprimées lors d'une réactivation. Les patients ayant des lymphocytes T spécifiques d'IE-1 pourraient donc mettre en œuvre une réponse cellulaire plus rapidement, à un stade où l'infection n'est pas encore trop importante. Or c'est le polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité qui détermine les types de peptides présentés aux lymphocytes T CD8+. Les patients avec des molécules B7 et A2 présentent en effet préférentiellement le peptide d'UL83 via la molécule B7 (Lacey et al., 2003). On peut donc penser que c'est la sélection peptidique réalisée par le complexe majeur d'histocompatibilité qui oriente l'efficacité et la rapidité de la réponse cellulaire T. D'une façon générale, l'importance de la reconnaissance par les lymphocytes T CD8+ de chaque ORF est proportionnelle à la taille de l'ORF dans le génome du CMV (Tableau 5). Il y a cependant quelques exceptions : Les peptides issus des gènes IE et d'évasion immune mobilisent 3 fois et 1.7 fois plus de lymphocytes T CD8+ qu'ils ne prennent de place au sein du génome du CMV. A la phase aiguë de l'infection la réponse T CD8+ est polyclonale avec plusieurs clones mis en jeu pour un seul épitope. A la phase chronique après la phase de contraction, la réponse T CD8+ est oligoclonale (Day et al., 2007), (Babel et al., 2009). Les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV immunodominants ont une avidité pour l'antigène très largement supérieure aux autres clones T CD8+ non dominants spécifiques du CMV. Cela démontre que l'affinité du TCR pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I présentant le peptide est un élément capital qui détermine à long terme les populations lymphocytaires T CD8+ persistantes et dominantes chez les individus infectés (Price et al., 2005). A titre d'exemple les lymphocytes T CD8+ spécifiques du peptide NLVP (pp65) présentés par la molécule HLA-A2 sont composés de plusieurs clones contenant un TCR public (TCR contenant un CDR3 conservé et partagé par

plusieurs individus). Cette restriction clonale de la réponse T CD8+ NLVP/HLA-A2 est très vraisemblablement sous la dépendance de l'affinité et l'avidité du TCR pour l'antigène (Trautmann et al., 2005). Chez un individu donné, les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV reconnaissent en moyenne 8 ORF du génome du CMV (Sylwester et al., 2005). Il n'est donc pas étonnant de constater que les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV représentent 4.6% des lymphocytes T CD8+ totaux du sang périphérique et 10.2% des lymphocytes T CD8+ mémoires (Figure 11). Enfin, dans la population séropositive pour le CMV, on retrouve significativement plus de lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifiques du CMV chez les patients transplantés rénaux que chez les sujets sains (Gamadia et al., 2001).

Tableau 5 : Reconnaissance T des ORF du génome du CMV (D'après (Sylwester et al., 2005)).

Category ^a	Number of HCMV ORFs (% of 213)	Genomic coding space %	CD4+ T cells		CD8+ T cells			
			Positive responses ^b (n = 499) %	Average positive response ± SEM ^d	Positive responses ^b (n = 378) %	Average positive response ± SEM ^d	Ratio ^c	
Kinetics								
Immediate-early	8 (3.8)	4.6	10.4**	2.3	0.58 ± 0.09	13.8**	3.0	2.23 ± 0.45
Early	56 (26.3)	29.3	29.5	1.0	0.85 ± 0.11	23.3*	0.8	0.55 ± 0.09
Early-late	41 (19.2)	22.9	19.2	0.8	0.73 ± 0.15	20.9	0.9	0.71 ± 0.09
Late	47 (22.1)	22.3	27.9**	1.3	0.75 ± 0.10	27.5*	1.2	1.35 ± 0.21
Function								
Capsid	7 (3.3)	8.1	9.8	1.2	0.79 ± 0.20	9.5	1.2	0.70 ± 0.26
Matrix/tegument	23 (10.8)	17.0	27.1**	1.6	0.74 ± 0.09	20.4	1.2	1.46 ± 0.26
Glycoprotein	19 (8.9)	8.6	13.8**	1.6	1.03 ± 0.19	7.4	0.9	0.50 ± 0.11
DNA/regulatory	23 (10.8)	18.5	15.8	0.9	0.50 ± 0.07	24.6**	1.3	1.42 ± 0.27
Immune evasion ^e	27 (12.7)	10.5	20.0**	1.9	0.82 ± 0.11	18.0**	1.7	1.25 ± 0.24
Localization								
Dense bodies	17 (8.0)	17.0	27.0**	1.6	0.88 ± 0.09	22.4*	1.3	1.16 ± 0.17
Virion	60 (28.2)	43.7	55.3**	1.3	0.84 ± 0.08	50.0*	1.1	1.13 ± 0.13

^aSee Table S1 for specific ORF assignments to each category.

^bp-value from comparison of percentage of genomic coding space vs. percentage of positive response values: <0.05 (*) or <0.005 (**).

^cRatio: percentage of positive responses/percentage of genomic coding space.

^dPercentage of peripheral blood memory compartment.

^eORFs implicated in immune evasion that are not essential for optimal in vitro growth (may overlap with other functional categories).

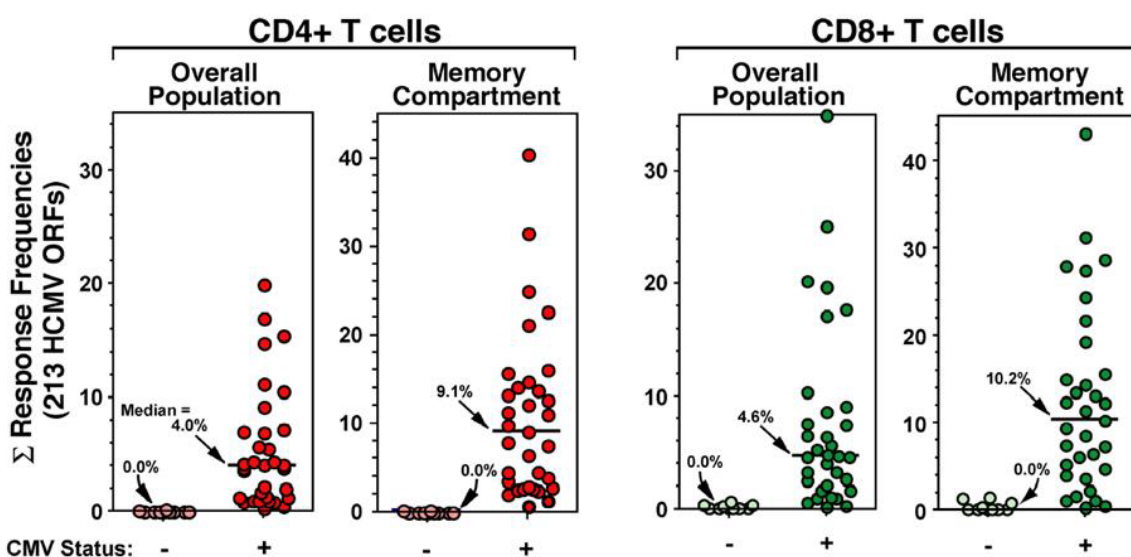


Figure 11: Importance de la réponse cellulaire T alpha beta contre les peptides issus des 213 ORF du génome du CMV (D'après (Sylwester et al., 2005)).

2.9.2 Cinétique d'apparition

Après une primo-infection à CMV, les lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifiques du virus sont détectés dans le sang environ 20 jours après l'apparition de la virémie chez les patients transplantés rénaux (Gamadia et al., 2003). A cette phase de virémie, le pourcentage de lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifiques du CMV est plus important que le pourcentage de lymphocytes T alpha beta CD4+ spécifiques du CMV (Sester et al., 2002). Après réactivation (chez les patients séropositifs pour le CMV au moment de la greffe), le nombre de lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifiques du virus augmente de nouveau dans le sang périphérique après cette nouvelle stimulation du système immunitaire (Gamadia et al., 2004b).

2.9.3 Phénotype

L'analyse phénotypique des lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifiques du CMV à la phase aiguë de l'infection a été réalisée chez des transplantés rénaux par l'équipe de R. Van Lier à Amsterdam grâce à des tétramères HLA chargés avec peptides issus de UL83 (pp65). Ils ont observé lors d'une primo-infection par le CMV (au cours de la virémie) que les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV avaient, un phénotype CD27+, CD28+, CD45RO+, CD45RA-, CCR7-, Perforine+, Granzyme B+, Ki67++ (**Figure 12**) (Gamadia et al., 2003). Ce phénotype CD27+ CD28+ correspond à un phénotype de différenciation précoce des cellules T après stimulation antigénique (Appay et al., 2002). A la phase chronique de l'infection (immunoglobulines de type G anti-CMV positive avec une PCR sanguine négative), l'analyse phénotypique des lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifiques du CMV montre qu'ils sont divisés en deux populations : 1/ Une population qui est CD27+, CD28-, CD45RA-, Perforine+/-, Granzyme A-B+/-, CCR7-, CD127(IL7Ralpha)+. Cette population dite « central/memory » se retrouve dans d'autres infections chroniques (VIH, EBV), a la capacité de proliférer après une activation par le TCR et exprime un faible potentiel cytotoxique in vitro. 2/ L'autre population est CD27-, CD28-, CD45RA+, Perforine++, Granzyme A-B++, CCR7-, CD62L-, CD57+, CD127(IL7Ralpha)-. Cette population dite « TEMRA » pour « terminally differentiated effector memory cells » est propre et spécifique à l'infection chronique à CMV (Kuijpers et al., 2003). Elle a une faible capacité de prolifération après une activation TCR mais a en revanche un gros potentiel cytotoxique in vitro (Hamann et al., 1997), (Sallusto et al., 1999). La différenciation des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV se traduit par la perte progressive du CD27, du CD28, de CCR7 (marqueur de homing lymphocytaire) et par l'acquisition de marqueurs de cytotoxicité (Appay et al., 2002). L'infection à CMV induit aussi des récepteur NK sur les cellules T CD8+ spécifiques du CMV. Le niveau d'expression des gènes codant pour les récepteurs NK au cours de l'infection à CMV est récapitulé dans le **tableau 6** (van Stijn et al., 2008).

La cohabitation de cellules « central/memory » et de cellules effectrices TEMRA plus différenciées traduit probablement des relations hôte-CMV différentes entre les individus. Parmi les lymphocytes T CD8+ du sang périphérique, la présence significative de lymphocytes T CD8+ CD45RA+ CD27- caractérise une infection ancienne à CMV. On peut considérer cette population et ce phénotype comme une empreinte laissée par le CMV sur le système immunitaire. Le nombre absolu de lymphocytes T CD8+ CD45RA+ CD27- est beaucoup plus important dans le sang des patients ayant été infectés par le CMV après transplantation rénale que chez les sujets sains séropositifs pour le CMV (Kuijpers et al., 2003). Plus précisément, à la phase chronique de l'infection chez le transplanté rénal, la population TEMRA représente environ 75 % des lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifiques du CMV, alors qu'elle n'en représente que 50% chez les individus sains séropositifs pour le

CMV (Gamadia et al., 2001). La réactivation d'une infection à CMV après transplantation rénale chez des sujets séropositifs pour le CMV entraîne la perte progressive du CD27 à la surface des cellules T CD8+ spécifiques du CMV « central memory » et une augmentation du pourcentage de cellules T CD45RA+ CD27- qui est d'ailleurs parfaitement bien corrélé au nombre de cellules T CD8+ spécifique du CMV. Les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV au cours d'une réactivation expriment transitoirement le CD70 qui engage son ligand le CD27, entraînant ainsi sa disparition de la membrane cellulaire. L'IL-2 et l'IL-15 induisent cette augmentation de l'expression du CD70 et sont donc indirectement responsable de l'évolution phénotypique TEMRA des cellules T CD8+. L'IL-21 en revanche n'induit pas l'expression du CD70 et semble donc plutôt responsable du maintien des cellules T CD8+ « central/memory » CD45RA- CD27+ (Gamadia et al., 2004b), (van Leeuwen et al., 2006a). L'infection chronique infra-clinique à CMV et la stimulation permanente du système immunitaire par le CMV pourrait donc être à l'origine de cette différenciation lymphocytaire T CD8+ vers le phénotype TEMRA, très fréquemment observé chez le patient transplanté rénal (Khan et al., 2004).

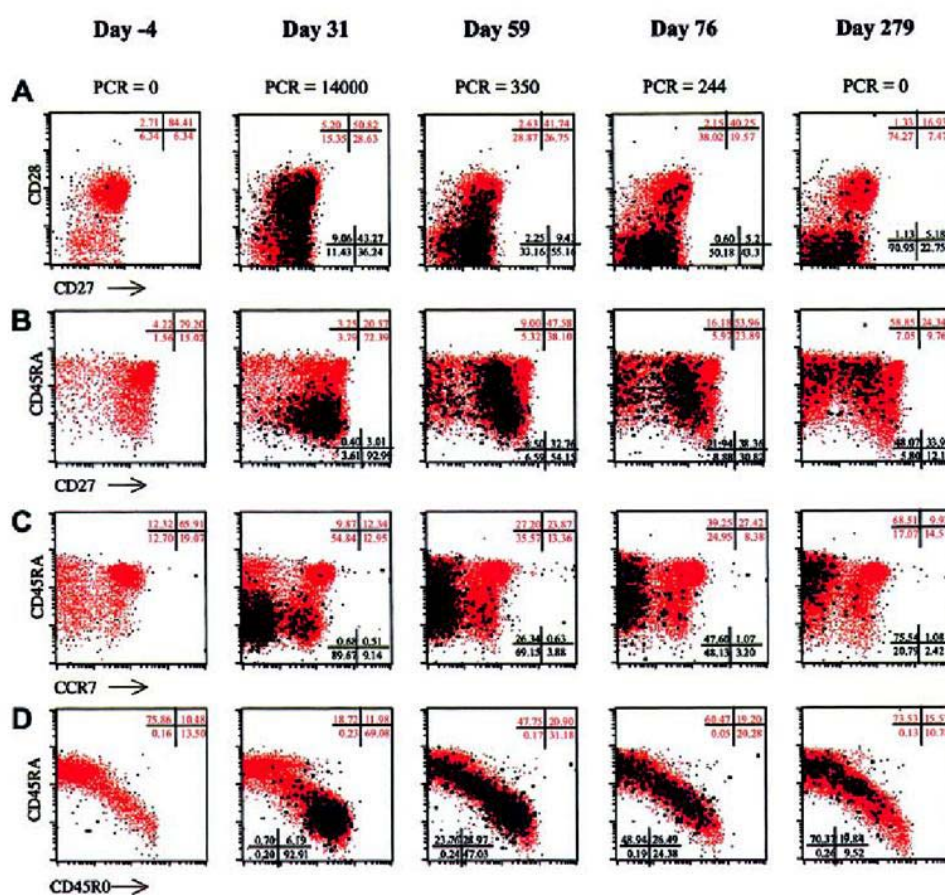


Figure 12: Differentiation of CMV-specific and total CD8+ T cells in a representative CMV-infected patient. Time defined as days after first positive PCR (day 0), all plots gated on CD8+ T cells. CMV-specific CD8+ T-cell frequencies (percent of total CD8+ T cells): day 31, 4.96%; day 59, 4.58%; day 76, 3.30%; day 279, 1.29%. CMV-specific CD8+ T cells as defined by specific tetramer staining are plotted *in black*, total CD8+ T cells are plotted *in red*. Quadrant percentages are depicted in black for CMV-specific CD8+ T cells and in red for total CD8+ T cells. (A) x-axis log fluorescence CD27-FITC, y-axis log fluorescence CD28-PE; (B) x-axis log fluorescence CD27-PE, y-axis log fluorescence CD45RA-FITC; (C) x-axis log fluorescence CCR7-PE, y-axis log fluorescence CD45RA-FITC; (D) x-axis log fluorescence CD45R0-PE, y-axis log fluorescence CD45RA-FITC (D'après (Gamadia et al., 2003)).

Tableau 6: Niveau d'expression des gènes codant pour les récepteurs NK au cours de l'infection par le CMV en transplantation rénale (D'après (van Stijn et al., 2008)).

	Alternative Name	Naive ^b	Peak ^c	1 Year ^d	mAbs ^e
aNKR					
MHC class I specific					
KIRs					
KIR2DS2	CD158j	1	3,6	1,4	GL183 ^f
KIR2DS4	CD158i	1,2	6,4	1,9	
KIR3DL5A	CD158f	1,1	2,3	1,1	
Leukocyte Ig-like					
LILRA1	LIR6/CD85I	0,9	10,6	13,4	
LILRA3	ILT6/LIR4/CD85e	0,9	2	2,9	
LILRA4	ILT7	0,9	1,3	1,3	
LILRA5	CD85f	0,9	3,7	2,3	
Non-MHC class I specific					
NCRs					
NCR1	NKp46	0,9	47,4	39,1	NKp46
NCR2	NKp44	1,1	0,9	0,9	NKp44
NCR3	NKp30	1,1	1,4	0,9	
C-type lectin receptors					
KLRC2	NGG2C	1	9,8	7,8	NGG2C
KLRK1	NGG2D	1	3,6	2,3	NGG2D
KLRC3	NGG2E	1	2,8	1,2	
KLRC4	NGG2F	1	2,2	1,9	
KLRF1		0,9	5	12,8	
CLEC2B	AICL	1	3,8	2,2	
Other					
CD16	FcγIIIa	0,9	8,5	14	
CD244	2b4	1,1	13,5	10,6	
NKG7		1	8,5	14,9	
iNKR					
MHC class I specific					
KIRs					
KIR2DL1	CD158a	0,8	6	1,6	EB6 ^g
KIR2DL2	CD158b1	1	5	1,5	GL183 ^f
KIR2DL4	CD158d	1	2,9	1	
KIR3DL1	CD158e1/NKB1	1	2,9	1,1	NKB1
KIR3DL2	CD158k	1,1	7,1	1,4	
KIR3DL3	CD158z	1	1,1	1,3	
Leukocyte Ig-like receptors					
LILR1		0,9	2,3	2,4	
LILRB1	ILT2/LIR1/CD85j	1	28,3	61,4	
LILRB2	ILT4/LIR2/CD85d	1,6	13,9	17,9	
LILRB3	ILT5/LIR3/CD85a	1	2,1	2,2	
LILRB4	ILT3/LIR5/CD85k	1	0,9	1,1	
LILRB5	LIR8/CB85c	0,9	1,4	1	
Non-MHC class I specific					
NCRs					
None					
C-type lectin receptors					
KLRA1		1	2,2	2,4	
KLRB1	CD161	1	9,3	17,1	
KLRC1	NGG2A/CD159A	1,1	9	8	NGG2A
KLRG1	MAFAL	0,9	11,5	14,5	
Other					
LAIR1		1	1,1	2,6	
LAIR2		1,2	11,8	34,4	
Either aNKR or iNKR					
Leukocyte Ig-like receptors					
LILRP2	ILT10/CD85m	1	1,5	2,1	
C-type lectin receptors					
KLRD1	CD94	1	36,5	38,9	CD94

^a Bold numbers represent fold changes of significantly changed genes according to the criteria described in *Materials and Methods*.

^b Naive: CD8⁺CD45⁺CD27⁺.

^c Peak: CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺.

^d One year: CMV-specific tetramer pp65⁺ cells.

^e mAbs used in FACS analyses.

^f Clone GL183 detects KIR2DS2/2DL2/2DL3.

^g Clone EB6 detects KIR2DS1/L1.

2.9.4 Fonction effectrice

A la phase aiguë et à la phase chronique de l'infection, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV sont capables de produire de grandes quantités d'interféron- γ et de lyser des cellules autologues chargées avec des peptides du CMV et des fibroblastes HLA-

identiques infectées par le CMV (Gamadia et al., 2003), (Cobbold et al., 2005). La production d'interféron- γ nécessite une stimulation massive du TCR qui entraîne une internalisation de celui-ci. En revanche, la cytotoxicité d'un lymphocyte T alpha beta CD8+ spécifique du CMV peut être observée même si le TCR est stimulé par une faible quantité de peptides. Cette différence fonctionnelle dépend des clones lymphocytaires T qui sont hétérogènes chez un individu donné, mais surtout de la capacité du virus à induire de faibles ou de grandes quantités de antigènes (Betts et al., 2004). Ces lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV prolifèrent et s'activent en présence d'alloantigènes *in vitro*. Malgré cette prolifération, ils ne sont pas capables de lyser des cellules allogéniques alors qu'ils restent capables de tuer des cellules chargées avec des peptides du CMV. Autrement dit, la réaction allogénique aboutit *in vitro* à une augmentation du pool de cellules T CD8+ spécifiques du CMV et donc à un renforcement théorique de la réponse anti-CMV. Mais aucune réaction croisée contre des alloantigènes n'est observée de la part des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV (Gamadia et al., 2004a). De la façon surprenante, une corrélation inverse est même retrouvée entre les lymphocytes T spécifique de IE-1 et les lymphocytes T alloréactifs (Nickel et al., 2009). L'ensemble de ces données n'est donc pas en faveur d'une réaction croisée des cellules T spécifiques du CMV contre des allo-antigènes.

Après transplantation rénale l'impact sur le système immunitaire d'une primo-infection ou d'une réactivation du CMV est bien connu. L'apparition ou l'augmentation du nombre de cellules T CD8+ spécifiques du CMV n'altère ni le nombre absolu de cellules T mémoires spécifiques d'autres pathogènes (comme l'EBV et la grippe) ni leur phénotype dans le sang périphérique. En conséquence, l'émergence de nouvelles cellules mémoires spécifiques du CMV lors de la phase de latence vient grossir le pool de cellules mémoires préexistantes (van Leeuwen et al., 2006a).

2.9.5 L'inflation de la mémoire

Avec l'âge, les lymphocytes T CD8+ spécifique du CMV s'accumulent et peuvent représenter jusqu'à 30% du pool total de lymphocyte T CD8+. Ce phénomène s'appelle « l'inflation de la mémoire » (Khan et al., 2002), (Karrer et al., 2003), (Almanzar et al., 2005), (Vescovini et al., 2007). Cette accumulation de lymphocytes T CD8+ dans tous les organes suggère une exposition répétée du virus au système immunitaire, au travers peut-être d'infections infra-cliniques successives. Cette augmentation du pourcentage des lymphocytes T CD8+ spécifique du CMV chez les sujets âgés (par rapport aux sujets jeunes) est spécifique de ce virus car elle n'est pas observée avec d'autres virus persistants, comme l'EBV. Elle est expliquée en partie par une diminution de leur capacité à produire de l'interféron- γ après activation par des peptides du CMV (Khan et al., 2004), mais ce résultat prête à discussion, car d'autres équipes retrouvent au contraire une réponse interféron- γ anti-CMV très largement accentuées chez les sujets âgés (Vescovini et al., 2007). Cette inflation mémoire pourrait être à l'origine d'une « certaine immunosuppression » ou immuno-sénescence et d'un risque infectieux accentué, car les individus âgés séropositifs pour le CMV ont une réponse cellulaire T anti-EBV moins importante que les individus séronégatifs (Khan et al., 2004). Ils répondent aussi moins bien à la vaccination antigrippale (Trzonkowski et al., 2003), (van de Berg et al., 2008). Cette « inflation de la mémoire » peut paraître surprenante. En effet, les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV CD45RA+ C27- CD28- CCR7- sont considérées en différenciation terminale (TEMRA) car ils sont incapable de proliférer après une activation par le TCR et car ils expriment des marqueurs de sénescence cellulaire comme le CD57 (Appay et al., 2002). Ce terme est cependant probablement impropre car ces cellules T CD8+ sont capables de proliférer en présence de lymphocytes T CD4+ activés par des antigènes du CMV. Cette prolifération T CD8+ est sous la dépendance d'une activation TCR mais nécessite en plus la présence de l'IL-2 ou de l'IL15 (van Leeuwen et al., 2002). L'IL-7 qui est

une cytokine importante pour la survie des cellules mémoires dirigées contre des virus transitoires, n'induit aucun signal de prolifération sur ces cellules spécifiques du CMV qui n'expriment d'ailleurs pas le récepteur à l'IL7 CD127 (van Leeuwen et al., 2005). In vitro, en présence de monocytes chargés avec des peptides du CMV, les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV expriment le CD137, et entrent aussi en prolifération grâce à une double stimulation impliquant le TCR et le couple CD137-CD137L (Waller et al., 2007). Ces lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV, initialement TEMRA, ré expriment le CD45R0 (qui semble être un marqueur de cellules en division) et le CCR7, perdent le CD45RA mais restent CD27- quand ils entrent en prolifération. Ils gardent les mêmes capacités cytotoxiques contre des cellules chargées avec des peptides du CMV et sont en capacité de produire de l'interféron- γ et du TNF- α (van Leeuwen et al., 2002), (Wills et al., 2002). En résumé, même si ces cellules sont différenciées en cellules effectrices, elles ne le sont pas de façon terminales puisqu'elles gardent encore la capacité à proliférer et représentent in vivo « l'inflation de la mémoire immunologique » des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV (Klenerman and Dunbar, 2008). Par ailleurs il est démontré chez la souris, que ce pool cellulaire mémoire TEMRA « inflationniste » est extrêmement dynamique et renouvelable, car ces cellules ont une demi-vie relativement courte. Ainsi, les cellules « central memory » ainsi que des cellules naïves participent au renouvellement de ce pool de cellules différenciées, très probablement sous la pression d'infections à CMV infra-cliniques répétées (**Figure 13**) (Snyder et al., 2008). Le renouvellement à long terme des cellules T CD8+ spécifique du CMV dans le sang par des cellules « central memory » est aussi observé chez le macaque. Dans ce modèle, le transfert adoptif de cellules « central memory » CD62L+, CCR7+ spécifique du CMV persiste au long cours au contraire du transfert adoptif de cellules effecteur/mémoire différenciées (Berger et al., 2008).

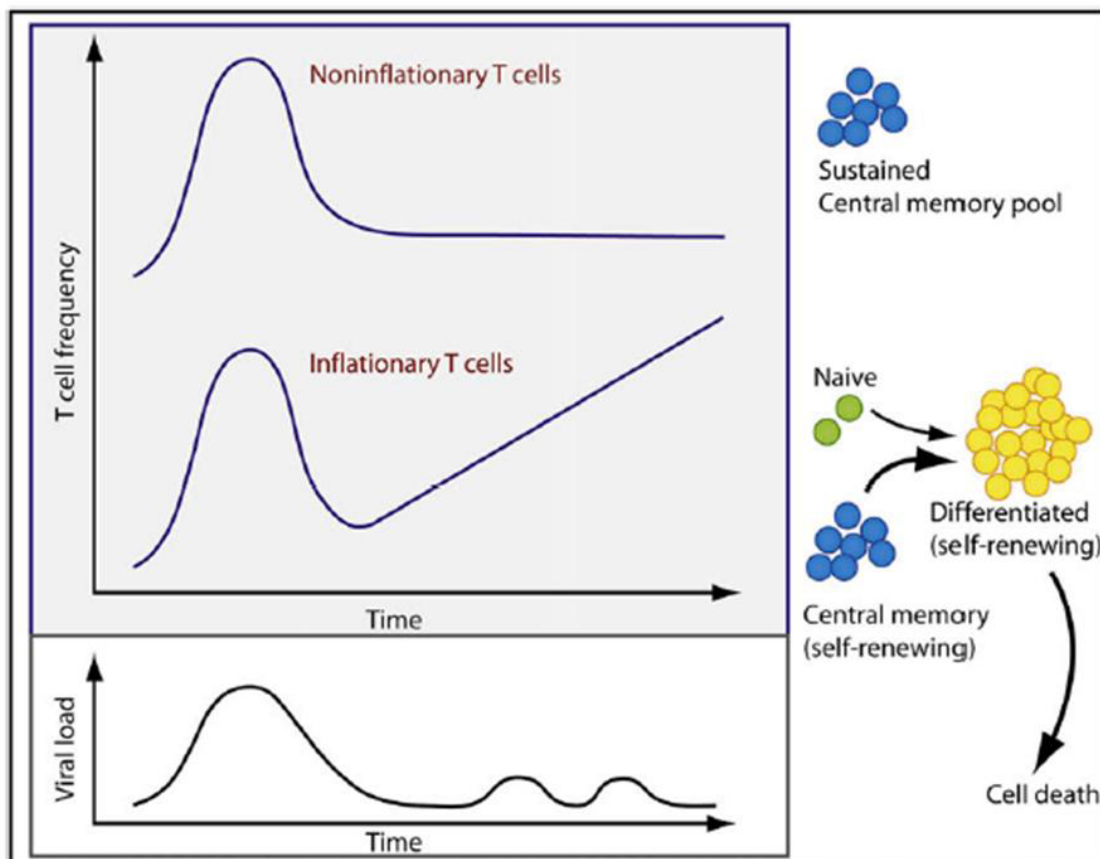


Figure 13: Evolution and Maintenance of Memory T Cell Memory after CMV Infection. The left-hand panels indicate two potential outcomes of CMV infection: The upper panel indicates conventional memory responses, and the lower panel indicates

“inflationary” responses. Over time, viral reactivation events serve to restimulate the inflationary responses but not the classical memory responses. On the right-hand side, for the noninflating response, the central memory pool (blue) is sustained at low levels and enriched within lymphoid tissue. In the case of the inflating response, the situation is much more dynamic. The large pools of differentiated cells (TEMRA) found in blood and tissues (yellow) are turning over continuously, with some cells progressing to death, but with rapid resupply from self-renewing differentiated cells, central memory pools, and naive (green) precursors (Klenerman and Dunbar, 2008).

2.9.6 CMV et Immuno-sénescence

Chez les transplantés rénaux, le facteur influençant le plus le passage d'un phénotype naïf à un phénotype effecteur CD45RA+ CD27- est l'infection à CMV, quelque soit l'âge du patient. Ce phénotype effecteur CD45RA+ CD27- se caractérise par l'expression du CD57 et des télomères courts. Les télomères sont des régions situées à la fin des chromosomes contenant des séquences répétées TTAGGG qui protègent les chromosomes d'une recombinaison ou de réparations inappropriées. Cette partie de l'ADN ne pouvant pas être dupliquée, les télomères se raccourcissent à chaque division cellulaire. La diminution de longueur de ces télomères est donc une horloge biologique, car en dessous d'une certaine longueur, les cellules meurent par apoptose. Les cellules du système immunitaire présentant ces télomères court sont des cellules immuno-sénescents. Cette diminution de télomères est associée à une plus grande mortalité, un plus grand risque cardio-vasculaire et plus de démences (Cawthon et al., 2003), (Samani et al., 2001). En conséquence, l'infection à CMV induit spécifiquement un pool très important de cellules T différenciés CD45RA+ CD27- avec des télomères courts et pourrait par ce biais avoir un effet indirect sur la dégradation de l'état physique et mental des sujets âgés (Vescovini et al.) et sur la mortalité à long terme des patients en induisant une « sénescence cellulaire accélérée » (van de Berg et al.), (van de Berg et al., 2008).

2.10 La réponse adaptative cellulaire T alpha beta CD4+

Chez la souris, la déplétion seule en lymphocytes T CD8+ n'est pas suffisante pour entraîner la réactivation d'une infection à CMV, mais elle le devient si on déplete dans le même temps les lymphocytes T CD4+ (Polic et al., 1998). Cela signifie que dans certaines situations, les lymphocytes T CD4+ sont capables de remplacer les lymphocytes T CD8+ pour contrôler le CMV. Chez les enfants, l'élimination retardée du CMV s'explique par un déficit quantitatif et fonctionnel de lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV présent chez ces enfants (Tu et al., 2004). Par ailleurs en allogreffe de moelle, le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques du CMV majoritairement T CD4+ (80%) permet de traiter les infections à CMV et de contrôler la virémie chez presque tous les patients (Einsele et al., 2002).

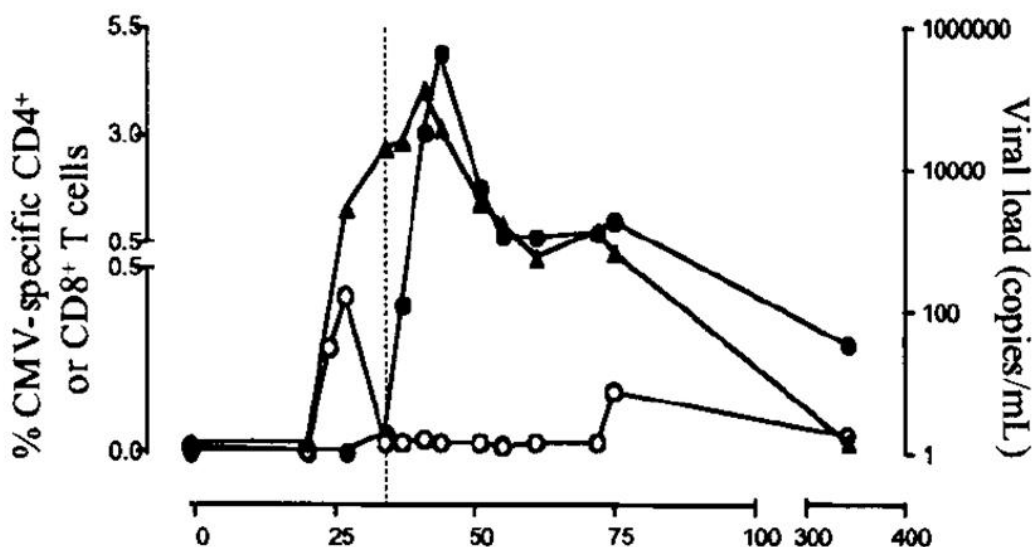
2.10.1 Cibles virales

L'analyse exhaustive de la réponse cellulaire contre les peptides du CMV montre que les lymphocytes T CD4+ reconnaissent 58.7% des ORF du génome du CMV. Les ORF suivants (UL55, UL83, UL86, UL99, UL122) sont reconnus par plus de la moitié des individus (**Figure 10**). Les lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV observés à la phase chronique de l'infection apparaissent après une forte sélection des lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV observée à la phase aiguë. Il existe une très grosse contraction du pool lymphocytaire T CD4+ et ne vont persister que les clones dominants. Mais certains clones lymphocytaires T CD4+ observés à la phase chronique ne proviennent pas de clones présents

lors de la primo-infection. Cela signifie que ces clones sont sélectionnés lors de la persistance de l'infection, traduisant un contact étroit et constant du système immunitaire avec le virus (van Leeuwen et al., 2006b). Une question pour l'instant sans réponse est quels clones vont rester présents, lesquels vont s'éteindre avec le temps, et lesquels apparaissent avec le temps. Pour les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV, il a été montré que l'avidité pour l'antigène joue un rôle majeur dans la sélection des clones dominants (Price et al., 2005). La quantité d'antigène, le polymorphisme HLA pourraient aussi influencer ce phénomène. Comme pour les cellules T CD8⁺ spécifiques du CMV, l'importance de la reconnaissance par les lymphocytes T CD4⁺ de chaque ORF est aussi proportionnelle à la taille de l'ORF dans le génome du CMV (**Tableau 5**). Il y a aussi quelques exceptions : Les peptides issus des gènes IE et d'évasion immune mobilisent 2.3 fois et 1.9 fois plus de lymphocytes T CD4⁺ qu'ils ne prennent de place au sein du génome du CMV. Les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du CMV représentent 4% des lymphocytes T CD4⁺ totaux du sang périphérique et 9.1% des lymphocytes T CD4⁺ mémoires (**Figure 11**). Chez un individu donné, ils reconnaissent en moyenne 12 ORF du génome du CMV (Sylwester et al., 2005).

2.10.2 Cinétique d'apparition

Les lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'interféron- γ peuvent être détectés dans le sang après une primo-infection à CMV 7 à 10 jours après l'apparition d'une virémie, chez les patient transplantés rénaux asymptomatiques (Rentenaar et al., 2000). Ces cellules T CD4⁺ spécifiques du CMV précèdent dans ce cas-là l'apparition des immunoglobulines de type G anti-CMV et des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV (**Figure 14**).



Enumeration of CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in primary CMV infection. Shown are the frequencies of CMV-specific CD4⁺ T cells, determined by intracellular staining for CD69 and IFN- γ on stimulation (○), CMV-specific CD8⁺ T cells, enumerated by tetramer binding (●), and first specific antibody appearance (dotted vertical line) in relation to viral load (CMV DNA, ▲) in one representative asymptomatic patient (patient 4, panel A) and one symptomatic patient (patient 8, panel B, closed vertical line, start of 14 days of ganciclovir therapy).

Figure 14: Cinétique d'apparition des lymphocytes CD4⁺, CD8⁺ et des Immunoglobulines spécifiques du CMV après une primo-infection à CMV chez un transplanté rénal qui ne développera pas de maladie à CMV (D'après (Gamadia et al., 2003)).

Ils sont détectés beaucoup plus tardivement chez les patients symptomatiques (maladie à CMV), où ils apparaissent dans le sang bien après la détection des lymphocytes T CD8+ spécifiques et des immunoglobulines de type G anti-CMV. Leur délai d'apparition dans le sang est donc très bien corrélé à l'intensité clinique de la maladie. Cependant, ils sont très probablement présents et fonctionnels rapidement dans les ganglions pour fournir l'activation aux cellules B et aux cellules T CD8+ spécifiques du CMV, y compris chez les sujet symptomatiques (Gamadia et al., 2003). Le groupe de M. Sester a observé que dans les premiers mois post-transplantation, les symptômes de la maladie à CMV sont précédées par une baisse des lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV (Sester et al., 2001). Douze mois après transplantation rénale, chez les patients ayant présenté une primo-infection à CMV, le pourcentage de lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV parmi les lymphocytes T CD4+ totaux est supérieur au pourcentage de lymphocytes T CD8+ spécifique du CMV. A long terme, le répertoire T CD4+ des patients transplantés réserverait donc au CMV une part plus importante de ces cellules que le répertoire T CD8+ (Sester et al., 2002), même si un résultat inversé a récemment été observé chez des transplantés rénaux (Radha et al., 2005). Il est cependant intéressant de noter que le pourcentage et la valeur absolue des lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV est identique entre des sujets sains et des sujets transplantés rénaux à distance de l'infection. En revanche les transplantés pulmonaires qui reçoivent des doses beaucoup plus importantes d'anti-calcineurine ont une immunité T CD4+ spécifique du CMV significativement moins importante et subissent ainsi plus de réactivation à CMV (Sester et al., 2005).

2.10.3 Phénotype

L'analyse phénotypique des lymphocytes T alpha beta CD4+ spécifiques du CMV à la phase aiguë de l'infection montre qu'ils sont CD27+/-, CD28-, CD45RA+, CD45RO+, CD62L-, CD11a+, Granzyme B+, Ki67+. La primo-infection en transplantation rénale fait émerger très rapidement et spécifiquement une population de lymphocytes T CD4+ CD28- Granzyme B+, facilement identifiable dans le sang périphérique (van Leeuwen et al., 2004). A la phase chronique, ils acquièrent un phénotype effecteur mémoire, proche de celui des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV, CD27-, CD28-, CD45RA-, CD45RO+, CD62L-, CCR7-, CD11a+, CD11b+, ICAM-1+, Granzyme A-B+, Perforine+, Ki67-, CD57+ (Rentenaar et al., 2000), (Casazza et al., 2006), (van Leeuwen et al., 2004). Une façon simple de les identifier est d'analyser les lymphocytes T CD4+ CD28- CD27- du sang périphérique qui sont très spécifique des patients séropositifs pour le CMV. En revanche, ils n'expriment aucun marqueur d'activation comme le CD25, CD38, HLA-DR ou CD69 (van Leeuwen et al., 2004). Il faut cependant noter qu'après stimulation ex vivo par des peptides du CMV, les lymphocytes T CD4+ CD28- CD27- peuvent transitoirement ré exprimer le CD28. La réexpression transitoire de cette molécule de costimulation pourrait être nécessaire à leur prolifération (van Leeuwen et al., 2004).

2.10.4 Fonctions

Les cellules T CD4+ jouent un rôle central dans l'immunité anti-CMV en aidant les lymphocytes B à monter une réponse humorale spécifique des antigènes du CMV (Davignon et al., 1996) et les lymphocytes T CD8+ à exécuter leurs fonctions effectrices (Walter et al., 1995). Mais comme cela est suggéré par les modèles murins, et à l'image des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV, elles produisent de l'interféron- γ , du TNF- α (van Leeuwen et al., 2004), du MP-1 β et expriment le CD107a après activation par des peptides du CMV. Elles sont ainsi capable in vitro de lyser des cellules chargées avec un peptide du CMV (Casazza et al., 2006), (Davignon et al., 1996), par une reconnaissance exclusive des molécules du

complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (van Leeuwen et al., 2006b). En revanche, face à ces cellules infectées par le CMV, leur capacité cytotoxique est plus discutée. En effet bien que la reconnaissance de cellules infectées par le CMV entraîne une dégranulation des lymphocytes T CD4+, la lyse des cellules infectées n'est pas toujours observée. Cela suggère un mécanisme d'évasion aux lymphocytes T CD4+ par résistance à l'apoptose des cellules infectées (Delmas et al., 2007).

2.10.5 L'épuisement cellulaire T

Au cours des infections chroniques virales, les cellules T CD8+ spécifiques de l'antigène acquièrent initialement des fonctions effectrices, mais progressivement deviennent moins fonctionnelles avec la progression de l'infection. Cette perte de fonction est connue sous le terme d'« épuisement cellulaire T » (ou « T cell exhaustion »). Initialement décrits avec le virus de chorioméningite lymphocytaire chez la souris (Zajac et al., 1998), ce phénomène d'« épuisement cellulaire T » est aussi connu chez l'homme au cours des infections chroniques par le VIH, le VHB et le VHC (Shin and Wherry, 2007), et semble une cause majeure de la non élimination des virus dans ces différentes situations. Les cellules T « épuisées » expriment des récepteurs inhibiteurs comme PD-1 (récepteur inhibiteur de la famille de CD28) ou LAG-3. Ces cellules T CD8+ épuisées « rajeunissent » et redeviennent capable d'éliminer les virus quand ces molécules PD-1 et LAG-3 sont inhibées (Blackburn et al., 2009). Un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) à l'intérieur de l'intron 4 du gène (rs11568821) de PD-1 (PD-1.3) a récemment été associé avec un risque d'infection à CMV chez les patients séropositifs pour le CMV qui ne recevaient pas de prophylaxie (Hoffmann et al.). Au cours de l'infection à CMV, l'expression de PD-1 est bien décrite au cours de la phase aiguë sur les lymphocytes T CD4+ spécifiques du CMV, au moment de la virémie. Ces lymphocytes T CD4+ PD-1+ produisent moins d'interféron- γ . Cette expression de PD-1 lors de la phase virémique est responsable d'une anergie et d'une diminution de la production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4+ spécifique du CMV. Une perte de leur capacité de prolifération est aussi observée. L'anergie cellulaire T CD4+ au cours du CMV est complètement réversible puisque l'expression de PD-1 disparaît à la surface de ces cellules avec le contrôle de l'infection (Sester et al., 2008). Le même phénomène est décrit avec les lymphocytes T CD8+ qui sur expriment PD-1 uniquement pendant la phase virémique (La Rosa et al., 2008). La persistance du CMV dans l'organisme au long cours est donc imputable principalement aux différents mécanismes d'immuno-évasion que ce virus met en jeu, mais ne semble pas être la conséquence d'un « épuisement cellulaire T CD4+ ou CD8+ » peu évident au cours de cette infection chronique.

2.11 La réponse T gamma delta : émergence d'un nouvel acteur

En 1988, une expansion de lymphocytes T alpha beta non CD4, non CD8 a été observée après transplantation rénale (Volk et al., 1989). Dans le sang des patients transplantés cardiaques, les lymphocytes T gamma delta V δ 1 ont aussi été observées à des taux significativement plus haut que dans celui des sujets sains, sans qu'aucune cause n'ait été clairement identifiée (Vaessen et al., 1996). Un lien éventuel avec l'infection aiguë à CMV a été décrits plus tard devant l'apparition d'une population étrange et aberrante T CD8+, phénotypiquement caractérisée par une diminution de l'expression du CD8 et du TCR alpha beta, qui était positivement corrélée à la charge virale (van Dam et al., 2000).

2.11.1 Cinétique d'apparition

En 1999, une nouvelle analyse des lymphocytes T gamma delta en transplantation rénale ne retrouva pas d'augmentation significative de leur nombre ni de leur pourcentage

dans le sang périphérique d'une population globale de patients transplantés rénaux par rapport à des sujets sains ou des insuffisants rénaux chroniques terminaux. En revanche, en analysant la distribution des patients transplantés il a été observé qu'une sous-population de patients transplantés rénaux avait dans son sang une expansion majeure de gamma-delta pouvant atteindre jusqu'à 20 % des lymphocytes T CD3+ totaux. L'analyse multivariée des facteurs de risque potentiellement impliqués dans cette expansion conclut finalement que l'antécédent d'infection à CMV était la seule variable significativement associée à ce phénomène biologique (Dechanet et al., 1999a). Des analyses cinétiques furent ensuite conduites et conclurent que seuls les patients transplantés rénaux qui développaient une infection à CMV post greffe rénale (incluant ceux avec une maladie) avaient une expansion de leur cellules T gamma delta en moyenne 50 jours après cette infection (Dechanet et al., 1999a), (Dechanet et al., 1999b). Plus précisément l'expansion des lymphocytes T gamma delta (défini par le temps nécessaire avant d'atteindre un plateau) apparaît entre 20 et 240 jours après l'apparition de la virémie à CMV (médiane 45 jours). La durée de l'infection à CMV est plus longue, la charge virale maximale plus élevée, la présence d'un syndrome à CMV et d'une pneumonie à CMV (Fièvre, hépatite, leucopénie) plus fréquente chez les patients ayant une expansion T gamma delta tardive (> 45 jours) (Lafarge et al., 2001). Cette amplification cellulaire peut donc être considérée comme un bon marqueur d'évolution de l'infection à CMV et suggère une implication de ces cellules dans la résolution de l'infection.

2.11.2 Phénotype

La structure de la chaîne delta du TCR gamma delta définit deux types de sous-population. Une sous-population qui exprime la chaîne chaîne V δ 2 et une autre qui exprime les chaînes V δ 1, V δ 3 et V δ 5 (ou V δ 2^{neg}). Alors que les patients sans infection à CMV ont une population exprimant le TCR V δ 2/V γ 9 prédominante, ceux qui développent un CMV subissent une remodelisation de leur répertoire T gamma delta avec l'émergence de nouvelles populations cellulaires exprimant des TCR V δ 1, V δ 3 et V δ 5 (ou V δ 2^{neg}). Bien que les combinaisons suivantes V δ 1/V γ 8 et V δ 3/V γ 9 soit plus souvent rencontrées, toutes les chaînes gamma peuvent s'associer aux chaînes V δ 1, V δ 3 ou V δ 5 (Dechanet et al., 1999b). L'analyse par immunoscope de la diversité jonctionnelle des segments V δ -C δ et V γ -C γ montre qu'au cours de l'infection à CMV, l'expansion des lymphocytes T gamma delta V δ 1 et V δ 3 est associée à une restriction du répertoire parfois même jusqu'à la clonalité, suggérant une réponse lymphocytaire T induite par un antigène (Dechanet et al., 1999b). A l'image des sous-populations lymphocytaires T alpha beta CD4+ CD28- et CD8+ CD45RA+ CD27- décrites par l'équipe de R Van Lier (van de Berg et al., 2008), l'augmentation des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} dans le sang des patients ayant subi une infection à CMV se révèle être une « nouvelle signature cellulaire » d'un contact passé avec ce virus (Pitard et al., 2008). Cette observation est par ailleurs confirmée chez des patients transplantés hépatiques, cardiaques, pulmonaires et intestinaux (**Figure 15**) (données non publiées). A ce jour cette observation n'a été faite que dans le sang périphérique. Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} ont une localisation préférentielle au niveau des épithéliums et une étude du même type est nécessaire dans d'autres tissus. Il a cependant été démontré chez les individus sains que les profils de clonalité étaient différents entre les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} de l'épithélium digestif et du sang périphérique, séparant ainsi ces deux sous-populations Chowers, 1994 #390}, (Holtmeier et al., 1995). Cela suggère que leur expansion dans le compartiment sanguin n'est pas nécessairement le reflet d'une expansion dans les tissus infectés. Le sang au contraire pourrait être le théâtre d'une fonction immunologique qui serait propre et spécifique à ces cellules. Elles y cohabitent par exemple avec les nombreuses cellules endothéliales et les nombreux monocytes impliqués dans la dissémination du CMV.

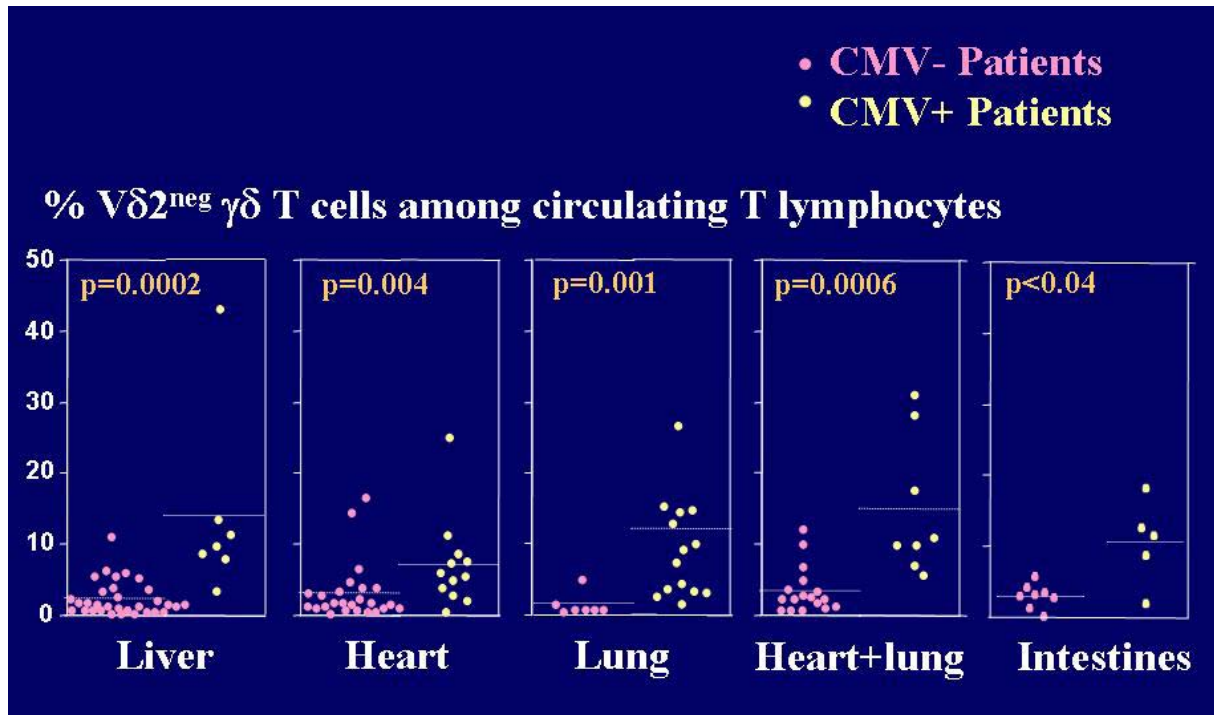


Figure 15: Les lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ sont une signature cellulaire de l'infection à CMV en transplantation d'organe, quelque soit l'organe transplanté (Données non publiées – Julie Déchanet-Merville)

La cinétique d'expansion et le phénotype des lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ dans le sang des patients est tout à fait similaire et superposable à ceux des lymphocytes T alpha beta $CD8+$ spécifique du CMV (Figure 16) (Couzi et al., 2009) **ARTICLE 2**. Ils sont $CD27^-$, $CD28^-$, $CD45RA^+$, $CD45RO^-$, Perforine $^{++}$, Granzyme B $^{++}$, $CCR7^-$, $CD62L^-$, et ont un phénotype activé ($CD69^+$, $HLA-DR^+$, mais $CD25^-$). Ils expriment un panel de récepteurs NK un peu différent des cellules T $CD8+$ spécifiques du CMV car ils sont $NKG2D^+$, $CD94-NKG2A^-$, $CD158b/j^+$, ce qui leur confèrent probablement une régulation un peu différente de celles de cellules alpha beta (Dechanet et al., 1999b), (Couzi et al., 2009).

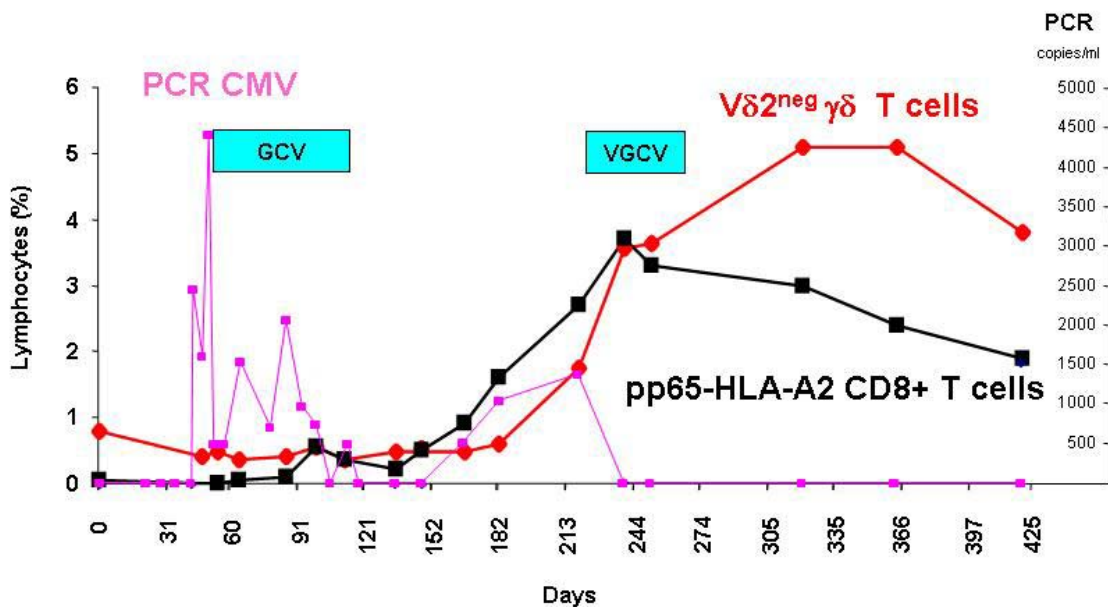


Figure 16: Cinétique d'apparition des lymphocytes T gamma delta (Rouge) et des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV (pp65-HLA2 CD8+ T cells, noir) dans le sang après une infection puis une récurrence d'infection à CMV (Violet) ; GCV : ganciclovir ; VGCV : valganciclovir (d'après (Couzi et al., 2009)).

L'hétérogénéité d'expression de ces récepteurs NK ne reflète pas la diversité clonale de ces cellules T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ car un même clone peut avoir des phénotypes de récepteurs NK différents d'une cellule à l'autre. Cette mosaïque de cellules aux propriétés fonctionnelles différentes au sein même de différents clones reflète leur très grande complexité d'activation et suggère probablement des mécanismes d'action différents en fonction des contextes, de la dynamique et de l'équilibre d'expression de tout ces corécepteurs (Lafarge et al., 2005). D'une façon plus globale et de façon quasi-exclusive, les cellules T $V\delta 2^{neg}$ induites par l'infection à CMV dans le sang des patients se présentent cependant avec le phénotype TEMRA et pas le phénotype « central memory » observé aussi mais plus minoritairement chez les lymphocytes T alpha beta CD8+ spécifique du CMV. L'accumulation de ce phénotype TEMRA CD45RA+ CD27- sur les lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV et sur les lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ démontre que ce phénotype est directement ou indirectement induits par ce virus (van de Berg et al., 2008), (Couzi et al., 2009).

2.11.3 Un acteur de la réponse adaptative

In vitro, les lymphocytes T lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ sont capables de proliférer en présence de lysats cellulaires provenant de cellules infectées par le CMV. Cette prolifération est aussi induite en présence de CMV inactivé ce qui suggère une activation spécifique et directe par ce virus (Dechanet et al., 1999b). Ceci est confirmé par le fait qu'aucune prolifération n'est observée en présence d'autres herpes virus comme l'HSV ou le VZV. Les lymphocytes T gamma delta grâce à leur capacité à répondre rapidement aux antigènes de stress sont considérés comme des acteurs de l'immunité innée (Hayday, 2009). Mais à l'image des cellules NK, les lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ induits par l'infection à CMV ont des propriétés propres à l'immunité adaptative. En effet, la réponse proliférative T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ à une stimulation par des lysats cellulaires provenant de cellules infectées par le CMV est beaucoup plus massive chez des sujets qui ont déjà rencontré le CMV (Dechanet et al., 1999b). In vivo, cela se traduit par une expansion T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ plus rapide après le pic de virémie, aboutissant à une élimination du CMV plus efficace, chez les sujets qui ont une réactivation virale après transplantation rénale (Pitard et al., 2008). Les lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ TEMRA ont donc probablement la même capacité proliférative que leurs homologues T CD8+ spécifique du CMV, car ce pool de cellules mémoires différenciées est capable de réagir plus rapidement et plus efficacement en réponse à une deuxième stimulation antigénique.

2.11.4 Une réactivité croisée anti-CMV et anti-tumorale

Une des grandes caractéristique de cette sous-population T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ TEMRA est leur réactivité croisée anti-CMV et anti-tumorale (Halary et al., 2005). En présence de cellules infectées par le CMV ou de cellules tumorales épithéliales de diverses origines, des clones et des lignées issues de lymphocytes T gamma delta $V\delta 2^{neg}$ TEMRA provenant du sang de patients transplantés rénaux, hépatiques et pulmonaires produisent du TNF- α et de l'interféron- γ . Cette production d'interféron- γ est capable d'inhiber la réplication virale du CMV in vitro. Une cytotoxicité dépendante de la perforine et de granzyme B est aussi observée contre des cellules infectées par le CMV et ces mêmes cellules épithéliales

tumorales. Ces données fonctionnelles supportent l'hypothèse que les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} se comportent, en cellules effectrices dirigées contre les cellules infectées par le CMV, à l'image des lymphocytes T CD8+ TEMRA spécifiques du CMV. Mais elles font aussi naître l'hypothèse que les sujets infectés par le CMV, armés avec cette sous-population gamma delta pourraient avoir une réponse immunologique anti-tumorale beaucoup plus efficace. Dans un modèle murin de xéno greffe tumorale, nous avons récemment observé que l'injection d'un clone T gamma delta V δ 5 induit par le CMV avait la capacité d'inhiber la croissance tumorale à distance de la zone d'injection, démontrant ainsi in vivo chez la souris le rôle potentiellement anti-tumoral de ces lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits par le CMV (Devaud et al., 2009).

2.11.5 Mécanismes d'activation

Compte tenu de leur panel relativement étendu de récepteurs activateurs, il est très probable que l'activation des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} TEMRA soit complexe et multifactorielle. Aucune activation par NKG2D et ses ligands (MICA/B et ULBP1-3) n'est observée avec ces lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} issus du sang périphérique de patients transplantés. En revanche, le TCR qui fait la spécificité de ces cellules est un élément déterminant à la fois pour l'amplification et la reconnaissance des cellules cibles. Trois niveaux de preuves démontrent son rôle central: 1/ Une diminution de l'expression du TCR est observée à la surface des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} quand on les mets en cultures avec leurs cellules cibles (Halary et al., 2005). 2/ Des expériences de blocage avec des anticorps anti-TCR permettent d'inhiber la prolifération induite par le CMV des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} (Dechanet et al., 1999b), ainsi que leur réactivité croisée anti-CMV et anti-tumorale (cytotoxicité et production de cytokines) (Halary et al., 2005). 3/ Le transfert dans un lymphocyte T dépourvu de TCR (Jurkat RT3) des chaînes gamma et delta provenant de deux clones T gamma delta [V δ 5 (4-29) et V δ 1 (5-4)] réactifs vis-à-vis de cellules tumorales et de cellules infectées par le CMV permet d'obtenir des lignées stables T exprimant les TCR V δ 5 4-29 (Jurkat RT3 4-29) et V δ 1 (Jurkat RT3 5-4) **ARTICLE 3**. Ce transfert de TCR permet d'observer que la Jurkat RT3 4-29 s'active en présence des mêmes cellules tumorales que le clone parent 4-29 dont le TCR est issu, montrant ainsi que la réactivité anti-tumorale des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} est portée exclusivement par les chaînes du TCR. La réactivité anti-CMV des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} est en revanche plus complexe car la lignée Jurkat RT3 4-29 ne reconnaît pas les fibroblastes infectés par le CMV. Ceci est expliqué par : 1/ la faible expression du ligand du TCR 4-29 à la surface des fibroblastes infectés par le CMV, 2/ le déficit d'expression par la Jurkat RT3 4-29 de CD2 et de LFA-1 indispensables à la costimulation du clone T gamma delta 4-29 par les fibroblastes infectés. D'autres molécules de costimulation sont probablement nécessaire car la transduction de ces corécepteurs ne permet pas de restaurer la réactivité des Jurkat RT3 4-29 contre des fibroblastes infectés par le CMV. Ces données montrent que la réactivité du clone T gamma delta 4-29 est spécifique des chaînes du TCR, mais que les interactions LFA-3/CD2 et ICAM-1/LFA-1 sont indispensables à la réactivité anti-CMV alors qu'elles semblent secondaires dans la réactivité anti tumorale. La surexpression d'ICAM-1 à la surface de la cellule infectée par le CMV ou d'autres molécules co-stimulatrices pourrait même être à l'origine de la réactivité puisque le niveau d'expression du ligand ne varie pas entre les fibroblastes et les fibroblastes infectés. Les lymphocytes T gamma delta des patients transplantés rénaux semblent donc reconnaître à la surface de leurs cibles cellulaires un complexe moléculaire incluant un antigène spécifique mais également des molécules de co-stimulation non-spécifiques (Couzi, manuscrit en préparation). L'expression de ce complexe pourrait être induite par le stress lié à l'infection virale ou à la transformation tumorale. A ce jour, la nature de ce ou ces antigènes n'est toujours pas identifiée. La reconnaissance de ces antigènes est toutefois indépendante des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

et des molécules CD1. Les molécules MICA/B, autres ligands identifiés du TCR gamma delta V δ 1, ne sont pas non plus impliquées dans cette réactivité croisée (Dechanet et al., 1999b), (Halary et al., 2005).

D'autres voies d'activation sont toutefois possibles, notamment par le CD16 qui est surexprimé à la membrane de ces lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits par le CMV. En effet, 71.9 ± 15.9 % des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} provenant de patients ayant développé une infection à CMV expriment la molécule CD16 (Fc γ RIIIA, marqueur NK habituellement absent sur les cellules T alpha bêta et T gamma delta V δ 2 non activées), contre seulement 19.8 ± 16.7 % des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} provenant des patients non infectés par le CMV. Des lignées de lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} CD16+ sont capables de produire de l'interféron- γ quand celles-ci sont stimulées via le CD16 par des complexes immuns (CMV-Immunoglobuline G anti-CMV). Cette production d'interféron- γ est augmentée en présence d'IL-12 et d' l'interféron- α , deux cytokines produites par les monocytes et les cellules dendritiques au cours de l'infection à CMV. L'interféron- γ produit par les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} via une activation CD16, est ensuite capable in vitro de bloquer la réplication du CMV. Alors qu'aucune ADCC induite par les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} CD16+ contre des fibroblastes infectés par le CMV, pré-incubés avec des Immunoglobuline G spécifiques anti-CMV, n'est été observée, les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} CD16+ induit par le CMV peuvent tuer les cellules tumorales de la lignée lymphomateuse Daudi et de la lignée carcinomateuse cutanée A431, préincubées respectivement avec du rituximab et du cetuximab. Ces données in vitro révèlent une nouvelle fonction anti-CMV des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}, dépendante du CD16 via la reconnaissance des complexes immuns. Elles démontrent aussi que ces cellules sont capables de tuer, via une ADCC, des lignées tumorales lymphomateuse et carcinomateuse cutanée, deux tumeurs fréquemment rencontrées chez les patients transplantés rénaux (Couzi, manuscrit en préparation) **ARTICLE 4**.

2.11.6 Place dans la réponse allogénique : un rôle régulateur ?

Enfin, les lymphocytes T gamma delta ne semblent pas jouer de rôle particulier dans le rejet d'allogreffe cardiaque et rénale, vu leur faible représentation sur les coupes histologiques de issues des biopsies myocardiques et rénales au cours de la première année de greffe (Raasveld et al., 1992), (Coelho et al., 1995). D'un point de vue immunologique, la reconnaissance par leur TCR n'est pas restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité. Su ces bases immunologiques théoriques, ils ne devraient donc pas intervenir directement dans la réponse allo-immune. Ceci-dit, leur forte expression de CD16 en fait des cellules de choix pour entraîner une ADCC contre des cellules allogéniques reconnues par des allo-anticorps. A l'heure où à on commence à décrire une forme du rejet à médiation humorale qui ne fait pas intervenir le complément (Sis et al., 2009), (Gloor et al., 2007), le rôle précis de l'ADCC par les cellules gamma delta mériterait d'être ré exploré.

Plus d'un an après une transplantation cardiaque, environ 30% des biopsies myocardiques contiennent des lymphocytes T gamma delta V δ 1 contre seulement 8% d'entre elles au cours de la première année. Ce pourcentage élevé de biopsie retrouvant la présence de lymphocytes T gamma delta V δ 1, à distance de la greffe et en en l'absence de rejet, avait fait naître l'hypothèse que ces cellules jouaient un rôle régulateur sur la réponse alloimmune (Vaessen et al., 1991). En transplantation hépatique, l'hypothèse d'un rôle régulateur des lymphocytes T gamma delta est proposée actuellement par deux équipes. Les patients « tolérants opérationnels » d'un greffon hépatique sont définis par l'acceptation du greffon

sans rejet en l'absence de tout traitement. Ces patients ont dans leur sang plus de cellules T régulatrices CD4⁺ CD25^{high} et plus de lymphocytes T gamma delta Vδ1 que les patients contrôles encore sous traitement immunosuppresseur (Li et al., 2004), (Koshiba et al., 2007), (Martinez-Llordella et al., 2007), (Martinez-Llordella et al., 2008). Dans un modèle d'allogreffe rénale chez le rat par tolérance orale, on observe une augmentation du nombre de lymphocyte T gamma delta CD8⁺ producteurs d'IL-10 et d'IL-4 dans les reins transplantés non rejetés. Ces cellules sont par ailleurs capable d'induire une tolérance quand on les transfère à d'autres rats naïfs et pourraient donc être directement responsable de cette « tolérance opérationnelle » (Zhou et al., 2008). Mais l'équipe de Barcelone est en train de remettre en doute ces résultats. Dans une large étude très récemment publiée, ils n'arrivent plus à prédire le profil de tolérance des patients sur l'analyse des lymphocytes T gamma delta Vδ1 ou du ratio Vδ1/Vδ2. Au contraire, ils confirment nos résultats en montrant une association très nette entre l'infection à CMV et l'augmentation des lymphocytes T gamma delta Vδ1 dans le sang (Puig-Pey et al., 2010).

2.12 Un équilibre entre contrôle immunologique et évasion immune

La cohabitation et la coévolution du CMV depuis des milliers d'années ont aboutie à un état d'équilibre entre le virus et l'homme que nous constatons aujourd'hui. Plusieurs questions restent en suspens : Cet état est-t-il permanent ou bien au contraire s'inscrit-il dans une dynamique d'évolution qui verra vaincre un des deux belligérants ? Le système immunitaire est-il en train de gagner cette bataille ? Au contraire, existe-t-il une symbiose entre l'hôte et le CMV au travers de laquelle l'hôte tirerait des bénéfices indirects ? Il est impossible de répondre, mais il est facile de constater l'impact que chaque acteur peut avoir sur l'autre.

D'un côté, le virus s'est profondément adapté à son hôte afin d'échapper à une réponse immune qui n'arrive toujours pas à l'éradiquer. Nous ne rentrerons pas dans les détails, car plusieurs revues ont largement détaillées les différents mécanismes connus d'évasion immune (Crough and Khanna, 2009), (Freeman, 2009), (Mocarski, 2002), (Tortorella et al., 2000), (Soderberg-Naucler, 2006). Les grandes fonctions d'évasion sont détaillées dans le **tableau 7**. La conséquence première de ces mécanismes d'évasion est bien entendu une propension accrue du virus à récidiver. Grâce un modèle de singe, on sait même que ces mécanismes d'évasion mis en œuvre par le virus expliquent les surinfections à CMV, rencontrées en transplantation d'organes chez les sujets séropositifs pour le CMV qui reçoivent un organe d'un donneur aussi séropositif (Hansen et al., 2010). Le CMV humains code pour 4 protéines (US2-US3-US6-US11) qui, bien qu'elles aient des mécanismes d'actions différents, bloquent toutes, les présentations de l'antigène. La production de ces glycoprotéines a pour conséquence l'inhibition de la fonction effectrice des lymphocytes T CD8⁺ spécifique du virus et une augmentation de la réplication virale. Grâce à ces mécanismes d'évasion, le CMV est aussi considéré comme un virus entraînant une immunosuppression. En effet, la diminution d'expression membranaire des molécules HLA (Soderberg-Naucler, 2006), (Fletcher et al., 1998), (Reyburn et al., 1997), la diminution de la capacité à présenter l'antigène (Ahn et al., 1996), la diminution de la prolifération lymphocytaire T (Schrier et al., 1986), la diminution de la production de cytokine de type Th1 (Sester et al., 2008), la production de récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines solubles (Rahman et al., 1976), (Atalay et al., 2002), la production d'inhibiteur du complément (Spiller et al., 1997) et la perte de la capacité de migration des macrophages (Neote et al., 1993), (Gredmark et al., 2004), (Frascaroli et al., 2009) sont des modifications imprimées au système immunitaire par le virus potentiellement capable d'entraîner sa paralysie ou au moins une moins bonne efficacité vis à vis d'un autre pathogène (Freeman, 2009). Ces modifications viennent se

surajouter au mécanisme « d'inflation mémoire » observée dans le compartiment T alpha beta CD8+, lui-aussi à l'origine d'une baisse de l'immunité globale chez l'hôte.

Tableau 7: Fonction d'évasion au système immunitaire du CMV (D'après (Crough and Khanna, 2009)).

HCMV protein	Immune evasion function(s)
gpTRL11	Serves as viral Fc receptor to block ADCC
gpUL16	Binds to nonclassical MHC proteins (MICB, ULBP1, and ULBP2) and thus blocks NKG2D-mediated NK cell activation
gpUL18	Binds LIR1 and thus interferes with NK cell recognition; also acts as ligand for HLA G (expressed on fetal trophoblast); may have a role in utero
gpUL27	Chemokine receptor; postulated to modulate host type I/II interferon effects
gpUL33	Orphan chemokine receptor; may be important for viral dissemination
gpUL40	Encodes peptide that binds HLA E and thus interferes with NK cell recognition
gpUL78	Orphan chemokine receptor; may be important for viral dissemination
gpUL83	Inhibits proteasomal processing of IE-1
gpUL111a	Homologous to human IL-10; inhibits MHC class I/II expression and lymphocyte proliferation
gpUL118	Immunoglobulin G Fc receptor; function not defined
gpUL144	TNF receptor homologue; function not defined
gpUL146	Potent IL-8-like chemokine (referred to as viral CXC-1); induces chemotaxis of neutrophils
gpUS2, gpUS3, gpUS6, gpUS10, and gpUS11	MHC class I/II downregulation through interference in transporters associated with antigen processing and tapasin-dependent peptide loading; ubiquitin-dependent retrograde dislocation of MHC from the endoplasmic reticulum; prevents egress of MHC class I from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus
gpUS28	Chemokine receptor; sequesters CC chemokines and may assist in viral dissemination

Malgré cela, la réponse immunitaire anti-CMV, comme nous l'avons vu, occupe une part importante, unique et majeure au sein de la réponse immune de l'hôte, résumée au sein de la **figure 17**. Le système immunitaire sous la contrainte du virus s'est refaçonné de façon à garder le contrôle du virus, mais le constat général est qu'il l'a fait au prix de profondes modifications responsables d'effets parallèles que l'on qualifie « d'indirects ».

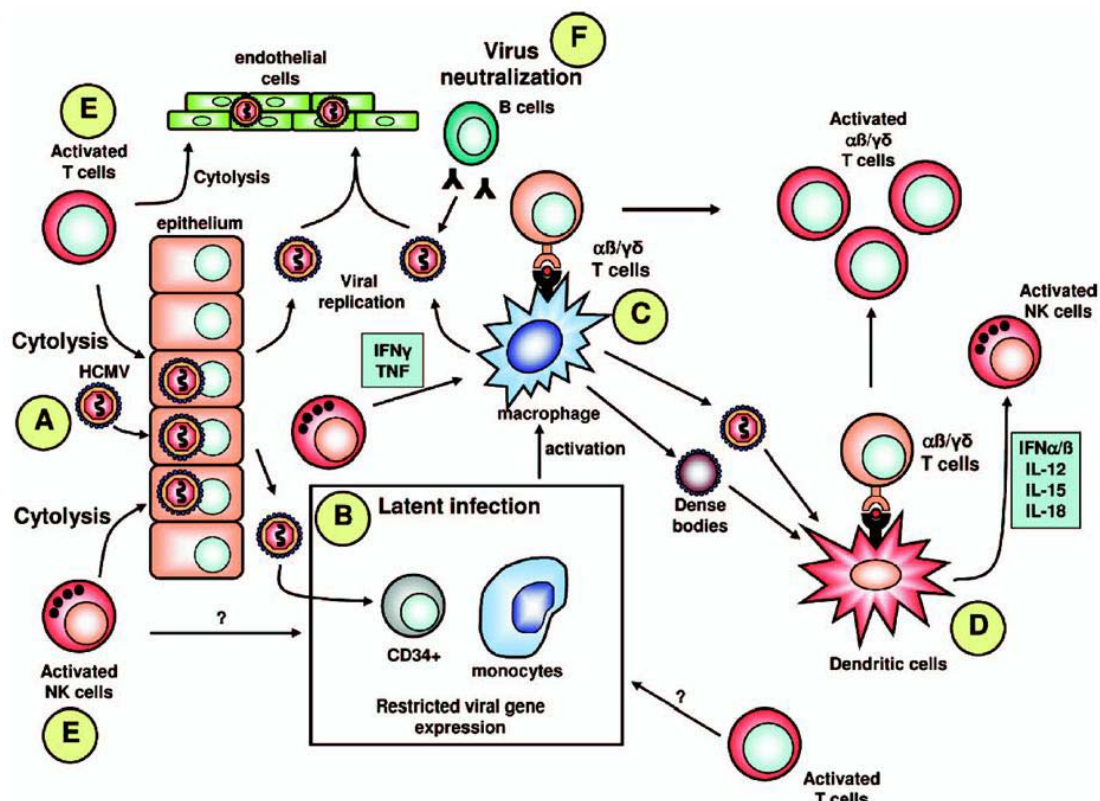


Figure 17: La Réponse immunologique anti-CMV : La primo-infection au CMV chez les individus sains se traduit classiquement par une phase de réplication dans l'épithélium des muqueuses (A), à partir duquel le virus se dissémine aux cellules mononuclées de la lignée myéloïde, y compris monocytes et cellules CD34+ où s'établit une infection latente (B). L'expression de gènes viraux est limitée dans ces cellules avec infection latente, diminuant ainsi leur reconnaissance par les cellules effectrices. La différenciation de ces monocytes infectés par le CMV en macrophages peut initier une infection productive (C). Les particules virales peuvent alors être apprêtées par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (ie cellules dendritiques), qui sont ensuite en mesure de mettre en œuvre une stimulation antigène-spécifique des cellules T (D). De plus, ces cellules dendritiques activées par Toll Like Receptor, peuvent aussi sécréter cytokines et chemokines capables d'activer le bras inné du système immunitaire (ie cellules Natural Killer NK) (D). Les macrophages infectés par le virus peuvent aussi stimuler directement les cellules T. Ces cellules T activées (CD8+, CD4+ et/ou lymphocytes T $\gamma\delta$) et les cellules NK peuvent induire la lyse directe des cellules infectées par le virus ou bloquer la réplication du virus par la sécrétion de cytokines telles que l'interféron- γ et le TNF- α (E). Un autre bras important de l'immunité adaptative implique les cellules lymphocytaires B, également activées par les cellules présentatrices de l'antigène et responsables du contrôle du virus extracellulaire par neutralisation médiée par les anticorps spécifiques (F) (D'après (Crough and Khanna, 2009)).

2.13 Effets indirects de l'infection à Cytomégalovirus

L'infection et la maladie à CMV définissent l'effet direct du virus qui envahit les tissus. Les effets directs sont l'apanage de l'immunosuppression et sont spécifiques au scénario de la transplantation. Les effets indirects regroupent des atteintes d'organes et des manifestations plus ou inattendues mais épidémiologiquement liées au CMV. Les effets indirects qui apparaissent dans ce contexte d'immunosuppression sont certainement les représentations cliniques exagérées et exacerbées : 1/ des mécanismes mis en jeu soit par le virus pour survivre et se transmettre, ou bien 2/ de la réponse immunitaire élaborée par l'hôte pour contrer le virus dans cette situation ou l'immunosuppression l'affaiblit (Freeman, 2009).

L'infection à CMV est associée à la survenue des rejets aigus en transplantation d'organe (Pouteil-Noble et al., 1993). La maladie à CMV est aussi un facteur de risque indépendant de rejet aigu à médiation lymphocytaire T (Sagedal et al., 2002), (Toupance et al., 2000). Le risque de rejet aigu est d'ailleurs abaissé chez les patients qui reçoivent un traitement préventif (15% vs 36%, $p=0.03$) (Reischig et al., 2008). Le rôle du virus dans l'induction du rejet aigu a été confirmé dans l'essai randomisé de Lowance et al. (Lowance et al., 1999) dans lequel les patients D+R- bénéficiant d'une prophylaxie anti-CMV présentaient une réduction de 50% des rejets aigus par rapport aux patients D+/R- sous placebo. Les relations entre rejet aigu et CMV semblent bi-directionnelles. Le CMV est effectivement un facteur de risque de rejet (Pouteil-Noble et al., 1993), mais ce phénomène n'est pas très clair. En effet, le CMV est considéré comme un virus « immunosuppresseur », échappant au système immunitaire. La réponse immune anti-CMV est aussi associée à une immunosénescence mobilisant un très grand nombre de cellules T CD8+ qui n'ont aucune réactivité croisée contre les alloantigènes. À la vue de ces éléments, cette association apparaît un peu paradoxale mais l'augmentation des molécules d'adhésion et des cytokines pro-inflammatoires au cours de l'infection à CMV dans les greffons pourrait maintenir une inflammation prolongée et par ce biais favoriser les lésions de rejets chroniques (Helantera et al., 2005), (Krogerus et al., 2003), (Legendre and Pascual, 2008). De même les cellules endothéliales infectées sont capables d'activer les cellules T CD4+ en leur faisant produire de l'interféron- γ (Waldman et al., 1993). À l'inverse, le rejet aigu est aussi un facteur de risque

de maladie à CMV (Sagedal et al., 2000), (Razonable et al., 2001). La réaction allogénique et l'activation lymphocytaire T peuvent en effet être à l'origine de la réplication du virus (Soderberg-Naucler et al., 1997b), grâce à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α . L'intensification de l'immunosuppression mise en place devant un rejet aigu est aussi un facteur favorisant la réactivation du CMV.

L'infection à CMV est associée avec des lésions de néphropathie chronique d'allogreffe (Tong et al., 2002) ou de fibrose interstitielle/atrophie tubulaire (Reischig et al., 2009) et une moins bonne survie de greffon après transplantation rénale (Kliem et al., 2008). La maladie à CMV est aussi associée à une moins bonne survie de greffon (Arthurs et al., 2008), surtout si elle survient avec un rejet aigu (Humar et al., 1999), (Nett et al., 2004). Les patients recevant une stratégie préventive semblent donc avoir une meilleure survie de greffon que les patients avec une stratégie préemptive (Kliem et al., 2008).

Les infections et les maladies à CMV sont aussi associées à une moins bonne survie des receveurs d'allogreffe rénale (Sagedal et al., 2004), en particulier les maladies à CMV tardives survenant à l'arrêt de la prophylaxie (Limaye et al., 2006), (Arthurs et al., 2008). Enfin, dans deux méta-analyses, il a été observé que la mise en place d'un traitement préventif était associé avec risque de décès moins important (Kalil et al., 2005), (Hodson et al., 2005).

En transplantation rénale, l'infection à CMV est associée à plus de sténose tardive (>3 mois) sur l'artère rénale des greffons (Pouria et al., 1998), (Audard et al., 2006) et à une moins bonne survie des greffons. Elle pourrait entraîner aussi plus d'accidents cardiovasculaires (Humar et al., 2000). En transplantation cardiaque, l'infection à CMV est associée à une sténose accélérée des artères coronaires et à la coronaropathie du transplant (McDonald et al., 1989), (Koskinen et al., 1993a), (Koskinen et al., 1993b), (Grattan et al., 1989). Ces lésions vasculaires propres à la transplantation s'expliquent en partie par les effets pro-inflammatoires du CMV sur les cellules endothéliales et musculaires lisses précédemment décrits (Bruggeman and van Dam-Mieras, 1991), (Zhou et al., 1999), (Lemstrom et al., 1993a), (Lemstrom et al., 1993b).

Alors que la souris infectée chronique avec le CMV semble protégée vis-à-vis d'un certain nombre d'infection bactérienne, le phénomène totalement inverse se produit chez l'homme dans le contexte de la transplantation rénale (Barton et al., 2007). On peut penser que l'immunosuppression médicamenteuse explique cette différence. Quoi qu'il en soit, l'immunosuppression induite ou aggravée par l'infection à CMV (évasion immune et « inflation mémoire ») pourrait expliquer l'association fréquente du CMV avec d'autres infections opportunistes fongiques (George et al., 1997), bactériennes (Falagas et al., 1996), ou virales (Chopra et al., 2003), (Humar et al., 2009). Logiquement, les patients recevant un traitement préventif font moins d'infections opportunistes, bactériennes et fongiques que ceux recevant un traitement préemptif (Sun et al., 2008), (Kalil et al., 2005), mais ce résultat reste discuté (Singh et al., 2005). Le traitement préventif anti-CMV prolongé pendant 6 mois (au lieu de 3 mois) permet cependant de faire passer le taux d'infections opportunistes (BKV, candidoses, HPV, HSV-1) de 27% à 13% (Humar et al., 2010).

Des liens entre infection à CMV et cancer existent. On le retrouve au sein des tumeurs coliques (Harkins et al., 2002), des gliomes (Cobbs et al., 2002) et des cancers de la prostate (Samanta et al., 2003). Mais, le CMV n'est pas un virus qui induit directement la transformation tumorale des cellules qu'il infecte. Il a été proposé qu'il joue un rôle « oncomodulateur » sur les cellules transformées en modifiant par exemple la résistance à l'apoptose des cellules, la mobilité cellulaire et bien sur en modulant la réponse immunitaire

(Soderberg-Naucler, 2006). Une protéine codée par le génome du CMV (US28) a cependant la capacité d'induire une transformation tumorale dans un modèle murin (Maussang et al., 2006). L'infection à CMV en post greffe pourrait aussi être associée à plus de lymphome EBV-induit (Fishman and Rubin, 1998), (Fishman et al., 2007), probablement parce que les sujets infectés par le MV sont plus souvent infectés par l'EBV. Cependant, les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits par le CMV partagent une réactivité contre les cellules infectées par le cytomégalo virus (CMV) et des cellules épithéliales tumorales (Halary et al., 2005). In vivo dans un modèle murin, elles ont la capacité d'inhiber la croissance tumorale (Devaud et al., 2009). En transplantation rénale à distance de la greffe, un taux élevé de lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} dans le sang est associé à une fréquence plus faible de cancers. Sur un suivi rétrospectif de 8 ans, une analyse des facteurs de risque potentiellement associés à la survenue des tumeurs post greffe (surtout cutanées) montre que l'absence d'infection à CMV pre- ou post-transplantation est associée à un risque de cancer 5.69 fois plus important (p=0.006). Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induit par le CMV semblent donc avoir chez l'homme un rôle anti-tumoral après greffe rénale (Couzi et al., 2010) **ARTICLE 5**. Alors que la persistance du CMV avait été vu jusqu'à présent sous l'angle exclusif de la persistance de la pathogénicité du virus, ces données suggèrent qu'une véritable symbiose a été établie entre le CMV et son hôte qui en retour a réussi à tirer des bénéfices, antibactériens (Barton et al., 2007) et maintenant anti-tumoraux.

Enfin de façon un peu plus anecdotique, l'infection à CMV pourrait être associée avec la survenue ultérieure d'un diabète post-transplantation (Hjelmsaeth et al., 2004), (Hjelmsaeth et al., 2005).

2.14 Comment suivre la réponse immunologique anti-CMV du patient transplanté ?

Il n'y a d'intérêt à mettre en place un suivi de la réponse immunologique anti-CMV que si celui-ci amène des réponses à des questions cliniques qui pourraient améliorer la prise en charge d'un patient. L'objectif numéro est de limiter la morbidité et les complications de l'infection et de la maladie à CMV. Avec l'avènement du Valgancyclovir qui est majoritairement utilisé comme traitement préventif, et qui a permis de faire baisser l'incidence des infections, le problème est désormais de savoir comment ce traitement peut être manipulé afin d'une part d'éviter les infections sévères et les maladies, et d'autre part d'éviter sa toxicité. L'idée finale est d'adapter pour chaque patient le traitement anti-viral au niveau de réponse immunologique anti-CMV développé par ce même patient. Concrètement, les questions suivantes se posent actuellement aux cliniciens et un suivi de cette réponse pourrait peut-être y répondre. Il s'agit surtout de trouver un outil simple, bon marché, reproductible prédisant les infections futures et pouvant s'inclure dans la prise en charge globale des patients :

- Chez les patients séropositifs pour le CMV, un suivi de la réponse immunologique anti-CMV permettrait-il de déterminer lesquels vont développer une réactivation ou une surinfection post-transplantation, autrement dit lesquels auront besoin d'un traitement anti-viral et lesquels n'en n'auront pas besoin ?
- Chez les patients séronégatifs pour le CMV, recevant un rein provenant d'un donneur séropositif, un traitement préventif est donné par la quasi-totalité des équipes. Cela fait d'ailleurs partie depuis peu des recommandations de prise en charge (Kotton et al., 2010). Chez ces patients un suivi de la réponse immunologique anti-CMV permettrait-il de déterminer lesquels vont développer une primo-infection ou une maladie post-transplantation à l'arrêt du traitement préventif, autrement dit lesquels auront besoin d'avoir un traitement préventif plus long ?

- Enfin chez tous les patients ayant développés une infection ou une maladie, lesquels connaîtront une récurrence ?

Il n'est pas certain que le suivi de la réponse immunologique anti-CMV à lui seul puisse répondre à toutes ces questions, car le niveau d'immunosuppression (Kotton et al.), la variabilité des souches virales et la cinétique d'apparition de la charge virale (Emery et al., 2000) sont aussi des déterminants de la maladie à CMV, mais il fait indiscutablement partie du jeu et son analyse doit être incluse dans ce raisonnement. Deux types de test sont actuellement disponibles : Des tests qualitatifs mesurant le niveau de présence des différents acteurs immunologiques impliqués et des tests quantitatifs mesurant le niveau de la réponse effectrice anti-CMV produite par l'ensemble de ces acteurs.

2.13.1 Tests qualitatifs

Les tests qualitatifs sont des analyses rapides et simples permettant d'énumérer les différents acteurs. On peut utiliser la cytométrie en flux pour détecter les lymphocytes T alpha beta CD4⁺ CD28⁻, les lymphocytes T CD8⁺ CD45RA⁺ CD27⁻, les lymphocytes T alpha beta CD8⁺ spécifiques du CMV (détectés grâce à des tétramères) et les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}. Un test ELISA suffit pour analyser les immunoglobulines de type G et de type M spécifiques du CMV. La majorité des études se sont concentrées sur l'analyse des lymphocytes TCD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du CMV, car leur expansion est bien démontré dans le sang mais aussi dans les organes infectés après une infection à CMV même minime (Westall et al., 2006). Les cellules NK et les cellules dendritiques bien qu'étant des acteurs majeurs potentiellement analysables dans le sang périphérique en cytométrie en flux, sont jusqu'à présent beaucoup moins étudiées.

Il a été observé chez 19 patients transplantés rénaux R+, que le pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV (détecté grâce à des tétramères HLA chargés avec des peptides pp65) ne permettait pas de prédire la survenue ultérieure d'une infection à CMV (Mattes et al., 2008). Un résultat identique a été observé par le groupes de Brisbane (Crough et al., 2007) et de Duarte (La Rosa et al., 2008). Le suivi immunologique en cytométrie en flux par la technique des tétramères des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV pose problème car il n'est pas exhaustif. Pour l'être, il faudrait avoir à disposition les tétramères HLA correspondant à toutes les molécules HLA de classe I rencontrées dans la population ainsi que l'ensemble des peptides du CMV présentés par ces molécules. Cette exhaustivité est inaccessible actuellement d'un point de vue technologique. En l'absence de détection de lymphocytes T CD8⁺ spécifique du CMV marqués par ces tétramères il est impossible de dire s'il s'agit d'une absence de réponse ou bien si la réponse est portée par des lymphocytes T reconnaissant d'autres tétramères actuellement non disponibles. Une façon d'affiner ce test pourrait être d'analyser plus précisément les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV, en rechercher un phénotype prédictif de la maladie à CMV. L'expression de PD-1 sur ces cellules pourrait être une piste car au cours de l'infection à CMV symptomatique tous les patients expriment PD-1 sur leur cellules T CD8⁺ spécifique du CMV avec une MFI toujours supérieure à 105.5 (La Rosa et al., 2008). Enfin, aucune étude à ce jour n'a testé si les lymphocytes T alpha beta CD4⁺ CD28⁻ CD27⁻, les lymphocytes T CD8⁺ CD45RA⁺ CD27⁻ ou les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} avaient la capacité de prédire correctement la survenue ultérieure d'une infection ou d'une maladie à CMV.

Actuellement le suivi immunologique qualitatif peut être fait en analysant la réponse humorale qui fournit un début de réponse aux questions posées précédemment. Chez les patients D+R- recevant un traitement préventif pendant 100 jours, la présence d'immunoglobine de type G anti-CMV à 6 mois post transplantation est associée avec un taux de maladie à CMV survenant après 6 mois quasiment négligeable : 1.3% contre 10% chez

ceux qui n'ont pas encore fait la séroconversion. Ce test extrêmement simple permet donc de prédire avec fiabilité le risque de maladie à CMV survenant 6 mois après greffe chez les patients ayant reçu 100 jours de prophylaxie (Humar et al., 2005).

2.13.2 Tests quantitatifs

Les tests quantitatifs sont des analyses plus complexes et plus longues qui mesurent la quantité d'interféron- γ produite ex-vivo après stimulation par les lymphocytes T spécifiques du CMV. L'interféron- γ produit par les lymphocytes T peut-être analysé 1/ en cytométrie en flux (co-marquage avec le CD69) après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides du CMV ou des lysat du CMV (Radha et al., 2005) ou après activation par des cellules dendritiques autologues préalablement infectées par le virus, 2/ par la technique ELISPOT après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides du CMV (Mattes et al., 2008), ou 3/ par ELISA après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides du CMV (QuantiFERON®-CMV).

La production par les lymphocytes T CD8+ d'interféron- γ analysée en cytométrie en flux après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides du CMV est apparue comme un bon outil en 2005 pour prédire la survenue ultérieure d'une maladie à CMV chez des transplantés cardiaques et pulmonaires principalement R+. Dans les 15 premiers jours post-greffe, la détection de lymphocytes T CD8+ spécifiques des peptides IE-1 du CMV (>0.2% des lymphocytes T CD8+) est associée avec une absence de maladie à CMV alors qu'en dessous de ce seuil, le risque de maladie est de 50 % (Bunde et al., 2005). Chez 29 transplantés hépatiques majoritairement R+, un pourcentage de lymphocytes T CD8+ produisant de l'interféron- γ supérieur à 0.4% dans les 20 jours post-transplantation (analysée en cytométrie en flux après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides pp65) prédit une absence d'infection à CMV avec une sensibilité de 87% et une spécificité de 62% (Nebbia et al., 2008).

La production par les lymphocytes T CD4+ d'interféron- γ analysée en cytométrie en flux après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par un lysat de cellules infectées par le CMV donne aussi des résultats prometteurs : Dans une cohorte de transplantés cardiaques tous séropositifs pour le CMV, les patients ayant plus de 400 cellules T CD4+ spécifiques du CMV/ml au cours du premier mois post greffe développent au cours des mois suivants des infections à CMV avec un pic de charge virale et une charge virale moyenne beaucoup plus faible que ceux qui n'ont pas ce niveau d'immunité T CD4+ spécifique (Tu et al., 2006). Malheureusement, on ne sait pas si l'utilisation d'un seuil plus haut peut prédire avec certitude l'absence d'infection. En transplantation rénale, la présence de plus 0.25% de lymphocytes T CD4+ produisant de l'interféron- γ après une activation par le CMV semble aussi protéger les patients d'une réactivation (Sester et al., 2001). Le seuil reste cependant flou, car chez 48 transplantés rénaux R+, un pourcentage de lymphocytes T CD4+ produisant de l'interféron- γ supérieur à 0.03% prédit aussi l'absence d'infection à CMV dans les huit semaines suivantes, avec une valeur prédictive positive de 95% et une valeur prédictive négative de 40% (Egli et al., 2008). La définition d'un seuil reproductible entre les différents centres est donc indispensable. On peut retenir aussi que chez 29 transplantés hépatiques majoritairement R+, un pourcentage de lymphocytes T CD4+ produisant de l'IL-2 supérieur à 0.1% dans les 20 jours post-transplantation (analysée en cytométrie en flux après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par un lysat de CMV) prédit aussi une absence d'infection à CMV avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 62% (Nebbia et al., 2008).

D'une façon générale, il apparaît que l'utilisation de peptides fournisse une meilleure activation des cellules T CD8+ que les lysats de CMV et que ce soit l'inverse avec les cellules T CD4+ (Radha et al., 2005), (Egli et al., 2008). Malgré tout, cette technique manque de sensibilité et ne permet pas dans certaines études de prédire la survenue d'une infection ou d'une maladie (La Rosa et al., 2007). En effet, la recherche de lymphocytes T spécifiques du CMV par activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides d'IE-1 et de pp65, permet d'obtenir environ 20% de faux négatifs (c'est-à-dire des patients ayant une réponse T spécifiques du CMV non identifiée par cette technique) (Lillieri et al., 2007).

La production d'interféron- γ par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ analysée en cytométrie en flux après activation par des cellules dendritiques autologues infectées par une souche endothélotrope du CMV de virus semble être un meilleur outil pour prédire les infections à CMV sévères (définies par la détection d'une antigénémie pp65 supérieure à 100 leucocytes/ 200000 cellules ou une PCR CMV > à 300000copies/ml) chez des transplantés cardiaques, rénaux et pulmonaires R+ (Lozza et al., 2005), (Gerna et al., 2006a), (Lillieri et al., 2007), (Gerna et al., 2009). En effet la présence de lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques du CMV (producteur d'interféron- γ) à un taux supérieur à 0.4/ μ l de sang dans le premier mois post transplantation est associée avec un pourcentage faible d'infection sévères ultérieures : 14.3% contre 76.5% chez ceux n'ayant pas développé ce niveau d'immunité dans le premier mois. Les infections qui étaient apparues chez les patients avec une réponse T CD4+ et CD8+ spécifique du CMV supérieure à 0.4/ μ l de sang étaient des patients ayant reçu une intensification de leur immunosuppression pour le traitement d'un rejet aigu (Gerna et al., 2006a). Cette technique bien que plus sensible que celle précédemment décrite a quand même le gros désavantage d'être extrêmement longue.

L'analyse de la production d'interféron- γ par la technique ELISPOT a été moins étudiée. Cette technique permet d'observer qu'une diminution significative du nombre de lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV producteurs d'interféron- γ (nombre initial divisé par 5) précède le plus souvent une réactivation de l'infection à CMV en post-transplantation (Crough et al., 2007). Chez 19 patients transplantés rénaux R+, le pourcentage de lymphocytes T CD8+ produisant de l'interféron- γ en post-transplantation (analysée en ELISPOT après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides pp65) ne prédit pas la survenue ultérieure d'une infection à CMV. En revanche, la diminution du pourcentage de lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV (identifiés par des tétramères) produisant de l'interféron- γ (ELISPOT) est associé avec un risque 14 fois plus important de développer une infection à CMV en post transplantation. La probabilité de faire une infection à CMV est de 60 % quand seulement 10% des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV sont capables de produire de l'interféron- γ (Mattes et al., 2008).

Enfin, la production d'interféron- γ analysée par une technique ELISA après activation des cellules mononuclées du sang périphériques par des peptides du CMV (QuantiFERON®-CMV) semble actuellement être l'outil le plus prometteur pour prédire la survenue ultérieure d'une maladie à CMV chez des receveurs d'organes solides traités préventivement par valgancyclovir pendant 3 mois. Cette technique a l'avantage d'être simple, reproductible et commercialisée (la seule à ce jour). Elle a une sensibilité comparable à la technique ELISPOT avec laquelle elle est bien corrélée, et peut tout à fait être utilisée chez des patients transplantés d'organes sous immunosuppression (Walker et al., 2007). Le contrôle positif de ce test repose sur une activation des lymphocytes par un mitogène. Mais dans les deux premiers mois post transplantation, 30% des patients n'ont pas de réponse robuste à ce mitogène ce qui pose problème dans l'interprétation du test (Westall et al., 2008). Avec un test considéré positif quand la production d'interféron- γ est supérieure à 0.2UI/ml, le test QuantiFERON®-CMV ne permet pas de prédire la réactivation d'un CMV chez 23 R+ ou une primo-infection à

CMV chez 8 D+R- transplantés pulmonaires (Westall et al., 2008). En revanche chez des receveurs d'organes solides traités préventivement par valgancyclovir pendant 3 mois (73 R+ et 35 D+R-), la positivité du test QuantiFERON®-CMV dans les 3 premiers mois post-greffe (définie par une production d'interféron- γ supérieure à 0.1UI/ml) prédit une quasi-absence de maladie à CMV tardive : 5.3% contre 22.9% chez ceux avec un test négatif (Kumar et al., 2009). Seulement 3 % des patients développent une virémie sous traitement préventif par valgancyclovir (Paya et al., 2004). Donc pour la première fois, il est suggéré dans cette étude qu'une réponse immunologique cellulaire peut se mettre en place chez un tiers des patients en l'absence de virémie. Ce résultat très étonnant mérite d'être confirmé dans une plus grande étude, car il est pour l'instant admis qu'une virémie est indispensable à la mise en place d'une réponse immunologique protectrice (Legendre and Pascual, 2008).

Bien que beaucoup d'équipes aient essayé de trouver un marqueur simple, fiable et reproductible qui permette de prédire une infection ou une maladie à CMV, aucun test n'a pour l'instant fait la preuve de son efficacité (**tableau 8**). La définition d'un seuil reproductible entre les différents centres est aussi indispensable. Actuellement la multitude de tests et de seuils rendent la problématique un peu confuse. D'autres voies sont donc à rechercher pour trouver cet outil reproductible. Quels que soient les seuils utilisés, le type lymphocytaire étudié ou bien la technique utilisée, la conclusion commune à ces études, est que le contrôle ultime de l'infection à CMV passe par l'instauration d'une réponse cellulaire efficace.

Tableau 8: Avantages et Inconvénients des différents tests utilisés dans le suivi de la réponse immune anti-CytomégaloVirus (D'après (Kotton et al.)).

Assay	Advantages	Limitations	Comments	Predict viremia	Predict disease
Intracellular cytokine staining	Whole-blood assay with low blood volume (1 mL) or PBMC	Needs access to a flow cytometer	Most data available with this technique	Yes	Yes
	Short incubation time Results available within 24 hr Knowledge of HLA not necessarily required Identification of CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells Quantitative and qualitative characterization	Not standardized	Potential to freeze PBMCs and ship to reference laboratory for testing		
QuantiFERON-CMV (Cellestis Inc.)	Whole-blood assay with low blood volume (3 mL)	CD8 ⁺ responses only	Approved in Europe	No data	Yes
	Simple to perform Results available after 30–40 hr Can be performed in any center and stimulated plasma could be sent to reference laboratory	Sensitive to lymphopenia Rare patients whose HLA types are not covered in assay			
ELISPOT	Identifies both CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells	Need for purified PBMC from at least 10 mL blood	Potential to freeze PBMCs and ship to reference laboratory for testing	No	Yes
	Knowledge of HLA not necessarily required	Cannot differentiate CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells			
MHC multimer staining	Results available within 30–40 hr Fast assay (1–2 hr)	Not standardized CD8 ⁺ responses only	Unlikely to be used on a widespread basis	No	No
	Whole-blood assay with low blood volume (0.5–1 mL) or PBMC	Needs access to a flow cytometer HLA and epitope specific No information about function unless combined with ICS Not standardized			
Cylex ImmunKnow	CD4 ⁺ response	Not specific for CMV	Commercially available in United States	No	No

PBMC, peripheral blood monocyte cell; HLA, human leukocyte antigen; CMV, cytomegalovirus; MHC, major histocompatibility complex.

ARTICLES GENERES AU COURS DE LA THESE

Article 1 : Long-term expansion of effector/memory V δ 2^{neg} gamma delta T cells is a specific blood signature of CMV infection

Vincent Pitard, David Roumanes, Xavier Lafarge, Lionel Couzi, Isabelle Garrigue, Marie-Edith Lafon, Pierre Merville, Jean-François Moreau and Julie Déchanet-Merville

blood

2008 112: 1317-1324
Prepublished online Jun 6, 2008;
doi:10.1182/blood-2008-01-136713

Long-term expansion of effector/memory V δ 2- $\gamma\delta$ T cells is a specific blood signature of CMV infection

Vincent Pitard, David Roumanes, Xavier Lafarge, Lionel Couzi, Isabelle Garrigue, Marie-Edith Lafon, Pierre Merville, Jean-François Moreau and Julie Déchanet-Merville

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/112/4/1317>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:
[Immunobiology](#) (3680 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>



Long-term expansion of effector/memory V δ 2⁻ γ δ T cells is a specific blood signature of CMV infection

Vincent Pitard,^{1,2} David Roumanes,^{1,2} Xavier Lafarge,^{1,2} Lionel Couzi,^{1,3} Isabelle Garrigue,^{1,4} Marie-Edith Lafon,^{1,4} Pierre Merville,^{1,3} Jean-François Moreau,^{1,2,5} and Julie Déchanet-Merville^{1,2}

¹Université Bordeaux 2, Bordeaux; ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5164, Bordeaux; ³Département de Néphrologie et Transplantation Rénale, ⁴Laboratoire de Virologie, and ⁵Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

The ability of human γ δ T cells to develop immunologic memory is still a matter of debate. We previously demonstrated the involvement of V δ 2⁻ γ δ T lymphocytes in the response of immunosuppressed organ recipients to cytomegalovirus (CMV). Here, we demonstrate their ability to mount an adaptive immune response to CMV in immunocompetent subjects. V δ 2⁻ γ δ T-cell peripheral blood numbers, repertoire restriction, and cytotoxicity against CMV-infected fibroblasts were markedly

increased in CMV-seropositive, compared with CMV-seronegative, healthy persons. Whereas V δ 2⁻ γ δ T cells were found as naive cells in CMV⁻ patients, they virtually all exhibited the cytotoxic effector/memory phenotype in CMV⁺ patients, which is also observed in transplanted patients challenged with CMV. This long-term complete remodeling of the V δ 2⁻ γ δ T-cell population by CMV predicts their ability to exhibit an adaptive anti-CMV immune response. Consistent with this,

we observed that the secondary response to CMV was associated with a faster γ δ T-cell expansion and a better resolution of infection than the primary response. In conclusion, the increased level of effector-memory V δ 2⁻ γ δ T cells in the peripheral blood is a specific signature of an adaptive immune response to CMV infection of both immunocompetent and immunosuppressed patients. (Blood. 2008;112:1317-1324)

Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) is a widespread β -herpesvirus that establishes a lifelong viral persistence without detectable symptoms in immunocompetent patients but with life-threatening consequences in immunologically immature or compromised patients. Many studies have been reported that support an important role for adaptive T lymphocytes in the control of CMV infection.¹⁻⁴ In addition, we have demonstrated that the γ δ T-cell subpopulation contributes to the anti-CMV immune responses.^{5,6} These unconventional T cells are generally considered to be intermediates between innate and adaptive immunity because of their rapid and massive responses to very diverse immune challenges.

Compelling data exist that demonstrate the importance of γ δ T cells in various microbial infections in humans. They exhibit *in vitro* reactivity against cells infected by viruses, bacteria, or parasites and are selectively expanded in the peripheral blood of infected patients.⁷⁻¹⁰ The majority of human circulating γ δ T cells express a T-cell receptor (TCR) encoded by the V γ 9 and V δ 2 gene segments. These cells are activated after interaction with nonpeptidic phosphorylated compounds, collectively called phosphoantigens, which are metabolic intermediates of the isoprenoid biosynthetic pathway.^{11,12} These phosphoantigens are expressed by a variety of bacteria and parasites and are also present in some tumors. The other γ δ T cells are known as V δ 2⁻ γ δ T cells, are largely located in mucosal epithelia and in the spleen, and represent approximately 20% of all circulating γ δ T cells. These cells predominantly express a TCR containing the V δ 1 region. Their repertoire in the peripheral blood of most healthy adults is restricted, whereas it is polyclonal in the thymus and in cord

blood.¹³⁻¹⁵ This observation suggests that unknown environmental factors encountered during adult life are selectively amplifying the V δ 1 T lymphocytes subpopulation. The ligand specificity of V δ 1 γ δ T cells has been much less explored than that of V γ 9V δ 2 T cells, even though some *in vitro* isolated V δ 1 γ δ T-cell lines or clones have been reported to be activated by CD1c¹⁶ or by MHC class I-related chain A or B.¹⁷

Although γ δ T cells express receptors that are encoded by somatically rearranged genes, they are generally considered to be innate-like effectors unable to establish antigen-specific memory. Nevertheless, adaptive immune responses mediated by V γ 9V δ 2 T cells have been shown to occur in macaques infected with live mycobacteria. The adaptive response to a secondary challenge had shorter kinetics and a higher magnitude V γ 9V δ 2 T-cell response.¹⁸ In contrast, injection of an agonist synthetic phosphoantigen leads to γ δ T-cell exhaustion in cynomolgus monkeys.¹⁹ In humans, phosphoantigen-induced *in vitro* proliferation of V γ 9V δ 2 T cells is increased by prior *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vaccination.^{20,21} This result suggests that human memory V γ 9V δ 2 T cells exist, but *in vivo* support for this conclusion has not been reported. To our knowledge, the ability of V δ 2⁻ γ δ T cells to develop a memory response has never been addressed.

Tissue localization of V δ 2⁻ γ δ T cells in physiologic conditions limits their study in humans. However, V δ 2⁻ γ δ T cells, but not V γ 9V δ 2 T cells, can persistently expand in the peripheral blood of organ recipients with CMV infection, suggesting that they contribute to the antiviral immune response in this immunocompromised context.⁵ This suggestion has been confirmed by the demonstration

Submitted January 29, 2008; accepted May 27, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 6, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-01-136713.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2008 by The American Society of Hematology

that V δ 2⁻ γ δ T-cell expansion is concomitant with the resolution of the viremia²² and that V δ 2⁻ γ δ T-cell clones and lines isolated from the patients kill CMV-infected cells and limit viral replication in vitro.⁶ The immunosuppressed status of transplant patients might be related to this particular expansion and involvement of V δ 2⁻ γ δ T cells during the host response against CMV. In this line, similar V δ 2⁻ γ δ T-cell expansions associated with CMV infections have been reported in immunodeficient children bearing a hypomorphic mutation in the Recombination Activating Gene-1 gene.^{23,24} Thus, the role of immunosuppression in the response of V δ 2⁻ γ δ T cells to CMV remains unresolved, and studies in immunocompetent patients are needed.

CMV infection in immunocompetent patients is asymptomatic, thus preventing studies on acute primary infections. Therefore, in the present study, we compared the phenotype and the functions of γ δ T-cell subsets present in the peripheral blood of healthy immunocompetent patients who had been exposed to CMV and were seropositive, to those who were CMV-seronegative. Strikingly, by selecting random cohorts of blood donors based only on their CMV serologic status, we found major differences of V δ 2⁻ γ δ T-cell percentages, repertoire, anti-CMV effector functions, and phenotype. All these features are highly suggestive of a long-term selection of a memory-like γ δ T-cell subset. Accordingly, we also showed that previous contact with CMV induced a rapid recall expansion of V δ 2⁻ γ δ T cells, which coincided with better infection resolution when CMV was reactivated in transplanted patients. These hallmarks of a secondary response represent the first in vivo demonstration of a human γ δ T-cell adaptive antiviral immune response. This study also highlights a very specific relationship between the highly prevalent virus CMV and a still enigmatic subset of human γ δ T cells.

Methods

Blood samples from healthy persons

Blood leftovers were obtained from anonymous healthy donors enrolled in the local blood bank cytopheresis program. Samples were subjected to determinations of herpes simplex virus (HSV), varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), and CMV serologies using specific enzyme-linked immunosorbent assay kits (Ortho, Eurogentec, or Enzygnost anti-CMV/IgG and IgM; Dade Behring, Deerfield, IL). CMV-seronegative (n = 80) and CMV-seropositive (n = 106) donor groups had comparable mean ages (mean [range] = 40 [19-60] years vs 41 [19-59] years, respectively, *P* > .05) and sex ratios (male/female = 1.5 vs 0.83, respectively, *P* > .05).

Renal transplant patients

CHU Bordeaux's ethics committee for the protection of patients involved in biomedical research has approved the study. After giving their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, 46 renal transplant patients receiving a standard immunosuppressive regimen (corticosteroids, anticalcineurins, and antimetabolites, with or without antithymocyte immunoglobulins) and experiencing CMV infection were analyzed for the delay between CMV infection onset and γ δ T-cell expansion in the peripheral blood. The duration of infection was also recorded. Inclusion in the study was based on CMV infection after transplantation and the CMV serology status of the donor and the recipient at the time of the graft. Only D⁺/R⁻ (n = 25) and D⁻/R⁺ (n = 20) patients were studied to compare primary CMV infections to CMV reactivations, respectively. CMV infection was diagnosed based on detection of CMV pp65 antigen (> 1 cell per 2 × 10⁵ leukocytes) in peripheral blood leukocytes (CINAKit; Argene-Biosoft, Varhiles, France).

Flow cytometric analysis

Monoclonal antibodies (mAbs) directed against the following molecules were purchased from Beckman Coulter (Marseille, France): TCR-C δ , TCR-V δ 1, TCR-V δ 2, TCR-V δ 3, NKG2A, NKp80, CD94, CD57, CD158b/j, CD158a/h, CD158i, and CD158e. mAbs directed against CD3, CD27, CD28, CD45RA, CD62L, perforin, and granzyme B were from BD Biosciences (San Jose, CA), and the anti-NKG2C mAb was from R&D Systems (Minneapolis, MN). Staining was performed on whole blood as previously described and analyzed on a FACScalibur Cytometer or a FACScanto Cytometer (BD Biosciences).⁵ At least 5000 T lymphocytes were analyzed for 3-color staining and 100 000 T lymphocytes were analyzed for 6-color staining.

Analysis of TCR CDR3-length distribution by Immunoscope

Donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs; 5 × 10⁶) were used to prepare total RNA in TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo-dT primers and MMLV-reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI). cDNAs were then amplified with V δ 1 (GCCTTA-ACCATTTCAGCC) or V δ 2 (TACCGAGAAAAGGACATCTATGGC) and C δ (GTCGTGTTGAACTGAACATGTCCTG) primers. Forty amplification cycles were performed followed by an additional completion step of 1 hour at 72°C. Aliquots (2 μ L) of the polymerase chain reaction products were reacted in a 2-cycle run-off reaction supplemented with the fluorescent C δ FAM primer (5'-ACGGATGGTTTGGTATGAGGCTGA-3'). Each labeled product was then loaded onto a 4.5% acrylamide sequencing gel for separation by size. The fluorescence intensity was measured with a DNA sequencer 373A and analyzed with Genescan Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). To quantify the deviation of sample T-cell repertoires from controls as measured by Immunoscope, we introduced an index of oligoclonality as described previously.⁵ This index is defined as follows:

$$\text{Index of clonality} = \sqrt{\sum_{(\delta, CDR3)} (\text{cont}_{(\delta, CDR3)} - \overline{\text{cont}_{(\delta, CDR3)}})^2}$$

where $\text{cont}_{(\delta, CDR3)}$ is the contribution of the ($\delta, CDR3$) combination to the donor repertoire and $\overline{\text{cont}_{(\delta, CDR3)}}$ is the contribution of the ($\delta, CDR3$) combination to the average repertoire.

Generation of polyclonal γ δ T-cell lines

V δ 2⁻ γ δ T-cell subpopulations were sorted from blood donor PBMCs using a combination of anti-V δ 1 mAb, anti-V δ 3 mAb, and magnetic beads coated with sheep anti-mouse Ig (Invitrogen). Bead-adherent cells were further expanded in culture with RPMI medium supplemented with 10% human serum, 1000 U/mL of rIL-2 (Chiron, Suresne, France), 1 μ g/mL of PHA-L (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), and irradiated allogeneic PBMCs (35 Gy). After 1 month of culture, T-cell lines were phenotyped by flow cytometry and used in the CD107 cytotoxicity assay.

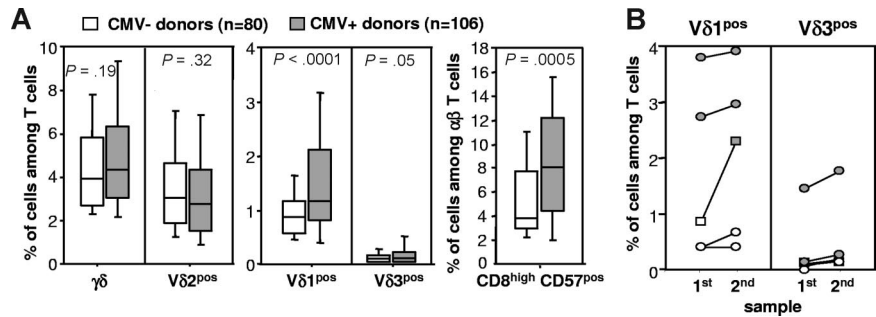
CD107 cytotoxicity assay

Subconfluent monolayers of primary foreskin fibroblasts (FSFs) were incubated with a CMV suspension (TB40/E strain) at a multiplicity of infection of 1 and cultured for 5 days at 37°C. Infected cell layers were washed before being used for coculture experiments with γ δ T-cell clones. The cytotoxic potential of γ δ T-cell lines was measured by the flow cytometric CD107a assay as previously described.²⁵ Briefly, γ δ T cells were cocultured with infected or uninfected FSFs for 6 hours in the presence of anti-CD107a mAb (H4A3, BD Biosciences). Brefeldin A was added in the coculture for the last 5 hours. Then cells were harvested, surface stained with anti-C δ and anti-CD3 mAbs, and analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

Data are expressed as median (range) or mean plus or minus SD. The statistical differences between groups of CMV⁻ and CMV⁺ donors were

Figure 1. Higher percentages of V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells in CMV⁺ vs CMV⁻ healthy subjects. The percentage of $\gamma\delta$ T cells in the freshly collected peripheral blood of 80 CMV⁻ and 106 CMV⁺ blood donors was determined by flow cytometry. Representative raw data are presented in Figure S1. (A) The medians, 25th and 75th percentiles (bottom and top of histograms), and 10th and 90th percentiles (bottom and top bars) of $\gamma\delta$, V δ 2⁺, V δ 1⁺, V δ 3⁺ T cells in the T-lymphocyte population, and CD8^{high}CD57⁺ cells in the $\alpha\beta$ T-cell population. (B) In the course of the study, blind phenotyping of V δ 1⁺ and V δ 3⁺ $\gamma\delta$ T-cell populations was performed twice for 5 subjects with an interval of several weeks. ○ represent seronegative subjects; ●, seropositive subjects; □ and ■, subject presenting a CMV seroconversion between first and second sample.



tested with the unpaired Mann-Whitney U test using Statview software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Differences were considered to be significant when P was less than .05.

Results

The percentage of circulating V δ 1 $\gamma\delta$ T cells is higher in CMV-seropositive (CMV⁺) donors than CMV-seronegative (CMV⁻) donors

We previously demonstrated that V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells participate in responses to CMV in immunosuppressed allograft recipients. To evaluate whether V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells are also involved in this response in immunocompetent patients, we measured and compared the percentages of $\gamma\delta$ T-cell subsets expressing the 3 main V δ chains (V δ 1, V δ 2, and V δ 3) in the peripheral blood of CMV⁺ ($n = 80$) and CMV⁻ ($n = 106$) healthy blood donors. As expected, the total $\gamma\delta$ T-cell population was mainly composed of V δ 2 cells, which had the same mean percentage in both groups of donors (Figure 1A, Figure S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). However, the percentages of V δ 1 cells were significantly higher in CMV⁺ than in CMV⁻ patients ($P < .001$, Figure 1A), although far lower than those observed in transplant patients (~10%).²⁶ In all groups, V δ 3 T cells were barely detectable using flow cytometry, and it was therefore difficult to make comparisons between groups for this subset. Consistent with previous results, a statistically significant increase of CD8^{high}CD57⁺ $\alpha\beta$ T cells was observed in CMV⁺ patients ($P = .005$).²⁷ Because these phenotypic tests were performed on blood samples collected over a period of several months, 5 subjects from this cohort were blindly analyzed twice at distinct blood collection times. They were considered only once within the cohort of 186 donors for the statistical analysis. Notably, 1 subject who seroconverted in the course of the study showed an increase in V δ 1⁺ T-cell levels between the first and the second blood test (Figure 1B). In conclusion, there is an increased number of circulating V δ 1 T cells in CMV⁺ immunocompetent patients. This is probably the signature of a prior $\gamma\delta$ T-cell selection in the course of CMV infection.

Influence of CMV infection on the repertoire of V δ 1 $\gamma\delta$ T cells

If V δ 1 $\gamma\delta$ T cells are selectively expanded by CMV challenge, they should display a restricted repertoire. Several studies have reported that restricted repertoire of V δ 1 T cells can be found in some healthy persons, but the reason for this is unknown.^{13-15,28} To address this issue, complementary determining region 3 (CDR3) size distributions of TCR V δ 1 chains expressed by PBMCs were analyzed by the Immunoscope technique in 10 CMV⁺ and

10 CMV⁻ healthy blood donors. As shown in Figure 2, the repertoire of V δ 1 T cells, but not that of V δ 2 T cells, was more restricted in seropositive patients than in seronegative patients. We next used a quantitative index of clonality, which measures the deviation between the repertoire of a given donor and an average repertoire computed as the arithmetic mean of the repertoire of all the donors.⁵ Accordingly, we observed a correlation ($P < .003$) between the indices of clonality of V δ 1 T cells, but not that of V δ 2 T cells, and the CMV serology status of the patient (Figure 2A,B left panels). This result demonstrated once again that the V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T-cell involvement in the anti-CMV immune response is unique.

We then tested whether CMV seropositivity was linked to other herpesvirus seropositivity, which might bias the aforementioned results. All 20 donors were seropositive for VZV and only one was negative for EBV, indicating that these viruses could not be held responsible for the observed restriction of the V δ 1 repertoire in some subjects. Nine patients were seropositive for HSV-1, among whom 5 were also CMV⁺ and 4 were CMV⁻. Ten patients were HSV-seronegative, among whom 4 were CMV⁺ and 6 were CMV⁻. These results indicate that there was not a correlation between CMV and HSV seropositivity. No statistical correlation between V δ 1 or V δ 2 repertoire restriction and HSV seropositivity could be observed (Figure 2 bottom right). In summary, CMV infection was linked to the V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T-cell repertoire in the competent immune system.

Amplification of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells reactive against CMV-infected cells in CMV⁺ subjects

To determine whether these expanded V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells from CMV⁺ subjects were reactive against CMV, V δ 1⁺ and/or V δ 3⁺ $\gamma\delta$ T cells were sorted from the donor PBMCs. Four CMV⁺ donors with more than 1% V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells, and 6 CMV⁻ donors with less than 0.5% of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells were analyzed. The sorted V δ 1⁺ and V δ 3⁺ $\gamma\delta$ T cells were polyclonally expanded with PHA-L, IL-2, and allogeneic PBMCs. This in vitro polyclonal activation has been previously shown to maintain the initial in vivo repertoire of T cells.²⁹ When incubated for 6 hours with CMV-infected FSF monolayers, a significantly higher proportion of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells from CMV⁺ donors expressed membrane CD107a, a sensitive marker of cytotoxic activity, in comparison to cells from CMV⁻ donors (Figures 3, S2). As a negative control, uninfected FSFs induced a minimal membrane expression of CD107a on T cells. The mean percentages plus or minus SD of CMV-reactive V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells (the percentage of CD107a⁺ cells on CMV-infected FSFs minus the percentage of CD107a⁺ cells on noninfected FSFs) were 13.7% plus or minus 8.8% for the 4 CMV⁺ donors and 2.7% plus or minus 2.4% for the 6 CMV⁻ donors ($P = .01$). These results indicate that at least some of the expanded V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells in

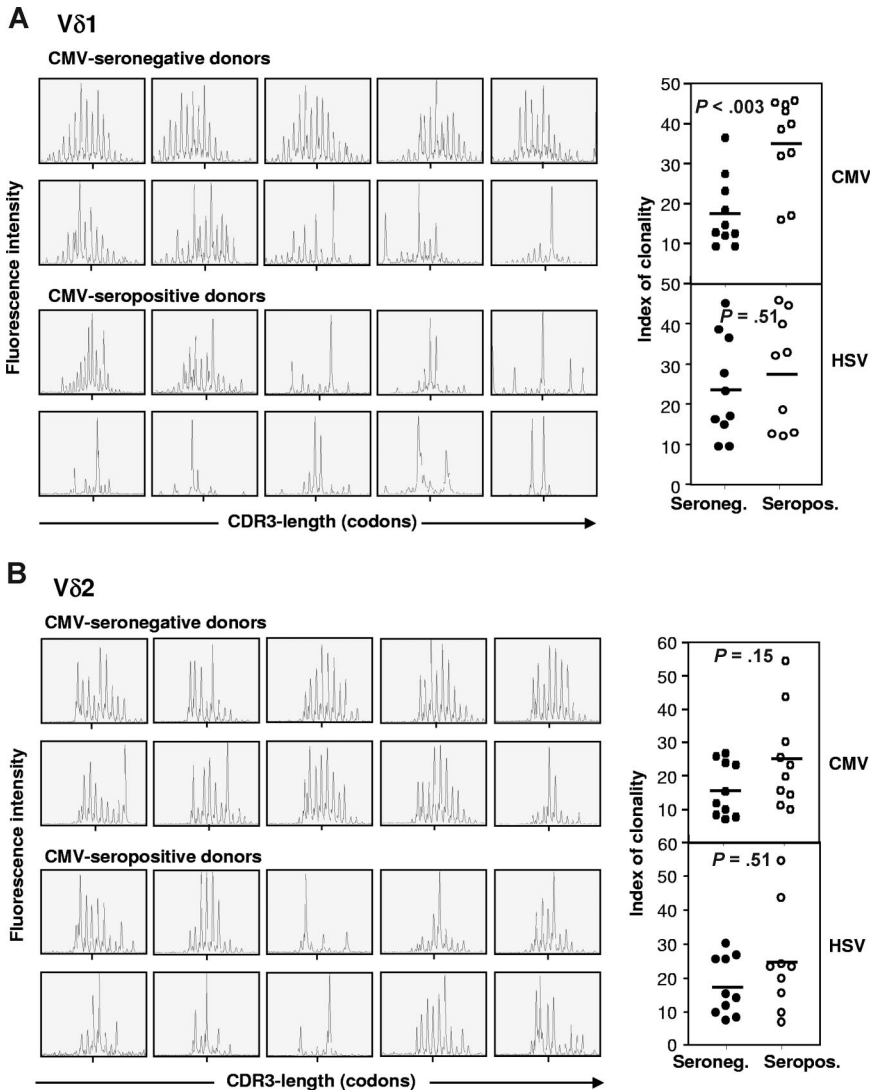


Figure 2. Oligoclonality of V δ 1, but not V δ 2, repertoire was more pronounced in CMV⁺ compared with CMV⁻ subjects. Profiles of C δ -V δ 1 (A) and C δ -V δ 2 (B) CDR3 length distribution were obtained by Immunoscope analysis of the PBMCs of 10 CMV⁻ and 10 CMV⁺ donors. (Left panels) Fluorescence intensity is represented in arbitrary units as a function of the size of single-stranded DNA fragments. (Right panels) The index of clonality for each patient studied was calculated as indicated in "Analysis of TCR CDR3-length distribution by Immunoscope" and plotted as a function of the donor CMV (top panels) or HSV (bottom panels) serology status. HSV serology could not be determined for one CMV-seropositive donor, explaining why only 19 donors are plotted in the bottom panels. Means are indicated by a short line.

CMV⁺ patients were specific for CMV-induced antigenic determinants expressed by infected fibroblasts.

Opposite effector versus naive phenotype of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells in CMV⁺ and CMV⁻ donors, respectively

To test whether these expanded V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells had memory activity, we analyzed the phenotype of freshly collected PBMCs. Analysis of CD27, CD28, CD45RA, and CD62L expression by V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells revealed strikingly different profiles for CMV⁻ and CMV⁺ donors (Figures 4A, S3). V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells expressed mainly a CD45RA⁺ CD27⁺ CD28^{+/-} CD62L⁺ naive phenotype in CMV⁻ donors. In sharp contrast, they were predominantly CD45RA⁺ CD27⁻ CD28⁻ CD62L⁻ effector/memory (TEMRA) cells in CMV⁺ donors. As shown in Figure 4, the variability of the expression of CD45RA/CD27 was low between patients within the tested cohort. The mean percentage of TEMRA cells in the V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T-cell population was 13.7% plus or minus 7.4% in CMV⁻ donors (n = 9) and 68.4% plus or minus 15.7% in CMV⁺ donors (n = 9; $P < .001$). V δ 1 and V δ 3 T cells (which comprise > 99% of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells) were analyzed separately in some CMV⁺ donors. As expected, V δ 1 were the dominant subpopulation of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells and were mainly TEMRA cells in all but one donor (Figure S4). V δ 3 T cells had a TEMRA phenotype in the donors

exhibiting the highest percentages of V δ 3 T cells (Figure S4, donors 1-5), and a naive phenotype in the rest (data not shown). The V δ 2⁺ T cells clearly exhibited the previously reported CD45RA⁻ CD27⁺ CD28^{+/-} CD62L⁻ central memory phenotype³⁰⁻³² in both CMV⁻ and CMV⁺ donors. The TEMRA V δ 2⁺ T cell minor subset showed a slight but significant increase in CMV⁺ donors ($P = .04$). TEMRA V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells in CMV⁺ donors expressed high amounts of perforin and granzyme B, in contrast to the naive V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells of CMV⁻ donors (Figure S4). A majority of these TEMRA V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells from CMV⁺ donors expressed NK cell receptors, such as the killer Ig-like receptors (CD158) or NKp80, and the senescence marker CD57 (Figures 4B, S4). A subset of these cells also expressed CD94 in association with NKG2C. In contrast, naive V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells from CMV⁻ donors were predominantly devoid of CD57, NKp80, and CD158 expression.

Adaptive immune response of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells during CMV infection in organ transplantation patients

We next examined whether the expanded V δ 1⁺ T cells in CMV⁺ patients act as memory cells and are able to manifest a rapid recall response. To answer this question, the kinetics of $\gamma\delta$ T-cell expansion was studied in CMV⁺ patients transplanted with CMV⁻

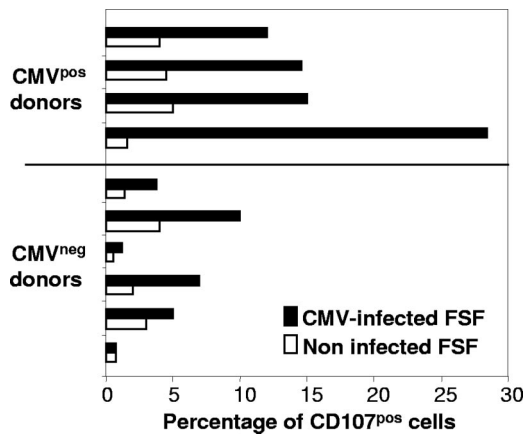


Figure 3. Anti-CMV reactivity of polyclonal $V\delta 2^- \gamma\delta$ T-cell lines isolated from CMV seronegative or seropositive blood donors. Whole $V\delta 2^- \gamma\delta$ T-cell lines generated by polyclonal activation were incubated on monolayers of CMV-infected or uninfected primary fibroblasts in the presence of an anti-CD107a mAb. After 6 hours, T cells were stained with an anti-C δ mAb and analyzed by flow cytometry; representative raw data are presented in Figure S2. Shown here are the percentages of CD107a⁺ cells in $\gamma\delta$ T cells for each studied donor.

renal allografts (donor⁻/recipient⁺ [D⁻/R⁺], n = 20) and who underwent secondary viral challenge because of CMV reactivation during immunosuppressive treatment. They were compared with CMV⁻ recipients transplanted with a CMV⁺ graft (D⁺/R⁻, n = 25), who were experiencing CMV primary infections. As previously described,²⁶ all patients had an expansion of $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells in their peripheral blood. However, a more rapid expansion of $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells was observed in patients with CMV reactivations (mean, 17 days; range, -21 to 126 days after onset of CMV infection) vs those with primary infections (mean, 66 days; range, 27 to 240 days, $P < .005$; Figure 5A). As previously reported, this faster response was associated with a faster resolution of CMV infection because D⁻/R⁺ patients displayed a positive CMV⁻ antigenemia for 4.5 (range, 1-9) weeks versus 10 (range, 2-20) weeks for D⁺/R⁻ patients ($P < .001$; Figure 5B). The phenotype of $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells was analyzed longitudinally before and after CMV infection in 3 D⁺/R⁻ and 3 D⁻/R⁺ transplant patients. As shown in Figure 5C, D⁺/R⁻ patients exhibited much lower percentages of TEMRA $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells in comparison to D⁻/R⁺ patients, a distribution very similar to that observed in healthy donors (Figure 4). During the course of CMV infection, an increase of TEMRA $V\delta 2^- \gamma\delta$ T-cell percentages appeared in the D⁺/R⁻ patients, suggesting that CMV drives remodeling of the naive cell phenotype toward an effector/memory profile. As expected, the high percentage of TEMRA $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells remained stable in D⁻/R⁺ patients during CMV infection (Figure 5C). Therefore, we propose that CMV infection led to an expansion of a pool of memory-like effector $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells which were able to rapidly respond to a second encounter with CMV.

Discussion

We have previously described a correlation between CMV infection and $\gamma\delta$ T-cell expansion in immunosuppressed transplant patients.²⁶ This association was also documented in immunodeficient children with a hypomorphic Recombinant Activating Gene-1 mutation.^{23,24} Both situations lead to a deficiency of the adaptive immune system, which raises the possibility that immunosuppression drives $\gamma\delta$ T cells to play a

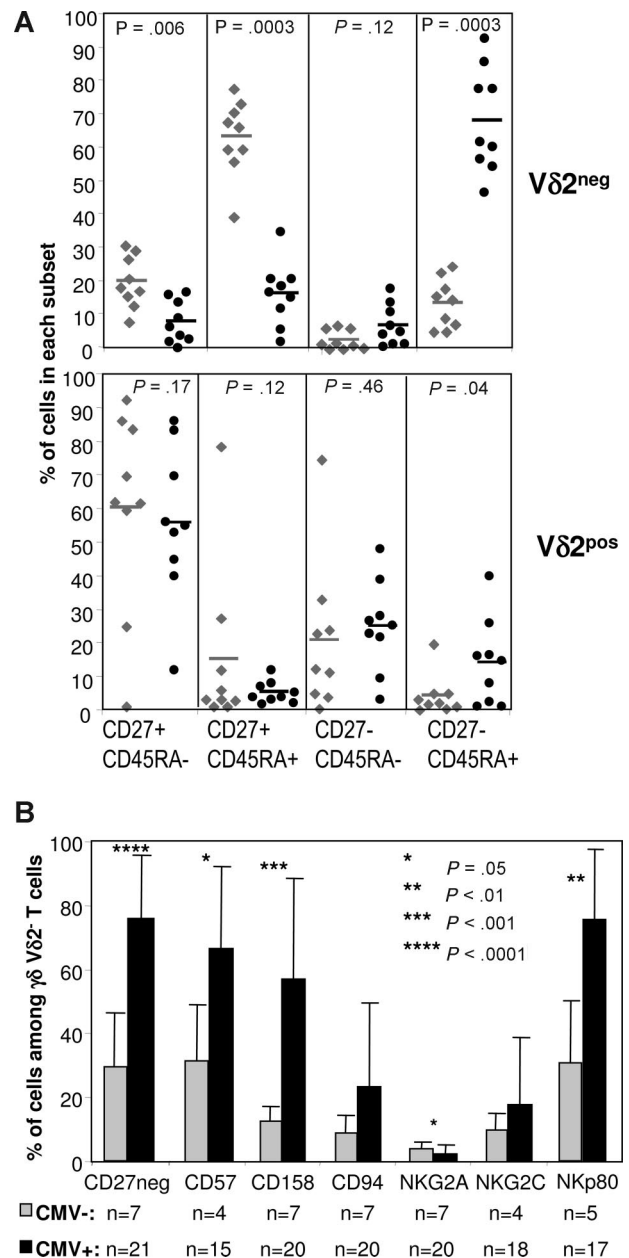


Figure 4. The expanded $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells in CMV-experienced donors are mainly TEMRA cells. Freshly collected blood from CMV⁻ or CMV⁺ blood donors was stained for 6-color flow cytometric analysis with mAbs directed against CD3, $\gamma\delta$ TCR, $V\delta 2$ and activation markers or NKR. Raw data are presented in Figure S3. (A) Percentages of $V\delta 2^+$ or $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells positive for CD27 and/or CD45RA in 9 CMV⁻ (\diamond) and 9 CMV⁺ donors (\bullet). The short line represents the mean percentage for each cohort. (B) Mean (\pm SD) percentages of positive cells (for CD57, CD158a/h, b/j, i, e, CD94, NKG2A, NKG2C, or NKp80) or negative cells (for CD27) among $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells from CMV⁻ or CMV⁺ blood donors.

surrogate function in the anti-CMV immune response. One aim of the present study was therefore to determine whether an expansion of $\gamma\delta$ T cells could be detected in immunocompetent patients who experienced a CMV infection. The $\gamma\delta$ T-cell subset that expanded in transplant patients (ie, $V\delta 2^- \gamma\delta$ T cells) was also found to be increased in healthy CMV-seropositive patients compared with CMV-seronegative patients. These cells displayed a restricted repertoire, which can be regarded as the signature of a CMV-driven selection and amplification of specific T cells in vivo. In agreement with this, they comprised

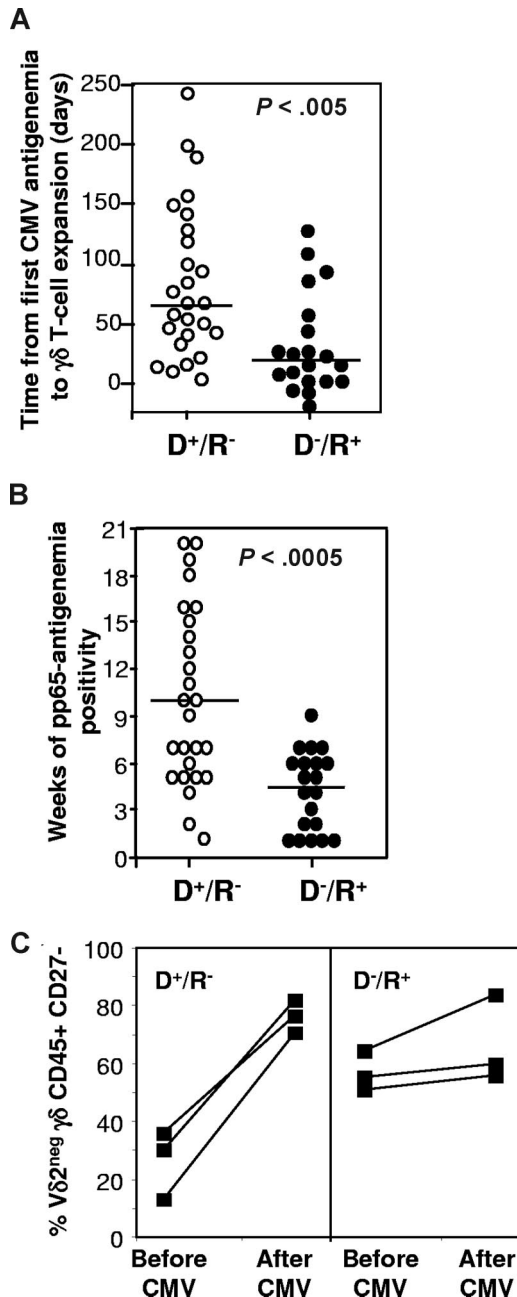


Figure 5. A faster expansion of $\gamma\delta$ T cells correlates with a faster infection resolution during CMV reactivation compared with primary infection. Forty-six renal allotransplantation patients, selected because they developed CMV infections, were divided according to the CMV serology of the recipient (R) and the donor (D) at the time of the graft. All patients displayed $\gamma\delta$ T-cell expansion in their peripheral blood. (A) The time to $\gamma\delta$ T-cell expansion was defined for each patient as the interval between the first day of CMV detection in the peripheral blood (pp65 antigenemia) and the day when $\gamma\delta$ T cell levels plateaued.²² (B) The duration of infection was defined as the number of weeks with a positive pp65 antigenemia. The long dashes in panels A and B represent the median value for each cohort. (C) 3 D⁺/R⁻ and 3 D⁻/R⁺ transplant patients who developed a CMV infection were monitored longitudinally for CD45RA and CD27 expression by V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells. Represented are the percentages of CD45RA⁺CD27⁻ cells in the V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T-cell population before and after CMV infection.

an increased proportion of the cells displaying *in vitro* CMV-specific cytotoxicity. Altogether, these data indicate an involvement of the $\gamma\delta$ T cells in a competent immune response to CMV.

Notably, the percentage of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells in the peripheral T cells of healthy CMV⁺ patients was much lower than in transplant patients infected with CMV (1.2% vs > 10.0%, respec-

tively).²⁶ In allograft patients, peripheral blood $\gamma\delta$ T cells remained elevated for at least 10 years, the time of last follow-up. We can only speculate that this might be the result of the long-term immunosuppressive treatment that continues to affect T-cell homeostasis³³ and thus promotes $\gamma\delta$ T-cell persistence in the periphery, and/or to low-grade sporadic multiplication of CMV in selected niches. The lower percentage of $\gamma\delta$ T cells that is detected in CMV⁺ healthy persons compared with transplant patients might be explained by a constrained expansion in response to CMV challenge and/or a negative regulation loop that is normally initiated after the resolution of the infection but that was impaired by immunosuppressive drugs. CMV infection is asymptomatic or subclinical in the majority of immunocompetent patients. Thus, the status of acute primary infections remains ethically and technically out of reach, making this question difficult to address directly. Nevertheless, we can reasonably state that the large $\gamma\delta$ T-cell expansion that was observed in the immunosuppressed patients is an amplified form of the normal immune response to CMV.

Several previous studies reported on the restricted repertoire of V δ 1 T cells that is commonly found in healthy adults.¹³⁻¹⁵ No physiologic or environmental cause was proposed to explain this phenomenon. We showed in this study that the restriction of the V δ 1 T-cell repertoire is associated with CMV but not with HSV, VZV, or EBV infection. We have previously reported additional support for this relationship in transplant patients for whom $\gamma\delta$ T-cell expansion is not correlated with viral infections (HSV, VZV, EBV, influenza),²⁶ and *in vitro* where V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T-cell clones are able to kill CMV-infected fibroblasts but have no effect on HSV- or VZV-infected fibroblasts.⁶ In the present study, we compared 2 groups of donors distinguished only by their CMV serotype status. Despite all the other pathogens encountered by each individual donor, the majority of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells were naive in CMV⁻ donors yet were memory effectors in CMV⁺ donors. This contrasting phenotype emphasizes the striking relationship between this lymphocyte subset and CMV and suggests that all circulating effector/memory V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells are anti-CMV-specific T cells. Such a dramatic skewing of the V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T-cell phenotype provides a useful and easy tool for the diagnosis of active or latent CMV infection. It could prove to be a sensitive and specific biologic marker in addition to or as an alternative to CMV serology for the detection of CMV infections in patients. However, analysis of large cohorts of donors is required to compare rigorously the specificity and sensitivity of each test.

Given the prevalence of CMV seropositivity worldwide, this virus appears to be a major environmental factor involved in the formation of an adult V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T-cell repertoire. This is reminiscent of significant impact of CMV on the CD4 and CD8 $\alpha\beta$ T-cell repertoire. The proportion of CD4 and CD8 T cells that are specific for CMV in healthy persons previously exposed to this virus has been shown to be strikingly high (up to 40% of memory T cells).³⁴ This frequency exceeds those observed for other common viruses, and CMV can also reduce prevailing levels of immunity to other persistent viruses.³⁵ An increase of CMV-specific CD8 T cells has been demonstrated in elderly donors and is postulated to be result of life-long recurrent reactivations.³⁶ The presence of cells permissive to CMV replication (mainly fibroblasts, epithelial cells, and endothelial cells) in nearly all organs may play an important role in this wide activation of CMV-specific T cells.³⁷ In this context, our results identify V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells as an additional, statistically significant, component of the immune response to CMV infections.

The long-term expansion of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells in CMV-experienced patients displayed effector/memory T-cell features

resembling that of CMV-specific CD4 or CD8 $\alpha\beta$ T cells analyzed in previous studies.^{38,39} This dominant representation of CD45RA⁺ CD27⁻ cells among virus-specific $\alpha\beta$ T cells is a characteristic of CMV infection that is not found with infections of other persistent viruses, such as EBV, HIV, or HCV.^{38,40} The reason why different chronic viral infections elicit distinct immune commitment is not clear but may relate to the different sites of virus replication. The long-lived effector/memory CD8 T cells poised for immediate response to infection have been shown to preferentially home to nonlymphoid tissue on antigenic challenge.⁴¹ Accordingly, V γ 9V δ 2 T cells found in ascites and cerebrospinal fluids of tuberculosis patients predominantly express a TEMRA phenotype.⁴² Similarly, V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells are found in the gastrointestinal tract, which is the preferential site of CMV replication. This could be a local mechanism for rapid containment of the virus by direct recognition and elimination of infected cells. The TEMRA V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells that we observed in the peripheral blood could be patrolling cells migrating from these sites with the goal of reaching other infected tissues. The local expansion of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells could have been overrepresented in immunosuppressed patients because of their impaired $\alpha\beta$ or regulatory T cells.⁴³

Despite compelling evidence that $\gamma\delta$ T cells can protect mice against several types of infection, their ability to develop pathogen-specific immunity has never been established in humans. In macaques, a memory-type response and rapid expansion of V γ 9V δ 2 T cells have been observed on a secondary challenge with *Bacillus Calmette-Guerin*.¹⁸ In contrast to these results, a study performed in cynomolgus monkeys that were treated with a synthetic ligand of V γ 9V δ 2 T cells showed a diminished ability of these cells to expand on repeated challenge with the agonist, suggesting a progressive exhaustion of the response.¹⁹ The role of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells in CMV infection provides an interesting model to follow the response of these cells to primary or secondary challenge with this virus in humans. The demonstration of a long-term expansion of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells with a restricted repertoire in CMV-seropositive patients, and, more importantly, of their quicker response to a secondary challenge in graft recipients, strongly suggests that they participate in the adaptive response. Furthermore, they share the same effector/memory phenotype as CMV-experienced CD4 and CD8 T cells, supporting the notion that all these T-cell subsets take part in the adaptive immune response. Combined with our previous observations that delayed expansion of $\gamma\delta$ T cells correlates with the severity of CMV infection in transplanted patients²² and that V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells can kill CMV-infected cells in vitro,⁶ the results obtained in this study form a solid basis to propose V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells as an active component of the antiviral response. A direct evidence of a protective role of these lymphocytes against CMV will require studies in nonhuman primate models of CMV infection.

The development of a CMV vaccine has been an important goal for at least 2 decades. It is well known that both humoral and cellular immune responses have crucial roles in controlling CMV infection. However, a better understanding of the complex network built by the different cellular components of the innate and adaptive immune responses is still needed to design a vaccine that is efficient and protective. Thus, the integration of $\gamma\delta$ T cells into this network and examination of their potential contributions to immunotherapeutic approaches designed to control or prevent CMV replication deserve further consideration.

Acknowledgments

The authors thank the Etablissement Français du Sang d'Aquitaine for blood samples, the nursing staff of the kidney transplant department, J. C. Carron, M. Garcie, and F. Saussais (Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux) for skillful routine immunological analyses, B. Tauzin (Université Bordeaux 2) for assistance in the immunoscope analysis, C. Schlundt (CNRS UMR 5164) for technical assistance, C. Sinzger (Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruserkrankungen, Tübingen, Germany) for the kind gift of the CMV strain TB40/E, C. Pain (Inserm U876, Université Bordeaux 2) for providing FSF, and C. Behr and M. Capone (CNRS UMR 5164) for critical reading of the manuscript.

This work was supported in part by institutional grants from CNRS and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by grants from the Agence National de la Recherche (ANR-05-JCJC-0129-01), the Fondation pour la Recherche Médicale, the Délégation à la Recherche Clinique d'Aquitaine, and the Conseil Régional d'Aquitaine.

Authorship

Contribution: V.P., D.R., and X.L. performed laboratory research and collected and analyzed data; L.C. and P.M. designed the clinical research methods and analyzed clinical data; I.G. and M.-E.L. designed and collected the samples for the viral analysis; J.-F.M. designed the research approach and wrote the paper; and J.D.-M. designed the research approach, analyzed and interpreted data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Julie Déchanet-Merville, UMR CNRS 5164, Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux Cedex, France; e-mail: julie.dechanet@u-bordeaux2.fr.

References

- Cobbold M, Khan N, Pourghesari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*. 2005;202:379-386.
- Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T-cell clones. *Science*. 1992;257:238-241.
- Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. *Blood*. 2003;101:2686-2692.
- Gerna G, Lilleri D, Fornara C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:2356-2364.
- Déchanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*. 1999;103:1437-1449.
- Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V δ 2(neg) $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2005;201:1567-1578.
- Theirez A, Sabourin C, Gertner J, et al. Self/non-self discrimination by human gamma/delta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev*. 2007;215:123-135.
- Pennington DJ, Vermijlen D, Wise EL, Clarke SL, Tigelaar RE, Hayday AC. The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell-mediated responses. *Adv Immunol*. 2005;87:27-59.
- Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:336-345.
- Poccia F, Agrati C, Martini F, Capobianchi MR, Wallace M, Malkovsky M. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect*. 2005;7:518-528.
- Bonneville M, Fournie JJ. Sensing cell stress

- and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes Infect.* 2005;7:503-509.
12. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vg9Vd2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev.* 2007;215:59-76.
 13. Beldjord K, Beldjord C, MacIntyre E, Even J, Sigaux F. Peripheral selection of Vd1+ cells with restricted T cell receptor d gene junctional repertoire in the peripheral blood of healthy donors. *J Exp Med.* 1993;178:121-127.
 14. Boullier S, Cochet M, Poccia F, Gougeon M-L. CDR3-independent gamma/delta Vd1+ T-cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. *J Immunol.* 1995;154:1418-1431.
 15. Hviid L, Akanmori BD, Loizon S, et al. High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the v(delta)1 subset in a healthy population. *Int Immunol.* 2000;12:797-805.
 16. Spada F, Grant E, Peters P, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med.* 1999;191:937-948.
 17. Wu J, Groh V, Spies T. 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.* 2002;169:1236-1240.
 18. Shen Y, Zhou D, Qiu L, et al. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science.* 2002;295:2255-2258.
 19. Sicard H, Ingoure S, Luciani B, et al. In vivo immunomanipulation of V gamma 9V delta 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol.* 2005;175:5471-5480.
 20. Hoff DF, Brown RM, Roodman ST. Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. *J Immunol.* 1998;161:1045-1054.
 21. Dieli F, Sireci G, Di Sano C, et al. Ligand-specific alphabeta and gammadelta T-cell responses in childhood tuberculosis. *J Infect Dis.* 2000;181:294-301.
 22. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis.* 2001;184:533-541.
 23. Ehl S, Schwarz K, Enders A, et al. A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gammadelta T cells. *J Clin Invest.* 2005;115:3140-3148.
 24. de Villartay JP, Lim A, Al-Mousa H, et al. A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest.* 2005;115:3291-3299.
 25. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods.* 2003;281:65-78.
 26. Déchanet J, Merville P, Bergé F, et al. Major expansion of gamma/delta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis.* 1999;179:1-8.
 27. Wang EC, Moss PAH, Frodsham P, Lehner PJ, Bell JI, Borysiewicz LK. CD8highCD57+ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J Immunol.* 1995;155:5046-5056.
 28. Parker CM, Groh V, Band H, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med.* 1990;171:1597-1612.
 29. David-Ameline J, Lim A, Davodeau F, et al. Selection of T cells reactive against autologous B lymphoblastoid cells during chronic rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 1996;157:4697-4706.
 30. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, et al. FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood.* 2004;104:1801-1807.
 31. Brandes M, Willmann K, Lang AB, et al. Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood.* 2003;102:3693-3701.
 32. Gioia C, Agrati C, Casetti R, et al. Lack of CD27-CD45RA-V gamma 9V delta 2+ T cell effectors in immunocompromised hosts and during active pulmonary tuberculosis. *J Immunol.* 2002;168:1484-1489.
 33. Labalette M, Queyrel V, Masy E, Noel C, Pruvot FR, Dessaint JP. Implication of cyclosporine in up-regulation of Bcl-2 expression and maintenance of CD8 lymphocytosis in cytomegalovirus-infected allograft recipients. *Transplantation.* 1995;59:1714-1722.
 34. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005;202:673-685.
 35. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol.* 2004;173:7481-7489.
 36. Khan N, Shariff N, Cobbold M, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T-cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol.* 2002;169:1984-1992.
 37. Plachter B, Singzer C, Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res.* 1996;46:195-260.
 38. Amyes E, Hatton C, Montamat-Sicotte D, et al. Characterization of the CD4+ T-cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med.* 2003;198:903-911.
 39. Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss PA. Comparative analysis of CD8+ T-cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis.* 2002;185:1025-1034.
 40. Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 2002;8:379-385.
 41. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science.* 2001;291:2413-2417.
 42. Dieli F, Poccia F, Lipp M, et al. Differentiation of effector/memory Vδ2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med.* 2003;198:391-397.
 43. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:199-210.

Article 2 : Common Features of gamma delta T Cells and CD8+ alpha beta T Cells Responding to Human Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients

Lionel Couzi, Vincent Pitard, Sonia Netzer, Isabelle Garrigue, Marie-Edith Lafon, Jean-François Moreau, Jean-Luc Taupin, Pierre Merville, and Julie Déchanet-Merville

Common Features of $\gamma\delta$ T Cells and CD8⁺ $\alpha\beta$ T Cells Responding to Human Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients

Lionel Couzi,^{1,2,3,a} Vincent Pitard,^{2,3,a} Sonia Netzer,^{2,3} Isabelle Garrigue,^{1,3} Marie-Edith Lafon,^{1,3} Jean-François Moreau,^{1,2,3} Jean-Luc Taupin,^{1,2,3} Pierre Merville,^{1,2,3} and Julie Déchanet-Merville^{2,3}

¹Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, ²Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5164, and ³Université Bordeaux 2, Bordeaux, France

Background. Kidney transplant recipients infected with cytomegalovirus (CMV) undergo a persistent $\gamma\delta$ T cell expansion in their peripheral blood. The anti-CMV function of these cells was previously demonstrated by their ability to kill CMV-infected cells in vitro.

Methods. To gain insight into the role of $\gamma\delta$ T cells within the antiviral immune network, we compared the expansion kinetics of these T cells with that of CMV pp65-specific CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells in the peripheral blood of twenty-one kidney transplant recipients.

Results. Both the percentage and the absolute number of pp65-specific CD8⁺ T cells and $\gamma\delta$ T cells showed a concomitant increase and persistence in most of the kidney transplant recipients with CMV infection. Both cell subsets exhibited an effector/memory phenotype (CD28⁻, CD27⁻, and CD45RA⁺) that predominated for the entire follow-up period.

Conclusions. In conclusion, CMV-specific CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells share common expansion kinetics and a common effector phenotype, suggesting that these cell types act similarly in response to CMV infection.

In kidney transplant recipients, symptomatic cytomegalovirus (CMV) infection is associated with morbidity, acute rejections [1], and graft losses [2]. Efficient antiviral treatments exist; however, effective use of these treatments requires accurate viral and immunological monitoring. The well-known players of cellular adaptive immunity implicated in the resolution of CMV infection are CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. In CMV-seropositive individuals, ~10% of the CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells are specific for CMV [3]. Both CD4⁺

and CD8⁺ T cells can be cytotoxic against CMV peptide-loaded cells [4, 5]; however, CMV-specific CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells are the principal actors of the anti-CMV cellular immune response, as these cells can elaborate at least 2 effector functions (interferon- γ production and cytotoxicity) to kill CMV-infected fibroblasts [6, 7]. Moreover, adoptive transfer of CMV-specific CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells efficiently restricts CMV infection in recipients of allogeneic bone marrow [7]. Interestingly, these CMV-specific CD8⁺ T cells display a singular effector memory T_{EMRA} phenotype (CD45RA⁺CD27⁻) [8], which differs from the central memory phenotype (CD45RA⁻CD27⁺) expressed by CD8⁺ T cells specific for other latent viruses [9].

Several years ago, we reported the implications of a subset of $\gamma\delta$ T cells in the anti-CMV response in kidney transplant recipients. These unconventional T cells are involved in diverse microbial infections in humans and are a minor subset (~4%) of peripheral blood T cells. The predominant population of circulating $\gamma\delta$ T cells (~3% of T cells) express a T cell receptor encoded by the V γ 9 and V δ 2 gene segments, whereas other populations of $\gamma\delta$ T cells use the V δ 1, V δ 3, or V δ 5 segments

Received 20 January 2009; accepted 10 June 2009; electronically published 24 September 2009.

Potential conflicts of interest: none reported.

Presented in part: American Transplant Congress 2007 meeting at the Moscone West Convention Center, San Francisco, California, 5–9 May 2007 (abstract 724).

Financial support: CHU de Bordeaux (AOI program 2003); the ATC Biothérapie Immunité anti-infectieuse de l'INSERM; the Agence Nationale de la Recherche (05JCJC0129); and the fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20051204312).

^a L.C. and V.P. contributed equally to this work.

Reprints or correspondence: Dr Julie Déchanet-Merville, UMR-CNRS 5164, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux (Julie.Dechanet@u-bordeaux2.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2009;200:1415–24

© 2009 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2009/20009-0009\$15.00

DOI: 10.1093/infdis/jin145

to form their T cell receptor (collectively designated as V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells and comprising ~1% of circulating T cells) and normally reside in epithelia. CMV infection induces a major, persistent, and specific expansion of the V δ 2 negative (V δ 2^{neg}) $\gamma\delta$ T cells in the peripheral blood of kidney transplant recipients, and this cell population often represents >10% of the total lymphocyte count [10]. V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell expansion kinetics differ widely from patient to patient. The duration and intensity of CMV infection, however, are greater in patients with late $\gamma\delta$ T cell expansion than in those with an early expansion. In fact, CMV infection regresses after the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell expansion, suggesting that these cells are involved in the resolution of this infection [11]. Extending these results, our recent studies in healthy blood donors demonstrated a specific correlation between CMV seropositivity and an increase of circulating V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell percentage and repertoire restriction [12]. Furthermore, in vitro analyses showed that V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell clones or cell lines from kidney transplant recipients with CMV infection are strongly reactive against CMV-infected fibroblasts. These cells are able to kill CMV-infected cells and yield large amounts of interferon- γ that limit CMV replication in vitro. This reactivity required T cell receptor engagement, but did not involve major histocompatibility complex class I molecules [13].

In general, $\gamma\delta$ T cells are considered to be intermediates between innate and adaptive immunity because of their rapid and massive responses to very diverse immune challenges. These features have been well demonstrated in mice, but a clear understanding of the timing of the $\gamma\delta$ T cell response to an infectious agent in humans is lacking. As a first approach to understand the timing of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell action during CMV infection in kidney transplant recipients, we compared the expansion kinetics and phenotype of peripheral blood V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells with those of the CMV-specific CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells, as a reference cell type involved in the anti-CMV cellular immune response [14].

PATIENTS AND METHODS

Patients. Twenty-one consecutive human leukocyte antigen (HLA)-A2 kidney transplant recipients were included in this pilot prospective study that was conducted from November 2004 through April 2006. This research protocol was approved by the relevant local institutional review board (CPPRB Bordeaux A), and all patients gave their written consent. Subjects were longitudinally monitored for ~1 year to analyze the cellular immune response during and after CMV infection. Immunosuppressive treatment for all patients involved a combination daclizumab, cyclosporine or tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisolone. Delayed graft function was defined as the need for hemodialysis within the first week after transplant. Acute rejection was diagnosed by kidney allograft biopsy. Only CMV-seronegative recipients who received CMV-seropositive allografts (donor positive [D⁺], recipient negative [R⁻]) were given

oral valganciclovir for 3 months. CMV infection was defined by 2 consecutive positive whole blood CMV polymerase chain reaction (PCR) results. CMV infection was treated with intravenous ganciclovir for 3 weeks.

Quantitative CMV PCR in whole blood. Quantitative CMV PCR was performed in whole blood specimens as described elsewhere [15]. Analysis was performed weekly for the first 3 months after transplantation, then twice each month during the next 3 months, and then monthly.

Flow cytometric analysis. Blood was drawn in ethylene diamine tetraacetic acid, and flow cytometric analysis was performed within 24 h after obtaining the sample. The detection of pp65-specific CD8 $\alpha\beta$ T cells was performed through labeling with an HLA-A2 tetramer loaded with a pp65 peptide (NLVPMVATV; Proimmune). Five hundred μ L of blood were incubated for 30 min at room temperature with the antibodies or HLA tetramers, then the blood was lysed and fixed with 2.5 mL of BD FACS lysing solution (BD Biosciences) for 10 min at room temperature. Cells were washed once with 3 mL of cell wash (BD Biosciences) and were resuspended in 200 μ L of cell wash. All cells were analyzed on a BD FACSCanto cytometer with use of the FACSDiva software, version 5.0 (BD Biosciences). The following antibodies were purchased from BD Biosciences: anti-CD3 allophycocyanin (APC)-CY7; anti-CD8 PE-CY7; anti-CD27 fluorescein isothiocyanate (FITC); anti-CD45RA PE-CY5; anti-CD94 FITC; anti-CD28 PE; anti-CD158a,h FITC; anti-CD158b,j FITC; anti-CD45RA APC; anti-CD94 APC; anti-CD56 FITC; anti-CD16 FITC; anti-CD4 PE-CY7; anti-Perforin PE; and anti-Granzyme B PE. The following antibodies were purchased from Beckman-Coulter: anti-NKG2A PE, anti-NKG2D PE, anti-CD158e PE, anti-CD158i PE, anti-pan delta PE-CY5, anti-Vdelta2 PE-CY7, anti-CD45 PE-CY7, anti-CD45RO PE and anti-CD11a FITC. Permeabilization and fixation of cells for intracellular stainings were performed as described elsewhere [12]. All data are expressed as absolute counts (per mm³) obtained by multiplying the percentages obtained with the flow cytometric analysis by the total lymphocyte count determined using an automatic hemocytometer (cell-dyn350; Abbott). The $\gamma\delta$ T cells and CMV-specific CD8⁺ T cells were also expressed as percentages of total lymphocytes and CD8⁺ T cells, respectively.

Statistical analysis. Comparisons were performed using conventional statistics. The Mac Nemar χ^2 test for qualitative variables, the Student's *t* test, or the Mann-Whitney test were used when appropriate. Analyses were performed with Statview Software (Abacus Concepts). Significance was defined as a *P* value <.05.

RESULTS

Baseline patient characteristics. Among the 21 patients included in this study, 8 developed CMV infection. The remain-

Table 1. Comparison of Baseline Clinical and Immunological Data between Cytomegalovirus (CMV)-Infected and Noninfected Patients

Characteristic	CMV-infected patients (n = 8)	Control patients (n = 13)	P
Demographic and clinical data			
Age, years	49.5 ± 10	49.3 ± 9.5	.9
Sex, M/F	5/3	10/3	.6
Duration of follow-up, mean months ± SD	408 ± 83	324 ± 126	.1
CMV status			
D ⁺ R ⁻	3	8	
R ⁺	5	5	.4
No. of HLA mismatches	3.1 ± 1.1	3.4 ± 1	.8
Cold ischemia, h	18 ± 7	18 ± 6	.9
Delayed graft function	5	2	.08
Receipt of cyclosporine/tacrolimus	4/4	7/6	.9
Acute rejection	1	4	.7
M6 serum creatinine value, μmol/L	147 ± 46	134 ± 39	.4
M12 serum creatinine value, μmol/L	149 ± 45	138 ± 47	.5
Baseline immunological data			
Total lymphocyte count, cells/mm ³	1357 ± 687	1549 ± 771	.6
NK cell count, cells/mm ³	146 ± 101	194 ± 119	.4
Vδ2 γδ T lymphocytes, %	1.86 ± 1.5	2.17 ± 1.7	.7
Vδ2 γδ T lymphocytes, cells/mm ³	28.1 ± 22	42.5 ± 52.3	.8
Vδ2-negative γδ T lymphocytes, %	1.53 ± 1.85	1.24 ± 1.26	.9
Vδ2 negative γδ T lymphocytes, cells/mm ³	17.7 ± 22.3	20.9 ± 21.9	.7
CD4 ⁺ T lymphocyte count, cells/mm ³	594 ± 362	760 ± 367	.1
CD8 ⁺ T lymphocyte count, cells/mm ³	260 ± 130	361 ± 302	.5
Among R ⁺ recipients			
pp65-HLA A2-specific CD8 ⁺ T cells, %	0.59 ± 0.69 ^a	0.28 ± 0.42 ^a	.5
pp65-HLA A2-specific CD8 ⁺ T cells, cells/mm ³	1.68 ± 2.50 ^a	0.95 ± 1.07 ^a	.9

NOTE. Data are no. of patients or mean values ± standard deviation. D⁺, CMV-positive donor; HLA, human leukocyte antigen; NK, natural killer; R⁻, CMV-negative recipient; R⁺, CMV-positive recipient.

^a n = 5.

ing 13 patients comprised the control group. Baseline data of the 2 groups of patients are summarized in Table 1. No statistical differences between the 2 groups regarding age, sex ratio, follow-up duration, donor/recipient CMV status (D⁺/R⁻, R⁺, D⁻/R⁻), HLA mismatches, cold ischemia duration, delayed graft function occurrence, use of anti-calcineurin, acute rejection, and serum creatinine values were noted. Although not statistically significant, more D⁺R⁻ patients were present in the control group (8 of 13) than in the CMV group (3 of 8), probably because only these patients received anti-CMV prophylactic treatment.

When the basal levels of several immunological parameters were compared on the day of the graft (day 0) in each group of patients, no statistical differences were observed between the 2 groups with regard to total lymphocyte count, CD3⁻CD16⁺CD56⁺ natural killer (NK) cell count, Vγ9/Vδ2 T cell count and percentage, Vδ2^{neg} γδ T cell count and percentage, CD4⁺ T cell count, or CD8⁺ T cell count were found (Table 1). The pp65-specific CD8⁺ αβ T cells were detected via

labeling with an HLA-A2 tetramer loaded with a pp65 peptide. As expected at day 0, R⁻ patients in either group did not have any pp65-specific CD8⁺ T cells. Among R⁺ patients, no statistical differences were observed between the infected and control groups regarding pp65-specific CD8⁺ T cell count and percentage.

Concomitant and parallel expansion and persistence of Vδ2^{neg} γδ T cells and CMV-specific CD8⁺ T cells during CMV infection. The 21 patients were then longitudinally monitored for the immunological parameters cited above. No significant changes were observed for the total lymphocyte count, NK cell count, CD4⁺ T cell count, CD8⁺ T cell count, or Vγ9/Vδ2 T cell count or percentage during the follow-up period for any of the 21 studied patients (data not shown). We observed alterations in the percentages of pp65-specific CD8⁺ T cells and/or Vδ2^{neg} γδ T cells in the peripheral blood of CMV-infected kidney transplant recipients (Figure 1). When patients were analyzed individually, only 5 of 8 CMV-infected patients demonstrated pp65-specific CD8⁺ T cell expansion (Figure 1, P1–

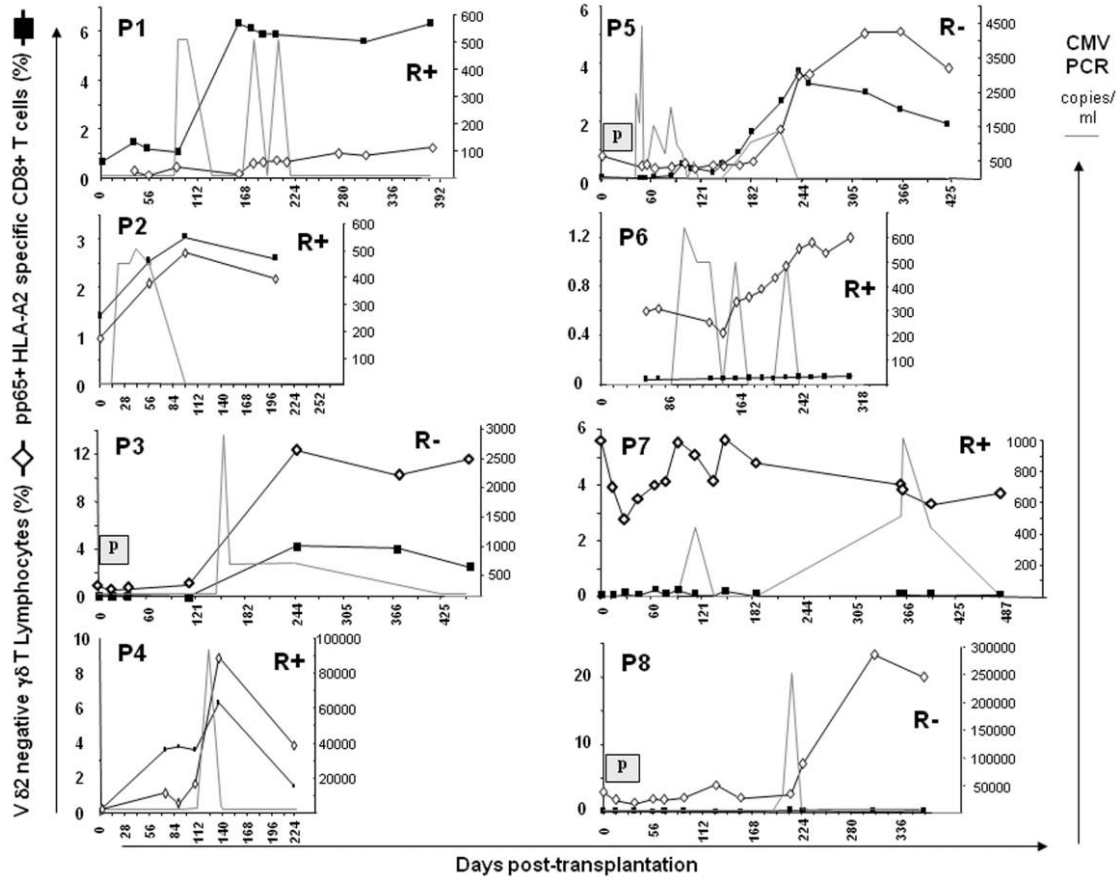


Figure 1. Concomitant expansion and parallel persistence of pp65 human leukocyte antigen (HLA)-A2-specific CD8⁺ T cells and Vδ2-negative γδ T cells in peripheral blood of CMV-infected kidney transplant recipients. CD8⁺ and γδ T cells subsets were analysed in the peripheral blood of eight patients (P1 to P8) with cytomegalovirus (CMV) infection. For CMV-specific CD8⁺ T cell staining, blood was incubated with the anti-CD3 allophycocyanin (APC)-CY7 and anti-CD8 PE-CY7 antibodies as well as the pp65-HLA-A2 tetramers APC. For Vδ2-negative γδ T cell staining, blood was incubated with the anti-CD3 APC-CY7, anti-pan delta PE-CY5, and anti-Vdelta2 PE-CY7 antibodies. The γδ T cells and CMV-specific CD8⁺ T cells are expressed as percentages of total lymphocytes and CD8⁺ T cells, respectively. CMV polymerase chain reaction (PCR) results are represented as a thin line. The duration of the anti-CMV prophylaxis given to the 3 R⁻ patients is indicated by a grey rectangle containing a P (prophylaxis).

P5). The other 3 infected patients, who lacked this expansion (P6–P8), may have responded to other CMV antigenic peptides that we could not assess in this study. With regard to the Vδ2^{neg} γδ T cells, all but 1 of the 8 CMV-infected patients displayed expansion of this cell subset after CMV infection. Of note, the only patient who did not demonstrate this cell expansion was an R⁺ patient who already had a high peripheral blood Vδ2^{neg} γδ T cell percentage on the day of the graft (Figure 1, P7), in accordance with that observed for other CMV-seropositive healthy individuals [12].

To analyze the effect of CMV on T cell subsets in the entire patient cohort, we compared the basal (at day 0) and the highest (peak) values of pp65-specific CD8⁺ T cell and Vδ2^{neg} γδ T cell percentages reached during the follow-up (Figure 2A). Among CMV-infected patients (*n* = 8), the basal mean value (± standard deviation [SD]) of pp65-specific CD8⁺ T cell percentage

was 0.39% ± 0.59% and reached 3.00% ± 2.64% after the infection (*P* = .03). Similarly, the basal mean value (±SD) of the Vδ2^{neg} γδ T cell percentage was 1.53% ± 1.86% and reached 7.31% ± 7.55% after CMV infection (*P* = .01). In contrast, among patients not infected with CMV (*n* = 13), we did not observe any significant fluctuation between the basal level (±SD) and the highest mean values (±SD) of either pp65-specific CD8⁺ T cells (0.11% ± 0.28% vs 0.23% ± 0.42%; *P* = .2) or Vδ2^{neg} γδ T cells (1.25% ± 1.27% vs 1.69% ± 1.56%; *P* = .6). Similar results were observed when considering the absolute counts (Figure 2B). Of note, the mean absolute number (±SD) of Vδ2^{neg} γδ T cells measured after CMV infection was greater than the mean absolute number (±SD) of pp65-specific CD8⁺ T cells (108.9 ± 116.3 cells/mm³ vs 14.7 ± 16.6 cells/mm³; *P* = .02). Taken together, these results reveal the existence of concomitant expansion kinetics

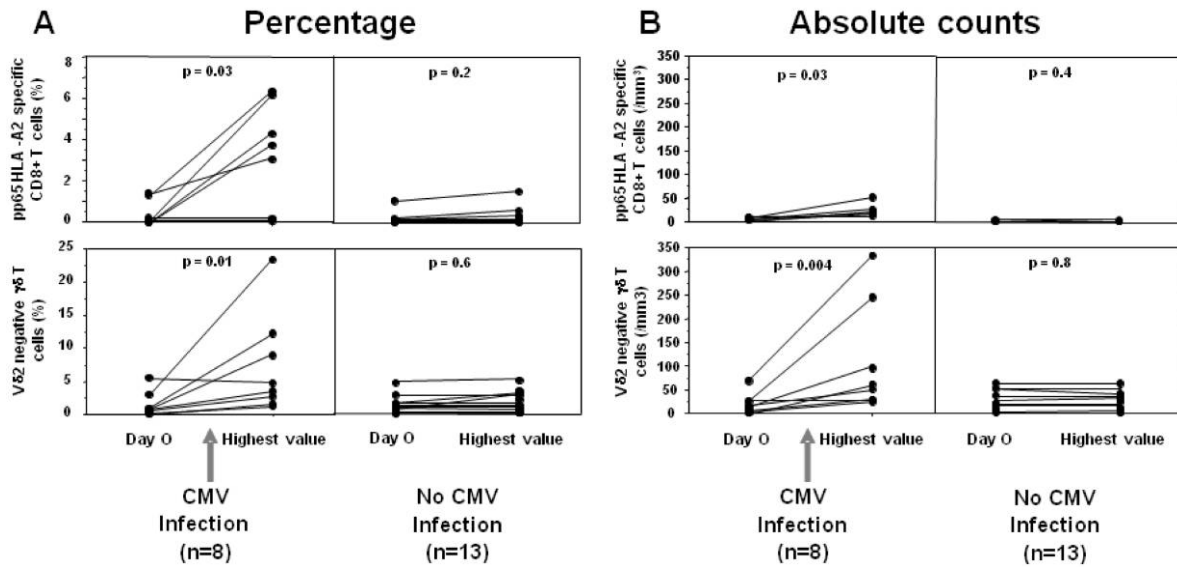


Figure 2. Comparison of the basal and maximum values of pp65-specific CD8⁺ T cell and Vδ2^{neg} γδ T cell percentages of kidney transplant recipients. Twenty-one patients were longitudinally monitored. The basal (day 0) and the highest values of pp65-specific CD8⁺ T cell and Vδ2^{neg} γδ T cell percentages and the absolute counts reached during the whole follow-up period are shown. *A*, γδ T cells and cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T cells are expressed as percentages of total lymphocytes and CD8⁺ T cells, respectively. *B*, Absolute counts (cells/mm³) were obtained by multiplying the percentages by the total lymphocyte and CD8⁺ T cell counts, respectively.

of CMV-specific αβ CD8⁺ and γδ T cells in the peripheral blood of kidney transplant recipients, suggesting a similar type of response to CMV for both subsets.

Vδ2^{neg} γδ T cells and CMV-specific CD8⁺ T cells are terminally differentiated effectors. CMV has a peculiar propensity to drive the majority of responding CD8⁺ T cells to express a phenotype of terminally differentiated T cells (CD27⁻CD28⁻CCR7⁻CD45RA⁺) [8, 9]. Given the similar response of γδ T cells and CMV-specific CD8⁺ T cells that we observed, we next determined whether these cell types also exhibited a similar effector phenotype during CMV infection in kidney transplant recipients. Thus, we determined the status of their CD27 and CD45RA membrane expression, which distinguishes naive (CD45RA⁺CD27⁺), effector memory T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁻), effector memory T_{EMh} (CD45RA⁻CD27⁻), and central memory T cells (CD45RA⁻CD27⁺) in both αβ and γδ T cell populations [8, 16]. When analyzed at the peak of their expansion (the highest value) in CMV-infected kidney transplant recipients, the majority of pp65-specific CD8⁺ T cells were terminally differentiated effector memory T cells (CD45RA⁺CD27⁻) also called T_{EMRA} (mean, 56%; median, 43.5%) (Figure 3A), as reported elsewhere [8]. The whole CD8⁺ T cell population, however, presented a different picture with a balanced mixture of the 3 different subsets: effector memory T_{EMRA}, 33.5% (median, 27.7%); naive T cells, 28.8% (median, 32.3%); effector memory T_{EMh}, 11.2% (median, 9.6%); and central memory T cells, 26.5% (median, 26.7%).

Strikingly, Vδ2^{neg} γδ T cells displayed a very similar phenotype to the primarily terminally differentiated effector memory T_{EMRA} phenotype (mean, 63.7%; median, 61.5%). We observed significantly more effector memory T_{EMRA} ($P = .006$) and significantly less naive ($P = .03$) Vδ2^{neg} γδ T cells in CMV-infected patients, compared with patients without CMV infection (Figure 3B), suggesting that the T_{EMRA} phenotype on Vδ2^{neg} γδ T cells was driven by CMV infection. This distribution was in stark contrast to that of Vγ9/Vδ2 T cells, which do not participate in the anti-CMV response [17] and principally express a central memory cell phenotype in both CMV-infected and CMV-uninfected patients [18].

It is noteworthy that among both CMV-specific αβ CD8⁺ T cells and Vδ2^{neg} γδ T cells, the second predominant subset was the naive CD45RA⁺CD27⁺ subset (Figure 3). Such a substantial amount of CMV-specific naive cells was quite surprising. Among CD45RA⁺CD27⁺ T cells, true naive cells can be distinguished from recently primed T cells through their bright expression of CD27 and dull expression of CD11a [19]. As depicted in Figure 4A, the CD45RA⁺CD27⁺ Vδ2^{neg} γδ T cells and pp65-specific CD8⁺ T cells turned out to be mainly CD27-dull CD11a-high (Figure 4A), a phenotype considered to identify non-naive cells and most probably recently primed T cells [19].

During longitudinal monitoring, we noted that R⁺ patients already demonstrated, before the infection, a predominant effector T_{EMRA} phenotype among pp65-specific CD8⁺ T cells and Vδ2^{neg} γδ T cells, whereas in R⁻ patients, this phenotype became

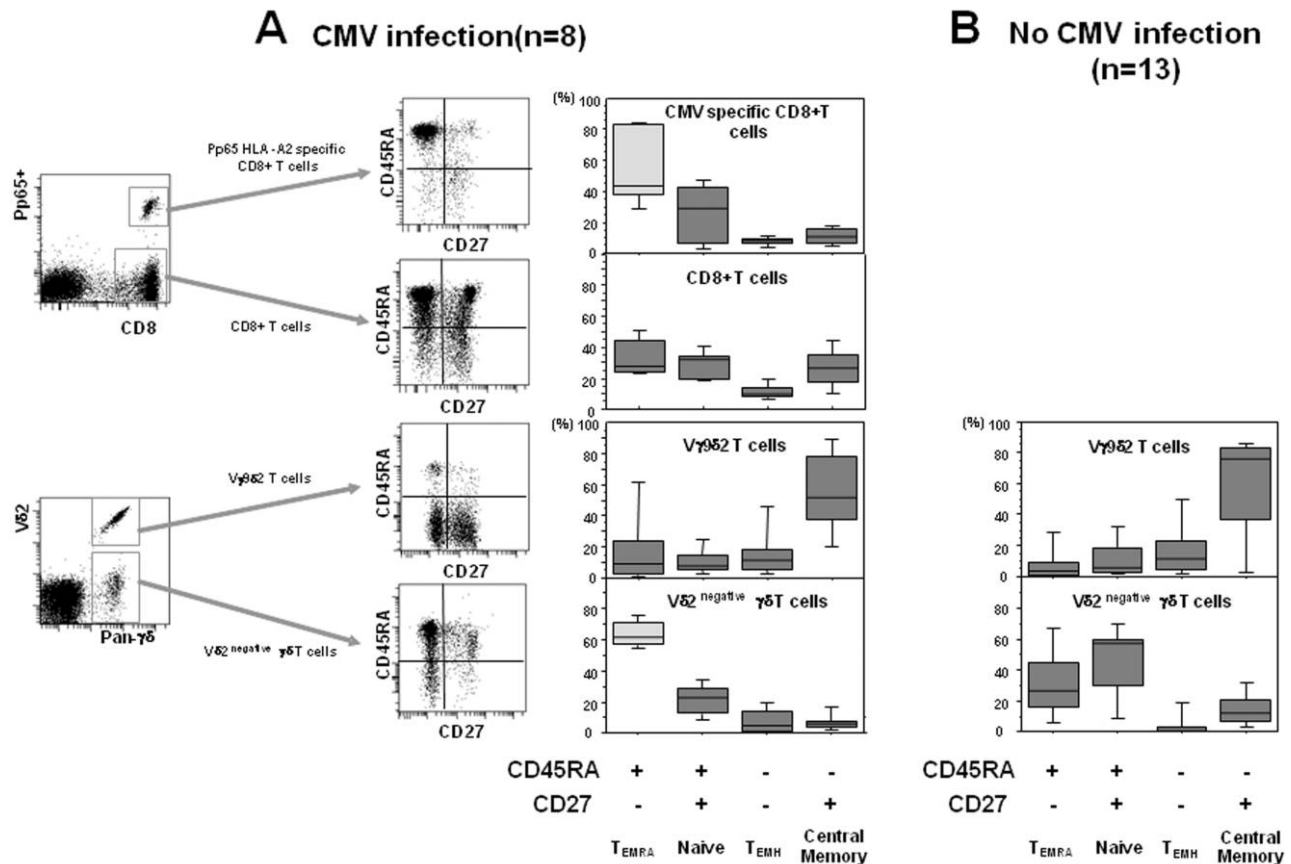


Figure 3. Predominance of terminally differentiated effector memory cells CD45RA⁺ CD27⁻ (T_{EMRA}) among pp65-specific CD8⁺ T cells and Vδ2^{neg} γδ T cells after cytomegalovirus (CMV) infection in kidney transplant recipients. Cell staining was performed using anti-CD27 fluorescein isothiocyanate and anti-CD45RA PE-CY5 or allophycocyanin (APC) antibodies. The phenotypes of the pp65-specific CD8⁺ T cells and Vδ2^{neg} γδ T cells analyzed at the peak in kidney transplant recipients are shown: naïve (CD45RA⁺CD27⁺), effector memory T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁻), effector memory T_{EMH} (CD45RA⁻CD27⁻), or central memory T cells (CD45RA⁻CD27⁺). The Vδ2^{neg} γδ T cell phenotypes of the 8 CMV-infected kidney transplant recipients have been studied, whereas only the 5 patients with pp65-specific CD8⁺ T cell expansion were analyzed at the peak. Results are expressed as medians.

prevalent after infection (Figure 5). This common effector cell phenotype shared by CMV-specific αβ CD8⁺ and γδ T cells suggests a similar behavior and function of both T cell subsets in the antiviral host defense.

Perforin, granzyme, CD28, and NK receptor expression by Vδ2^{neg} γδ T cells and CMV-specific CD8⁺ T cells during CMV infection. To extend the comparison between Vδ2^{neg} γδ T cells and pp65-specific CD8⁺ T cells after CMV infection, we analyzed several markers specific of effector/memory T cells. We first observed that the T_{EMRA} Vδ2^{neg} γδ T cells and pp65-specific CD8⁺ T cells of the CMV-infected patients displayed high expression of perforin and granzyme B (Figure 4B).

We also analyzed their cell surface expression of CD28, a marker known to be down-modulated on fully differentiated effector αβ T cells [8, 9]. In the 8 patients who experienced CMV infection, the pp65-specific CD8⁺ T cells and Vδ2^{neg} γδ T cells displayed a much lower percentage of CD28⁺ cells than the other CD8⁺ T cells and Vγ9/Vδ2 γδ T cells (Table 2).

Moreover, CMV-infected patients displayed a lower CD28 expression on Vδ2^{neg} γδ T cells than did CMV-uninfected patients.

Next, the expression of the NK cell receptors for major histocompatibility complex class I molecules or related molecules was investigated, because these molecules are important for regulating γδ T cell reactivity [20]. Also, these receptors reflect the maturation of T cells following antigen exposure or CMV infection [21, 22]. We looked at NKG2A-CD94⁺, which is an inhibitory receptor for HLA-E that is induced by CMV on infected cells [23]. Both Vδ2^{neg} γδ T cells and pp65-specific CD8⁺ T cells of CMV-infected patients comprised low percentages (±SD) of NKG2A-CD94⁺ cells (4.1% ± 5.4% and 14.4% ± 7.9% of cells, respectively). Interestingly, expression of CD158 a/h and CD158 b/j molecules was higher on Vδ2^{neg} γδ T cells than on pp65-specific CD8⁺ T cells and Vγ9/Vδ2 T cells. Finally, CMV-infected patients had a lower NKG2A-CD94⁺ expression but a higher CD158 b/j expression on Vδ2^{neg} γδ T cells than did CMV-uninfected patients. This high CD158b/j

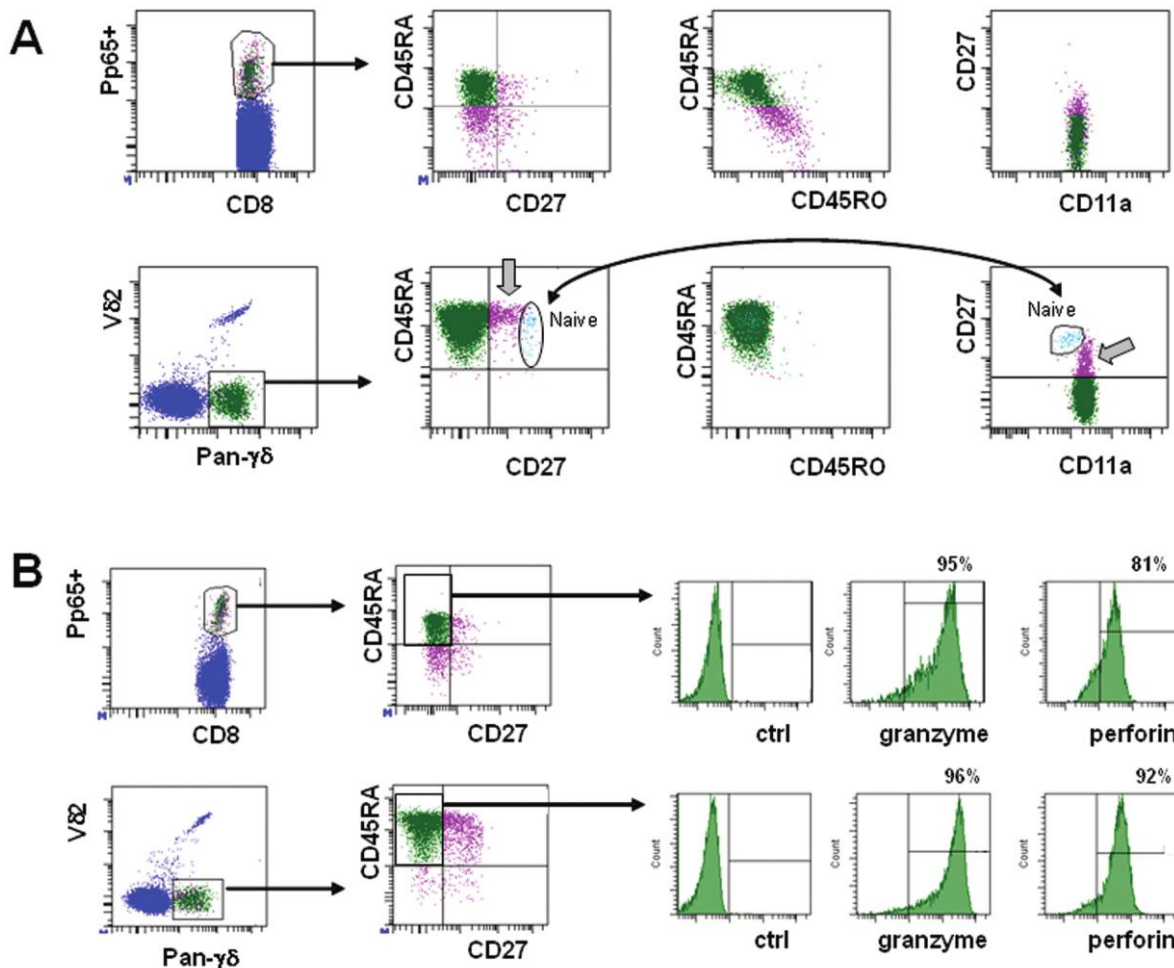


Figure 4. A, High expression of CD11a by CD45RA⁺CD27⁺ pp65-specific CD8⁺ T cells and Vδ2^{neg} γδ T cells from cytomegalovirus (CMV)-infected patients. The markers CD45RO and CD11a were added to our previous multicolor staining (CD3, pan-γδ, Vδ2, CD45RA, CD27). For pp65-specific CD8⁺ T cells of the 4 patients analyzed, only few CD45RA⁺CD27⁺ cells were observed and no CD45RA⁺ CD27⁺ cells were CD11a dull (ie, real naive cells). Among the Vδ2^{neg} γδ T cells of the representative patient presented in panel A, only 12.2% of the CD45RA⁺ CD27⁺ cells were CD11a dull (real naive cells). The majority of the CD45RA⁺CD27⁺ Vδ2^{neg} γδ T cells were CD11a high and thus non-naive (gray arrow). B, T_{EMRA} pp65-specific CD8⁺ T cells and Vδ2^{neg} γδ T cells from CMV-infected patients express high levels of perforin and granzyme B. Intra cellular staining of permeabilized cells was performed with specific anti-perforin and anti-granzyme B antibodies. This patient is representative of the 8 CMV-infected patients included in the study. ctrl, control.

expression could also be driven by CMV infection and may be involved in the regulation of Vδ2^{neg} γδ T cell functions that are distinct from that of pp65-specific CD8⁺ T cells.

DISCUSSION

In this study, we compared Vδ2^{neg} γδ T cells to CMV-specific CD8⁺ αβ T cells during the course of CMV infection in kidney transplant recipients. Despite variable expansion between patients, similar expansion kinetics were shared by the 2 subsets in most of the patients. Therefore, these data highlight the redundancy of the immune system and indicate that mechanisms involved in the response of both Vδ2^{neg} γδ T cells and pp65 HLA-A2-specific CD8⁺ T cells may be similar. Because we can only analyze the cells in the peripheral blood, the early

response of each cell subset to the CMV in the infected tissues is out of reach. Vδ2^{neg} γδ T cells are normally located in the epithelia where they are considered to be sentinels readily responding in the early phase of an immune challenge. The circulating subsets analyzed here may reflect the phase of the antiviral response when the multiplying effector T cells migrate out of the infected sites to the periphery. Nonetheless, the similar timing of the CD8⁺ αβ and γδ T cell subsets detected in the blood suggests that these cell types are involved and proliferate concomitantly during the antiviral response. This is not the case for CMV-specific CD4⁺ T cells, which display an independent and heterogeneous expansion [5, 14].

The Vδ2^{neg} γδ T cells and the pp65-specific CD8⁺ T cells shared the same terminally differentiated effector memory

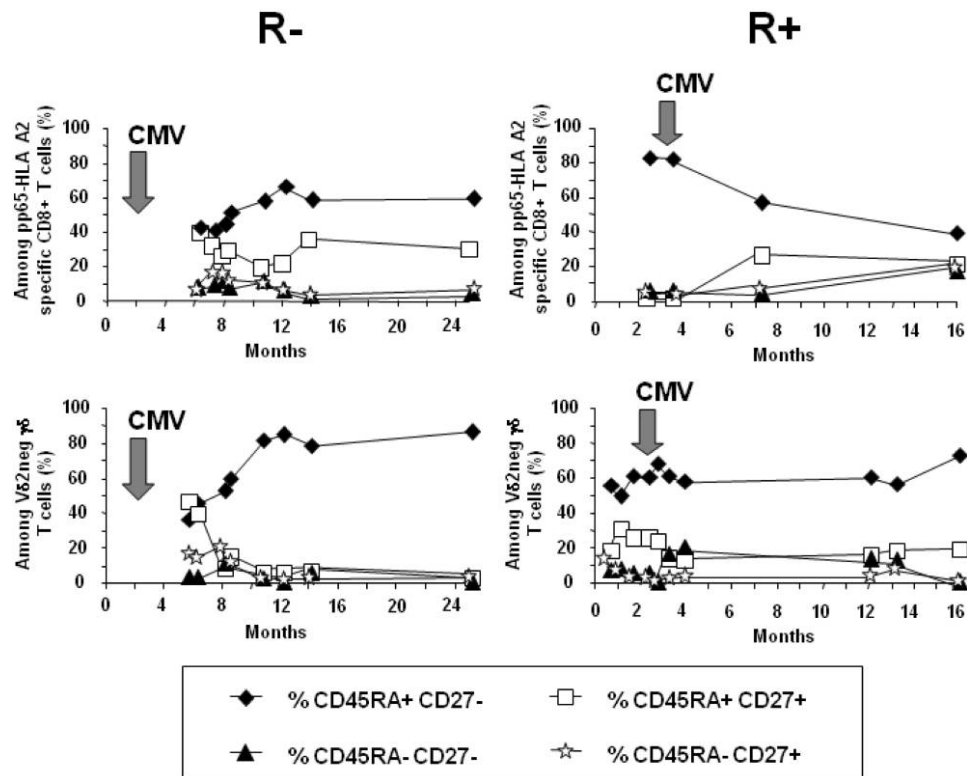


Figure 5. The effector phenotypes of T_{EMRA} of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells and pp65 HLA-2-specific $CD8^+$ T cells are stable over time. Analyses of peripheral blood from 2 representative cytomegalovirus (CMV)-infected kidney transplant recipients are depicted. Data are lacking for the first graft weeks of R^- kidney transplant recipients because of the absence of peripheral blood expansion of these 2 lymphocyte subsets at this time. The data shown in this figure are representative of the 8 CMV-infected patients included in the study.

T_{EMRA} phenotype. It has been shown that T_{EMRA} CMV-specific $CD8^+$ T cells can proliferate in vitro on activation with CD137-expressing APC or interleukin-15 [24, 25] and T_{EMRA} $V\gamma 9V\delta 2$ T cells can proliferate ex vivo with interleukin-15 [26]. Such accumulation of CMV-specific cells over time has also been

described in the murine model of CMV, a phenomenon called memory inflation. It was recently shown that the inflationary murine CMV-specific T cells are terminally differentiated T cells able to divide in response to viral antigen in vivo and are a dynamic population with a short half-life in the blood that

Table 2. Cell Surface Expression of CD28 and Natural Killer (NK) Receptors for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules or Related Molecules

Marker ^a	CMV-infected patients (n = 8)					CMV-uninfected patients (n = 13)				
	$CD8^+$ T cells, %	CMV-specific $CD8^+$ T cells, %	P	$V\gamma 9/V\delta 2$ T cells, %	$V\delta 2$ -negative $\gamma\delta$ T cells, %	P	$V\gamma 9/V\delta 2$ T cells, %	$V\delta 2$ -negative $\gamma\delta$ T cells, %	P	
CD28	30.6 ± 13.9	6.5 ± 3	.04	61.7 ± 27.5	10.8 ± 10 ^d	.01	55.3 ± 30.6	33.8 ± 20.9 ^d	.02	
NKG2A-CD94	9.5 ± 13.7	4.1 ± 5.4	.3	40.7 ± 18.7 ^c	14.4 ± 7.9 ^d	.01	64.7 ± 20.7 ^c	36.8 ± 26.9 ^d	.02	
CD158 a/h	1.4 ± 1.2	3.6 ± 7.4 ^b	.9	2.7 ± 3.5	21.2 ± 30.2 ^b	.01	0.9 ± 1.1	7.8 ± 17.8	.002	
CD158 b/j	3.8 ± 4.6	3.7 ± 5.8 ^b	.7	10.3 ± 9.1	50.1 ± 24.2 ^{bd}	.01	6.8 ± 8.4	26.4 ± 25.6 ^d	.004	

NOTE. Data are mean values ± standard deviation, unless otherwise indicated. CMV, cytomegalovirus.

^a The human leukocyte antigen A2-specific $CD8^+$ T cells and $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells analyzed at the peak in kidney transplant recipients were stained with the anti-CD28 PE, anti-NKG2D PE, anti-CD94 fluorescein isothiocyanate (FITC) or allophycocyanin, anti-NKG2A PE, anti-CD158a,h FITC, anti-CD158b,j FITC, anti-CD158e PE, and anti-CD158i PE antibodies.

^b $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells versus CMV-specific $CD8^+$ T cells, $P = .04$.

^c $V\delta 2$ $\gamma\delta$ T cells of CMV-infected patients versus $V\delta 2$ $\gamma\delta$ T cells of CMV-uninfected patients, $P = .03$.

^d $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells of CMV-infected patients versus $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells of CMV-uninfected patients, $P < .01$.

are constantly replaced by an influx of differentiated cells [27]. In humans, this influx could be represented by the recently primed CD45RA⁺CD27^{+(dull)}CD11a^{+(bright)} T cells [19].

In R⁻ transplant recipients, we can presume that naive cells differentiate in T_{EMRA} cells, either directly or more probably via an intermediate T_{EMh} phenotype, as proposed elsewhere for V γ 9V δ 2 T cells [18]. In R⁺ transplant recipients, the slight increase of CD45RA⁺CD27⁺ CMV-specific $\alpha\beta$ T cells might correspond to the new recruitment of recently primed cells [27].

Similar to V γ 9V δ 2 T cells in healthy donors and CMV-specific CD8⁺ T cells in kidney transplant recipients, cells expressing the T_{EMRA} phenotype display a high cytotoxic potential [5, 16, 18]. The low cell surface expression of CD28 by both V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells and pp65 HLA-A2-specific CD8⁺ T cells is also consistent with this effector phenotype [9]. To summarize, the similarities between the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell and pp65 HLA-A2-specific CD8⁺ T cell phenotypes suggest a similar cytolytic function against CMV-infected cells in vivo. Thus, protection against CMV disease was associated with a rapid recovery of CMV-specific CD8⁺ T cells in bone marrow transplanted patients [28] and with a rapid expansion of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in kidney transplant recipients [11].

On binding their ligand, NK receptors transmit activating or inhibitory signals to the cells. CMV infection induces the expression of activating NK receptors, such as NKG2D and the heterodimer NKG2C-CD94, at the cell surface of CMV-specific CD8⁺ T cells [21, 22, 29]. Similar to CMV-specific CD8⁺ T cells, all V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expressed NKG2D (data not shown), a major activating NK receptor, whereas only a few of these cells expressed CD94-NKG2A, which is an inhibitory NK receptor. This result is consistent with the effector phenotype described above. CD158 was expressed on a small proportion of pp65-specific CD8⁺ T cells, consistent with results reported elsewhere [8], but was also present on a large fraction of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. Because the quality of the signal delivered by CD158 molecules depends on the composition of the intracellular part of the individual receptor or associated molecules, it is difficult to speculate on their precise action; however, these NK receptors may play an important role in the control of T cell activation when the virus persists and coexists with its host for many years [21]. Previously, we showed that CD158j expression confers an enhanced T cell receptor-induced cytotoxic activity to V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells isolated from a CMV-infected kidney transplant recipients, compared with their CD158-negative counterparts [30].

Finally, this pilot study demonstrates that CMV-specific CD8⁺ T cells and V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells are committed in a similar fashion to the anti-CMV host response. These results confirm and extend our previous report demonstrating that expansion

of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells is specific to CMV infection [10, 12, 13]. In addition, we noted that this expansion was larger in terms of absolute count than that of pp65-specific CD8⁺ T cells. The use of anti-CMV prophylaxis does not seem to interfere with this marker, which can be monitored in both R⁻ and R⁺ recipients. Thus, V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell detection could be a realistic candidate for CMV infection monitoring in kidney transplant recipients. Furthermore, phenotyping of these cells by flow cytometry is easy and fast. In the future, larger studies are necessary to evaluate the potential role of these newly described effector cells in the prevention of CMV infection or disease in kidney transplant recipients.

Acknowledgments

We thank Catherine Rio and the nurses of the Department of Nephrology for their precious help. We are indebted to J. C. Carron, M. Garcie, and F. Saussais, who skillfully contributed to this study.

References

1. Sageda S, Nordal KP, Hartmann A, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* **2002**; 2:850–6.
2. Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsch JD. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* **2004**; 78:1036–41.
3. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* **2005**; 202:673–85.
4. van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Heemskerk MH, ten Berge IJ, van Lier RA. Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4⁺ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection. *Blood* **2006**; 108:3121–7.
5. Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. *Blood* **2003**; 101:2686–92.
6. Betts MR, Price DA, Brenchley JM, et al. The functional profile of primary human antiviral CD8⁺ T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration. *J Immunol* **2004**; 172:6407–17.
7. Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* **2005**; 202:379–86.
8. Gamadia LE, Rentenaar RJ, Baars PA, et al. Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood* **2001**; 98:754–61.
9. Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* **2002**; 8:379–85.
10. Dechanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* **1999**; 103:1437–49.
11. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* **2001**; 184:533–41.
12. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, et al. Long term expansion of effector/memory V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* **2008**; 112:1317–24.

13. Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* **2005**;201:1567–78.
14. Sester M, Sester U, Gartner BC, Girndt M, Meyerhans A, Kohler H. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol* **2002**;13:2577–84.
15. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* **2008**;46:493–8.
16. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, et al. Fc γ RIII discriminates between 2 subsets of V γ 9V δ 2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* **2004**;104:1801–7.
17. Dechanet J, Merville P, Berge F, et al. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* **1999**;179:1–8.
18. Dieli F, Poccia F, Lipp M, et al. Differentiation of effector/memory V δ 2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* **2003**;198:391–7.
19. De Rosa SC, Andrus JP, Peretto SP, et al. Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol* **2004**;172:1637–45.
20. De Libero G. Control of $\gamma\delta$ T cells by NK receptors. *Microbes Infect* **1999**;1:263–7.
21. van Stijn A, Rowshani AT, Yong SL, et al. Human cytomegalovirus infection induces a rapid and sustained change in the expression of NK cell receptors on CD8⁺ T cells. *J Immunol* **2008**;180:4550–60.
22. Lopez-Botet M, Angulo A, Guma M. Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. *Tissue Antigens* **2004**;63:195–203.
23. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* **2000**;287:1031.
24. Waller EC, McKinney N, Hicks R, Carmichael AJ, Sissons JG, Wills MR. Differential costimulation through CD137 (4–1BB) restores proliferation of human virus-specific “effector memory” (CD28(-) CD45RA(HI)) CD8(+) T cells. *Blood* **2007**;110:4360–6.
25. van Leeuwen EM, Gamadia LE, Baars PA, Remmerswaal EB, ten Berge IJ, van Lier RA. Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8⁺ T cells. *J Immunol* **2002**;169:5838–43.
26. Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V, et al. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human V γ 9V δ 2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol* **2005**;35:1764–72.
27. Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, van Dommelen S, Shellam GR, Hill AB. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity* **2008**;29:650–9.
28. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **1991**;78:1373–80.
29. Huard B, Karlsson L. KIR expression on self-reactive CD8⁺ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* **2000**;403:325–8.
30. Lafarge X, Pitard V, Ravet S, et al. Expression of MHC class I receptors confers functional intraclonal heterogeneity to a reactive expansion of gammadelta T cells. *Eur J Immunol* **2005**;35:1896–905.

Article 3 : Recognition of Tumor-specific T Cell Receptor Antigenic Ligands by Cytomegalovirus-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T Cells

Lionel Couzi, Sonia Netzer, Vincent Pitard, Severine Martin, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville

Le manuscrit qui suit est une synthèse de résultats qui méritera comme vous allez le voir un certain nombre de retouches et plusieurs approfondissements avant la future sousmission.

**Recognition of Tumor-specific T Cell Receptor Antigenic Ligands by
Cytomegalovirus-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T Cells**

Lionel Couzi ^{1,2,3}, Sonia Netzer ^{1,2}, Vincent Pitard ^{1,2}, Severine Martin ³, Jean-François Moreau ^{1,2,3},
Julie Déchanet-Merville ^{1,2}

¹ CNRS UMR 5164, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

² Université Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

³ CHU Bordeaux, Hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux, France

Address correspondence to: Julie Déchanet-Merville, UMR-CNRS 5164, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux.

Tel : 33-5 57 57 14 71

Fax : 33-5 57 57 14 72

E-mail : Julie.Dechanet@u-bordeaux2.fr

ABSTRACT:

We have previously demonstrated that V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes isolated from cytomegalovirus (CMV) infected patients are able to kill both CMV-infected cells and tumour epithelial cells in vitro, suggesting that they recognize a non-specific stress-associated molecular pattern on cell targets. In the present study, we investigated whether this pattern comprised a TCR antigenic ligand and whether the same pattern is recognized on both tumor and CMV-infected targets by different V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes. Three TCRs from tumor and CMV-infected double reactive $\gamma\delta$ T cells were transduced in a TCR-deficient JRT3 cell line. Two JRT3 cell lines expressing two different $\gamma\delta$ TCRs (V γ 4V δ 5, V γ 9V δ 1) displayed CD69 when incubated with anti-TCR monoclonal antibodies (mAb), and when co-cultured with tumor cell lines that also activated the parental $\gamma\delta$ T cell clones. Interestingly, each JRT3 $\gamma\delta$ TCR were activated by a different panel of tumor cell lines indicating the recognition of different antigenic ligands by each $\gamma\delta$ TCR. CMV-infected cells did not activate the JRT3 V γ 4V δ 5-TCR and accordingly expressed lower levels of the V γ 4V δ 5 TCR ligand. We showed that CD2 and LFA1 were essential accessory molecules for the activation of the parental clone V γ 4V δ 5 by CMV-infected cells and that the lack of costimulatory molecules could explain the absence of anti-CMV reactivity by the JRT3 V γ 4V δ 5-TCR. Altogether these results demonstrated that a unique $\gamma\delta$ T cell can recognize different stress-associated molecular pattern by accommodating TCR and evidenced a panel of valuable tumor cell lines for the identification of new $\gamma\delta$ TCR antigenic ligands.

Introduction

Gamma-delta T cells represent about 4% of peripheral blood T cells. In physiological conditions, the predominant population of circulating $\gamma\delta$ T cells (about 3% of T cells) express a T-cell receptor (TCR) encoded by the V γ 9 and V δ 2 gene segments. Other populations of $\gamma\delta$ T cells use the V δ 1, V δ 3, or V δ 5 segments to form their TCR and normally reside in epithelia. They are collectively designated as V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells and comprise about 1% of circulating T cells. Studies in human have implicated $\gamma\delta$ T cells in host defense against various microbial infections and tumors. The TCR V γ 9V δ 2 subset plays a role in the defense against intracellular bacteria or parasites and haematological malignancies. By contrast, growing evidences indicate that the second subset of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells may provide a first line of defense against viral infections and epithelial malignancies^{1,2,3,4,5}.

In contrast to $\alpha\beta$ T cells, an important feature of $\gamma\delta$ T cells is that they do not require classical histocompatibility complex (MHC)-presenting molecules in the antigen recognition pattern by their TCR⁶. In human, the $\gamma\delta$ T cells expressing a TCR encoded by the V γ 9 and V δ 2 gene subunits are activated through their TCR, following interaction with soluble mycobacterial prenyl pyrophosphate and alkylamine compounds⁷ or with the association of membrane F1-ATPase and apolipoprotein A-I⁸. The TCR ligand specificity of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell subset has been much less explored than that of V δ 2/V γ 9 T cells. However, some V δ 1 TCR from *in vitro* isolated V δ 1 $\gamma\delta$ T cell lines or clones have been reported to recognize CD1c⁹ or MHC class I-related chain A (MICA, a stress-induced protein expressed on epithelial cells)^{10,11}.

Few years ago, we have observed a major increase of blood V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell levels following CMV infection in KTR^{12,13}, and correlated this expansion to viral load resolution¹⁴. The cytotoxicity of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell against CMV-infected cells has also been demonstrated *in vitro*¹⁵. In addition, we have observed that V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T clones or cell lines displayed a cross reactivity against both CMV-

infected cells and some tumor epithelial cells, suggesting the recognition of a non-specific stress-associated surface molecular pattern on infected and transformed cells ¹⁵. This reactivity was abrogated by anti-TCR antibodies and was associated with $\gamma\delta$ TCR internalization, suggesting the recognition of TCR antigenic ligands on both CMV-infected and tumor cells.

The present study was initiated to address three critical points to understand the activation mechanisms of $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells: (i) to definitively assess TCR-dependency in the recognition of CMV-infected or transformed cell targets, (ii) to know whether the same stress-associated pattern is recognized on tumor cells and CMV-infected cells and (iii) to know whether all $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells are able to recognize the same TCR antigenic ligand. To these purposes, the cDNA encoding several TCRs from $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell clones were transduced in the TCR-deficient Jurkat mutant J.RT3-T3.5 cell line to create reporter cell lines with the same reactivity as the parental $\gamma\delta$ T cell clones. Using these reporter cell lines, we were able 1/ to compare the extended reactivity of different $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ TCRs, and 2/ to test whether the recognition of target cells (CMV-infected or transformed cells) was dependent of the $\gamma\delta$ TCR alone.

Materials and Methods

V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell clones

The $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell clones 4-29, 6-1 and 4-5 were generated as previously described ¹⁵. They were monthly stimulated with 1000 U/ml rIL-2 (Proleukine, Chiron, France), 1 $\mu\text{g/ml}$ PHA-L (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and irradiated allogenic PBMC (35Gy) in RPMI supplemented with 10% of humans serum. T cells were used at least 14 days after stimulation for phenotype or activation experiments. All cultures were mycoplasma free.

Cell lines, virus and antibodies:

The human J.RT3-T3.5 TCR β -chain mutant was obtained from American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France) as well as all tumor cell lines. The U343 and U251 cell lines have been kindly given by C. Söderberg-Nauclér (Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden). Primary human foreskin fibroblasts (FSFs) were a gift from C. Pain (INSERM U876, Bordeaux, France). CMV suspensions were produced with the clinical strain TB40/E (a gift from C. Sinzger, University of Tu-bingen, Tübingen, Germany). Subconfluent monolayers of primary FSF cells were incubated with CMV suspension at a multiplicity of infection (MOI) of 1 cultured for 5 days at 37°C. Infected-cell layers were washed before being used for co-culture experiments with $\gamma\delta$ T cell clones or reporter cell lines. Control for viral infection were performed with CMV (monoclonal mAbs (mAbs) E13)-specific detection kits according to manufacturer's instructions (Argene, Biosoft, Varilhes, France). The following mAbs were purchased from Beckman Coulter (Roissy, France): anti-pan- $\gamma\delta$ (clone IMMU510), anti-CD2 (clone 39C1.5), anti-CD11a (clone 25.3), anti-CD54 (clone 84H10), anti-CD58 (clone AICD58). The anti-CD3 mAb (Clone OKT3) was provided by Jansen-Cilag. The anti-LIF (clone 1F10 and 7D2) mAbs have been kindly given by JL. Taupin (UMR-CNRS 5164, Bordeaux, France) and were used as control.

Cloning and Transfections

The $V\gamma$ and $V\delta$ chains of T cell clones, 4-29 ($V\gamma4V\delta5$), 5-4 ($V\gamma9V\delta1$) and 6-1 ($V\gamma8V\delta1$), were cloned by RT-PCR using primers that spanned the entire molecule. Restriction sites have been added on 5' end of primers for the cloning. The primers used were: $V\gamma4$ -5' BglIII AAAGATCTCTTTCCCTTCCAAGGC, $V\gamma9$ -5' BglIII AAAGATCTGACAAGACAATCTGC, $V\gamma8$ -5' BglIII AAAAGATCTATGCTGTTGGCTCTAGCTCT, $C\gamma$ -3' Sall AAAGTCGACGTGAGGTTCTCTGTGT, $V\delta5$ -5' BglIII AAAGATCTGACAAGACAATCTGC, $V\delta1$ -5' BglIII AAAGATCTCTTCAGGCAGCACAACT, $C\delta$ -3' Sall AAAGTCGACAGCGTATCACTTGTAGGAGTAA. Restriction sites added are underlined. After

RT-PCR, the product was subcloned in pCR2.1 (TA Cloning® Kit, Invitrogen, Paisley, UK) and sequenced. The cDNA were digested with the restriction enzymes BglIII and Sall, purified and then cloned into the vector 110 (plateforme de vectorologie, Bordeaux, France) digested with BamHI and Sall. The cDNA was under the control of the promoter EF1 α . The cDNA of CD2 and LFA1 α L and β 2 subunits were cloned by PCR using primers that spanned the entire molecule. CD2 and LFA1- β 2 cDNA were obtained by RT-PCR performed on the 4-29 T cell clone. LFA1- α L cDNA was amplified by PCR on vector containing the LFA1- α L cDNA (addgene plasmid 8630). This plasmid has been kindly given by Larson RS¹⁶. Restrictions sites have been added on 5' end of primers for the cloning. The primers used were :

<u>AAGGATCCA</u> AACCCCTAAGATGAGCTTTCC,	CD2-5'	BamHI
	CD2-3'	Sall
<u>TTGTCGACTC</u> TTTTTTAATTAGAGGAAGG,	LFA1- α L-5'	PmeI
<u>AAGTTTAAACTC</u> GAGTGCTGGAAGGATGAAGG,	LFA1- α L-3'	SpeI
<u>TTACTAGTATC</u> CTGAGTCCAGTTCTGGGC,	LFA1- β 2-5'	PmeI
<u>AAGTTTAAAC</u> AGGACTCCAGCACACCGAGGG,	LFA1- β 2-3'	SpeI
<u>TTACTAGTGGC</u> CTTGTCCTTCACCAAGTGC.		

Restriction sites added are underlined. The cDNA was subcloned in pCR2.1 (TA Cloning® Kit, Invitrogen, Paisley, UK) and sequenced. The CD2 cDNA was digested by BamHI and Sall restriction enzymes, purified and cloned in the vector 110 (plateforme de vectorologie, Bordeaux, France) digested with BamHI and Sall restriction enzymes. The LFA1 α L and β 2 cDNA was digested by PmeI and SpeI restriction enzymes, purified and cloned in the vector 143 (plateforme de vectorologie, Bordeaux, France) also digested PmeI and SpeI. The CD2 and LFA1 cDNA are under the control of the EF1 α promoter. Transfection was next performed using lentiviral particles, which were produced by transient transfection of 293T cells as described previously¹⁷. Enzyme-linked immunosorbent assays of p24 were used to determine the concentration of viral p24 protein in the different viral supernatants. Titration was done by comparing the p24 concentration of the different supernatants and the

specific titers of EGFP. J.RT3-T3.5 cell lines were transfected with lentiviral vectors at a multiplicity of infection of 2, 4 and 8 in RPMI (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) 8% FCS medium with 8 μ g/mL protamine sulfate (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). After 24h of infection, cells were washed twice and selected if necessary using the cell sorter BD FACSAria cytometer and the FACSDiva 6.1.1 software from BD biosciences (Le Pont de Claix, France).

Generation of the 2E9 monoclonal antibody

1.10⁶ HT29 in 50 μ l PBS without adjuvant were injected into each footpad of the back legs of two balb/c mice. Twelve days later a boost was realized in the same conditions and at day fifteen, popliteal lymph nodes were collected and B cells extracted and fused with the myeloma partner P3U1¹⁸. Medium was removed from 96 flat bottom well plate containing subconfluent HT29 and 50 μ l of hybridoma supernatant was added. After 30 minutes of incubation at room temperature, 5 x 10⁴ cells from the clone 4-29 were added per well and plates were incubated for 4 hours at 37°C, 5% CO₂. 50 μ l of supernatant was removed from the wells and TNF- α was measured by ELISA (BenderMedsystem, Vienna, Austria). The mAb 2E9 (isotype IgM) was generated in these experiments.

Detection of TNF- α production by the clones

$\gamma\delta$ T cell clones (5 x 10⁴/well) were incubated with monolayers of epithelial cell lines or virus-infected or noninfected FSFs for 6 hours at 37°C. As a positive control for activation, $\gamma\delta$ T cell clones were incubated with an agonist anti-CD3 mAb (OKT3). TNF- α released into the supernatant was quantified by ELISA according to the manufacturer's recommendations (Bender Medsystems, Austria).

Flow cytometry analysis

For phenotyping cells, 2×10^5 cells were incubated 15 minutes at $+4^\circ\text{C}$ with the fluoro-conjugated mAbs, then washed once and resuspended in 200 μl of cell wash (BD biosciences, Le Pont de Claix, France). MAbs directed against the following molecules were purchased from Beckman-Coulter (Roissy, France): Anti-pan $\gamma\delta$ FITC, anti-CD2 FITC, anti-CD3 FITC, anti-CD11a FITC, anti-CD28 FITC, anti-CD48 FITC, anti-CD54 FITC, anti-ICAM-2 FITC and anti-ICAM-3 FITC, anti-CD58 FITC, anti-CD59 FITC, anti-CD69 PC5. For indirect staining with the mAb 2E9 (10 $\mu\text{g/ml}$), cells were washed twice after the primary staining, then incubated 15 minutes at $+4^\circ\text{C}$ with a goat anti-mouse IgM FITC (1/200, Beckman-Coulter,), then washed once and resuspended in 200 μl of cell wash. All the cells were analyzed on a BD FACSCanto cytometer using the FACSDiva 6.1.1 software from BD biosciences (Le Pont de Claix, France).

For measuring the activation of the reporter cell lines, cells were incubated alone or with monolayers of epithelial cell lines or virus-infected or non-infected FSFs for 4 h at 37°C . After one wash, cells were stained with the anti-CD2 FITC and the anti-CD69 PC5 mAbs and analyzed on a BD FACSCanto cytometer. At least 5000 events were analyzed. The JRT3 4-29 cell line was isolated with a CD2 staining and level of activation was measured on the basis of the CD69 mean fluorescence intensity.

Results:

Lentiviral transfection of the Jurkat mutant J.RT3-T3.5 T cell line with the $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ TCRs

To obtain direct evidence for TCR-mediated $\gamma\delta$ T cell recognition of both tumor cells and CMV-infected cells, we transduced the Jurkat mutant J.RT3-T3.5 T cell line (JRT3), which lacks endogenous TCR- β with the cDNA encoding the γ - and δ -chains derived from 3 $\gamma\delta$ T cell clones named 4-29, 5-4 and 2-6 expressing the $V\gamma 4V\delta 5$, $V\gamma 9V\delta 1$ and $V\gamma 4V\delta 1$ chains, respectively. These clones have been previously described¹⁵ and are all reactive against both carcinoma cells and CMV-infected cells. Stable transductants were obtained and after cell sorting, more than 95% of

the JRT3 T cell lines expressed high levels of the TCRs as exemplified in Figure 1A with the $\gamma\delta$ TCR 4-29 (JRT3 4-29). TCR expression on JRT3 cells was at least as important as that of the parental clone (data not shown). Upon TCR activation with anti-CD3 and anti- $\gamma\delta$ mAbs, the JRT3 $\gamma\delta$ -TCR cell lines responded by expression of CD69, whereas the JRT3 did not (Figure 1B). The highest level of CD69 expression was observed between 3 and 4 hours after the beginning of the culture (Figure 1C) and was obtained with as low as 0.1 ng/ml of anti-CD3 mAb (Figure 1D). Others markers of activation, such as CD25, HLA-DR, CD154 or the production of interleukin-2 or TNF- α were screened, but none of them were expressed or produced by the JRT3 even when activated by PMA and ionomycin (data not shown). The JRT3 $\gamma\delta$ -TCR cell lines can thus be used as reporter cell lines in which the level of CD69 expression was used as a read-out to measure the engagement of the TCR by a putative ligand.

Transfer of the anti tumor specificity by expression of two of the $\gamma\delta$ TCR in the Jurkat mutant cell lines

We have already published that the $\gamma\delta$ T cell clones described above were reactive and could kill some tumor epithelial cell lines (HT29, CAco2 and Hela) ¹⁵. We assessed whether the transfer of the three $\gamma\delta$ TCRs described above was able to confer anti-tumour reactivity to the JRT3 reporter cells. We extended the panel of targets by testing more tumor cell lines of various origins. As shown in Table 1, the 4-29 TCR and the 5-4 TCR were able to confer reactivity toward tumor cell lines. However, the panel of recognized tumors was strikingly different from one TCR to the other, suggesting the recognition of different antigenic ligands by each TCR. No anti-tumor reactivity could be observed with the JRT3 2-6. The affinity of the TCR 2-6 was probably too low to transfer the specificity to the JRT3 cells. On the opposite, an important basal reactivity of the JRT3 5-4 was observed against FSF, making uncertain the study of the anti-CMV reactivity. For these reasons we decided to focus our attention on the JRT3 4-29.

Success to redirect anti tumor specificity by expression of the $\gamma\delta$ 4-29 TCR in the Jurkat mutant cell line

As shown in Figure 2A and B, the JRT3 4-29 cell line could be activated by exactly the same tumor cell targets than the parental $\gamma\delta$ T cell clone 4-29: HT29 (colorectal adenocarcinoma), K562 (chronic myelogenous leukaemia), U937 (histiocytic lymphoma) and U343 (Glioma). The untransduced JRT3 was not able to express CD69 to its cell surface in the same conditions of culture, suggesting that anti-tumor specificity was only supported by the $\gamma\delta$ TCR 4-29. Next, mismatched combinations of γ - and δ -chains were realized from the responder 4-29 and the non-responder 6-1 TCR. Although the surface amounts of the mismatched $\gamma\delta$ TCR heterodimers were similar to the unaltered TCRs (data not shown), no activation could have been observed when they were co-cultured with the same tumor cell lines (Figure 2A). Taken together, these data supported the idea that the anti tumor specificity was only supported by the $\gamma\delta$ TCR 4-29 and that both γ - and δ -chains were necessary and sufficient to activate the cell.

Generation and validation of a monoclonal antibody recognizing the ligand of the $\gamma\delta$ 4-29 TCR

To determine whether the tumor ligand of the $\gamma\delta$ TCR 4-29 was soluble or at the cell surface of tumor cells, we co-cultured the JRT3 4-29 and the HT29 in the same vial, separating them by a membrane of 0.45 μ m to prevent cell contacts. No activation of the JRT3 4-29 was observed in this condition, suggesting the presence of the ligand at the cell surface of the tumor cells. This hypothesis was confirmed by the persistence of the reactivity of the JRT3 4-29 against paraformaldehyde pre-treated HT29, a product known to kill and fix the cells (data not shown).

On this supposition, mice were immunized with the HT29 tumor epithelial cell line in order to obtain mAbs against the ligand of the TCR 4-29. The mAb 2E9 was selected because it was able to block the reactivity of the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 against both the HT29 tumor epithelial cell line and

CMV-infected FSFs (Figure 3A). The mAb 2E9 was also able to block the reactivity of the JRT3 4-29 against the HT29 cell line (Figure 3B), suggesting that it was directed against the ligand of the TCR 4-29. Because the HT29-reactive $\gamma\delta$ T cell clone 5-4 that was not inhibited by the mAb 2E9 (data not shown), we used the reporter cell line JRT3 5-4 as control to confirm this finding. The JRT3 5-4 was also able to be reactive when co-cultured with the HT29 cell line while the mAb 2E9 was not able to block its reactivity (Figure 3B). Since the only difference between the JRT 4-29 and the JRT3 5-4 was the TCR, this experiment definitively proved that the mAb 2E9 was directed against the ligand of the $\gamma\delta$ TCR 4-29. Furthermore, strong staining with 2E9 was found at the cell surface of the tumor cells that were able to activate both the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 and the JRT3 4-29 (HT29, K562, U937 and U343 cell lines). On the contrary, cell lines which were not able to activate the cells bearing the $\gamma\delta$ TCR 4-29 (U251, Hutu 80, Huh7 and A431 cell lines), showed low staining of 2E9 (Figure 3C). None of the JRT3 were stained by the mAb E9 (data not shown). Taken together, these data demonstrated that the tumor ligand of the TCR 4-29 was recognized by the mAb 2E9 and that this ligand was over expressed only in tumor cells that were able to activate both the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 and the JRT3 4-29.

Failure to redirect specificity against cytomegalovirus-infected cells

As previously mentioned, the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 is also reactive against CMV-infected cells. Interaction with CMV-infected cells lead to a TCR internalization and anti-TCR blocking mAbs are able to block the clone reactivity against CMV-infected cells, demonstrating that the $\gamma\delta$ TCR 4-29 engagement is necessary to trigger anti-CMV reactivity¹⁵. To go further into this finding, we tried to activate the JRT3 4-29 reporter cell line with CMV-infected FSFs. However, the JRT3 4-29 cell line was not able to be activated by CMV-infected FSFs (Figure 4A and B) despite an expression level of TCR as high as the parental clone. Taken together, these experiments supported the idea

that the $\gamma\delta$ TCR 4-29 engagement was necessary but not sufficient to trigger anti-CMV reactivity, because TCR transfer was not sufficient to give anti-CMV specificity to the JRT3 4-29.

Correlation between JRT3 4-29 cell line reactivity and TCR ligand expression

To explain the discrepancy between the tumor cells and CMV-infected cells, we postulated that expression level of the TCR ligand could be different between them. To explore this point, we used our home-made mAb 2E9 that recognized the tumor ligand of the $\gamma\delta$ TCR 4-29. Using flow cytometry, we observed a low staining of mAb 2E9 at the cell surface of the CMV-infected FSFs, whereas its level was much higher at the cell surface of the tumor cells (Figure 5A). To summarize, we found that the JRT3 4-29 cell line was reactive only against the cells expressing high level of TCR ligand, but not against those with a low level of TCR ligand (U251, Hutu 80, Huh7 and A431 cell lines, CMV-infected and non infected FSFs) (Figures 3C and 5A). This result could have suggested that the CMV-induced ligand of the $\gamma\delta$ TCR 4-29 is different from the tumor ligand. However, the mAb 2E9 ability to block the reactivity of the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 against CMV-infected FSFs had previously demonstrated the implication of this molecule in the anti-CMV reactivity of the parental $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 (Figure 3A).

Production of TNF- α by the clone 4-29 is correlated with ICAM1 expression, when target cells displays low levels of TCR ligand

Considering this last observation, we tried to understand why the parental $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 was reactive against CMV-infected cells (Figure 4B), since CMV-infected FSFs expressed low level of TCR ligand. Because some previous published reports have already demonstrated the very important role displayed by the couples CD2/LFA3 and LFA-1/ICAM1 in the co-activation of $\gamma\delta$ T cells^{19,20}, we postulated that a second signal of activation could be necessary to activate the parental clone 4-29 and compensate the low level of TCR ligand at the target cell surface. As

previously described ²¹, we observed among the known ligands of CD2 (CD48, CD59 and LFA-3) and LFA1 (ICAM1, ICAM2 and ICAM3), a significant increase of ICAM1 at the cell surface of the CMV-infected FSFs when compared to the non-infected FSFs (Figure 5B). The very low expression level of ICAM 1, 2 or 3 exhibited on tumor cell lines, which were not able to activate the cells bearing the $\gamma\delta$ TCR 4-29 (U251, Hutu 80, Huh7 and A431 cell lines) (Figure 5C), was correlated with the reactivity of the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29. That suggested that the reactivity of the clone could have been supported by an increase of adhesive molecules at the cell surface of the target cells displaying a low expression level of TCR ligand.

Necessity of LFA1 and CD2 molecules for the co-activation of the clone 4-29

We finally wondered why the parental clone was reactive against CMV-infected cells and why the JRT3 4-29 was not. We compared both cell phenotype and observed a lower expression of CD2 and LFA1 at the cell surface of the JRT3 4-29 when compared with the parental $\gamma\delta$ T cell clone 4-29, suggesting that a second signal of activation could lack at the cell surface of the JRT3 4-29 to trigger anti-CMV reactivity (Figure 6A). To argue this hypothesis, we first showed that engagement of CD2 or LFA1, in combination with sub-optimal doses of anti-CD3, led to an enhancement of the level of the TNF- α produced by the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29, when compared to anti-CD3 alone (Figure 6B). Moreover, anti-CD2, anti-LFA3, anti-ICAM1 and anti-LFA1 blocking mAbs were able to block the reactivity of the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 against CMV-infected FSFs (Figure 6C), demonstrating that CD2 and LFA1 co-signals were necessary for the co-activation of the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 by CMV-infected FSFs. However, the JRT3 4-29 was transduced with the CD2 and LFA1 cDNAs and stably JRT3 4-29 transfectants expressing high levels of CD2 and LFA1 failed to be activated by CMV-infected cells (Figure 6D). Taken together, these data showed that LFA1 and CD2 molecules were necessary for the co-activation of the clone 4-29, but not sufficient to provide anti-CMV reactivity to the JRT3 4-29 to acquire.

Discussion:

In order to identify the molecular determinants necessary for the activation of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells against both CMV-infected cells and tumor cells, we have carried out this study to confirm that $\gamma\delta$ T cell recognition of both tumor cells and CMV-infected cells was mediated by the $\gamma\delta$ TCR. For this purpose, we have chosen to transduce $\gamma\delta$ TCR from reactive $\gamma\delta$ T cell clones in the TCR-deficient Jurkat mutant line. Using this strategy, we observed that the panel of recognized tumors was strikingly different from one TCR to the other, suggesting the recognition of different antigenic ligands by each TCR. However, we failed to formally demonstrate that anti-CMV reactivity of the parental V δ 5 $\gamma\delta$ T cell clone was supported by the $\gamma\delta$ TCR. This lack of transfer of specificity could be explained by a low expression level of the $\gamma\delta$ TCR 4-29 ligand at the cell surface of the CMV-infected FSFs. This observation allowed us to demonstrate that co-signaling was necessary between CMV-infected cells and $\gamma\delta$ T cells to activate the reactive $\gamma\delta$ T cell clone and that the pattern of activation of the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells was more complex than the only TCR-ligand interaction.

To our knowledge, only two groups have previously tried this strategy to identify TCR ligand of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells with different successes. Spada et al. formally demonstrated that V γ 2/V δ 1 TCR transfectants were able to produce IL-2 in response to CD1c+ dendritic cells⁹, whereas Wu et al. failed to stably transduce V δ 1 TCRs in the Jurkat mutant T cell line¹¹. Using lentiviral transduction, we succeeded to obtain stably transfectants expressing V δ 1 and V δ 5 TCR. However these cell lines showed a poor activation potential, because we only detected CD69 over expression after TCR engagement. This singular reactivity could be an intrinsic feature of the Jurkat mutant T cell line, but it could be more likely explained by a disturbing in the intra-cellular signaling occurred during the lentiviral transduction. No cytokine production (and no TNF- α production) was detected even with a strong non specific activation. Because of this characteristic, we failed to

find a similar read out for both types of cells. We also tried to measure CD69 expression level on the parental clone 4-29, but CD69 level was always found high on these cells, even in the absence of activation. Despite this difference of read out, the activation pattern of both the JRT3 4-29 and the parental clone 4-29 against a panel of tumor cells was fully similar demonstrating that transfer of TCR was responsible of transfer of anti-tumor specificity.

Mismatched combinations of γ - and δ -chains were realized to determine whether the specificity was embedded in a clonotypic $\gamma\delta$ TCR heterodimer or mainly conferred by γ - or δ - chains alone. The conclusion was that tumor antigen recognition was determined by specific $\gamma4$ - and $\delta5$ -chain heterodimer, as previously described ¹¹.

Using this transfectant, we were next able to validate a mAb directed against the ligand of this $\gamma\delta$ TCR 4-29. We tried to use this mAb to immunoprecipitate the TCR ligand, but we failed despite many experiments. Actually, the isotype of this mAb is IgM and the low affinity of IgM for their ligand could explain our results. However, this mAb was very interesting in blocking experiments, because it allowed us to demonstrate that the ligand of the $\gamma\delta$ TCR 4-29 was implicated in the anti-CMV reactivity.

Despite the implication of the ligand of the $\gamma\delta$ TCR 4-29 in the anti-CMV reactivity, we failed to formally demonstrate than the anti-CMV reactivity was only supported by the $\gamma\delta$ TCR 4-29. We have two hypotheses to explain this failure: 1/ the identified $\gamma\delta$ TCR 4-29 ligand was very low at the cell surface of the CMV-infected FSF, and 2/ the lack of costimulatory molecules at the cell surface of the JRT3 4-29. It is a delicate business to formally demonstrate this failure. Then in the future, we have to generate new clones, new transductants and maybe test another targets as CMV-infected monocytes and CMV-infected endothelial cells to find another $\gamma\delta$ TCR ligands. Probably only a broader approach will allow us to demonstrate formally the implication of the $\gamma\delta$ TCR in the anti-CMV reactivity.

In summary, we observed in this study that 1/ the anti-tumor reactivity of $\gamma\delta$ T cells was supported by the $\gamma\delta$ TCR, 2/ each $\gamma\delta$ TCR recognized different antigenic ligands, 3/ the anti-CMV reactivity was not only supported by $\gamma\delta$ TCR and 4/ the lack of costimulatory molecules could explain the absence of transfer of anti-CMV reactivity into the JRT3. In the future, our main goal is to identify the tumor ligands of the $\gamma\delta$ TCR 4-29 by using the suitable panels of tumor target cells identified in this study.

Acknowledgments:

We thank V. Guyonnet-Duperat and F. Moreau-Gaudry for their precious help. We thank Larson RS to kindly give us the plasmid encoding the LFA1- α L cDNA, and C. Söderberg-Nauclér the U343 and U251 cell lines.

References:

1. Falini B, Flenghi L, Pileri S, et al. Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol.* 1989;143:2480-2488.
2. Poccia F, Agrati C, Martini F, Capobianchi MR, Wallace M, Malkovsky M. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect.* 2005;7:518-528.
3. Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, Poggi A, Zocchi MR. Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol.* 2002;23:14-18.
4. Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res.* 2007;67:5-8.
5. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity.* 2009;31:184-196.

6. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*. 1995;3:495-507.
7. Bonneville M. Forum in immunology. Introduction. Non-conventional T cells: useful or harmful players in microbial immunity? *Microbes Infect*. 2005;7:501-502.
8. Scotet E, Martinez LO, Grant E, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity*. 2005;22:71-80.
9. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med*. 2000;191:937-948.
10. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*. 1998;279:1737-1740.
11. Wu J, Groh V, Spies T. 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*. 2002;169:1236-1240.
12. Dechanet J, Merville P, Berge F, et al. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis*. 1999;179:1-8.
13. Dechanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*. 1999;103:1437-1449.
14. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis*. 2001;184:533-541.
15. Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2005;201:1567-1578.

16. Larson RS, Corbi AL, Berman L, Springer T. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J Cell Biol.* 1989;108:703-712.
17. Geronimi F, Richard E, Redonnet-Vernhet I, et al. Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34⁺ and CD34⁺/38⁻/lin⁻ cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation. *Stem Cells.* 2003;21:472-480.
18. Taupin JL, Acres B, Dott K, et al. Immunogenicity of HILDA/LIF either in a soluble or in a membrane anchored form expressed in vivo by recombinant vaccinia viruses. *Scand J Immunol.* 1993;38:293-301.
19. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol.* 2005;175:5481-5488.
20. Das H, Sugita M, Brenner MB. Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components. *J Immunol.* 2004;172:6578-6586.
21. Grundy JE, Downes KL. Up-regulation of LFA-3 and ICAM-1 on the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Immunology.* 1993;78:405-412.

Legends to Figures:

Figure 1

The V γ 4 and V δ 5 chains of the T cell clone 4-29 were cloned by RT-PCR. Jurkat mutant J.RT3-T3.5 T cell line (JRT3), which lacks endogenous TCR- β , was transfected with lentiviral vectors. After 24h of infection, cells were washed twice. Stable transductant was obtained and after cell sorting, more than 95% of the JRT3 T cell lines expressed high levels of the TCR (A). For measuring the activation of the reporter cell lines, cells were incubated alone or with an activating anti-CD3 and anti- $\gamma\delta$ mAb for 4 h at 37°C. After one wash, cells were stained with the anti-CD69 PC5 mAbs and analyzed on a cytometer. At least 5000 events were analyzed (B, C, D).

Figure 2

The $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 was incubated alone, with an activating anti-CD3 mAb or with tumors cell lines for 6 h at 37°C. TNF- α released into the supernatant was quantified by ELISA (A). For measuring the activation of the reporter cell lines, the different JRT3 cell lines (non transduced: JRT3, JRT3 4-29, JRT3 with mismatched $\gamma\delta$ TCR heterodimers) were incubated alone or with tumors cell lines for 4 h at 37°C. After one wash, cells were stained with the anti-CD2 FITC and the anti-CD69 PC5 mAbs and analyzed on a cytometer (A). At least 5000 events were analyzed. The JRT3 4-29 cell line was isolated with a CD2 staining and level of activation was measured on the basis of the CD69 mean fluorescence intensity (B).

Figure 3

The $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 was incubated with fibroblasts (FSFs), CMV-infected FSFs or with tumors cell lines for 6 h at 37°C in the presence or absence of mAb 2E9 or a control isotype. TNF- α released into the supernatant was quantified by ELISA (A). The JRT3 4-29 and the JRT4 5-4 were incubated alone or with the tumor cell line HT29 for 4 h at 37°C, in the presence or absence of mAb 2E9 or a control isotype. After one wash, cells were stained with the anti-CD2 FITC and the anti-CD69 PC5 mAbs and analyzed on a cytometer. At least 5000 events were analyzed. The JRT3 4-29 cell line was isolated with a CD2 staining and level of activation was measured on the basis of the CD69 mean fluorescence intensity (B). For indirect staining with the mAb 2E9 (10 μ g/ml), HT29, K562, U937, U343, U251, Hutu 80, Huh7 and A431 cell lines were washed twice after the primary staining, then incubated 15 minutes and analyzed on cytometer. At least 10000 events were analyzed (C).

Figure 4

The JRT3 and JRT3 4-29 were incubated with fibroblasts (FSFs) and CMV-infected FSFs for 4 h at 37°C. After one wash, cells were stained with the anti-CD2 FITC and the anti-CD69 PC5 mAbs and analyzed on a cytometer. At least 5000 events were analyzed. The JRT3 4-29 cell line was isolated with a CD2 staining and level of activation was measured on the basis of the CD69 mean fluorescence intensity (A). The $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 was incubated with fibroblasts (FSFs) or CMV-infected FSFs for 6 h at 37°C. TNF- α released into the supernatant was quantified by ELISA (B).

Figure 5

For indirect staining with the mAb 2E9 (10 μ g/ml), HT29, Fibroblasts (FSFs), CMV-infected FSFs were washed twice after the primary staining, then incubated 15 minutes and analyzed on cytometer. At least 10000 events were analyzed (A). For phenotyping cells, 2 x 10⁵ FSFs and CMV-infected FSFs were incubated 15 minutes with the fluoro-conjugated mAbs, then washed once and analyzed on cytometer (B). Comparison of the staining with the mAb 2E9, the staining with an anti-ICAM-1, 2, 3 mAb and the TNF- α production by the clone 4-29 (C).

Figure 6

For phenotyping cells, 2 x 10⁵ clone 4-29 and JRT 4-29 were incubated 15 minutes with the fluoro-conjugated mAbs, then washed once and analyzed on cytometer (A). $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 was incubated with increasing concentrations of an activating anti-CD3 mAb and/or an activating anti-LFA-1 mAb (10 μ g/ml) and an activating anti-CD2 mAb (10 μ g/ml) for 6 hours at 37°C. TNF- α released into the supernatant was quantified by ELISA (B). $\gamma\delta$ T cell clone 4-29 was incubated with Fibroblasts (FSFs) or CMV-infected FSFs in the presence of blocking antibodies (anti-CD3, anti-ICAM-1, anti-LFA1, anti-CD2, anti-LFA3 at 10 μ g/ml) for 6 hours at 37°C. TNF- α released into the supernatant was quantified by ELISA (C). The cDNA of CD2 and LFA1 α L and β 2 subunits were cloned by PCR. The JRT3 4-29 was transfected with lentiviral vectors. After 24h of

infection, cells were washed twice. Stable transductants were obtained and after cell sorting, were stained with anti-CD2 and anti-LFA1 mAb before cytometer analysis (D). For measuring the activation of the reporter cell lines, cells were incubated with FSFs or CMV-infected FSFs for 4 h at 37°C. After one wash, cells were stained with the anti-CD2 FITC and the anti-CD69 PC5 mAbs and analyzed on a cytometer. At least 5000 events were analyzed. The JRT3 4-29 cell line was isolated with a CD2 staining and level of activation was measured on the basis of the CD69 mean fluorescence intensity.

Figure 1

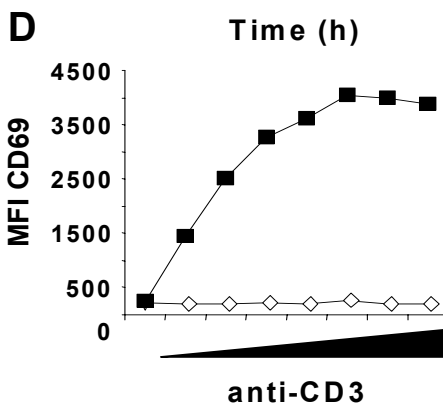
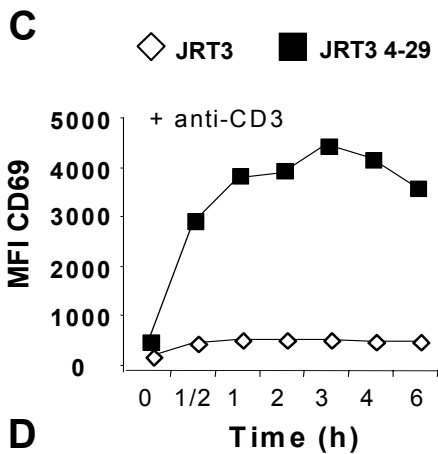
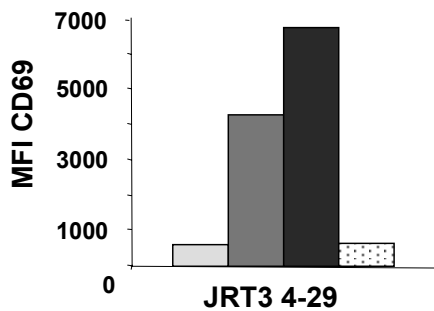
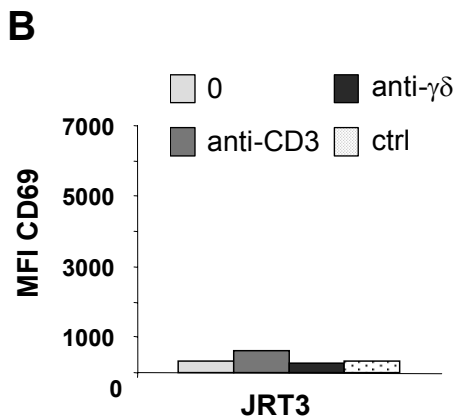
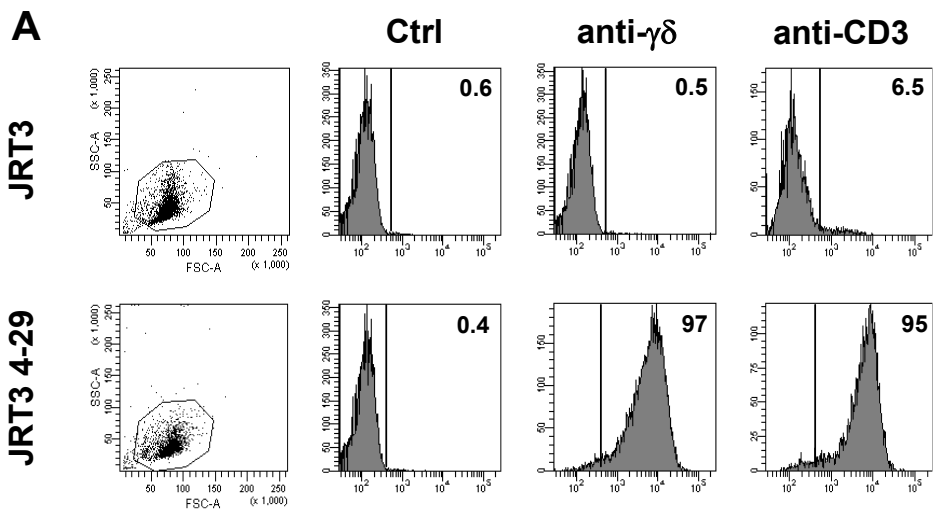


Table 1: anti-tumor reactivity of JRT3 $\gamma\delta$ -TCR reporter cell lines

	JRT3 4-29	JRT3 5-4	JRT3 6-1
3T3	0	++	0
CHO	0	0	0
COS	0	+	0
DAUDI	0	0	0
FSF	0	++	0
H9	0	0	0
HEK	0	+	0
HELA EV2	0	0	0
HELA PF	0	++	0
HEP B3	0	0	0
HEP G2	0	0	0
HT29	+	++	0
HUH7	0	0	0
HUTU 80	0	0	0
HUVEC		++	0
JAR	0	+	0
JY	0	0	0
K562	+	0	0
MEF	0	++	0
MRC5	0	++	0
RAJI	0	0	0
SK-CO1	0	+	0
SK-MES	0	++	0
T84	0	0	0
THP-1	0	0	0
U373	0	+	0
U937	+	0	0
VERO	0	++	0
WR19L	0	0	0

Figure 2

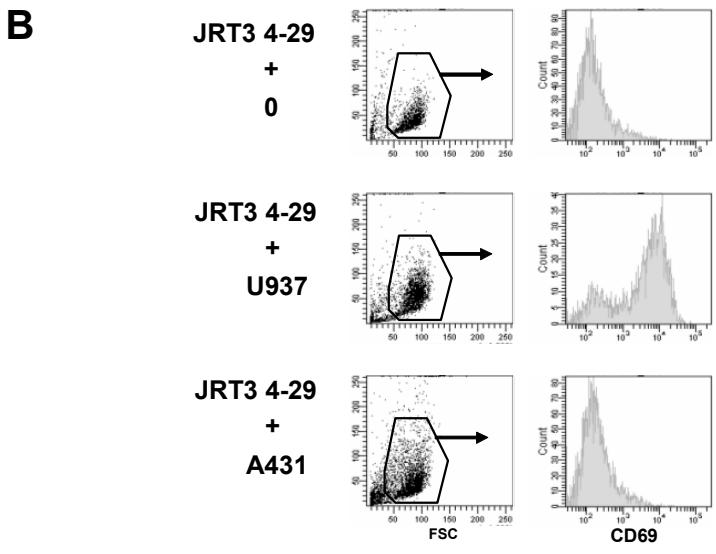
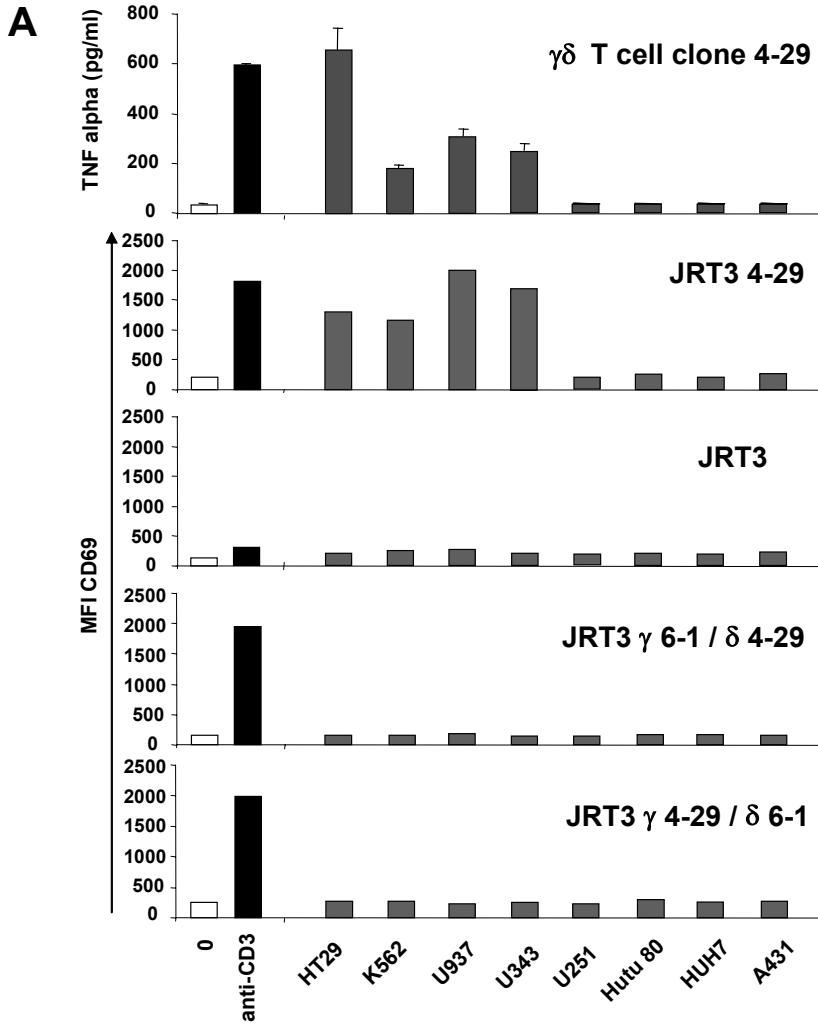


Figure 3

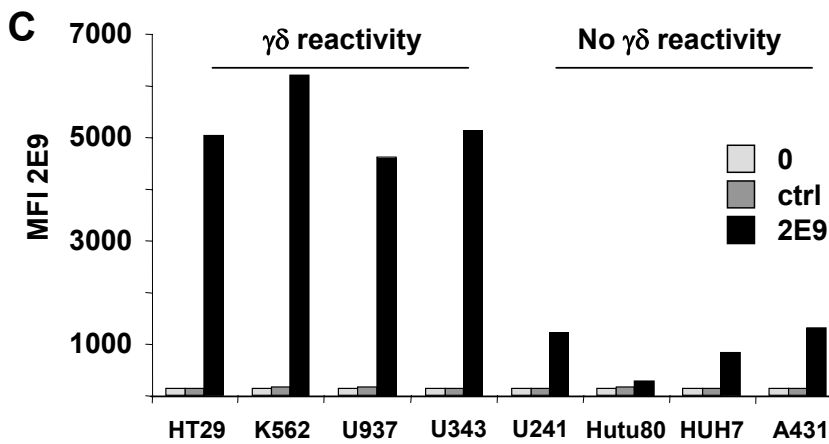
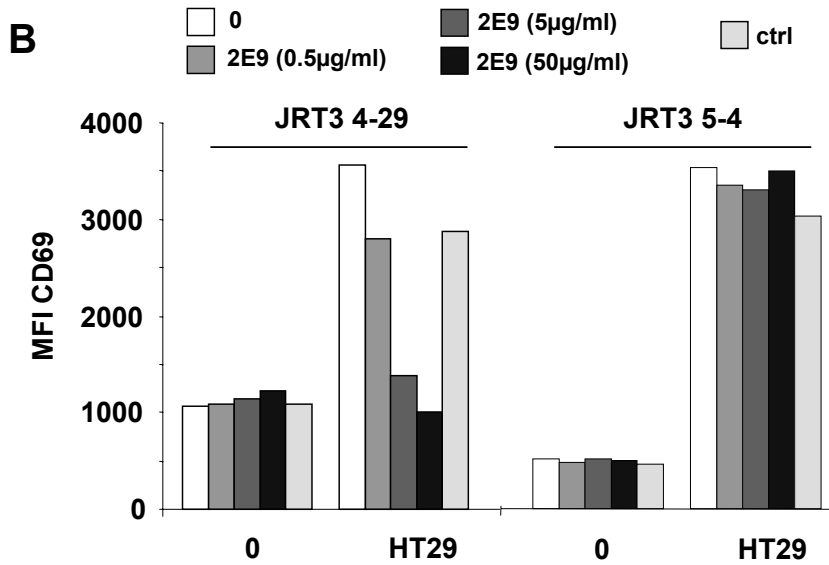
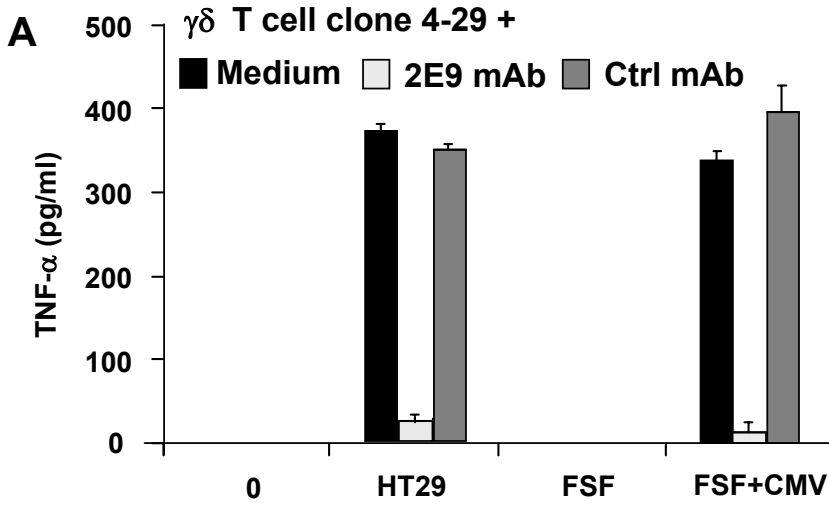


Figure 4

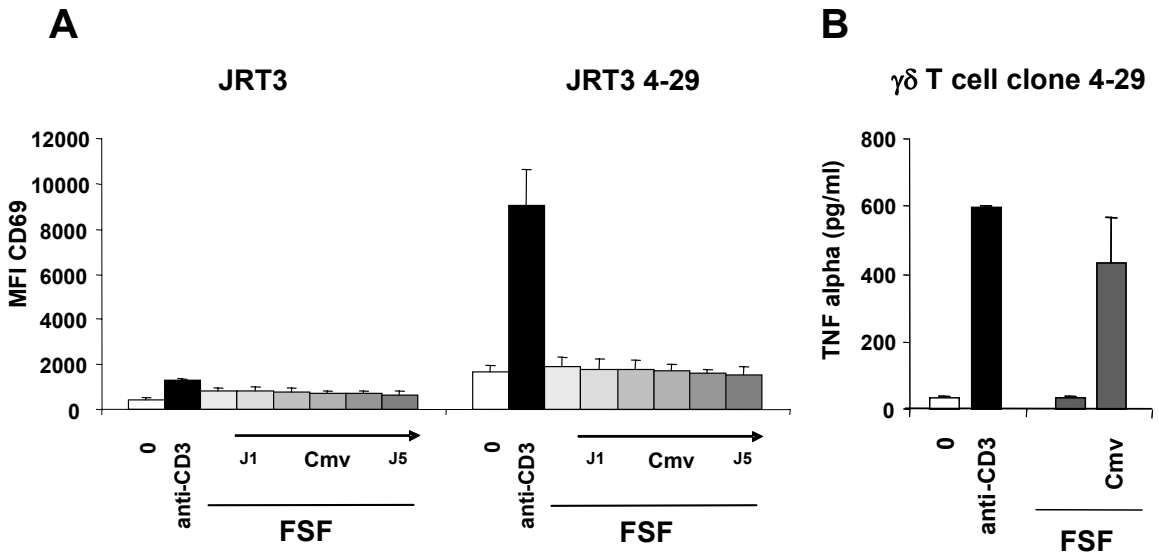
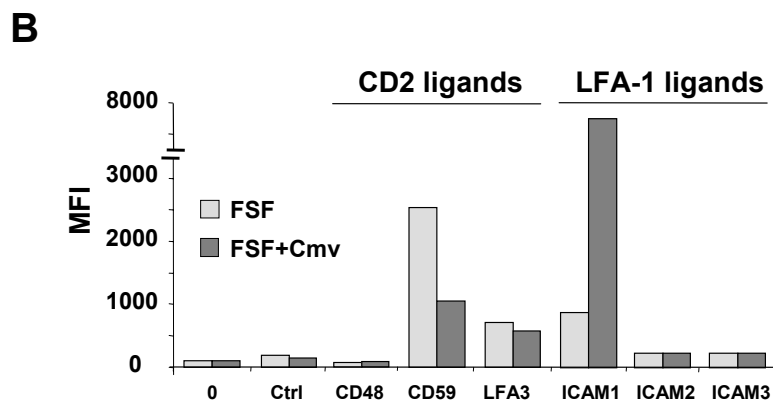
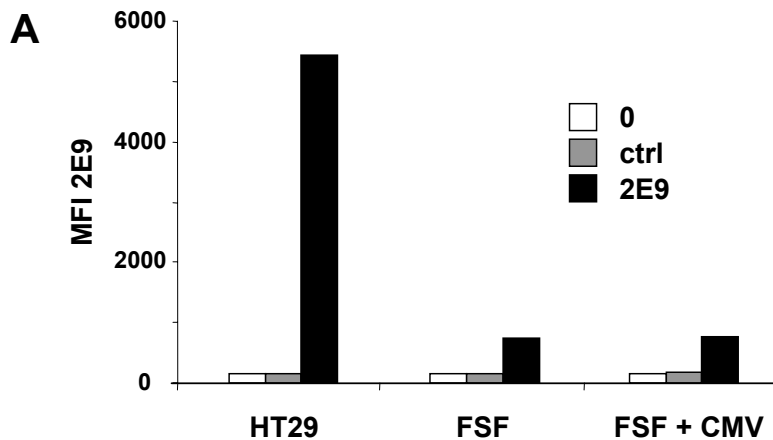


Figure 5



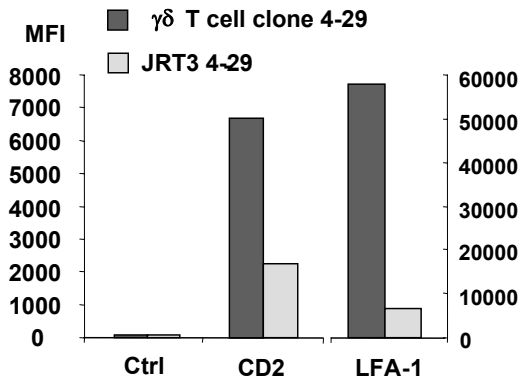
C

Cells	2E9 staining	ICAM1-2-3 staining	TNF α * (pg/ml)
HT29	++++	+	657
K562	++++	++	183
U937	++++	+++	197
U343	++++	++	148
U251	+	+	< 30
Hutu80	+	+	< 30
HUH7	+	+	< 30
A431	+	+	< 30
FSF	+	+	< 30
FSF-Cmv	+	++++	430

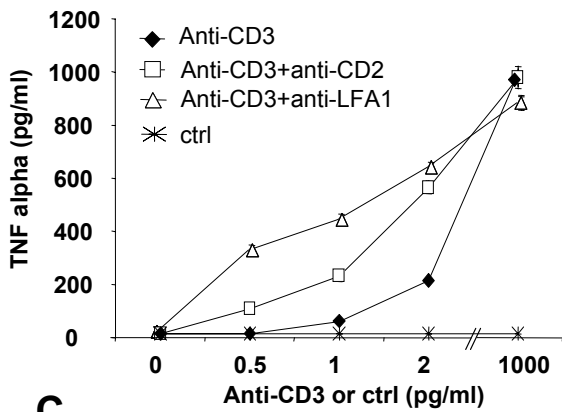
* Production by the $\gamma\delta$ T cell clone 4-29

Figure 6

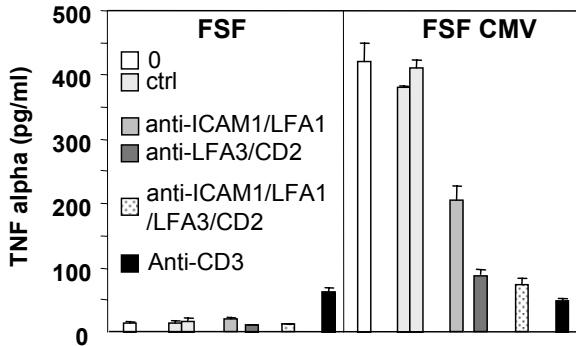
A



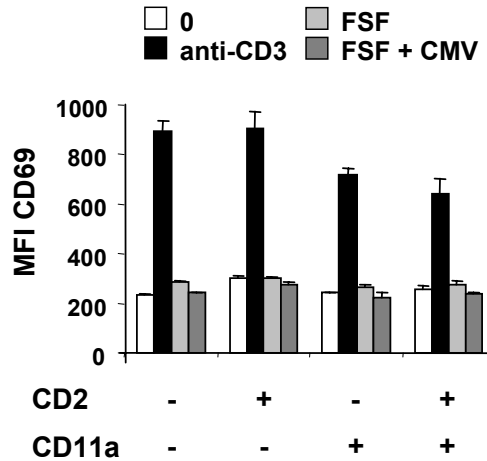
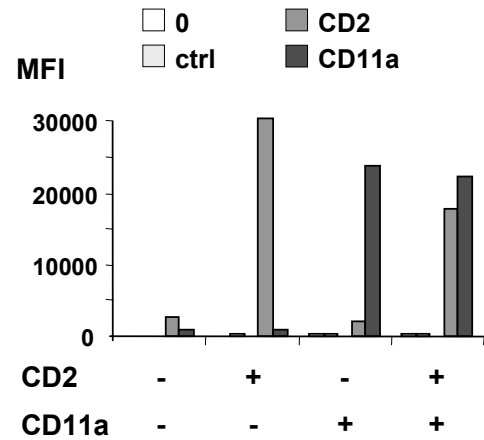
B



C



D



Article 4 : A new CD16-dependent anti-cytomegalovirus function of gamma delta T cells

Lionel Couzi, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Isabelle Garrigue, Omar Hawchar, Pierre Merville, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville

A new CD16-dependent anti-cytomegalovirus function of gamma delta T cells

**Lionel Couzi 1,2,3, Vincent Pitard 2,3, Xavier Sicard 2,3, Isabelle Garrigue 1,3, Omar
Hawchar 2,3, Pierre Merville 1,2,3, Jean-François Moreau 1,2,3, Julie Déchanet-
Merville 2,3**

1 CHU Bordeaux, Bordeaux, France

2 CNRS UMR 5164, Bordeaux, France

3 Université Bordeaux, Bordeaux, France

Address correspondence to: Julie Déchanet-Merville, UMR-CNRS 5164, Université Victor
Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux.

Tel : 33-5 57 57 14 71

Fax : 33-5 57 57 14 72

E-mail : Julie.Dechanet@u-bordeaux2.fr

Abstract:

A few years ago, we observed a significant expansion of circulating Vdelta2^{neg} gamma-delta T cells following cytomegalovirus (CMV) infection in kidney transplant recipients (KTR). *In vitro*, these cells display TCR-dependent cytotoxicity against both CMV-infected cells and carcinoma cells. *In vivo*, their expansion associates with resolution of CMV infection and with protection against cancer. In this study, an extensive phenotyping of gamma-delta T cells from KTR lymphocytes revealed that 71.9% of Vdelta2^{neg} gamma-delta T cells from CMV-infected KTR expressed high levels of CD16 (FcgammaRIIIA), when compared with only 19.8% in non infected patients. Similar results were obtained when comparing CMV-seropositive to CMV-seronegative healthy donors. CD16⁺ gamma-delta T (TEMRA phenotype) cell lines were unable to make antibody-dependant cellular cytotoxicity (ADCC) against CMV-infected cells pre-treated with anti-CMV IgGs, while they efficiently killed the Daudi lymphoma cell line and the A431 skin carcinoma cell line preincubated with rituximab or cetuximab, respectively. However, these CD16⁺ gamma-delta T cells were able to produce interferon-gamma in a CD16-dependent manner when activated by IgG-opsonised virus. This production was greatly enhanced in the presence of IL-12 and IFN-alpha, two cytokines produced during CMV infection by the dendritic cells and monocytes. The CD16-induced interferon-gamma production by gamma-delta T cells was able to inhibit CMV release by CMV-infected cells *in vitro*. These data uncover a new CD16-dependent antiviral function of gamma-delta T cells through recognition of IgG-opsonised virus.

Introduction:

$\gamma\delta$ T cells represent a minor population in the blood. However, they are normal residents in several tissues, notably epithelia where they reach 30% of T cells. In humans, 70% of $\gamma\delta$ T cells in the peripheral blood express V δ 2. V δ 2 T cells recognize small non-peptidic phosphorylated antigens derived, for example, from *Mycobacteria*^{1,2}, some biphosphonates³, alkylamines⁴, and the association of membrane F1-ATPase and apolipoprotein A-I⁵. These compounds are ubiquitous components of microorganisms, as well as of self-antigens. In contrast, most tissue $\gamma\delta$ T cells use the V δ 1 or V δ 3 chains (V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells). Until now, only two ligands have been identified: MHC class I-related chain A (MICA; a stress-induced protein expressed on epithelial cells) and CD1c that are indeed able to stimulate V δ 1 chain T cell lines and to interact with their V δ 1 TCR^{6,7}. An important feature of $\gamma\delta$ T cells is that they do not require classical MHC-presenting molecules in the antigen recognition process. It is now accepted that $\gamma\delta$ T cells play specific and non-redundant functions with those of $\alpha\beta$ T cells. They are immune effectors that have been involved in anti-viral and anti-tumor responses^{8,9}. A few years ago, we observed a marked and persistent expansion of circulating V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells following cytomegalovirus (CMV) infection in the peripheral blood of kidney transplant recipients (KTR)^{10,11}. This expansion paralleled that of CMV-specific CD8⁺ T cells. Interestingly, CMV-specific CD8⁺ T cells and V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells share a similar effector memory TEMRA phenotype (CD45RA⁺, CD27⁻)¹². *In vitro*, these unconventional T cells display a TCR-dependent cytotoxicity against both CMV-infected cells and carcinoma cells¹³. Constitutively *in vivo*, their expansion associates with resolution of CMV infection suggestive of their anti-viral function¹⁴ and with protection against cancer in kidney transplant recipients¹⁵. Recently, the strong association between CMV infection and TEMRA V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell expansion has also been confirmed in healthy volunteers¹⁶ and during the fetal life¹⁷.

The CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells display many Natural Killer (NK) receptors as CD158, CD94-NKG2C or Nkp80¹⁶. Although their role in the immune response against CMV is still unknown they usually act as activating or inhibitory receptors. Recently, up-regulation of their RNA expression has also been observed in CMV-specific CD8+ T cells¹⁸. Many other NK receptors could exist at the cell surface of CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. They could provide alternative pathways of activation to the conventional and well-described $\gamma\delta$ TCR-dependant pathway and might be involved in the anti-CMV functions of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells.

CD16 (or Fc γ RIII) is another well-known NK receptor. Fc γ RIIIA consists of a ligand-binding α -chain and a signal-transducing γ -chain dimer, which carries immunoreceptor tyrosine based activating motifs (ITAMs). The vast majority of cells that express Fc γ RIIIA belong to the innate immune system. These include monocytes/macrophages and NK cells. In addition, humans have a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked form of CD16 that is exclusively expressed by neutrophils, called Fc γ RIIIB¹⁹. CD16 is usually absent on conventional $\alpha\beta$ T cells, since it was demonstrated twenty five years ago by Lanier et al that T cells expressing CD16 comprised around two percent of the total peripheral blood lymphocytes in healthy individuals²⁰. However, the existence of $\alpha\beta$ T cells expressing constitutively the CD16 molecule (Fc γ RIIIA) has been observed in very rare few instances. Patients with chronic hepatitis C virus infection have a significant proportion (often up to 10%) of CD8+ $\alpha\beta$ T cells expressing CD16²¹ and during hyperlymphocytosis, a systemic increase in the proportion of CD16 positive cells is also observed among the $\alpha\beta$ T lymphocytes²². In the peripheral blood, the CD16+ CD3+ T cells are usually not stained with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies²⁰ and it is admitted that the CD3+ CD16+ T cells are mainly $\gamma\delta$ T cells²³. The major population of circulating $\gamma\delta$ T cells that expresses a TCR displaying the V δ 2 chain does not express constitutively CD16²⁴, except a very low population²⁵ or in very few individuals²⁶.

Actually, CD16 is only transitory inducible on V δ 2 $\gamma\delta$ T cells following TCR activation^{25, 24, 27}.

CD16 is a low-affinity Fc receptor for IgG¹⁹. It is best characterized for its role in antibody-dependant cellular cytotoxicity (ADCC) on NK cells^{28, 29}. However, CD16 could have a broader function. Serum amyloid P component (a member of the pentraxin family) binds to Fc γ RIIIB and opsonises particles for phagocytosis³⁰. Freshly isolated human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells can phagocytose *Escherichia coli* via antibody opsonization and CD16, leading to antigen processing and presentation on MHC class II³¹. In a murine model, by binding CD16, *Escherichia coli* triggers an inhibitory pathway that impairs bacterial clearance. FcRc $^{-/-}$ mice show increased survival during peritonitis, owing to markedly increased *Escherichia coli* phagocytosis and killing³².

In summary, the CD3⁺ CD16⁺ T cells are mainly $\gamma\delta$ T cells, but the $\gamma\delta$ T cell sub-population expressing this molecule is still unknown as well as its functional properties. In the present study, we have observed that high levels of CD16 expression were specifically and constitutively present on CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. Interestingly, the CD16⁺ CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells were not able to induce ADCC against CMV-infected fibroblasts using CMV hyperimmune IgGs. However, we have discovered a new CD16-dependent anti-CMV function of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells through which IgG-opsonised CMV triggers an activating signalling, leading to interferon- γ production and CMV replication inhibition in a unique cytokinic microenvironment.

Material and methods:

Healthy individuals and kidney transplant recipients. Blood samples (5ml) for serology controls were obtained from anonymous twenty eight healthy donors enrolled in the local Blood Bank cytapheresis program. After giving their informed consent, thirty-two renal

transplanted patients receiving standard immunosuppressive regimen (corticosteroids, anti-calcineurins and mycophenolate mofetil) were also included. This study was carried out on samples harvested for medical care. This study was approved by the local medical ethics committee. Blood samples were used for a flow cytometric analysis of $\gamma\delta$ T cell sub-populations and were subjected to CMV serology using specific ELISA kits (Ortho, Eurogentec or Enzygnost anti-CMV/IgG and IgM, Dade-Behring).

Flow cytometry analysis. MAbs directed against the following molecules were purchased from Beckman-Coulter: TCR-C δ , TCR-V δ 2, CD16, Fc portion of IgG (Goat anti human). MAbs directed against CD3, CD27, CD45RA, CD107a were from BD Biosciences. Rituximab and Cetuximab were kindly given by Roche and Merck serono, respectively. Anti-CMV IgGs (Cytogam®) were kindly given by CSL Behring and are IgGs pools from hyperimmune sera of CMV-infected people. Control IgG pools were from seronegative individual. Stainings were performed on PBMC or V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell sub-populations and analyzed on a FACScanto Cytometer (BD Biosciences). At least 10000 T lymphocytes were analyzed for 6-color stainings.

Generation of polyclonal $\gamma\delta$ T cell lines. Initially, V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell sub-populations were sorted from blood donors' PBMC using a combination of anti-CD3, anti-V δ 2, anti-TCR-C δ , and antiCD16 mAbs, using a FACSaria cell sorter (BD Biosciences). CD16 positive et negative V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell sub-populations were further expanded in culture RPMI medium supplemented with 10% human serum, 1000 U/ml rIL-2 (Chiron), 1 μ g/ml leucohemaglutinine (Sigma) and irradiated allogeneic PBMC (35 Gy). After one month of culture, T cell lines were phenotyped by flow cytometry and used in the experiments. Recently we used a new technique for generating CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines (Howchar, under

submission). Briefly, they were generated by adding 1000 U/ml rIL-2 and 10ng/ml rIL-15 (Peprotech) to blood donors' PBMC. After 3 weeks in culture, the CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell sub-populations were sorted using the FACS Aria cell sorter and used subsequently in the experiments.

CD107 cytotoxicity assay. The cytotoxic potential of $\gamma\delta$ T cell was measured by the flow cytometric CD107a assay, as previously described ¹⁶. Briefly, 6h cultures of PBMC with activating mAbs coated over-night (isotype control, anti-CD16, anti-CD3 all from Biosciences), were performed in the presence of anti-CD107a mAb (H4A3, BD Biosciences). Brefeldin A (Sigma) was added in the co-culture for the last 5 hours, then cells were harvested and surface stained with a combination of anti-CD3, anti-V δ 2, anti- TCR-C δ mAbs, and analyzed by flow cytometry.

Cell cytotoxicity assays. Cytolytic activity of $\gamma\delta$ T cells was measured by a standard ⁵¹Cr-release assay ¹³. Tumor cells (Daudi and A431 cell lines purchased at ATCC) and CMV-infected fibroblasts (FSF) were labeled with ⁵¹Cr (1.85 MBq/10⁶ cells), for 1 h at 37°C, then 3,000 cells/well were incubated in triplicate with $\gamma\delta$ T cell clones at the indicated effector/target ratios. After 4 h at 37°C, ⁵¹Cr released in supernatant was measured. The percent specific lysis was calculated as: [(experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release)] x 100. The spontaneous ⁵¹Cr re-lease from target cells in medium alone was always <15% of the control maximal ⁵¹Cr release obtained with 1% Triton X-100.

Detection of interferon- γ production

$\gamma\delta$ T cell lines were incubated for 24 hours at 37°C with or without activating mAbs coated over night at 4°C and recombinant cytokines. rIL-12 and interferon- α were purchased at (Peprotech). Interferon- γ released into the supernatant was quantified by ELISA according to the manufacturer's recommendations (Bender Medsystems, Austria).

IgG-opsonised CMV

IgG-opsonised CMV were generated by adding CMV (TB40/E) with 500 μ g/ml of anti-CMV specific IgG. After 20 minutes at room temperature, IgG-opsonised CMV were used in experiments of binding on $\gamma\delta$ T cell lines where they were stained with a goat anti-human mAb, and activation.

Quantitative CMV PCR

Quantification of the CMV replication in the supernatants of FSF was performed using a real-time quantitative CMV PCR, as previously described³³.

Statistical analysis. Data are expressed as medians (range). The statistical differences between groups of CMV-seronegative and CMV-seropositive donors were tested with the unpaired Mann-Whitney U test using the Statview software (Abacus concepts, Berkeley). Differences were considered as significant when p was <0.05.

Results:

High expression of CD16 on CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells

Using multicolour flow cytometry, an extensive phenotyping of $\gamma\delta$ T cells was performed in the blood from 32 KTR and 28 healthy volunteers divided in CMV-infected or uninfected

individuals according to the presence or absence of anti-CMV specific IgGs in their serum. As previously described, we observed that both CMV-infected KTR and healthy volunteers had more V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells than non CMV-infected KTR and healthy volunteers (median: 3.2% vs 0.4%, p=0.0002 and 2% vs 0.5%, p=0.002, respectively) (Figure 1A). V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells of CMV-infected patients displayed mainly the effector memory phenotype CD45RA⁺ CD27⁻ (median for KTR: 60.1% vs 4%, p=0.0001 and median for healthy volunteers: 81.4% vs 10.8%, p=0.0001). Finally, we found that V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells from CMV-infected individuals expressed high amount of CD16, when compared with non CMV-infected individuals (median for KTR: 72.3% vs 19.5%, p=0.0003 and median for healthy volunteers: 47.2% vs 17.9%, p=0.01, respectively). Neither CD32, nor CD64 were observed at a significant level at the cell surface of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells (data not shown). Pre-treatment with phosphatidylinositol-specific phospholipase C did not decrease the strong CD16 staining on V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells (while decreasing the staining of the control GPI-linked CD59), demonstrating that CD16 was not the Fc γ RIIIB GPI-linked receptor on these cells (data not shown). Only 30% of V δ 2^{positive} $\gamma\delta$ T cells of both KTR and healthy volunteers were CD16 positive independently of the CMV serological status (data not shown).

We next assessed whether V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells could be activated via CD16. Direct ex-vivo activation of PBMC from 6 CMV-infected KTR with an agonist anti-CD16 monoclonal antibody demonstrated that V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells displayed a CD107a expression 2 or 3 times greater than when incubated with a control mAb (Figure 1B and Table 1).

Hyperimmune IgGs of CMV-infected people do not allow antibody-dependent cytotoxicity of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells against CMV-infected fibroblasts

In order to study the functional properties of CD16 on V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells we generated CD16 positive and negative V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines from a CMV-infected patient as described in

materials and methods. When activated by an agonist anti-CD16 mAb, the CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line expressed CD107a at a similar level than when activated through CD3. It suggested that CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells could be cytotoxic upon CD16-dependant activation. As a control, the CD16 negative V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line was not activated by an agonist anti-CD16 mAb (Figure 2A).

CD16 is well-known to mediate antibody-dependant cellular cytotoxicity (ADCC), especially in Natural Killer cells. To test this function on V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells, CMV-infected fibroblasts (FSF) were pre-incubated with polyclonal anti-CMV IgG from hyperimmune sera of CMV-infected people (Cytogam). Using flow cytometry, we observed that CMV-infected FSF, but not uninfected fibroblasts, were able to specifically bind anti-CMV IgG, but not control IgGs, as revealed with a fluorescent goat anti-human antibody (Figure 2B, left panel). It is noteworthy that the binding was low and required high amounts of IgGs (at least 0.3 mg/ml) suggesting that the proportion of IgGs directed against CMV-infected fibroblasts is very low among the antibodies produced during the immune response to CMV, which mainly recognize the free virus ³⁴. By comparison, the labelling of tumour cell lines (such as the Daudi lymphoma cell line and the A431 skin carcinoma cell line) with specific human monoclonal antibodies (anti-CD20 Rituximab and anti-EGFR Cetuximab, respectively) was much stronger (Figure 2B, right panel).

In line with this, when testing the ability of CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells to kill CMV-infected cells pre-incubated with anti-CMV IgGs, no ADCC could be observed most probably because the opsonization of the infected cells with the anti-CMV IgG is too low (Figure 2C, left panel). In contrast, Daudi and A431 cell lines were efficiently killed by CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines, but not by CD16-negative V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells (data not shown), only when they were pre-incubated with the specific human mAbs (Figure 2C, middle and right panel). Similar results were obtained with the SKBR3 breast cancer cell line pre-treated with

the anti-HER-2 trastuzumab (data not shown). Altogether these results indicate that CD16+ V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells are able to perform ADCC, but that this mechanism is most probably not involved in their anti-viral functions.

CD16-dependent production of high levels of interferon- γ by V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell

In an attempt to find another function of CD16 in the anti-CMV response elaborated by V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells, we looked at whether CD16-dependent activation of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells allowed the production of interferon- γ , a potent anti-viral cytokine. When activated by an agonist anti-CD16 mAb alone, no significant interferon- γ production was observed (Figure 3A).

In NK cells, the dual recruitment of CD16 and the IL-12 receptor to lipid raft microdomains allows for enhanced activation of downstream signaling events that lead to interferon- γ production^{35, 36}. Moreover IL-12 is produced by dendritic cells and plays an important role during CMV infection^{37, 38, 39}. We therefore tested the effect of IL12 and anti-CD16 combination on V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells and observed that the CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line produced high levels of interferon- γ when activated with an agonist anti-CD16 mAb and increasing doses of rIL-12 (Figure 3A).

Monocytes are the predominant cells infected during CMV infection⁴⁰ and they produce high amounts of interferon- α upon infection⁴¹. We then tested whether interferon- α could act on V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell as IL-12, when coactivated by an agonist anti-CD16 mAb. Similarly, we observed that the CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line produced high levels of interferon- γ in culture with both an agonist anti-CD16 mAb and interferon- α (Figure 3B). Finally, the highest interferon- γ production by the CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line was observed upon CD16-dependant activation in presence of both cytokines interferon- α and rIL-12 (Figure

3C). This phenomenon was confirmed with seven others CD16 positive V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell lines generated from seven different kidney transplant recipients (Figure 3D).

CD16-dependent binding of IgG-opsonised CMV by V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells

Given the ability of CD16 to stimulate interferon- γ production suggesting it is involved in the anti-viral functions of V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells, we next speculated that CD16 could bind IgG-opsonised CMV. To test this hypothesis, we incubated both CD16 positive and CD16-negative V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell lines with CMV alone, anti-CMV specific IgG alone or mix of CMV and anti-CMV specific IgGs (IgG-opsonised CMV). We next detected IgG-opsonised CMV binding on the cells with a goat anti-human mAb. Interestingly, the CD16 positive V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell line, but not the CD16 negative V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell line, was able to bind IgG-opsonised CMV (Figure 4). This binding was really mediated by CD16 since this binding was abrogated by a blocking anti-CD16 mAb. This binding was not observed when CMV was mixed with control pools of IgGs.

High levels of interferon- γ production by V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell in culture with IgG-opsonised CMV, interferon- α and IL-12

We next wondered whether the CD16 positive V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells could be activated by IgG-opsonised CMV. We first observed that the CD16 positive V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells produced low levels of interferon- γ in culture with IgG-opsonised CMV for 24 hours while no production was observed with CMV alone or anti-CMV specific IgG alone. This interferon- γ production was abrogated by a blocking anti-CD16 mAb (Figure 5A) and was not detected when using control IgG pools. Interestingly, the CD16 positive V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells produced higher levels of interferon- γ when IgG-opsonised CMV were combined with IL-12 (Figure 5B), interferon-

α (Figure 5C) or both cytokines (Figure 5D). No CD16 production was observed with CD16 negative V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells (data not shown). Taken together, these data demonstrate that the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells can secrete large amount of interferon- γ when they bind IgG-opsonised CMV through CD16 in the presence of interferon- α and IL-12, two cytokines produced during CMV infection.

Interferon- γ produced by CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell inhibits CMV replication

We next seek to determine whether interferon- γ produced by CD16-activated V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells was able to inhibit CMV replication *in vitro*. To this purpose, the supernatant of activated V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells was added to fibroblasts at the onset of CMV-infection and its effect on the release of new virions was evaluated after 4 days of culture. As the presence of anti-CMV IgGs in the IgG-opsonised CMV prevented the infection of fibroblasts, the anti-CD16 agonist mAb was used instead of IgG-opsonised CMV to activate V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line was then incubated with a control mAb or the agonist anti-CD16 mAb for 24 hour with or without rIL-12. Experiment with interferon- α , was not performed because this cytokine has a potent anti-CMV activity that could mask the effect of interferon- γ . Then, the supernatant was harvested and added on CMV-infected FSF. After 4 days in cultures, only supernatant of the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line activated with CD16 and IL-12 activation decreased the production of new virions as efficiently as 10UI/ml of interferon- γ (Figure 6). This inhibitory effect was abrogated by a blocking anti-interferon- γ mAb, indicating the crucial role of this cytokine on inhibition of CMV replication.

Discussion:

Since many years, it was known that $\gamma\delta$ T cells express the molecule CD16 more frequently than $\alpha\beta$ T cells. However, the $\gamma\delta$ T cell subset expressing the CD16 was not identified as well as the situation that allowed for the amplification of these cells in the peripheral blood. In this study we have demonstrated that the CMV-induced $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells over-expressed this molecule in KTR and in healthy individuals, demonstrating a strong link between CMV infection and CD16 expression on these cells. Although these CMV-induced $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells were unable to make ADCC against CMV-infected cells pre-treated with anti-CMV IgGs, they were able to recognize IgG-opsonised CMV in a CD16-dependent manner and to be activated by this way to produce interferon- γ . To our knowledge, this is the first observation of the recognition of IgG-opsonised virus by $\gamma\delta$ T cells and of an activation of these cells mediated by this process. The production of interferon- γ was greatly enhanced in the presence of rIL-12 and interferon- α , two cytokines produced during CMV infection by the dendritic cells and monocytes. Finally, we observed that the CD16-induced interferon- γ production by $\gamma\delta$ T cells was able to inhibit CMV release by CMV-infected cells *in vitro*. We have then demonstrated here a new CD16-dependent antiviral function of $\gamma\delta$ T cells through recognition of IgG-opsonised virus.

We already knew that $CD45RA^+ CD27^- V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells represent one of the cell signatures of CMV infection in the peripheral blood^{16, 12}, like the $CD45RA^+ CD27^- CD8^+$ T cells⁴² and the $CD27^- CD28^- CD4^+$ T cells previously described by R Van Lier's group⁴³. The extensive phenotyping of these cells allowed us to discover that CD16 is also a good marker intimately linked with the TEMRA phenotype ($CD45RA^+ CD27^-$)²⁶ and very specifically associated to a past CMV infection. CD16 expression and distribution are however limited to the $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells because it is not present on CMV-specific $CD8^+$ T cells detected with an HLA tetramer loaded with a CMV peptide nor on $V\delta 2^{\text{pos}}$ $\gamma\delta$ T cells (data not shown). We

observed that V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells express the Fc γ RIIA receptor like in NK cells, receptor. Further studies are required to determine the mechanisms related to CMV-infection that are able to induce CD16 expression at the cell surface of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells.

CD16 is best characterized for its role in ADCC on NK cells. In mouse, ADCC against CMV-infected cells can be implemented by the NK cells⁴⁴. In humans, an ADCC by NK cells directed against CMV-infected FSF has been demonstrated *in vitro* but the cytotoxicity was modest and required the presence of IL-2 or IL-15^{45, 46}. In the present study, CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells efficiently killed only the Daudi lymphoma cell line and the A431 skin carcinoma cell line preincubated with rituximab or cetuximab, respectively, but not CMV-infected FSFs. This capability to induce ADCC *in vitro* could confer to these cells two interesting roles *in vivo*. First, CMV-induced CD16+ V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells could be involved in the anti-tumor effect of these therapeutic monoclonal antibodies (as cetuximab, trastuzumab, or rituximab) and thus be a good prognostic factor for the response to such treatments in different cancers. This property could enhance the previously demonstrated anti-tumor role of CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T¹⁵. Secondly, in the context of transplantation, CMV-induced CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells could induce ADCC against allogenic cells recognized by donor-specific anti-HLA antibodies. This mechanism could explain the well-known but poorly understood relationship between CMV infection, acute rejection and poor allograft outcome^{47, 48, 49, 50, 51}. These two issues need to be addressed in further studies.

In striking contrast with their high cytotoxic potential, CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells are unable to kill FSF pre-treated with anti-CMV IgGs. The most plausible explanation is that the binding of anti-CMV IgGs on CMV-infected fibroblasts is too low. During ADCC, the observed lysis of the target cell line increases with increasing binding and concentration of the antibody directed against this cell line, then reaches a plateau at high concentrations²⁸. In our experiments we observed that the binding of cetuximab and rituximab on tumor cell lines was

more than 10 fold higher than the binding of CMV-specific IgGs on CMV-infected cells. It is then probably that the binding of CMV-specific IgGs on CMV-infected cells is not sufficient to activate via the CD16 the effectors cells. Another explanation for the absence of ADCC on CMV-infected FSF could be that they are resistant to the ADCC exerted by the CD16+ V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. It has been previously demonstrated that CD4+ T cell cytotoxicity against CMV peptide-pulsed targets was inhibited by CMV infection, despite a sustained degranulation by CD4+ T cells and without alteration of the antigen processing ⁵². A resistance to apoptosis induced by CMV could be implicated ⁵³. To discriminate between a resistance to the apoptosis and an insufficient binding of CMV-specific IgGs, the same experiment should be performed with a humanized IgG that would have a binding on CMV-infected cells as high as rituximab on the Daudi cell line. We tried with anti-class I HLA antibodies coming from hyperimmunized patients, but the decrease of class I HLA molecule expression by CMV prevented the ADCC to occur.

Fc γ RIIIA is one of the low-affinity receptors for IgG Fc. The *FCGR3A* gene, which encodes Fc γ RIIIA, displays a functional allelic dimorphism generating allotypes with either a phenylalanine (F) or a valine (V) residue at amino acid position 158 ^{54, 55}. This residue directly interacts with the lower hinge region of IgG1 ⁵⁶. Monomeric IgG1, IgG2 and IgG4 do not bind to neither Fc γ RIIIA-158V nor Fc γ RIIIA-158F, while monomeric IgG3 bind to both. At high concentration, F(ab')₂-aggregated human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 (that mimic IgG immune complexes) all bind to Fc γ RIIIA-158V. The V158F mutation in Fc γ RIIIA decreases the binding of IgG1 and abrogates the binding of IgG2 and IgG4 ⁵⁷. The purified anti-CMV IgGs used in this study (Cytogam®) are derived from pooled adult human plasma selected for high titers of antibody for Cytomegalovirus and mainly contain IgG1. As expected, they do not bind to Fc γ RIIIA in the absence of CMV, whereas when IgG-opsonised CMV are allowed to be formed they bind specifically to this receptor. The association

between *FCGR3A* genotype and clinical response to rituximab has been observed in previously untreated follicular NHL patients with low tumor burden⁵⁸, in relapsed follicular NHL patients⁵⁹ and in Waldenstrom's macroglobulinemia patients⁶⁰. Indeed, VV patients had a higher probability of experiencing a clinical response compared with F carriers. In the future, we will test whether a similar association exists between *FCGR3A* genotype and the speed of resolution of CMV infection in individuals.

A very important point to note is that interferon- γ production by V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells seems highly regulated as it requires several actors that must be present at a same place in the same time. Late after a CMV infection when the virus has been controlled, both specific anti-CMV IgGs and CD16+ V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells are found in the blood of healthy individuals or kidney transplant recipients. If we translate our in vitro results to this in vivo situation, no interferon- γ production should be observed in this condition, in the absence of virus. During a reactivation, CMV spreads again in the plasma, and CMV-IgGs immune complexes can be generated. This situation should still not be sufficient to induce large amounts of interferon- γ by CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells unless IL-12 and interferon- α are present in sufficient amount. This additional control is exerted by at least two cytokines largely produced during CMV infection by monocytes/macrophages^{40, 41} and dendritic cells^{37, 38}. This might avoid excessive interferon- γ productions that could favor auto-immune manifestations. Another explanation could be the prevention of a systemic production of interferon- γ . This anti-viral function could be rather a local action restricted to specific tissues infiltrated by V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells, as epithelium, where these cells could be armed in a local environment associating CMV, IgGs, interferon- α and IL-12.

In summary in the present study, we have observed that high levels of CD16 expression were specifically and constitutively present on CMV-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. These data uncover a new CD16-dependent antiviral function of $\gamma\delta$ T cells through the recognition of IgG-

opsonised CMV in a specific cytokinic environment. This late action of circulating terminally differentiated $\gamma\delta$ T cells (after the production of specific antibodies) could be added to their more recognized role of early effectors involved in the surveillance of mucosa. This function could be particularly important to control CMV-reactivation in tissue or super-infections with new CMV strains.

Acknowledgments:

We thank Catherine Rio and the nurses of the Department of Nephrology for their precious help.

References:

1. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*. 1994;264:267-270.
2. Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*. 1995;375:155-158.
3. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*. 2000;96:384-392.
4. Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity*. 1999;11:57-65.
5. Scotet E, Martinez LO, Grant E, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity*. 2005;22:71-80.
6. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*. 1998;279:1737-1740.
7. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med*. 2000;191:937-948.
8. Poccia F, Agrati C, Martini F, Capobianchi MR, Wallace M, Malkovsky M. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect*. 2005;7:518-528.
9. Kabelitz D, Wesch D, He W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res*. 2007;67:5-8.

10. Dechanet J, Merville P, Berge F, et al. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis.* 1999;179:1-8.
11. Dechanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest.* 1999;103:1437-1449.
12. Couzi L, Pitard V, Netzer S, et al. Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis.* 2009;200:1415-1424.
13. Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V $\{\delta\}$ ²(neg) $\{\gamma\}$ $\{\delta\}$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med.* 2005;201:1567-1578.
14. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis.* 2001;184:533-541.
15. Couzi L, Levaillant Y, Jamaï A, et al. Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*;21:181-188.
16. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, et al. Long term expansion of effector/memory V $\{\delta\}$ ²neg $\{\gamma\}$ $\{\delta\}$ T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood.* 2008.
17. Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, et al. Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med*;207:807-821.
18. van Stijn A, Rowshani AT, Yong SL, et al. Human Cytomegalovirus Infection Induces a Rapid and Sustained Change in the Expression of NK Cell Receptors on CD8⁺ T Cells. *J Immunol.* 2008;180:4550-4560.

19. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:34-47.
20. Lanier LL, Kipps TJ, Phillips JH. Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3⁺ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J Exp Med.* 1985;162:2089-2106.
21. Bjorkstrom NK, Gonzalez VD, Malmberg KJ, et al. Elevated numbers of Fc gamma RIIIA⁺ (CD16⁺) effector CD8 T cells with NK cell-like function in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2008;181:4219-4228.
22. Clemenceau B, Vivien R, Berthome M, et al. Effector memory alphaβ T lymphocytes can express FcγRIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol.* 2008;180:5327-5334.
23. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med.* 1989;169:1277-1294.
24. Tokuyama H, Hagi T, Mattarollo SR, et al. Vγ9 Vδ2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. *Int J Cancer.* 2008;122:2526-2534.
25. Lafont V, Liautard J, Liautard JP, Favero J. Production of TNF-α by human Vγ9Vδ2 T cells via engagement of FcγRIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol.* 2001;166:7190-7199.
26. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, et al. FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood.* 2004;104:1801-1807.

27. Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, et al. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood*. 2009;113:4875-4884.
28. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 2004;64:4664-4669.
29. Clemenceau B, Congy-Jolivet N, Gallot G, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood*. 2006;107:4669-4677.
30. Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW. Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol*. 2001;166:6735-6741.
31. Wu Y, Wu W, Wong WM, et al. Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J Immunol*. 2009;183:5622-5629.
32. Pinheiro da Silva F, Aloulou M, Skurnik D, et al. CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat Med*. 2007;13:1368-1374.
33. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2008;46:493-498.
34. Gerna G, Sarasini A, Patrone M, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol*. 2008;89:853-865.
35. Parihar R, Dierksheide J, Hu Y, Carson WE. IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *J Clin Invest*. 2002;110:983-992.

36. Kondadasula SV, Roda JM, Parihar R, et al. Colocalization of the IL-12 receptor and FcγRIIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon-gamma. *Blood*. 2008;111:4173-4183.
37. Renneson J, Dutta B, Goriely S, et al. IL-12 and type I IFN response of neonatal myeloid DC to human CMV infection. *Eur J Immunol*. 2009;39:2789-2799.
38. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med*. 2002;195:517-528.
39. Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, et al. Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation*. 2008;85:1406-1411.
40. Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol*. 2004;78:4444-4453.
41. Chan G, Bivins-Smith ER, Smith MS, Smith PM, Yurochko AD. Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage. *J Immunol*. 2008;181:698-711.
42. Kuijpers TW, Vossen MT, Gent MR, et al. Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol*. 2003;170:4342-4348.
43. van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Vossen MT, et al. Emergence of a CD4+CD28-granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol*. 2004;173:1834-1841.

44. Quinnan GV, Manischewitz JE. The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med.* 1979;150:1549-1554.
45. Lang P, Griesinger A, Hamprecht K, et al. Antiviral activity against CMV-infected fibroblasts in pediatric patients transplanted with CD34(+)-selected allografts from alternative donors. *Hum Immunol.* 2004;65:423-431.
46. Forthal DN, Phan T, Landucci G. Antibody inhibition of cytomegalovirus: the role of natural killer and macrophage effector cells. *Transpl Infect Dis.* 2001;3 Suppl 2:31-34.
47. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant.* 2002;2:850-856.
48. Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, Matas AJ. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1999;68:1879-1883.
49. Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsch JD. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation.* 2004;78:1036-1041.
50. Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Treska V. Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation.* 2009;87:436-444.
51. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in Long-Term Renal Graft Survival due to CMV Prophylaxis with Oral Ganciclovir: Results of a Randomized Clinical Trial. *Am J Transplant.* 2008.

52. Delmas S, Brousset P, Clement D, Le Roy E, Davignon JL. Anti-IE1 CD4+ T-cell clones kill peptide-pulsed, but not human cytomegalovirus-infected, target cells. *J Gen Virol.* 2007;88:2441-2449.
53. Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med.* 2006;259:219-246.
54. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 1997;90:1109-1114.
55. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al. A novel polymorphism of Fc gammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997;100:1059-1070.
56. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature.* 2000;406:267-273.
57. Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 2009;113:3716-3725.
58. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gammaRIIIa gene. *Blood.* 2002;99:754-758.
59. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2003;21:3940-3947.

60. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, et al. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Oncol.* 2005;23:474-481.

Figures:

Figure 1

Figure 1A: Using multicolour flow cytometry, an extensive phenotyping of $\gamma\delta$ T cells was performed in the blood from 32 KTR and 28 healthy volunteers divided in CMV-infected or uninfected individuals according to the presence or absence of anti-CMV specific IgGs in their serum. Data are expressed as medians (range). At least 10000 T lymphocytes were analyzed for 6-color stainings.

Figure 2B: Direct ex-vivo activation of PBMC from a representative CMV-infected KTR with an agonist anti-CD16 monoclonal antibody. The cytotoxic potential of $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell was measured by the flow cytometric CD107a assay.

Figure 2

Figure 2A: CD16 positive and negative $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell lines from a CMV-infected patient were generated and activated by an agonist anti-CD16 mAb and/or an anti-CD3 mAb. The cytotoxic potential of $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell was measured by the flow cytometric CD107a assay.

Figure 2B: Using flow cytometry, we analyzed whether CMV-infected FSF, uninfected fibroblasts, the Daudi lymphoma cell line and the A431 skin carcinoma cell line were able to specifically bind anti-CMV IgG, control IgGs, specific human monoclonal antibodies (anti-CD20 Rituximab and anti-EGFR Cetuximab), respectively. The binding of specific antibody was revealed with a fluorescent goat anti-human antibody.

Figure 2C: Tumor cells (Daudi and A431 cell lines) and CMV-infected fibroblasts (FSF) were labeled with ^{51}Cr . Next, CMV-infected FSF were pre-incubated with polyclonal anti-CMV IgG from hyperimmune sera of CMV-infected people. Daudi and A431 cell lines were pre-incubated with the specific human mAbs (anti-CD20 Rituximab and anti-EGFR Cetuximab,

respectively). Cytolytic activity of $\gamma\delta$ T cells was measured after 4 h at 37°C, by analysing the 51Cr released in the supernatant.

Figure 3

Figure 3A, B, C: A representative CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines was incubated for 24 hours at 37°C with or without activating anti-CD16 mAb coated over night at 4°C and recombinant cytokines (rIL-12 and interferon- α). Interferon- γ released into the supernatant was quantified by ELISA.

Figure 3D:

Seven CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines were generated from seven different kidney transplant recipients. They were incubated for 24 hours at 37°C with or without activating anti-CD16 mAb coated over night at 4°C and recombinant cytokines (rIL-12 and interferon- α).

Figure 4

IgG-opsonised CMV were generated by adding CMV with an anti-CMV specific IgG. After 20 minutes at room temperature, IgG-opsonised CMV were used in experiments of binding. We incubated both CD16 positive and CD16-negative V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines with CMV alone, anti-CMV specific IgG alone or IgG-opsonised CMV. Blocking anti-CD16 or control mAbs were used in certain condition. We next detected IgG-opsonised CMV binding on the cells with a fluorescent goat anti-human mAb by flow cytometry.

Figure 5

IgG-opsonised CMV were generated by adding CMV with an anti-CMV specific IgG. A representative CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines was incubated for 24 hours at 37°C with

or without IgG-opsonised CMV and recombinant cytokines (Figure 5A: no cytokines, Figure 5B: rIL-12, Figure 5C: interferon- α , Figure 5D: rIL-12 and interferon- α). Interferon- γ released into the supernatant was quantified by ELISA.

Figure 6:

A representative CD16 positive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell line was incubated with a control mAb or the agonist anti-CD16 mAb for 24 hour with or without rIL-12. Then, the supernatant was harvested and added on CMV-infected fibroblasts (FSFs). As control, 10UI/ml of recombinant interferon- γ was added on CMV-infected FSFs. In order to demonstrate the specific anti-viral function of interferon- γ (IFN- γ), we used a blocking anti-interferon- γ (IFN- γ) mAb. After 4 days in cultures, quantification of the CMV replication in the supernatants of FSFs was performed using a real-time quantitative CMV Polymerase Chain Reaction.

Figure 1

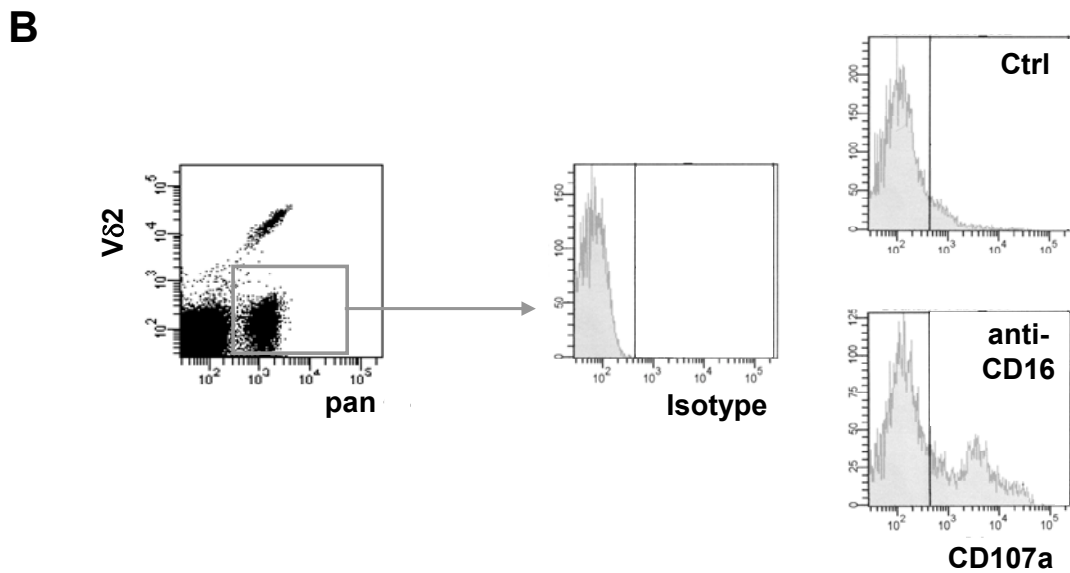
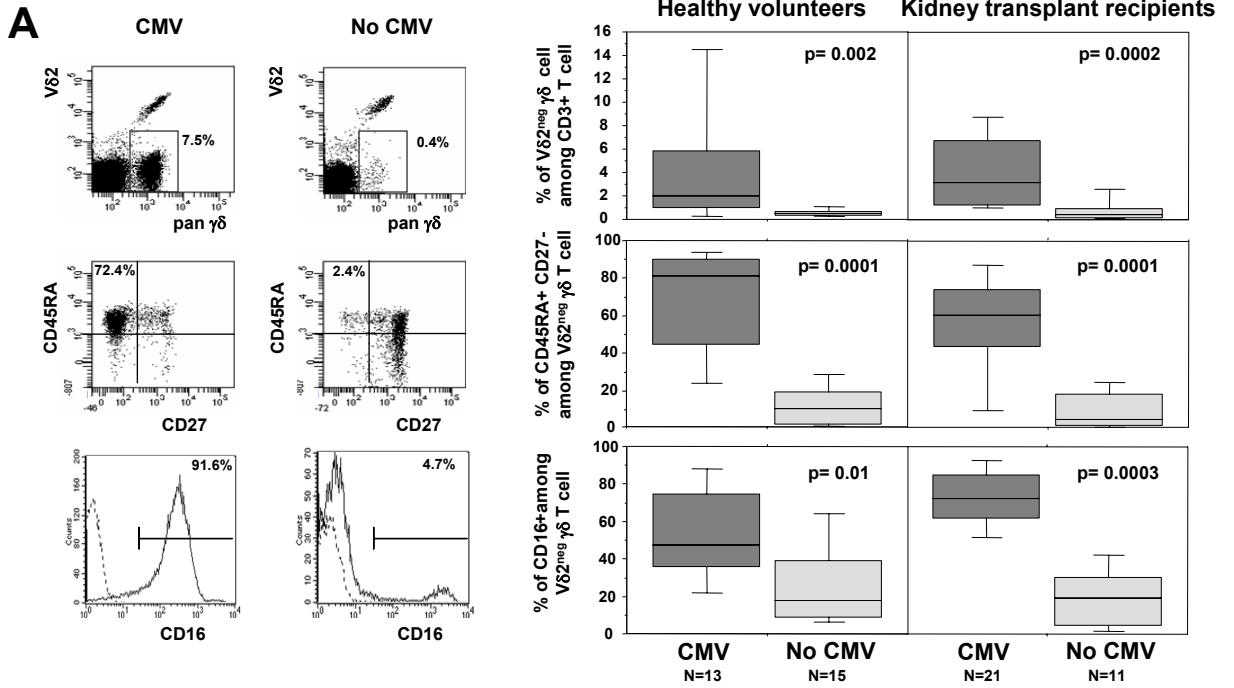


Table 1

% of CD107a positive cells among V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells

%	Ctrl mAb	Agonist anti-CD16 mAb
P1	9	31
P2	5,3	10,2
P3	3,8	12,1
P4	5,4	9
P5	9	29,4
P6	14,9	25,5

Figure 2

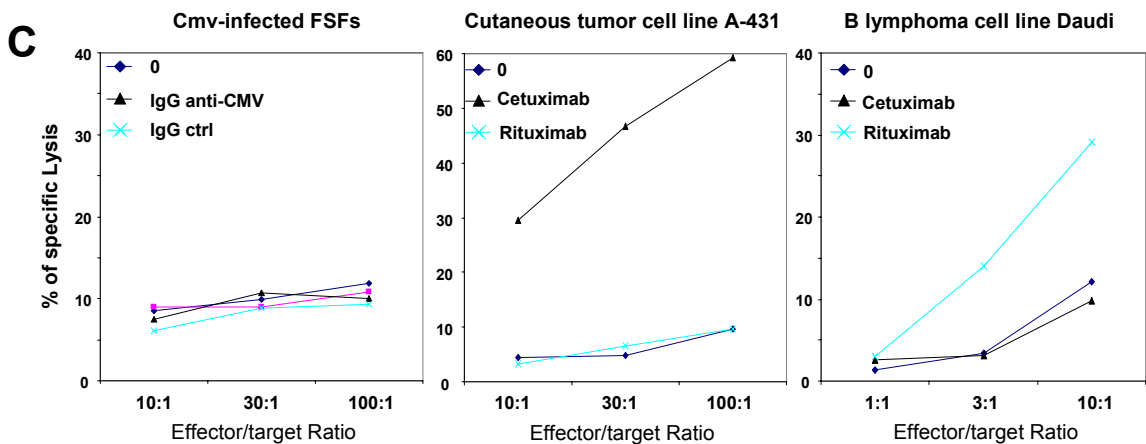
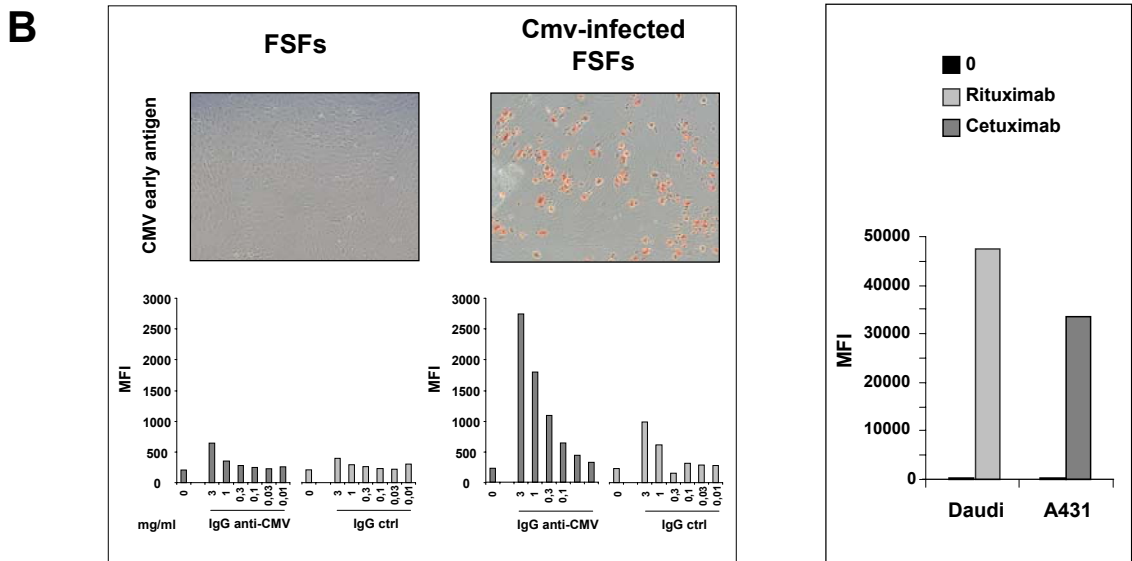
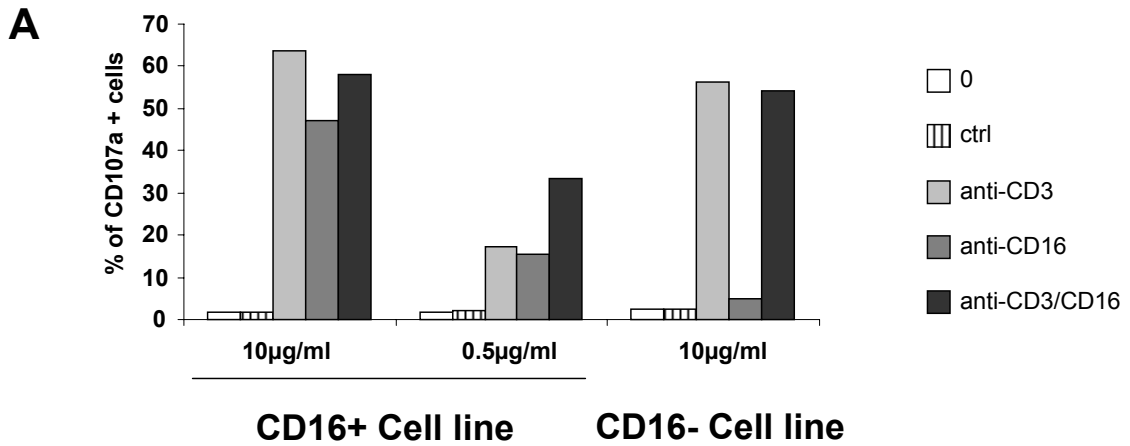


Figure 3

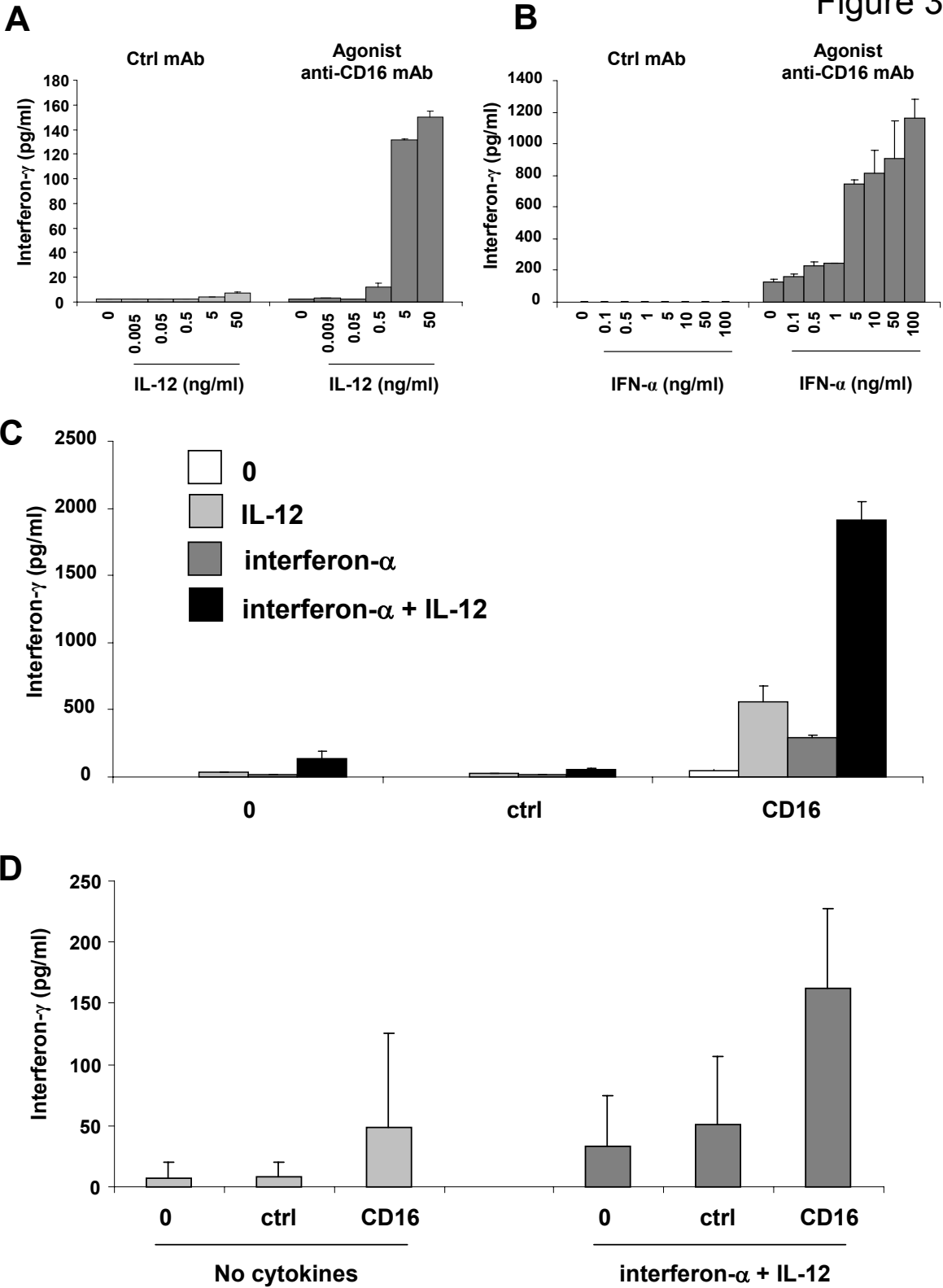
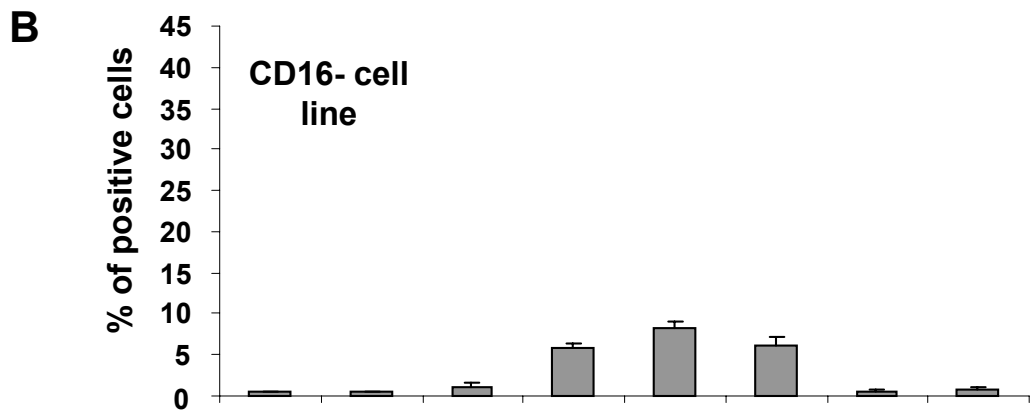
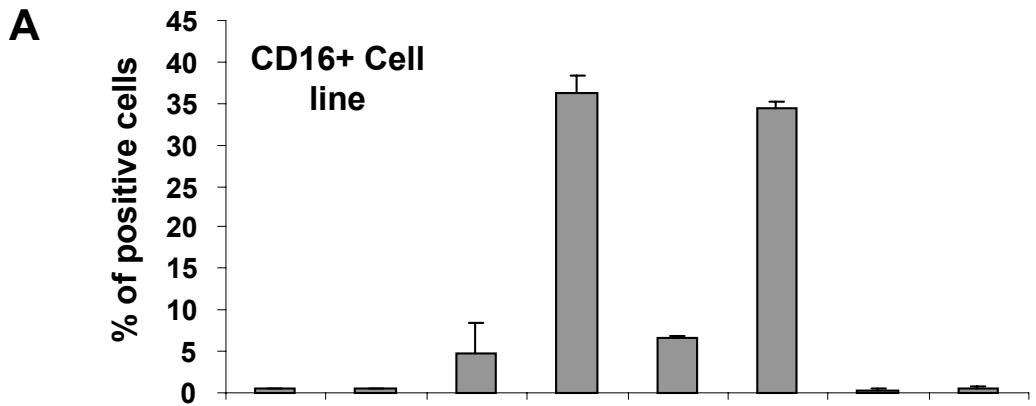


Figure 4



Cmv	-	+	-	+	+	+	-	+
IgG anti-Cmv	-	-	+	+	+	+	-	-
IgG ctrl	-	-	-	-	-	-	+	+
Anti-CD16 mAb	-	-	-	-	+	-	-	-
Ctrl mAb	-	-	-	-	-	+	-	-

Figure 5

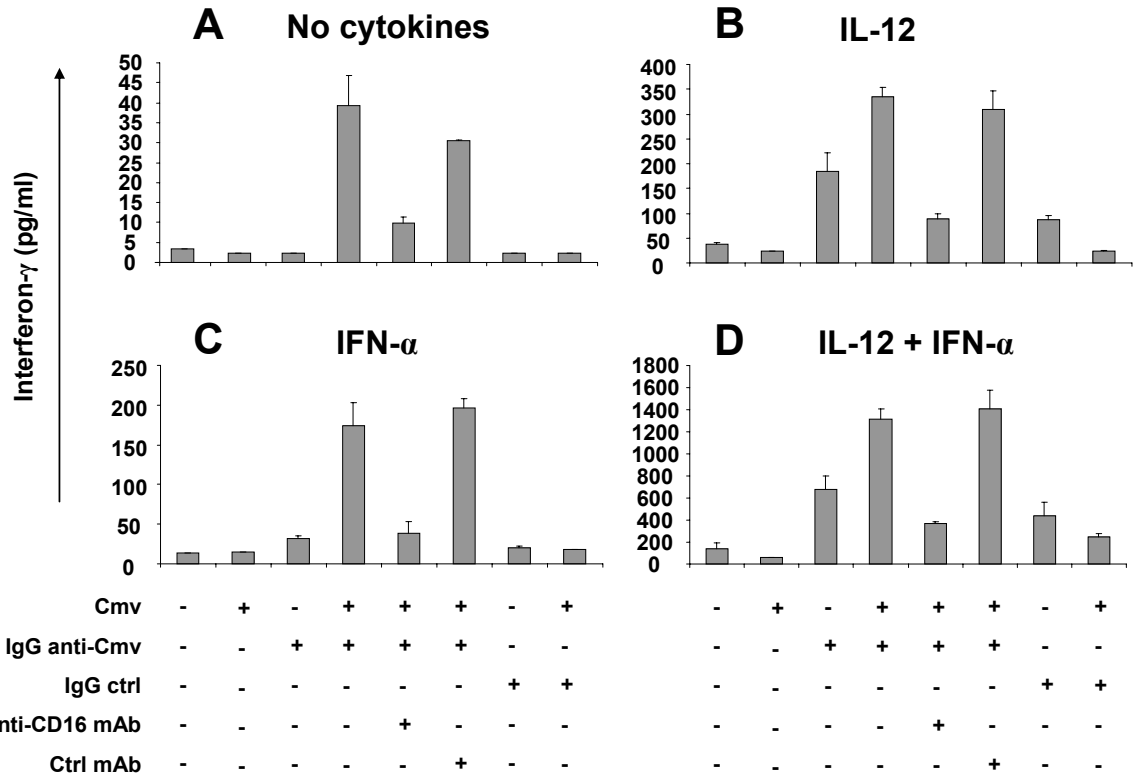
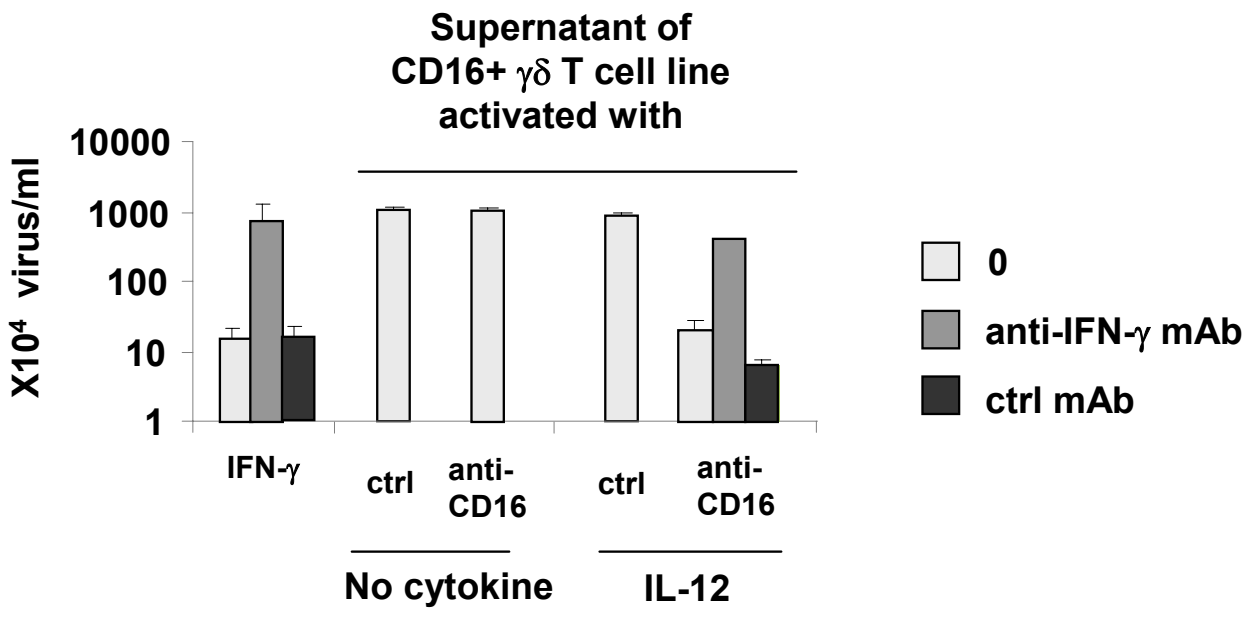


Figure 6



Article 5 : Cytomegalovirus-Induced gamma delta T Cells Associate with Reduced Cancer Risk after Kidney Transplantation

Lionel Couzi, Yann Levaillant, Abdellah Jamaï, Vincent Pitard, Régis Lassalle, Karin Martin, Isabelle Garrigue, Omar Hawchar, François Siberchicot, Nicholas Moore, Jean-François Moreau, Julie Dechanet-Merville, and Pierre Merville

Cytomegalovirus-Induced $\gamma\delta$ T Cells Associate with Reduced Cancer Risk after Kidney Transplantation

Lionel Couzi,^{*†‡} Yann Levaillant,^{*} Abdellah Jamaï,^{*} Vincent Pitard,^{†‡} Régis Lassalle,[‡] Karin Martin,^{*‡} Isabelle Garrigue,^{*‡} Omar Hawchar,^{†‡} François Siberchicot,^{*‡} Nicholas Moore,^{*‡} Jean-François Moreau,^{*†‡} Julie Dechanet-Merville,^{†‡} and Pierre Merville^{*†‡}

^{*}Centre Hospitalier Universitaire Bordeaux, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France; [†]Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5164, Bordeaux, France; and [‡]Université Bordeaux, Bordeaux, France

ABSTRACT

An increase in the number of blood $\gamma\delta$ T cells follows cytomegalovirus (CMV) infection in kidney transplant recipients. These cells react against CMV-infected cells and tumor epithelial cells *in vitro*. We hypothesized that these CMV-induced $\gamma\delta$ T cells play a protective role against cancer in kidney transplant recipients. We performed a longitudinal case-control study involving 18 recipients who developed cancer between 2 and 6 yr after transplantation and 45 recipients who did not. The median percentage of $\gamma\delta$ T cells among total lymphocytes in patients with malignancies was significantly lower compared with that in control patients at 6, 12, and 18 mo before the diagnosis of cancer. Patients with a $\gamma\delta$ T cell percentage of more than 4% were protected from cancer. An increase of the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell subset significantly associated with lower incidence of cancer only in recipients who experienced pre- or postgraft CMV infection. Finally, a retrospective follow-up of 131 recipients for 8 yr revealed that CMV-naïve recipients had an approximately 5-fold higher risk of cancer compared with CMV-exposed patients. In summary, these results suggest a protective role of CMV exposure against cancer in kidney transplant recipients.

J Am Soc Nephrol ●●: –, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008101072

Currently, the rates of cancer in kidney transplant recipients (KTRs) are similar to those of nontransplant recipients that are 20 to 30 yr older, and the risk of cancer among this population is between 2.5 and 4 times greater than in the general population.^{1,2} Elevated age at transplantation, Caucasian origin, long-term exposure to immunosuppressant therapy, and the presence of cancer before graft are risk factors for cancer after transplant, whereas diabetes mellitus and return to dialysis significantly reduce risk of subsequent malignancy.^{1,3} Twenty years after the graft, 80% of patients develop at least one nonmelanoma skin cancer, which is the most common type of malignancy in KTRs.⁴ Other cancers that have the highest standardized incidence ratio are lymphoma, cancer of the lip, vulvovaginal tumors, and kidney cancers.^{2,3}

Many possible explanations for this increased incidence of cancer in KTRs have been proposed. Immunosuppressive agents may cause DNA dam-

age and promote tumor formation. Some cancer types have been linked to viral infection. However, drug-mediated impairment of immune surveillance, which ordinarily prevents the development of malignancies, is also a major contributing factor. The concept of cancer immunosurveillance is well characterized in mice, in which recombinase-activating gene knockout mice that lack functional lymphocytes exhibit increased tumor incidence.⁵ In humans, immunosurveillance has also been dem-

Received October 14, 2008. Accepted July 19, 2009.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Julie Dechanet-Merville, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5164, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. Phone: 33-5-57-57-14-71; Fax: 33-5-57-57-14-72; E-mail: julie.dechanet@u-bordeaux2.fr

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology

onstrated. Healthy Japanese subjects whose whole blood lymphocytes exhibited a high degree of natural cytotoxicity had a significantly lower risk of cancer than subjects whose lymphocytes exhibited a low degree of cytotoxicity.⁶ More recently, in patients suffering of colorectal cancer, the presence of a high level of tumor-infiltrating effector memory T cells was correlated with the absence of early metastatic invasion signs.⁷ Much is known about the antitumor role of $\alpha\beta$ T cells, and in fact, *in vitro* expansion of autologous CD4+ and CD8+ T cell clones with specificity for melanoma antigens is used in treating patients with melanoma.^{8,9}

In addition to $\alpha\beta$ T cells, $\gamma\delta$ T cells that function in the innate immune system are also involved in antitumor immunity.¹⁰ Indeed, $\gamma\delta$ T cell receptor (TCR) knockout mice develop more skin cancers than wild-type mice.¹¹ In humans, the major population of circulating $\gamma\delta$ T cells expresses a TCR displaying the V δ 2 chain (V δ 2^{pos} $\gamma\delta$ T cells), and these cells are able to kill myeloma and carcinoma cell lines *in vitro*.¹⁰ An additional population expresses a TCR composed of the V δ 1 or V δ 3 chain (V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells). These cells, which reside in the epithelia, are retrieved from the infiltrating cells of many carcinomas and exert a strong cytotoxicity against carcinoma cells *in vitro*.^{12,13} Circulating V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells have also been found to be increased in few other diseases by other groups (HIV, HHV-8, systemic sclerosis, and Crohn disease).^{14–17} In contrast to $\alpha\beta$ T cells, the development of intraepithelial $\gamma\delta$ T cells seems to be resistant to cyclosporin A in mice,¹⁸ rendering these cells especially interesting for KTRs.

Immunity to tumors may be acquired during events that have no clear relationship to cancer. For example, certain febrile infectious childhood diseases (measles, mumps, rubella, pertussis, and chicken pox) are associated with a reduced risk of many cancers in adulthood.¹⁹ Moreover, history of severe infectious disease is associated with a reduced risk of melanoma.²⁰ Human cytomegalovirus (CMV), a virus that establishes a lifelong viral persistence in immunocompetent individuals, is responsible for opportunistic infection after transplantation. Recent evidence indicated that the genome and antigens of CMV were frequently present in certain malignant tumors, such as colon cancer and malignant glioma,^{21,22} suggesting a relationship between CMV and some cancers. Interestingly, we have previously observed a major and specific increase of blood V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell levels after CMV infection in KTRs,²³ and this expansion was correlated with the resolution of CMV infection.²⁴ We have also demonstrated that reactive V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell clones or cell lines displayed a specific TCR-dependent crossreactivity against CMV-infected cells and tumor epithelial cells, suggesting the recognition of a common surface molecular pattern on infected and transformed cells.²⁵ Moreover, we recently reported on the ability of human CMV-specific V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells to inhibit tumor cell development *in vivo* in a model of human tumor xenograft in immunodeficient mice.²⁶

Taken together, our previous findings have suggested that the $\gamma\delta$ T cells that were amplified during CMV infection may also be involved in tumor surveillance. In this report, we have

examined the relationship between CMV-induced $\gamma\delta$ T cells and *in vivo* cancer occurrence in KTRs. This population allowed us to test his hypothesis because KTRs typically develop CMV infection before graft or during the first year posttransplantation, whereas cancer development occurs much later.

RESULTS

Association between Elevated Blood $\gamma\delta$ T Cells and a Diminished Occurrence of Cancer in KTRs

We performed a case *versus* control study to longitudinally analyze the putative link between blood $\gamma\delta$ T cell percentages and malignancy incidence in KTRs. Eighteen patients who developed cancer (12 skin cancers and 6 solid cancers) between 2 and 6 yr after transplantation (median 3 yr) were compared with 45 control KTRs. Patients from the malignancy group were slightly older than patients from the control group (mean age 54 ± 6.5 yr *versus* 49 ± 9 yr, $P = 0.03$). No statistical differences were observed between the malignancy patient group and the control patient group for the sex ratio (12/6 *versus* 31/14 men/women, $P = 0.9$), use of anti-thymocyte globulin (ATG) (56% *versus* 49%, $P = 0.8$), CMV status (R+: 72% *versus* 69%, D+R-: 6% *versus* 17%, D-R-: 22% *versus* 13%, $P = 0.5$), HLA mismatches (MMs) (0 to 1 MM: 37.5% *versus* 20%, 2 to 4 MMs: 62.5% *versus* 76%, 5 to 6 MMs: 0% *versus* 4%, $P = 0.5$), and acute rejection (22% *versus* 13%, $P = 0.1$). Patients with skin types I/II, III/IV, and V/VI (Fitzpatrick classification) represented 18% and 21%, 73% and 67%, and 9% and 12% in patients with cutaneous cancer and their matched controls, respectively ($P = 0.9$).

We did not find any statistical differences between the cancer patient group and the control patient group for the median number of total blood lymphocytes at 18 [(M-18) 1401 *versus* 1200/mm³, $P = 0.3$], 12 [(M-12) 1294 *versus* 1455/mm³, $P = 0.3$], and 6 [(M-6) 1347 *versus* 1458/mm³, $P = 0.1$] mo before cancer diagnosis (Figure 1A). By contrast, the median $\gamma\delta$ T cell percentage among total lymphocytes in patients with malignancies was significantly lower than that of control patients at M-18 (2.4% *versus* 5%, $P < 0.001$), M-12 (2.7% *versus* 6%, $P < 0.004$), and M-6 (2.7% *versus* 5.5%, $P < 0.001$) (Figure 1B). Similar results were only obtained when skin cancer patients were compared with their matched controls (data not shown).

Next, we determined a blood $\gamma\delta$ T cell percentage threshold, which would predict protection of KTRs from malignancy occurrence. Using a conditional logistic model, we determined that patients with a $\gamma\delta$ T cell percentage above 4.1% at M-18 [odds ratio (OR) = 0.06, Akaike's information criterion (AIC) = 32.7, $P = 0.008$], 4% at M-12 (OR = 0.11, AIC = 35.9, $P = 0.006$), and 3.5% at M-6 (OR = 0.06, AIC = 32.8, $P = 0.007$) displayed significantly less neoplasia than patients with a lower $\gamma\delta$ T cell percentage. The number of patients who developed a cancer with the risk phenotype of a $\gamma\delta$ T cell percentage below 4% was 14 of 32 at M-18 (44%), 15 of 32 at M-12 (47%), and 14 of 33 at M-6 (42%). Conversely, the number of

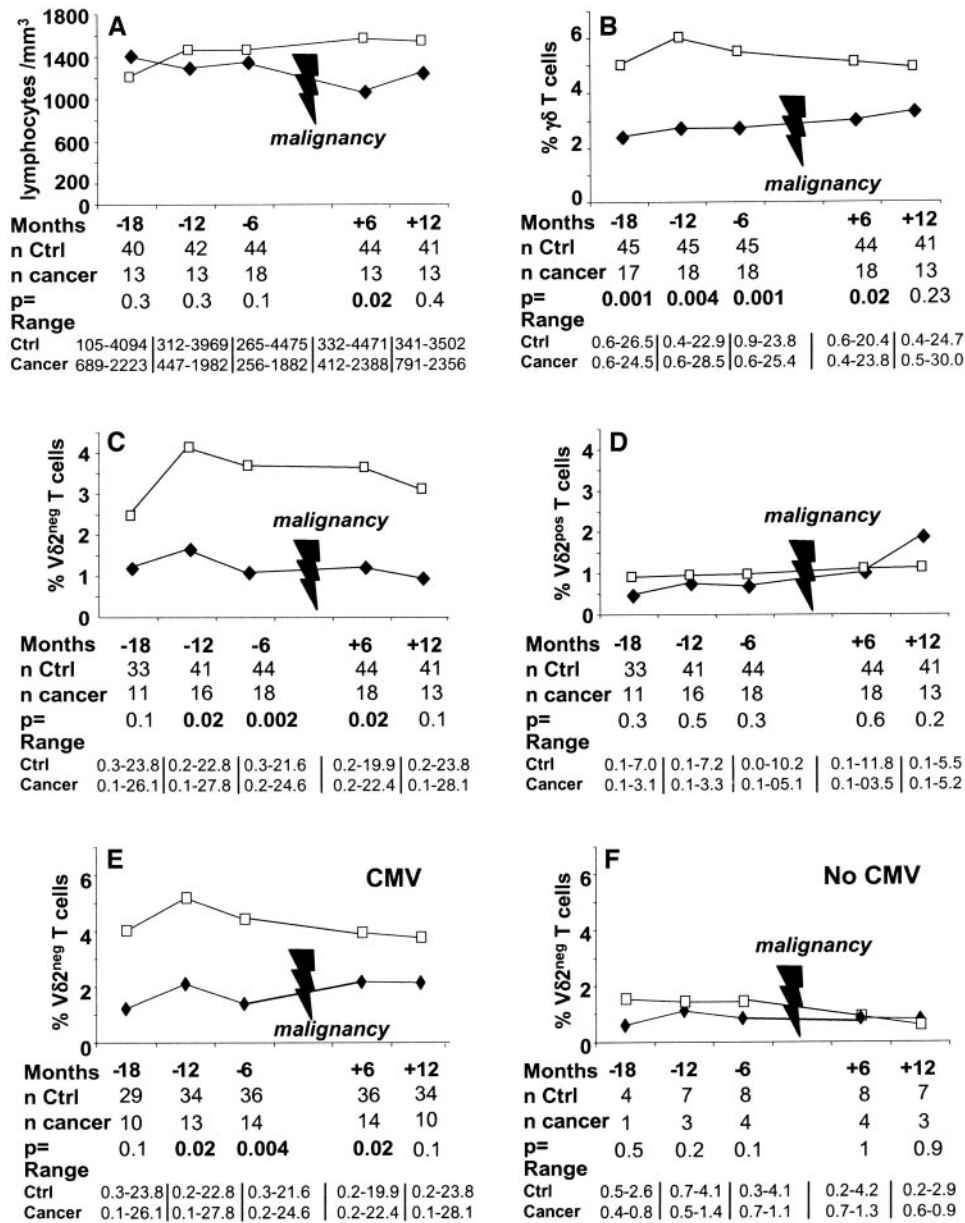


Figure 1. Evolution of $\gamma\delta$ T cells. Evolution of the median (A) number of lymphocytes, (B) percentage of $\gamma\delta$ T cells, (C) $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells, and (D) $V\delta 2^{pos}$ $\gamma\delta$ T cells among total T cells before and after cancer occurrence in KTRs with cancer (\blacklozenge) and their matched controls (\square). (E, F) Evolution of the medians of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cell percentage before and after cancer occurrence in KTRs with cancer (\blacklozenge) and their matched controls (\square) according to history of CMV. (E) Patients who have been in contact with CMV (before or after transplantation). (F) Patients naïve for CMV infection.

patients who developed a cancer with a $\gamma\delta$ T cell percentage above 4% was only 3 of 30 at M-18 (10%, $P = 0.004$), 3 of 31 at M-12 (10%, $P = 0.002$), and 4 of 30 at M-6 (13%, $P = 0.01$).

$V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T Cells Are Associated with Diminished Cancer Occurrence in KTRs

As previously mentioned, $V\delta 2^{pos}$ and $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells have been shown to exhibit antitumor functions; thus, we determined which of these two subsets was associated with lower cancer occurrence in KTRs. The median $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cell percentage in patients with

malignancies was lower than that of cancer-free KTRs at M-18 (1.2% versus 2.5%, $P = 0.1$), M-12 (1.7% versus 4.1%, $P = 0.02$), and M-6 (1.1% versus 3.7%, $P = 0.002$), whereas no differences in the median percentage of $V\delta 2^{pos}$ $\gamma\delta$ T cells were observed between the two groups (Figure 1, C and D).

Six and 12 mo after the cancer occurrence, total $\gamma\delta$ T cell and $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cell percentages in the cancer group were lower than those of the control group, but this difference was statistically significant only at 6 mo (3% versus 5%, $P = 0.02$ and 1.2% versus 3.6%, $P = 0.02$, respectively).

Only CMV-Induced Vδ2^{neg} γδ T Cells Are Associated with Lower Cancer Occurrence

CMV is the only factor reported to date to be responsible for the long-term expansion of the peripheral blood Vδ2^{neg} γδ T cell population in KTRs²³ and healthy individuals.²⁷ Therefore, we next determined whether these Vδ2^{neg} γδ T cells, which had increased after the CMV infection, were associated with lower cancer occurrence in KTRs. We separated the patients who have never experienced CMV infection from those who had been in contact with CMV either before (pregraft CMV infection, determined through CMV seropositivity at the day of the graft) or after transplantation (postgraft CMV infection, determined through pp65 antigenemia). A significant association between an elevated number of blood Vδ2^{neg} γδ T cells and a lower cancer occurrence was only found in KTRs who experienced pre- or postgraft CMV infection (*n* = 51; Figure 1, E and F). This result strongly supports a link between CMV infection-induced high blood Vδ2^{neg} γδ T cell percentages and protection against subsequent cancer development.

Higher Frequency of Malignancies in KTRs Who Have Never Been Exposed to CMV

The above data, together with our previous *in vitro* studies,²⁵ suggested a new antitumor function of CMV-reactive Vδ2^{neg} γδ T cells. Therefore, an indirect positive effect of CMV infection on a diminished cancer occurrence in KTRs may be envisioned. To examine this unexpected link, we retrospectively analyzed a cohort of 105 consecutive long-term immunosuppressed KTRs. Twenty-three of these patients developed at least one malignancy (13 cutaneous, 8

solid, and 2 lymphomas) from 1 to 9 yr after transplantation (median 5 yr). Three patients died as a result of their cancer. Eighty-two patients without cancer were included in the control group.

Baseline characteristics of these patients are summarized in Table 1. Using univariate analysis, we failed to show any significant association between cancer occurrence and dialysis duration, age at time of graft, sex, calcineurin inhibitor use, induction treatment with ATG, HLA MMs, delayed graft function, or acute rejection (Table 2). The 13 skin cancer patients had the same skin type distribution as the control group patients (*P* = 0.8 by χ² test). Taken separately, neither pregraft CMV infection nor postgraft CMV infection were associated with cancer occurrence; however, patients who never experienced CMV infection (absence of pre- or postgraft CMV infection) displayed an increased risk of cancer (OR = 4.3, *P* = 0.009). The use of azathioprine (*versus* mycophenolate mofetil) was also associated with an increased risk of cancer (OR = 3.2, *P* = 0.02), as described previously.³ Patients receiving ganciclovir displayed the same rate of cancer (9 of 44 cancers) than those who did not receive ganciclovir (14 of 61 cancers) (*P* = 0.8).

Using multivariable analysis, the same variables remained significantly correlated to the occurrence of cancer. Patients naïve for CMV exhibited a risk of cancer 5.28 times greater than patients who had been exposed to CMV (*P* = 0.006). Finally, patient survival without cancer development was decreased in KTRs who never encountered CMV than in those patients who had been infected with CMV (68.8% *versus* 92% at 5 yr and 62.5% *versus* 83.6% at 8 yr, respectively; *P* = 0.01 by log-rank test) (Figure 2).

Table 1. Descriptive analysis of KTRs

	Malignancy Group (<i>n</i> = 23)	Control Group (<i>n</i> = 82)
Dialysis duration (mo)	51.7 ± 71.7	36.4 ± 40.3
Age at the graft (yr)	52.6 ± 8	49.6 ± 7.3
Gender (male/female)	15/8	51/31
Mean time of study (yr)	8.5 ± 0.9	8.2 ± 1
Immunosuppressive treatment		
cyclosporin/tacrolimus	12/11	38/44
azathioprine/mycophenolate mofetil	14/9	27/55
ATG/ anti-IL-2 receptor antibody/no induction	8/1/14	21/5/56
HLA MMs		
0 to 1 MM (%)	7 (30)	11 (14)
2 to 4 MMs (%)	16 (70)	69 (85)
5 to 6 MMs (%)	0	1 (1)
CMV status		
D+R- (%)	3 (13)	18 (22)
D-R- (%)	7 (30)	4 (5)
R+ (%)	13 (56)	60 (73)
Postgraft CMV infection (%)	7 (30)	32 (39)
Pre- or postgraft CMV infection (%)	15 (65)	73 (89)
Delayed graft function (%)	11 (48)	47 (57)
Acute rejection	3 (13)	13 (16)
Acute rejection treatment (steroid/ATG)	1/2	3/14

Table 2. Factors associated with the occurrence of cancer in KTRs

	OR	P
Univariate analysis		
dialysis duration (mo)	1.01	0.2
age at the graft (yr)	1.7	0.09
female (versus male)	0.89	0.82
tacrolimus (versus cyclosporin)	0.79	0.62
azathioprine (versus mycophenolate mofetil)	3.2	0.02
induction with ATG	1.55	0.39
HLA mismatches 2 to 4 versus 0 to 1	0.37	0.07
CMV R+ (versus D+ R- and D-R-)	0.47	0.13
postgraft CMV infection	0.68	0.45
no pre- and postgraft CMV infection	4.3	0.009
delayed graft function	0.68	0.42
acute rejection	1.25	0.74
acute rejection treatment (ATG versus steroid)	0.43	0.54
Multivariate analysis		
azathioprine (versus mycophenolate mofetil)	3.76	0.01
no pre- or postgraft CMV infection	5.28	0.006

In Vitro Antitumor Reactivity of CMV-Induced Vδ2^{neg} γδ T Lymphocytes

We next tested whether γδ T cells from CMV-infected KTR patients had a better antitumor potential than γδ T cells from patients who had never been exposed to CMV. Among the 105 patients of the cohort study, we selected either patients who developed CMV-infection and did not display cancer (CMV+ cancer-free) or patients who did not develop any CMV infection and displayed a cancer (CMV-free cancer+). Because peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) had to be harvested 1 yr posttransplantation (after CMV-infection and before cancer occurrence), we only found available frozen PBMCs for ten patients. After sorting of γδ T cells from all ten patients, γδ T cell lines from only five patients grew. Those γδ T cells were co-cultured with the A431 (epidermoid carcinoma) and the Daudi (Burkitt’s lymphoma) cell lines, two tu-

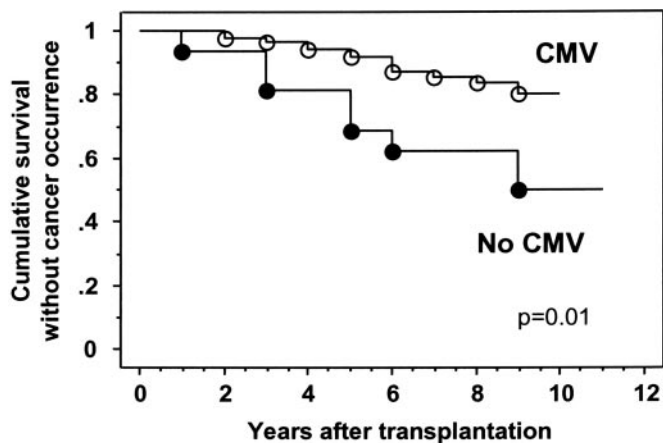


Figure 2. Cumulative survival without cancer development in KTRs stratified according to history of CMV infection (pre- or postgraft CMV infection). Kaplan–Meier analysis was used. Comparison was made using the log-rank test.

mors occurring frequently after kidney transplantation. In accordance with our hypothesis, Vδ2^{neg} γδ T cell lines from the three CMV+ cancer-free KTRs produced more IFN-γ than those from the two CMV-free cancer+ KTRs when cultured with the tumor cells (Figure 3).

DISCUSSION

For several years, our group has been committed to the study of γδ T cell response in KTRs, and longitudinal monitoring of γδ T cells for all patients has been routine practice in our center for 10 yr. This unique opportunity has allowed us to make a long-term retrospective analysis to observe that a low γδ T cell percentage was characteristic of patients who develop cancer in the upcoming years. Previously, we had demonstrated that these γδ T cells were induced by a past CMV infection, and we observed that CMV seronegative recipients who did not develop postgraft CMV infection developed cancer after kidney transplantation more frequently than CMV-infected patients.

The main limitation of this study is the modest sample size. Obviously, large register studies yield more reliable findings, but even these types of studies can be limited by incomplete data collection. Our single-center study has the advantage of a long follow-up period, and the data set includes all cancers, including skin cancers.

Immunosurveillance is greatly impaired by immunosuppressive drugs as evidenced by the association of CD4⁺ T cell

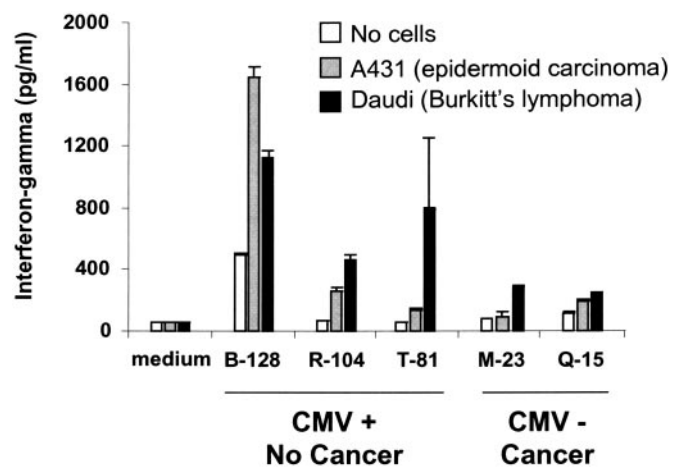


Figure 3. In vitro antitumor reactivity of CMV-induced Vδ2^{neg} γδ T cells. γδ T cells from either patients who developed CMV-infection and did not display cancer (CMV+ cancer-free) or patients who did not develop any CMV infection but displayed a cancer (CMV-free cancer+) were sorted from PBMCs. γδ T cells were then expanded in culture RPMI medium supplemented with 10% human serum, 1000 U/ml rIL-2, 15 ng/ml rIL-15, and irradiated autologous PBMCs. After 1 mo, those γδ T cell lines were incubated with the A431 (epidermoid carcinoma) and the Daudi (Burkitt’s lymphoma) cell lines for 24 h in the presence of rIL-12 and rInterferon-α. IFN-γ released into the supernatant was quantified by ELISA.

depletion with skin cancer in KTRs.²⁸ However, the development of $\gamma\delta$ T cells appears to be resistant to cyclosporin A in mice.¹⁸ Among their multiple functions, the antitumor role of $\gamma\delta$ T cells has been widely documented. First, a high blood $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell percentage is associated with a lower melanoma occurrence.²⁹ Second, $\gamma\delta$ T cells are observed near many epithelial tumors.^{12,13} Third, even if some breast tumor-infiltrating $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells have been reported to suppress T cell and dendritic cell function *in vitro*,³⁰ these cells are usually cytotoxic against tumor epithelial cell lines and thus behave as conventional T cells.¹² Finally, $\gamma\delta$ T cells in mice contribute to protection against epithelial malignancies.¹¹ For all of these reasons, we hypothesize that the $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells observed in the epithelia function as sentinels aimed at killing emerging tumor cells.¹²

Reports have indicated that $\gamma\delta$ T cells are involved in anti-infection and antitumor responses.^{10,31} This dual function of $\gamma\delta$ T cells has been explained by the expression of common antigens in transformed and infected cells. Compelling evidence indicated that $V\delta 2^{\text{pos}}$ $\gamma\delta$ T cells are activated by phosphoantigens overexpressed by microorganisms and tumor cells.³² Although the study presented here was performed on a limited number of patients, the results are consistent and extend our previous *in vitro* data showing that $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells share killing activity against CMV-infected cells and tumor epithelial cells.²⁵ In KTRs who experienced either pre- or post-graft CMV infections, cancer occurrence was associated with low $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell percentages (Figure 1). A decreased ability to have these cells amplified at the periphery could be associated with an increased risk of developing cancer. However, the factors necessary for a significant $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cell expansion after CMV infection are still unknown. Furthermore, we demonstrated an inverse relationship between exposure to CMV and cancer occurrence (Figure 2). Interestingly, a recent multicenter retrospective analysis also observed that CMV seronegative patients with CMV seronegative donors had a higher risk of developing lymphoma than CMV seropositive recipients.³³ This result was unexpected because the mechanisms of immune evasion induced by CMV may decrease immune response against tumor cells.³⁴ In addition, this result is in apparent contrast to the previously reported presence of the CMV genome and antigens in diverse types of carcinomas. However, it is not yet clear whether CMV plays a direct role in carcinogenesis or if it represents an epiphenomenon. CMV has rather been proposed to mediate indirect oncomodulatory functions such as inhibition of apoptosis, tumor invasiveness through modulation of adhesion molecule expression and cell motility, increase of angiogenesis, and modulation of host immune system.³⁴ However, one protein coded by the CMV genome (US28) induces tumor transformation in animal models.³⁵ All of these studies may be consistent with our results if we assume that CMV-infected cells and tumor cells express the same stress-induced molecules, resulting in the selection of common immune effector cells among which $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells play an important role. Presence of CMV-infected cells in tu-

mors from three patients of this cohort was searched through PCR but all were found to be CMV-negative (data not shown).

In conclusion, this study reveals a dual role for CMV-induced $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells in KTRs. This cell subset is not only involved in control of the virus but is also associated with a lower incidence of subsequent malignancy. In this respect, a simple measurement of $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells in the blood of KTRs may provide an interesting parameter for the evaluation of the cancer risk of this long-term immunosuppressed population.

CONCISE METHODS

Patients

Case-Control Study.

Between 1996 and 2000, 313 kidneys from deceased donors were transplanted in our department. We retrospectively identified 18 KTRs who had developed cancer and for whom blood $\gamma\delta$ T cells had been enumerated at M-18, M-12, and M-6 as well as at 6 and 12 mo after cancer diagnosis. Comparisons were made with a case-control group of 45 cancer-free patients that were matched for sex, year of transplantation, CMV infection status, and ATG regimen.

Cohort Study.

Retrospectively, we included 131 consecutive KTRs who received transplants in our department between 1997 and 1999. Only patients older than 38 yr of age were included because no younger patient developed cancer after transplantation. Eight patients failed to complete the follow-up. Eighteen graft losses occurred during the follow-up until January 2007: 2 deaths, 13 chronic allograft dysfunctions, 1 vascular thrombosis, 1 toxic nephropathy, and 1 relapse of the primary kidney disease. None of these patients developed cancer until their graft loss. Finally, 105 KTRs with a functional graft were followed for 8.33 ± 1 yr.

All patients received an immunosuppressive regimen comprised of cyclosporin or tacrolimus, azathioprine or mycophenolate mofetil, and corticosteroids. Some patients also received induction treatment with ATG or anti-IL-2 receptor antibody. Delayed graft function was defined by the need for dialysis for the first week. All acute rejection episodes were proven by biopsy.

Pretransplant CMV infection was defined by positive CMV serology on the day of the graft (R+). Posttransplant CMV infection was diagnosed using CMV pp65 antigen positivity in peripheral blood leukocytes. For all CMV seronegative patients, CMV DNA analyses of three historical sera (month 3, 6, and 12) from the first year of posttransplantation were retrospectively performed and confirmed that patients were truly CMV negative (data not shown). From 1999, CMV seronegative patients who received CMV seropositive allograft (D+R-) and CMV seropositive recipients (R+) treated with ATG received oral ganciclovir for the first 3 mo posttransplantation. Patients suffering from postgraft CMV infection also received intravenous ganciclovir.

The diagnosis of cancer was based on histologic examination. This study was carried out on samples harvested for medical care. This study did not require agreement from any ethics committees.

Flow Cytometric Analysis of $\gamma\delta$ T Lymphocytes

Whole blood was incubated with different monoclonal antibodies (anti-CD45 and anti-CD3 from BD Bioscience, anti-pan δ and anti-V δ 2 from Beckman Coulter). After red cell lysis and fixation, at least 5000 lymphocytes were processed by the FACScalibur flow cytometer, and the percentages of cell populations were obtained using the CELLQUEST software (BD Bioscience). Absolute counts of lymphocytes were obtained using the single platform lyse/no wash Trucount (BD Biosciences).

In Vitro Analysis

The conservation of frozen PBMCs was approved by our relevant local institutional review board (CHU Bordeaux), and the patients gave their written consent. $\gamma\delta$ T cells were sorted from PBMCs by a flow cytometer cell sorter (ARIA, BD Bioscience). $\gamma\delta$ T cells were then expanded in culture RPMI medium supplemented with 10% human serum, 1000 U/ml rIL-2, 15 ng/ml rIL-15, and irradiated autologous PBMCs. After 1 mo, 30,000 $\gamma\delta$ T cells were incubated with subconfluent A431 (epidermoid carcinoma) and the Daudi (Burkitt's lymphoma) cell line layers in flat-bottomed 96-well plates for 24 h at 37°C in the presence of rIL-12 and rInterferon- α (two cytokines that enhance IFN- γ production by V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells). IFN- γ released into the supernatant was quantified by ELISA (Bender Medsystems, Austria) to evaluate the response of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell lines against tumor antigens

Statistical Analysis

Case-Control Study.

Comparisons between cases and controls were performed using conventional statistics for matched data, including McNemar χ^2 test for qualitative variables, *t* test, or Wilcoxon rank-test. To identify a $\gamma\delta$ T cell threshold predicting malignancy occurrence, conditional logistic regression models were used at M-18, M-12, and M-6 with the $\gamma\delta$ T cell value as the explanatory variable. Results were expressed as AIC, Wald test *P* value, and OR.

Cohort Study.

The variables potentially associated with the occurrence of cancer were subjected to univariate analysis. Risk factors associated with cancer occurrence with *P* < 0.25 in univariable analysis were included in a multivariable model. Then, a backward selection procedure was used to select a final multivariate model including all significant variables with *P* < 0.05. Kaplan–Meier analysis was used to construct patient survival curves without cancer occurrence after kidney transplantation. Comparison was made using the log-rank test. Analyses were performed with SAS Software (version 9.1, Cary, NC).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Catherine Rio for her help and BioScience Writers for manuscript editing. We are indebted to J.C. Carron, M. Garcia, and F. Saussais, who skillfully carried out the flow cytometric analysis.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Webster AC, Craig JC, Simpson JM, Jones MP, Chapman JR: Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: A cohort study of 15,183 recipients. *Am J Transplant* 7: 2140–2151, 2007
- Vajdic CM, McDonald SP, McCredie MR, van Leeuwen MT, Stewart JH, Law M, Chapman JR, Webster AC, Kaldor JM, Grulich AE: Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* 296: 2823–2831, 2006
- Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C: Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 4: 905–913, 2004
- Ramsay HM, Fryer AA, Hawley CM, Smith AG, Harden PN: Non-melanoma skin cancer risk in the Queensland renal transplant population. *Br J Dermatol* 147: 950–956, 2002
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD: IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107–1111, 2001
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K: Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: An 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356: 1795–1799, 2000
- Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J: Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353: 2654–2666, 2005
- Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD: Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16168–16173, 2002
- Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjatich S, Thompson JA, Yee C: Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 358: 2698–2703, 2008
- Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, Poggi A, Zocchi MR: Human gammadelta T cells: A nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol* 23: 14–18, 2002
- Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC: Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294: 605–609, 2001
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T: Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6879–6884, 1999
- Maeurer MJ, Martin D, Walter W, Liu K, Zitvogel L, Halusczyk K, Rabinowich H, Duquesnoy R, Storkus W, Lotze MT: Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med* 183: 1681–1696, 1996

14. Barcy S, De Rosa SC, Vieira J, Diem K, Ikoma M, Casper C, Corey L: Gamma delta+ T cells involvement in viral immune control of chronic human herpes virus 8 infection. *J Immunol* 180: 3417–3425, 2008
15. De Maria A, Ferrazin A, Ferrini S, Ciccone E, Terragna A, Moretta L: Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 165: 917–919, 1992
16. Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P, Ghersetich I, Lattanzio R, Pavan A, Pignone A, Cagnoni ML, Lotti T, Tonietti G: Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 41: 327–334, 1998
17. Giacomelli R, Parzanese I, Frieri G, Passacantando A, Pizzuto F, Pimpo T, Cipriani P, Viscido A, Caprilli R, Tonietti G: Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 98: 83–88, 1994
18. Lin T, Matsuzaki G, Umesue M, Omoto K, Yoshida H, Harada M, Singaram C, Hiromatsu K, Nomoto K: Development of TCR-gamma delta CD4-CD8+ alpha alpha but not TCR-alpha beta CD4-CD8+ alpha alpha i-IEL is resistant to cyclosporin A. *J Immunol* 155: 4224–4230, 1995
19. Albonico HU, Braker HU, Husler J: Febrile infectious childhood diseases in the history of cancer patients and matched controls. *Med Hypotheses* 51: 315–320, 1998
20. Krone B, Kolmel KF, Grange JM, Mastrangelo G, Henz BM, Botev IN, Niin M, Seebacher C, Lambert D, Shafir R, Kokoschka EM, Kleeberg UR, Gefeller O, Pfahlberg A: Impact of vaccinations and infectious diseases on the risk of melanoma—Evaluation of an EORTC case-control study. *Eur J Cancer* 39: 2372–2378, 2003
21. Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS: Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* 360: 1557–1563, 2002
22. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ: Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 62: 3347–3350, 2002
23. Dechanet J, Merville P, Lim A, Retiere C, Pitard V, Lafarge X, Michelson S, Meric C, Hallet MM, Kourilsky P, Potaux L, Bonneville M, Moreau JF: Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 103: 1437–1449, 1999
24. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, Dechanet-Merville J: Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 184: 533–541, 2001
25. Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, Merville P, Dromer C, Emilie D, Moreau JF, Dechanet-Merville J: Shared reactivity of Vdelta2-gammadelta T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 201: 1567–1578, 2005
26. Devaud C, Bilhere E, Loizon S, Pitard V, Behr C, Moreau JF, Dechanet-Merville J, Capone M: Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res* 69: 3971–3978, 2009
27. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, Lafon ME, Merville P, Moreau JF, Dechanet-Merville J: Long term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 112: 1317–1324, 2008
28. Ducloux D, Carron PL, Rebibou JM, Aubin F, Fournier V, Bresson-Vautrin C, Blanc D, Humbert P, Chalopin JM: CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients. *Transplantation* 65: 1270–1272, 1998
29. Argentati K, Re F, Serresi S, Tucci MG, Bartozzi B, Bernardini G, Provinciali M: Reduced number and impaired function of circulating gamma delta T cells in patients with cutaneous primary melanoma. *J Invest Dermatol* 120: 829–834, 2003
30. Peng G, Wang HY, Peng W, Kiniwa Y, Seo KH, Wang RF: Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 27: 334–348, 2007
31. Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H: Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: Discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev* 215: 59–76, 2007
32. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournie JJ, Scotet E, Bonneville M: Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: Simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* 215: 123–135, 2007
33. Opelz G, Daniel V, Naujokat C, Fickenscher H, Dohler B: Effect of cytomegalovirus prophylaxis with immunoglobulin or with antiviral drugs on post-transplant non-Hodgkin lymphoma: A multicentre retrospective analysis. *Lancet Oncol* 8: 212–218, 2007
34. Soderberg-Naucler C: Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 259: 219–246, 2006
35. Maussang D, Verzijl D, van Walsum M, Leurs R, Holl J, Pleskoff O, Michel D, van Dongen GA, Smit MJ: Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13068–13073, 2006

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

L'association entre infection à CMV et lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} en transplantation d'organe a été découverte en 1999 par Julie Déchanet, Pierre Merville et Jean-François Moreau. Fin 2006, leurs travaux avaient conduit aux conclusions suivantes : 1/ A l'échelle de l'individu, l'expansion lymphocytaire T gamma delta V δ 2^{neg} était associée à la guérison de la maladie et la résolution de l'infection à CMV. 2/ A l'échelle cellulaire, cette sous-population effectrice avait une réactivité croisée contre des cellules infectées par le CMV et des cellules tumorales. 3/ Enfin, à l'échelle moléculaire le blocage de la réactivité des cellules T gamma delta V δ 2^{neg} par des anticorps bloquant le TCR faisait suggérer une activation TCR-dépendante.

Entre 2006 et 2010, nous avons pu étendre et approfondir nos connaissances sur la physiologie et les rôles des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} en transplantation d'organe. 1/ A l'échelle des individus, nous avons montré que l'expansion des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits par l'infection à CMV s'associe à une survenue moindre de cancer à long terme chez les patients transplantés rénaux. 2/ A l'échelle cellulaire, on observe que les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} ressemblent beaucoup aux lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV in vivo, phénotypiquement mais aussi en terme de cinétique d'apparition. 3/ Enfin d'un point de vue moléculaire, l'interaction TCR-ligand qui était suspectée a pu être confirmée sur deux clones grâce à des expériences de transfert de TCR. Enfin, nous avons découvert une autre voie d'activation dépendante du CD16, faisant intervenir les complexes immuns CMV-IgG anti-CMV, nécessitant une co-stimulation par des cytokines comme l'IL-12 et l'interféron- α .

Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} peuvent être considérés comme un nouveau marqueur de l'inflation mémoire observée après une infection à CMV. Cette sous-population lymphocytaire est en effet une représentation supplémentaire de l'énorme impact du CMV sur le système immunitaire. Leur phénotype et leur fonction effectrice anti-CMV peuvent paraître redondants avec celles des cellules T CD8+ spécifiques du CMV. Mais ils partagent aussi un phénotype commun avec les cellules NK, en particulier le CD16. Ces cellules pourraient être l'expression d'un continuum entre les cellules NK et les cellules T conventionnelles alpha beta. Par conséquent, leurs fonctions pourraient varier en fonction des circonstances et du microenvironnement et pourraient être plus ou moins mouvantes entre immunité adaptative et immunité innée. Bien qu'elles apparaissent dans le sang de façon concomitante aux lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV, leur cinétique d'apparition dans les tissus pourrait être différente. Dans un futur proche, beaucoup de pistes restent à explorer :

En premier lieu, l'identification des ligands du TCR gamma delta reste un objectif majeur. A ce jour, seuls les ligands de quelques clones V δ 1 ont été identifiés (MICA/B et CD1c). Les ligands des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} sont probablement multiples et beaucoup d'autres restent à découvrir. Seule l'identification d'un nombre suffisant de ligands permettra d'avoir une idée plus précise sur les conditions d'activation et de sélection de ces cellules. Grâce aux outils générés (transfectants, anticorps monoclonaux dirigés contre les ligands potentiels, identification de lignées cellulaires réactives et non réactives), l'identification des premiers ligands est proche. Pour poursuivre sur cette voie, d'autres lignées et d'autres clones devront être générés.

Jusqu'à présent, le phénotype des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits par le CMV nous a fait penser que ces cellules avaient une fonction effectrice anti-virale et anti-tumorale.

Cette fonction a été démontrée in vitro contre des fibroblastes infectés par le CMV et contre des lignées tumorales souvent épithéliales car les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} ont un tropisme épithélial et tissulaire. Leur fréquence dans les tissus infectés par le CMV reste maintenant à établir. Car c'est uniquement dans le sang périphérique que l'expansion lymphocytaire T gamma delta V δ 2^{neg} a été observée jusqu'alors après une infection à CMV. Ce point capital traduit où bien une « circulation » augmentée de cette sous-population vers les tissus ou bien supporte une nouvelle fonction propre dans la circulation sanguine. Pour explorer plus en avant ces hypothèses, il nous reste à tester les interactions possibles entre lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} et les monocytes ainsi que les cellules endothéliales infectées ou non par le CMV. Le produit de ces interactions pourrait définir une nouvelle fonction de ces cellules au cours de l'infection à CMV dans le compartiment sanguin.

Le développement d'un modèle animal est devenu indispensable pour avancer dans la compréhension de la physiologie des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}. Le modèle murin n'est pas forcément idéal car les sous-populations lymphocytaires T gamma delta ne sont pas concordantes entre l'homme et la souris. Par exemple, les cellules T dendritiques épidermiques (DECT) présentes au niveau de la peau murine n'existent pas chez l'homme. Le modèle idéal serait un modèle de singe. Une collaboration avec un laboratoire ayant développé un modèle d'infection à CMV chez le grand singe est la solution de choix afin: 1/ de reproduire les données humaines (lien CMV, cancer et lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}), 2/ d'essayer de comprendre où se fait l'expansion de cette sous-population, 3/ et d'essayer de tester de nouveaux protocoles d'immunothérapie préventifs ou curatifs visant à activer ces cellules afin de stimuler l'immunité anti-virale ou anti-tumorale des individus, une fois que des ligands auront été identifiés.

Enfin en clinique, il reste à explorer si les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} peuvent être utilisés dans le suivi immunologique des patients transplantés rénaux. Une étude rétrospective actuellement en cours devrait permettre de savoir si ce marqueur simple peut permettre de prédire la survenue d'infection ou de maladie chez les patients D+R- ou R+ avec ou sans prophylaxie.

Il a aussi été démontré que lymphocytes T gamma delta V δ 1 pouvaient avoir une activité suppressive tout en gardant la capacité à produire de l'interferon- γ contre des cellules tumorales. En transplantation hépatique, l'augmentation des lymphocytes T gamma delta V δ 1 a été retrouvée assez spécifiquement chez les patients tolérants opérationnels bien que les dernières données remettent ce fait en question. Il faut cependant confronter ces données à la sérologie CMV des patients pour déterminer si ces lymphocytes T gamma delta V δ 1 régulateurs sont induits ou non par le virus. En cas de lien direct avec le CMV, cette « tolérance opérationnelle » pourrait être un effet indirect relativement original et inattendu de l'infection à CMV en transplantation hépatique.

Il apparaît aussi important de vérifier la relation inverse récemment démontré entre CMV et cancer en transplantation rénale. Ce nouvel effet indirect anti-tumoral est imputé à l'expansion lymphocytaire T gamma delta V δ 2^{neg} secondaire. Il faudrait donc dans un premier temps tester sur une grosse étude de registre le lien potentiel entre les patients séronégatif pour le CMV et la survenue des cancers.

L'activation par le TCR n'est pas la seule voie par laquelle ces cellules s'amplifient et deviennent cytotoxique. Le CD16 bien sur mais aussi la protéine NKP80, sont spécifiquement exprimée sur les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg}. L'expression du CD16- sur ces cellules est particulièrement intéressante. En transplantation rénale, nous savons désormais que la réponse allo-immune humorale est à l'origine d'un nombre significatif de perte de greffon.

D'un point de vue anatomo-pathologique, Elle s'est initialement caractérisée par des dépôts de complément dans les greffons (C4d). Les lésions rénales imputables à la réponse humorale allogénique semblent en réalité cibler plus spécifiquement la microcirculation rénale et la cellule endothéliale. Dans deux tiers des rejets chroniques humoraux caractérisés par des lésions endothéliales glomérulaires et de la microcirculation, les dépôts de complément ne sont plus retrouvés dans les études récentes. Cela soulève l'hypothèse d'un mécanisme de cytotoxicité indépendant du complément. Il pourrait s'agir d'une action directe pro-apoptotique des anticorps anti-HLA anti-donneur mais l'hypothèse d'une cytotoxicité dépendante des allo-anticorps via des cellules T CD16+ est aussi possible compte tenu de la présence importante de cellules mononucléées dans les capillaires péri-tubulaires des reins au cours des rejets aigus humoraux. Les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits par CMV CD16+ sont donc des candidats naturels pour jouer ce rôle cytotoxique. Ce mécanisme original ferait le lien physiopathologique entre l'infection à CMV, l'augmentation du risque de rejet aigu et le risque de perte de greffon surajouté. Enfin, les lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} induits par CMV CD16+ et donc l'infection à CMV pourraient être un facteur de risque de bonne réponse aux anticorps monoclonaux (rituxomab, trastuzumab, cetuximab) utilisés en cancérologie. Nos données in vitro préliminaires montrent en tout cas que ces cellules sont capables d'ADCC contre des cellules tumorales pré-incubées avec ces anticorps monoclonaux.

Enfin, ces dix années dédiées à l'exploration des lymphocytes T gamma delta V δ 2^{neg} ont assez naturellement fait naître beaucoup plus d'interrogations que de réponses et beaucoup de travail reste à faire pour mieux comprendre leur physiologie et leur rôle chez l'homme, en particulier dans le contexte de la transplantation.

BIBLIOGRAPHIE

- Agrati, C., D'Offizi, G., Narciso, P., Abrignani, S., Ippolito, G., Colizzi, V., and Poccia, F. (2001a). Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Mol Med* 7, 11-19.
- Agrati, C., D'Offizi, G., Narciso, P., Selva, C., Pucillo, L. P., Ippolito, G., and Poccia, F. (2001b). Gammadelta T cell activation by chronic HIV infection may contribute to intrahepatic vdelta1 compartmentalization and hepatitis C virus disease progression independent of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17, 1357-1363.
- Agrati, C., Nisii, C., Oliva, A., D'Offizi, G., Montesano, C., Pucillo, L. P., and Poccia, F. (2002). Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC-unrestricted T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50, 307-316.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y., and Fruh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10990-10995.
- Alaibac, M., Morris, J., Yu, R., and Chu, A. C. (1992). T lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor: a study in normal human skin and pathological skin conditions. *Br J Dermatol* 127, 458-462.
- Allison, T. J., Winter, C. C., Fournie, J. J., Bonneville, M., and Garboczi, D. N. (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820-824.
- Almanzar, G., Schwaiger, S., Jenewein, B., Keller, M., Herndler-Brandstetter, D., Wurzner, R., Schonitzer, D., and Grubeck-Loebenstein, B. (2005). Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol* 79, 3675-3683.
- Angelini, D. F., Borsellino, G., Poupot, M., Diamantini, A., Poupot, R., Bernardi, G., Poccia, F., Fournie, J. J., and Battistini, L. (2004). FcgammaRIII discriminates between 2 subsets of Vgamma9Vdelta2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* 104, 1801-1807.
- Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., *et al.* (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8, 379-385.
- Arthurs, S. K., Eid, A. J., Pedersen, R. A., Kremers, W. K., Cosio, F. G., Patel, R., and Razonable, R. R. (2008). Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 46, 840-846.
- Atalay, R., Zimmermann, A., Wagner, M., Borst, E., Benz, C., Messerle, M., and Hengel, H. (2002). Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcgamma receptor homologs. *J Virol* 76, 8596-8608.
- Audard, V., Matignon, M., Hemery, F., Snanoudj, R., Desgranges, P., Anglade, M. C., Kobeiter, H., Durrbach, A., Charpentier, B., Lang, P., and Grimbert, P. (2006). Risk factors and long-term outcome of transplant renal artery stenosis in adult recipients after treatment by percutaneous transluminal angioplasty. *Am J Transplant* 6, 95-99.
- Autran, B., Triebel, F., Katlama, C., Rozenbaum, W., Hercend, T., and Debre, P. (1989). T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. *Clin Exp Immunol* 75, 206-210.
- Babel, N., Brestrich, G., Gondek, L. P., Sattler, A., Wlodarski, M. W., Poliak, N., Bethke, N., Thiel, A., Hammer, M. H., Reinke, P., and Maciejewski, J. P. (2009). Clonotype analysis of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Am Soc Nephrol* 20, 344-352.

- Bachelez, H., Flageul, B., Degos, L., Boumsell, L., and Bensussan, A. (1992). TCR gamma delta bearing T lymphocytes infiltrating human primary cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol* 98, 369-374.
- Barcy, S., De Rosa, S. C., Vieira, J., Diem, K., Ikoma, M., Casper, C., and Corey, L. (2008). Gamma delta+ T cells involvement in viral immune control of chronic human herpesvirus 8 infection. *J Immunol* 180, 3417-3425.
- Barton, E. S., White, D. W., Cathelyn, J. S., Brett-McClellan, K. A., Engle, M., Diamond, M. S., Miller, V. L., and Virgin, H. W. t. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 447, 326-329.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Beck, K., Meyer-Konig, U., Weidmann, M., Nern, C., and Hufert, F. T. (2003). Human cytomegalovirus impairs dendritic cell function: a novel mechanism of human cytomegalovirus immune escape. *Eur J Immunol* 33, 1528-1538.
- Bentz, G. L., and Yurochko, A. D. (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, 5531-5536.
- Berger, C., Jensen, M. C., Lansdorp, P. M., Gough, M., Elliott, C., and Riddell, S. R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118, 294-305.
- Betts, M. R., Price, D. A., Brenchley, J. M., Lore, K., Guenaga, F. J., Smed-Sorensen, A., Ambrozak, D. R., Migueles, S. A., Connors, M., Roederer, M., *et al.* (2004). The functional profile of primary human antiviral CD8+ T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration. *J Immunol* 172, 6407-6417.
- Bhagat, G., Naiyer, A. J., Shah, J. G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T. C., Green, P. H., and Manavalan, J. S. (2008). Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* 118, 281-293.
- Bialasiewicz, A. A., Ma, J. X., and Richard, G. (1999). Alpha/beta- and gamma/delta TCR(+) lymphocyte infiltration in necrotising choroidal melanomas. *Br J Ophthalmol* 83, 1069-1073.
- Biron, C. A., Byron, K. S., and Sullivan, J. L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320, 1731-1735.
- Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A., and Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10, 29-37.
- Booss, J., Dann, P. R., Griffith, B. P., and Kim, J. H. (1989). Host defense response to cytomegalovirus in the central nervous system. Predominance of the monocyte. *Am J Pathol* 134, 71-78.
- Bordessoule, D., Gaulard, P., and Mason, D. Y. (1990). Preferential localisation of human lymphocytes bearing gamma delta T cell receptors to the red pulp of the spleen. *J Clin Pathol* 43, 461-464.
- Borst, E. M., Mathys, S., Wagner, M., Muranyi, W., and Messerle, M. (2001). Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J Virol* 75, 1450-1458.
- Bos, J. D., Teunissen, M. B., Cairo, I., Krieg, S. R., Kapsenberg, M. L., Das, P. K., and Borst, J. (1990). T-cell receptor gamma delta bearing cells in normal human skin. *J Invest Dermatol* 94, 37-42.
- Boullier, S., Cochet, M., Poccia, F., and Gougeon, M. L. (1995). CDR3-independent gamma delta V delta 1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. *J Immunol* 154, 1418-1431.

Boullier, S., Dadaglio, G., Lafeuillade, A., Debord, T., and Gougeon, M. L. (1997). V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and IFN-gamma production but are not selected in lymph nodes. *J Immunol* *159*, 3629-3637.

Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., *et al.* (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* *12*, 1365-1371.

Brenner, M. B., Strominger, J. L., and Krangel, M. S. (1988). The gamma delta T cell receptor. *Adv Immunol* *43*, 133-192.

Brestrich, G., Zwinger, S., Fischer, A., Schmuck, M., Rohmhild, A., Hammer, M. H., Kurtz, A., Uharek, L., Knosalla, C., Lehmkuhl, H., *et al.* (2009). Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy. *Am J Transplant* *9*, 1679-1684.

Brigl, M., and Brenner, M. B. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol* *22*, 79-86.

Britt, W. J., and Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol* *65*, 395-402.

Britt, W. J., Vugler, L., Butfiloski, E. J., and Stephens, E. B. (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*, 1079-1085.

Bruggeman, C. A., and van Dam-Mieras, M. C. (1991). The possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. *Prog Med Virol* *38*, 1-26.

Bryant, N. L., Suarez-Cuervo, C., Gillespie, G. Y., Markert, J. M., Nabors, L. B., Meleth, S., Lopez, R. D., and Lamb, L. S., Jr. (2009). Characterization and immunotherapeutic potential of gammadelta T-cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol* *11*, 357-367.

Bucy, R. P., Chen, C. L., and Cooper, M. D. (1989). Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *J Immunol* *142*, 3045-3049.

Bukowski, J. F., Warner, J. F., Dennert, G., and Welsh, R. M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* *161*, 40-52.

Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, B., Habedank, D., Hetzer, R., Cherepnev, G., Proesch, S., Reinke, P., Volk, H. D., Lehmkuhl, H., and Kern, F. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* *201*, 1031-1036.

Burns, L. J., Pooley, J. C., Walsh, D. J., Vercellotti, G. M., Weber, M. L., and Kovacs, A. (1999). Intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells is activated by cytomegalovirus immediate early proteins. *Transplantation* *67*, 137-144.

Cai, J. L., and Tucker, P. W. (2001). Gamma-delta T cells: immunoregulatory functions and immunoprotection. *Chem Immunol* *79*, 99-138.

Casazza, J. P., Betts, M. R., Price, D. A., Precopio, M. L., Ruff, L. E., Brenchley, J. M., Hill, B. J., Roederer, M., Douek, D. C., and Koup, R. A. (2006). Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med* *203*, 2865-2877.

Catellani, S., Poggi, A., Bruzzone, A., Dadati, P., Ravetti, J. L., Gobbi, M., and Zocchi, M. R. (2007). Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins. *Blood* *109*, 2078-2085.

Cavanaugh, V. J., Deng, Y., Birkenbach, M. P., Slater, J. S., and Campbell, A. E. (2003). Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland. *J Virol* *77*, 1703-1717.

- Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., and Kerber, R. A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* *361*, 393-395.
- Chan, G., Bivins-Smith, E. R., Smith, M. S., Smith, P. M., and Yurochko, A. D. (2008). Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage. *J Immunol* *181*, 698-711.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A., and et al. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* *154*, 125-169.
- Cheung, A. K., Abendroth, A., Cunningham, A. L., and Slobedman, B. (2006). Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood* *108*, 3691-3699.
- Chien, Y. H., Iwashima, M., Wettstein, D. A., Kaplan, K. B., Elliott, J. F., Born, W., and Davis, M. M. (1987). T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* *330*, 722-727.
- Chien, Y. H., and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev* *215*, 46-58.
- Chopra, K. B., Demetris, A. J., Blakolmer, K., Dvorchik, I., Laskus, T., Wang, L. F., Araya, V. R., Dodson, F., Fung, J. J., Rakela, J., and Vargas, H. E. (2003). Progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* *76*, 1487-1491.
- Choudhary, A., Davodeau, F., Moreau, A., Peyrat, M. A., Bonneville, M., and Jotereau, F. (1995). Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* *154*, 3932-3940.
- Chowers, Y., Holtmeier, W., Harwood, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M. F. (1994). The V delta 1 T cell receptor repertoire in human small intestine and colon. *J Exp Med* *180*, 183-190.
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., et al. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* *202*, 379-386.
- Cobbs, C. S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G. Y., Bharara, S., King, P. H., Nabors, L. B., Cobbs, C. G., and Britt, W. J. (2002). Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* *62*, 3347-3350.
- Coelho, V., Moliterno, R., Higuchi, M. L., Guilherme, L., Cunha-Neto, E., Fiorelli, A. I., and Kalil, J. (1995). Gamma delta T cells play no major role in human heart allograft rejection. *Transplantation* *60*, 980-984.
- Collins, C., Shi, C., Russell, J. Q., Fortner, K. A., and Budd, R. C. (2008). Activation of gamma delta T cells by *Borrelia burgdorferi* is indirect via a TLR- and caspase-dependent pathway. *J Immunol* *181*, 2392-2398.
- Collins, C., Wolfe, J., Roessner, K., Shi, C., Sigal, L. H., and Budd, R. C. (2005). Lyme arthritis synovial gammadelta T cells instruct dendritic cells via fas ligand. *J Immunol* *175*, 5656-5665.
- Compton, T., Kurt-Jones, E. A., Boehme, K. W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D. T., and Finberg, R. W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* *77*, 4588-4596.
- Compton, T., Nowlin, D. M., and Cooper, N. R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* *193*, 834-841.
- Coquerelle, C., and Moser, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* *234*, 317-334.

- Corvaisier, M., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Bennouna, J., Mosnier, J. F., Scotet, E., Bonneville, M., and Jotereau, F. (2005). V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* *175*, 5481-5488.
- Couzi, L., Levaillant, Y., Jamaï, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., *et al.* Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* *21*, 181-188.
- Couzi, L., Pitard, V., Netzer, S., Garrigue, I., Lafon, M. E., Moreau, J. F., Taupin, J. L., Merville, P., and Dechanet-Merville, J. (2009). Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* *200*, 1415-1424.
- Crough, T., Fazou, C., Weiss, J., Campbell, S., Davenport, M. P., Bell, S. C., Galbraith, A., McNeil, K., and Khanna, R. (2007). Symptomatic and asymptomatic viral recrudescence in solid-organ transplant recipients and its relationship with the antigen-specific CD8(+) T-cell response. *J Virol* *81*, 11538-11542.
- Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* *22*, 76-98, Table of Contents.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G., and Biron, C. A. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* *195*, 517-528.
- Dantal, J., and Pohanka, E. (2007). Malignancies in renal transplantation: an unmet medical need. *Nephrol Dial Transplant* *22 Suppl 1*, i4-10.
- Das, H., Sugita, M., and Brenner, M. B. (2004). Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components. *J Immunol* *172*, 6578-6586.
- Davignon, J. L., Castanie, P., Yorke, J. A., Gautier, N., Clement, D., and Davrinche, C. (1996). Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *J Virol* *70*, 2162-2169.
- Day, E. K., Carmichael, A. J., ten Berge, I. J., Waller, E. C., Sissons, J. G., and Wills, M. R. (2007). Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol* *179*, 3203-3213.
- De Maria, A., Ferrazin, A., Ferrini, S., Ciccone, E., Terragna, A., and Moretta, L. (1992). Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* *165*, 917-919.
- De Paoli, P., Gennari, D., Martelli, P., Basaglia, G., Crovatto, M., Battistin, S., and Santini, G. (1991). A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* *83*, 187-191.
- De Paoli, P., Gennari, D., Martelli, P., Cavarzerani, V., Comoretto, R., and Santini, G. (1990). Gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* *161*, 1013-1016.
- De Rosa, S. C., Andrus, J. P., Perfetto, S. P., Mantovani, J. J., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A., and Roederer, M. (2004). Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol* *172*, 1637-1645.
- de Villartay, J. P., Lim, A., Al-Mousa, H., Dupont, S., Dechanet-Merville, J., Coumau-Gatbois, E., Gougeon, M. L., Lemainque, A., Eidenschenk, C., Jouanguy, E., *et al.* (2005). A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* *115*, 3291-3299.
- Dechanet, J., Merville, P., Berge, F., Bone-Mane, G., Taupin, J. L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., and Moreau, J. F. (1999a). Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* *179*, 1-8.

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

Delmas, S., Brousset, P., Clement, D., Le Roy, E., and Davignon, J. L. (2007). Anti-IE1 CD4+ T-cell clones kill peptide-pulsed, but not human cytomegalovirus-infected, target cells. *J Gen Virol* *88*, 2441-2449.

Deusch, K., Luling, F., Reich, K., Classen, M., Wagner, H., and Pfeffer, K. (1991). A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur J Immunol* *21*, 1053-1059.

Devaud, C., Bilhere, E., Loizon, S., Pitard, V., Behr, C., Moreau, J. F., Dechanet-Merville, J., and Capone, M. (2009). Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res* *69*, 3971-3978.

Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., *et al.* (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* *85*, 1301-1312.

Dumortier, J., Streblow, D. N., Moses, A. V., Jacobs, J. M., Kreklywich, C. N., Camp, D., Smith, R. D., Orloff, S. L., and Nelson, J. A. (2008). Human cytomegalovirus secretome contains factors that induce angiogenesis and wound healing. *J Virol* *82*, 6524-6535.

Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., and Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 14223-14228.

Dyugovskaya, L., Hirsh, M., and 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.

Ebert, L. M., Meuter, S., and Moser, B. (2006). Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol* *176*, 4331-4336.

Egli, A., Binet, I., Binggeli, S., Jager, C., Dumoulin, A., Schaub, S., Steiger, J., Sester, U., Sester, M., and Hirsch, H. H. (2008). Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med* *6*, 29.

Ehl, S., Schwarz, K., Enders, A., Duffner, U., Pannicke, U., Kuhr, J., Mascart, F., Schmitt-Graeff, A., Niemeyer, C., and Fisch, P. (2005). A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J Clin Invest* *115*, 3140-3148.

Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., *et al.* (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* *99*, 3916-3922.

Emery, V. C., Sabin, C. A., Cope, A. V., Gor, D., Hassan-Walker, A. F., and Griffiths, P. D. (2000). Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* *355*, 2032-2036.

Falagas, M. E., Snyderman, D. R., Griffith, J., and Werner, B. G. (1996). Exposure to cytomegalovirus from the donated organ is a risk factor for bacteremia in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin Infect Dis* *23*, 468-474.

Falini, B., Flenghi, L., Pileri, S., Pelicci, P., Fagioli, M., Martelli, M. F., Moretta, L., and Ciccone, E. (1989). Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol* *143*, 2480-2488.

Fausther-Bovendo, H., Wauquier, N., Cherfils-Vicini, J., Cremer, I., Debre, P., and Vieillard, V. (2008). NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *Aids* *22*, 217-226.

- Fenoglio, D., Poggi, A., Catellani, S., Battaglia, F., Ferrera, A., Setti, M., Murdaca, G., and Zocchi, M. R. (2009). Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* *113*, 6611-6618.
- Ferrarini, M., Ferrero, E., Dagna, L., Poggi, A., and Zocchi, M. R. (2002). Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol* *23*, 14-18.
- Ferrarini, M., Heltai, S., Pupa, S. M., Mernard, S., and Zocchi, R. (1996). Killing of laminin receptor-positive human lung cancers by tumor infiltrating lymphocytes bearing gammadelta(+) t-cell receptors. *J Natl Cancer Inst* *88*, 436-441.
- Fildes, J. E., Walker, A. H., Williams, S. G., Yonan, N., and Leonard, C. T. (2008). CMV infection is associated with the depletion but lack of activation of peripheral blood natural killer cells in a lung transplant cohort. *Transpl Immunol* *19*, 235-237.
- Fishman, J. A. (2007). Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* *357*, 2601-2614.
- Fishman, J. A., Emery, V., Freeman, R., Pascual, M., Rostaing, L., Schlitt, H. J., Sgarabotto, D., Torre-Cisneros, J., and Uknis, M. E. (2007). Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* *21*, 149-158.
- Fishman, J. A., and Rubin, R. H. (1998). Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* *338*, 1741-1751.
- Fletcher, J. M., Prentice, H. G., and Grundy, J. E. (1998). Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV-induced down-regulation of cell surface class I HLA. *J Immunol* *161*, 2365-2374.
- Forthal, D. N., Phan, T., and Landucci, G. (2001). Antibody inhibition of cytomegalovirus: the role of natural killer and macrophage effector cells. *Transpl Infect Dis* *3 Suppl 2*, 31-34.
- Frascaroli, G., Varani, S., Blankenhorn, N., Pretsch, R., Bacher, M., Leng, L., Bucala, R., Landini, M. P., and Mertens, T. (2009). Human cytomegalovirus paralyzes macrophage motility through down-regulation of chemokine receptors, reorganization of the cytoskeleton, and release of macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* *182*, 477-488.
- Freeman, R. B., Jr. (2009). The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant* *9*, 2453-2458.
- Gamadia, L. E., Remmerswaal, E. B., Surachno, S., Lardy, N. M., Wertheim-van Dillen, P. M., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. (2004a). Cross-reactivity of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells to allo-major histocompatibility complex class I molecules. *Transplantation* *77*, 1879-1885.
- Gamadia, L. E., Remmerswaal, E. B., Weel, J. F., Bemelman, F., van Lier, R. A., and Ten Berge, I. J. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* *101*, 2686-2692.
- Gamadia, L. E., Rentenaar, R. J., Baars, P. A., Remmerswaal, E. B., Surachno, S., Weel, J. F., Toebes, M., Schumacher, T. N., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2001). Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood* *98*, 754-761.
- Gamadia, L. E., van Leeuwen, E. M., Remmerswaal, E. B., Yong, S. L., Surachno, S., Wertheim-van Dillen, P. M., Ten Berge, I. J., and Van Lier, R. A. (2004b). The size and phenotype of virus-specific T cell populations is determined by repetitive antigenic stimulation and environmental cytokines. *J Immunol* *172*, 6107-6114.
- George, M. J., Snyderman, D. R., Werner, B. G., Griffith, J., Falagas, M. E., Dougherty, N. N., and Rubin, R. H. (1997). The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG-Study Group. Cytogam, MedImmune, Inc. Gaithersburg, Maryland. *Am J Med* *103*, 106-113.

Gerna, G., Lilleri, D., Fornara, C., Comolli, G., Lozza, L., Campana, C., Pellegrini, C., Meloni, F., and Rampino, T. (2006a). Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 6, 2356-2364.

Gerna, G., Lilleri, D., Rognoni, V., Agozzino, M., Meloni, F., Oggionni, T., Pellegrini, C., Arbustini, E., and D'Armini, A. M. (2009). Preemptive therapy for systemic and pulmonary human cytomegalovirus infection in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 9, 1142-1150.

Gerna, G., Percivalle, E., Baldanti, F., Sozzani, S., Lanzarini, P., Genini, E., Lilleri, D., and Revello, M. G. (2000). Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol* 74, 5629-5638.

Gerna, G., Sarasini, A., Genini, E., Percivalle, E., and Revello, M. G. (2006b). Prediction of endothelial cell tropism of human cytomegalovirus strains. *J Clin Virol* 35, 470-473.

Gerna, G., Sarasini, A., Patrone, M., Percivalle, E., Fiorina, L., Campanini, G., Gallina, A., Baldanti, F., and Revello, M. G. (2008). Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol* 89, 853-865.

Giacomelli, R., Matucci-Cerinic, M., Cipriani, P., Ghersetich, I., Lattanzio, R., Pavan, A., Pignone, A., Cagnoni, M. L., Lotti, T., and Tonietti, G. (1998). Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 41, 327-334.

Giacomelli, R., Parzanese, I., Frieri, G., Passacantando, A., Pizzuto, F., Pimpo, T., Cipriani, P., Viscido, A., Caprilli, R., and Tonietti, G. (1994). Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 98, 83-88.

Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39, 389-400.

Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-609.

Gloor, J. M., Sethi, S., Stegall, M. D., Park, W. D., Moore, S. B., DeGoey, S., Griffin, M. D., Larson, T. S., and Cosio, F. G. (2007). Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant* 7, 2124-2132.

Goodrum, F., Reeves, M., Sinclair, J., High, K., and Shenk, T. (2007). Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood* 110, 937-945.

Goodrum, F. D., Jordan, C. T., High, K., and Shenk, T. (2002). Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16255-16260.

Grattan, M. T., Moreno-Cabral, C. E., Starnes, V. A., Oyer, P. E., Stinson, E. B., and Shumway, N. E. (1989). Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *Jama* 261, 3561-3566.

Gredmark, S., Tilburgs, T., and Soderberg-Naucler, C. (2004). Human cytomegalovirus inhibits cytokine-induced macrophage differentiation. *J Virol* 78, 10378-10389.

Green, P. H., and Jabri, B. (2006). Celiac disease. *Annu Rev Med* 57, 207-221.

Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W., and The, T. H. (1993). Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 167, 270-277.

Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L. L., Picker, L. J., Anderson, T., Warnke, R. A., Bhan, A. K., Strominger, J. L., and Brenner, M. B. (1989). Human lymphocytes bearing T

cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 169, 1277-1294.

Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., and Spies, T. (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, 6879-6884.

Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., and Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279, 1737-1740.

Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107, 3624-3631.

Hacker, G., Kromer, S., Falk, M., Heeg, K., Wagner, H., and Pfeffer, K. (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, 3984-3989.

Hadaya, K., de Rham, C., Bandelier, C., Bandelier, C., Ferrari-Lacraz, S., Jendly, S., Berney, T., Buhler, L., Kaiser, L., Seebach, J. D., *et al.* (2008). Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 8, 2674-2683.

Hahn, G., Jores, R., and Mocarski, E. S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3937-3942.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 17, 653-664.

Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (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.

Hamada, S., Umemura, M., Shiono, T., Hara, H., Kishihara, K., Tanaka, K., Mayuzumi, H., Ohta, T., and Matsuzaki, G. (2008a). Importance of murine Vdelta1gammadelta T cells expressing interferon-gamma and interleukin-17A in innate protection against *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* 125, 170-177.

Hamada, S., Umemura, M., Shiono, T., Tanaka, K., Yahagi, A., Begum, M. D., Oshiro, K., Okamoto, Y., Watanabe, H., Kawakami, K., *et al.* (2008b). IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. *J Immunol* 181, 3456-3463.

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

Hansen, S. G., Powers, C. J., Richards, R., Ventura, A. B., Ford, J. C., Siess, D., Axthelm, M. K., Nelson, J. A., Jarvis, M. A., Picker, L. J., and Fruh, K. Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science* 328, 102-106.

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

Hata, K., Zhang, X. R., Iwatsuki, S., Van Thiel, D. H., Herberman, R. B., and Whiteside, T. L. (1990). Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin Immunol Immunopathol* 56, 401-419.

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

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

Helantera, I., Loginov, R., Koskinen, P., Tornroth, T., Gronhagen-Riska, C., and Lautenschlager, I. (2005). Persistent cytomegalovirus infection is associated with increased

- expression of TGF-beta1, PDGF-AA and ICAM-1 and arterial intimal thickening in kidney allografts. *Nephrol Dial Transplant* 20, 790-796.
- Hjeltnes, J., Muller, F., Jenssen, T., Rollag, H., Sagedal, S., and Hartmann, A. (2005). Is there a link between cytomegalovirus infection and new-onset posttransplantation diabetes mellitus? Potential mechanisms of virus induced beta-cell damage. *Nephrol Dial Transplant* 20, 2311-2315.
- Hjeltnes, J., Sagedal, S., Hartmann, A., Rollag, H., Egeland, T., Hagen, M., Nordal, K. P., and Jenssen, T. (2004). Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk of new-onset diabetes mellitus and impaired insulin release after renal transplantation. *Diabetologia* 47, 1550-1556.
- Hodson, E. M., Jones, C. A., Webster, A. C., Strippoli, G. F., Barclay, P. G., Kable, K., Vimalachandra, D., and Craig, J. C. (2005). Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 365, 2105-2115.
- Hoffmann, T. W., Halimi, J. M., Buchler, M., Velge-Roussel, F., Goudeau, A., Al-Najjar, A., Marliere, J. F., Lebranchu, Y., and Baron, C. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet* 47, 54-58.
- Hoffmann, T. W., Halimi, J. M., Buchler, M., Velge-Roussel, F., Goudeau, A., Al-Najjar, A., Boulanger, M. D., Houssaini, T. S., Marliere, J. F., Lebranchu, Y., and Baron, C. (2008). Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation* 85, 1406-1411.
- Holtmeier, W., Chowers, Y., Lumeng, A., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M. F. (1995). The delta T cell receptor repertoire in human colon and peripheral blood is oligoclonal irrespective of V region usage. *J Clin Invest* 96, 1108-1117.
- Hue, S., Mention, J. J., Monteiro, R. C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., and Caillat-Zucman, S. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21, 367-377.
- Humar, A., Asberg, A., Kumar, D., Hartmann, A., Moussa, G., Jardine, A., Rollag, H., Mouas, H., Gahlemann, C. G., and Pescovitz, M. D. (2009). An assessment of herpesvirus co-infections in patients with CMV disease: correlation with clinical and virologic outcomes. *Am J Transplant* 9, 374-381.
- Humar, A., Gillingham, K., Payne, W. D., Sutherland, D. E., and Matas, A. J. (2000). Increased incidence of cardiac complications in kidney transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Transplantation* 70, 310-313.
- Humar, A., Gillingham, K. J., Payne, W. D., Dunn, D. L., Sutherland, D. E., and Matas, A. J. (1999). Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 68, 1879-1883.
- Humar, A., Lebranchu, Y., Vincenti, F., Blumberg, E. A., Punch, J. D., Limaye, A. P., Abramowicz, D., Jardine, A. G., Voulgari, A. T., Ives, J., *et al.* The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 10, 1228-1237.
- Humar, A., Mazzulli, T., Moussa, G., Razonable, R. R., Paya, C. V., Pescovitz, M. D., Covington, E., and Alecock, E. (2005). Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *Am J Transplant* 5, 1065-1070.
- Humar, A., and Michaels, M. (2006). American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant* 6, 262-274.
- Hutto, C., Little, E. A., Ricks, R., Lee, J. D., and Pass, R. F. (1986). Isolation of cytomegalovirus from toys and hands in a day care center. *J Infect Dis* 154, 527-530.

- Ibanez, C. E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., and Nelson, J. A. (1991). Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* *65*, 6581-6588.
- Inman, B. A., Frigola, X., Harris, K. J., Kuntz, S. M., Lohse, C. M., Leibovich, B. C., and Kwon, E. D. (2008). Questionable relevance of gamma delta T lymphocytes in renal cell carcinoma. *J Immunol* *180*, 3578-3584.
- Isaacson, M. K., Feire, A. L., and Compton, T. (2007). Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol* *81*, 6241-6247.
- Ismail, A. S., Behrendt, C. L., and Hooper, L. V. (2009). Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol* *182*, 3047-3054.
- Jameson, J., and Havran, W. L. (2007). Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* *215*, 114-122.
- Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F., and Guy-Grand, D. (1990). Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* *20*, 1097-1103.
- Jarvis, M. A., and Nelson, J. A. (2002). Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol* *5*, 403-407.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., and Koszinowski, U. H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* *179*, 1713-1717.
- Kabelitz, D., Wesch, D., and He, W. (2007). Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res* *67*, 5-8.
- Kalil, A. C., Levitsky, J., Lyden, E., Stoner, J., and Freifeld, A. G. (2005). Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med* *143*, 870-880.
- Karrer, U., Sierro, S., Wagner, M., Oxenius, A., Hengel, H., Koszinowski, U. H., Phillips, R. E., and Klenerman, P. (2003). Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *J Immunol* *170*, 2022-2029.
- Khan, N., Hislop, A., Gudgeon, N., Cobbold, M., Khanna, R., Nayak, L., Rickinson, A. B., and Moss, P. A. (2004). Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol* *173*, 7481-7489.
- Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J. A., Sinclair, A. J., Nayak, L., and Moss, P. A. (2002). Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* *169*, 1984-1992.
- Khoury, J. A., Storch, G. A., Bohl, D. L., Schuessler, R. M., Torrence, S. M., Lockwood, M., Gaudreault-Keener, M., Koch, M. J., Miller, B. W., Hardinger, K. L., *et al.* (2006). Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* *6*, 2134-2143.
- Klenerman, P., and Dunbar, P. R. (2008). CMV and the art of memory maintenance. *Immunity* *29*, 520-522.
- Kliem, V., Fricke, L., Wollbrink, T., Burg, M., Radermacher, J., and Rohde, F. (2008). Improvement in Long-Term Renal Graft Survival due to CMV Prophylaxis with Oral Ganciclovir: Results of a Randomized Clinical Trial. *Am J Transplant*.
- Koshiha, T., Li, Y., Takemura, M., Wu, Y., Sakaguchi, S., Minato, N., Wood, K. J., Haga, H., Ueda, M., and Uemoto, S. (2007). Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. *Transpl Immunol* *17*, 94-97.
- Koskinen, P. K., Nieminen, M. S., Krogerus, L. A., Lemstrom, K. B., Mattila, S. P., Hayry, P. J., and Lautenschlager, I. T. (1993a). Cytomegalovirus infection accelerates cardiac

allograft vasculopathy: correlation between angiographic and endomyocardial biopsy findings in heart transplant patients. *Transpl Int* 6, 341-347.

Koskinen, P. K., Nieminen, M. S., Krogerus, L. A., Lemstrom, K. B., Mattila, S. P., Hayry, P. J., and Lautenschlager, I. T. (1993b). Cytomegalovirus infection and accelerated cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant* 12, 724-729.

Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Snyderman, D. R., Allen, U., and Humar, A. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 89, 779-795.

Krech, U. (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ* 49, 103-106.

Krogerus, L., Soots, A., Bruggeman, C., Loginov, R., Ahonen, J., and Lautenschlager, I. (2003). CMV increases TNF-alpha expression in a rat kidney model of chronic rejection. *Transplant Proc* 35, 803.

Kuijpers, T. W., Vossen, M. T., Gent, M. R., Davin, J. C., Roos, M. T., Wertheim-van Dillen, P. M., Weel, J. F., Baars, P. A., and van Lier, R. A. (2003). Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol* 170, 4342-4348.

Kumar, D., Chernenko, S., Moussa, G., Cobos, I., Manuel, O., Preiksaitis, J., Venkataraman, S., and Humar, A. (2009). Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9, 1214-1222.

Kutza, A. S., Muhl, E., Hackstein, H., Kirchner, H., and Bein, G. (1998). High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis* 26, 1076-1082.

Kvale, E. O., Dalgaard, J., Lund-Johansen, F., Rollag, H., Farkas, L., Midtvedt, K., Jahnsen, F. L., Brinchmann, J. E., and Olweus, J. (2006). CD11c+ dendritic cells and plasmacytoid DCs are activated by human cytomegalovirus and retain efficient T cell-stimulatory capability upon infection. *Blood* 107, 2022-2029.

La Rosa, C., Krishnan, A., Longmate, J., Martinez, J., Manchanda, P., Lacey, S. F., Limaye, A. P., and Diamond, D. J. (2008). Programmed death-1 expression in liver transplant recipients as a prognostic indicator of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 197, 25-33.

La Rosa, C., Limaye, A. P., Krishnan, A., Longmate, J., and Diamond, D. J. (2007). Longitudinal assessment of cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses in liver transplant recipients at high risk for late CMV disease. *J Infect Dis* 195, 633-644.

Lacey, S. F., Villacres, M. C., La Rosa, C., Wang, Z., Longmate, J., Martinez, J., Brewer, J. C., Mekhoubad, S., Maas, R., Leedom, J. M., *et al.* (2003). Relative dominance of HLA-B*07 restricted CD8+ T-lymphocyte immune responses to human cytomegalovirus pp65 in persons sharing HLA-A*02 and HLA-B*07 alleles. *Hum Immunol* 64, 440-452.

Lacombe, M. (2002). [Renal transplantation, a centenary epic]. *Ann Chir* 127, 542-548.

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

Lafarge, X., Pitard, V., Ravet, S., Roumanes, D., Halary, F., Dromer, C., Vivier, E., Paul, P., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2005). Expression of MHC class I receptors confers functional intraclonal heterogeneity to a reactive expansion of gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 35, 1896-1905.

Lang, P., Griesinger, A., Hamprecht, K., Feuchtinger, T., Schumm, M., Neuhauser, F., Greil, J., Martin, D., Handgretinger, R., and Niethammer, D. (2004). Antiviral activity against CMV-infected fibroblasts in pediatric patients transplanted with CD34(+)-selected allografts from alternative donors. *Hum Immunol* 65, 423-431.

Lanier, L. L., Ruitenberg, J., Bolhuis, R. L., Borst, J., Phillips, J. H., and Testi, R. (1988). Structural and serological heterogeneity of gamma/delta T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur J Immunol* 18, 1985-1992.

Lefranc, M. P., and Rabbitts, T. H. (1990). A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes. *Res Immunol* 141, 615-618.

Legendre, C., and Pascual, M. (2008). Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences. *Clin Infect Dis* 46, 732-740.

Lemstrom, K., Persoons, M., Bruggeman, C., Ustinov, J., Lautenschlager, I., and Hayry, P. (1993a). Cytomegalovirus infection enhances allograft arteriosclerosis in the rat. *Transplant Proc* 25, 1406-1407.

Lemstrom, K. B., Bruning, J. H., Bruggeman, C. A., Lautenschlager, I. T., and Hayry, P. J. (1993b). Cytomegalovirus infection enhances smooth muscle cell proliferation and intimal thickening of rat aortic allografts. *J Clin Invest* 92, 549-558.

Leogrande, G., Merchionne, F., Lazzarotto, T., and Landini, M. P. (1992). Large-scale testing of human serum to determine cytomegalovirus neutralising antibody. *J Infect* 24, 289-299.

Leslie, D. S., Vincent, M. S., Spada, F. M., Das, H., Sugita, M., Morita, C. T., and Brenner, M. B. (2002). CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* 196, 1575-1584.

Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Masuda, K., Ito, A., Ueda, M., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., *et al.* (2004). Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 4, 2118-2125.

Lilleri, D., Zelini, P., Fornara, C., Comolli, G., and Gerna, G. (2007). Inconsistent responses of cytomegalovirus-specific T cells to pp65 and IE-1 versus infected dendritic cells in organ transplant recipients. *Am J Transplant* 7, 1997-2005.

Limaye, A. P., Bakthavatsalam, R., Kim, H. W., Randolph, S. E., Halldorson, J. B., Healey, P. J., Kuhr, C. S., Levy, A. E., Perkins, J. D., Reyes, J. D., and Boeckh, M. (2006). Impact of cytomegalovirus in organ transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. *Transplantation* 81, 1645-1652.

Lowance, D., Neumayer, H. H., Legendre, C. M., Squifflet, J. P., Kovarik, J., Brennan, P. J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M. R., Coggon, G. L., *et al.* (1999). Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* 340, 1462-1470.

Lozza, L., Lilleri, D., Percivalle, E., Fornara, C., Comolli, G., Revello, M. G., and Gerna, G. (2005). Simultaneous quantification of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells by a novel method using monocyte-derived HCMV-infected immature dendritic cells. *Eur J Immunol* 35, 1795-1804.

Lundqvist, C., and Hammarstrom, M. L. (1993). T-cell receptor gamma delta-expressing intraepithelial lymphocytes are present in normal and chronically inflamed human gingiva. *Immunology* 79, 38-45.

Lusso, P., Garzino-Demo, A., Crowley, R. W., and Malnati, M. S. (1995). Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *J Exp Med* 181, 1303-1310.

Macagno, A., Bernasconi, N. L., Vanzetta, F., Dander, E., Sarasini, A., Revello, M. G., Gerna, G., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. Isolation of human monoclonal antibodies that potentially neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol* 84, 1005-1013.

Maeurer, M. J., Martin, D., Walter, W., Liu, K., Zitvogel, L., Halusczyk, K., Rabinowich, H., Duquesnoy, R., Storkus, W., and Lotze, M. T. (1996). Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med* 183, 1681-1696.

Marshall, G. S., Rabalais, G. P., Stout, G. G., and Waldeyer, S. L. (1992). Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J Infect Dis* *165*, 381-384.

Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* *31*, 321-330.

Martinez-Llordella, M., Lozano, J. J., Puig-Pey, I., Orlando, G., Tisone, G., Lerut, J., Benitez, C., Pons, J. A., Parrilla, P., Ramirez, P., *et al.* (2008). Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* *118*, 2845-2857.

Martinez-Llordella, M., Puig-Pey, I., Orlando, G., Ramoni, M., Tisone, G., Rimola, A., Lerut, J., Latinne, D., Margarit, C., Bilbao, I., *et al.* (2007). Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* *7*, 309-319.

Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* *177*, 7303-7311.

Mattes, F. M., Vargas, A., Kopycinski, J., Hainsworth, E. G., Sweny, P., Nebbia, G., Bazeos, A., Lowdell, M., Klenerman, P., Phillips, R. E., *et al.* (2008). Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant* *8*, 990-999.

Maussang, D., Verzijl, D., van Walsum, M., Leurs, R., Holl, J., Pleskoff, O., Michel, D., van Dongen, G. A., and Smit, M. J. (2006). Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 13068-13073.

McDonald, K., Rector, T. S., Braulin, E. A., Kubo, S. H., and Olivari, M. T. (1989). Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am J Cardiol* *64*, 359-362.

Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., and Sinclair, J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* *77 (Pt 12)*, 3099-3102.

Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T. N., Raulet, D. H., Lanier, L. L., Groh, V., Spies, T., *et al.* (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* *21*, 357-366.

Meresse, B., Curran, S. A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E., *et al.* (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* *203*, 1343-1355.

Mocarski, E. S., Jr. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* *10*, 332-339.

Modlin, R. L., Pirmez, C., Hofman, F. M., Torigian, V., Uyemura, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., and Brenner, M. B. (1989). Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* *339*, 544-548.

Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B. R., Golan, D. E., and Brenner, M. B. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* *3*, 495-507.

Moutaftsi, M., Mehl, A. M., Borysiewicz, L. K., and Tabi, Z. (2002). Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* *99*, 2913-2921.

Mutter, W., Reddehase, M. J., Busch, F. W., Buhring, H. J., and Koszinowski, U. H. (1988). Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J Exp Med* *167*, 1645-1658.

Nanno, M., Seki, H., Mathioudakis, G., Suzuki, R., Itoh, K., Ioannides, C. G., Suzuki, S., Chen, P. F., and Platsoucas, C. D. (1992). Gamma/delta T cell antigen receptors expressed

on tumor-infiltrating lymphocytes from patients with solid tumors. *Eur J Immunol* 22, 679-687.

Nebbia, G., Mattes, F. M., Smith, C., Hainsworth, E., Kopycinski, J., Burroughs, A., Griffiths, P. D., Klenerman, P., and Emery, V. C. (2008). Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4⁺ and pp65 CD8⁺ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am J Transplant* 8, 2590-2599.

Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J. Y., Horuk, R., and Schall, T. J. (1993). Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 72, 415-425.

Nett, P. C., Heisey, D. M., Fernandez, L. A., Sollinger, H. W., and Pirsch, J. D. (2004). Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 78, 1036-1041.

Nickel, P., Bold, G., Presber, F., Biti, D., Babel, N., Kreutzer, S., Pratschke, J., Schonemann, C., Kern, F., Volk, H. D., and Reinke, P. (2009). High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol* 20, 238-242.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34-47.

Ninomiya, T., Takimoto, H., Matsuzaki, G., Hamano, S., Yoshida, H., Yoshikai, Y., Kimura, G., and Nomoto, K. (2000). Vγ1⁺ γδ T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-γ. *Immunology* 99, 187-194.

Norris, S., Collins, C., Doherty, D. G., Smith, F., McEntee, G., Traynor, O., Nolan, N., Hegarty, J., and O'Farrelly, C. (1998). Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 28, 84-90.

Numazaki, K., and Chiba, S. (1997). Current aspects of diagnosis and treatment of cytomegalovirus infections in infants. *Clin Diagn Virol* 8, 169-181.

Orsini, D. L., Res, P. C., Van Laar, J. M., Muller, L. M., Soprano, A. E., Kooy, Y. M., Tak, P. P., and Koning, F. (1993). A subset of Vδ1⁺ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines in vitro. *Scand J Immunol* 38, 335-340.

Orsini, D. L., van Gils, M., Kooy, Y. M., Struyk, L., Klein, G., van den Elsen, P., and Koning, F. (1994). Functional and molecular characterization of B cell-responsive Vδ1⁺ γδ T cells. *Eur J Immunol* 24, 3199-3204.

Paya, C., Humar, A., Dominguez, E., Washburn, K., Blumberg, E., Alexander, B., Freeman, R., Heaton, N., and Pescovitz, M. D. (2004). Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 4, 611-620.

Penfold, M. E., and Mocarski, E. S. (1997). Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* 239, 46-61.

Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K. S., Peng, W., Fu, T., Wang, D. Y., Li, Y., Wang, H. Y., and Wang, R. F. (2005). Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. *Science* 309, 1380-1384.

Peng, G., Wang, H. Y., Peng, W., Kiniwa, Y., Seo, K. H., and Wang, R. F. (2007). Tumor-infiltrating γδ T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 27, 334-348.

Pennington, D. J., Silva-Santos, B., Silberzahn, T., Escorcio-Correia, M., Woodward, M. J., Roberts, S. J., Smith, A. L., Dyson, P. J., and Hayday, A. C. (2006). Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature* 444, 1073-1077.

Percivalle, E., Revello, M. G., Vago, L., Morini, F., and Gerna, G. (1993). Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest* 92, 663-670.

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

Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M. E., Merville, P., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2008). Long term expansion of effector/memory V δ 2neg γ δ T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*.

Poccia, F., Agrati, C., Martini, F., Capobianchi, M. R., Wallace, M., and Malkovsky, M. (2005). Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect* 7, 518-528.

Poggi, A., Venturino, C., Catellani, S., Clavio, M., Miglino, M., Gobbi, M., Steinle, A., Ghia, P., Stella, S., Caligaris-Cappio, F., and Zocchi, M. R. (2004). Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res* 64, 9172-9179.

Poles, M. A., Barsoum, S., Yu, W., Yu, J., Sun, P., Daly, J., He, T., Mehandru, S., Talal, A., Markowitz, M., et al. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy. *J Virol* 77, 10456-10467.

Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U. H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 188, 1047-1054.

Pouria, S., State, O. I., Wong, W., and Hendry, B. M. (1998). CMV infection is associated with transplant renal artery stenosis. *Qjm* 91, 185-189.

Pouteil-Noble, C., Ecochard, R., Landrison, G., Donia-Maged, A., Tardy, J. C., Bosshard, S., Colon, S., Betuel, H., Aymard, M., and Touraine, J. L. (1993). Cytomegalovirus infection--an etiological factor for rejection? A prospective study in 242 renal transplant patients. *Transplantation* 55, 851-857.

Price, D. A., Brenchley, J. M., Ruff, L. E., Betts, M. R., Hill, B. J., Roederer, M., Koup, R. A., Migueles, S. A., Gostick, E., Wooldridge, L., et al. (2005). Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J Exp Med* 202, 1349-1361.

Puig-Pey, I., Bohne, F., Benitez, C., Lopez, M., Martinez-Llordella, M., Oppenheimer, F., Lozano, J. J., Gonzalez-Abraldes, J., Tisone, G., Rimola, A., and Sanchez-Fueyo, A. Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation. *Transpl Int*.

Pulliam, L. (1991). Cytomegalovirus preferentially infects a monocyte derived macrophage/microglial cell in human brain cultures: neuropathology differs between strains. *J Neuropathol Exp Neurol* 50, 432-440.

Pulliam, L., Moore, D., and West, D. C. (1995). Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity. *J Neurovirol* 1, 219-227.

Quinnan, G. V., and Manischewitz, J. E. (1979). The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 150, 1549-1554.

Raasveld, M. H., Bloemena, E., Surachno, S., and ten Berge, R. J. (1992). T gamma/delta lymphocytes in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 7, 530-533.

Radha, R., Jordan, S., Puliyaanda, D., Bunnapradist, S., Petrosyan, A., Amet, N., and Toyoda, M. (2005). Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 5, 110-117.

Rahman, A. A., Teschner, M., Sethi, K. K., and Brandis, H. (1976). Appearance of IgG (Fc) receptor(s) on cultured human fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *J Immunol* 117, 253-258.

- Rasmussen, L., Matkin, C., Spaete, R., Pachl, C., and Merigan, T. C. (1991). Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis* *164*, 835-842.
- Razonable, R. R., Rivero, A., Rodriguez, A., Wilson, J., Daniels, J., Jenkins, G., Larson, T., Hellinger, W. C., Spivey, J. R., and Paya, C. V. (2001). Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* *184*, 1461-1464.
- Reeves, M. B., MacAry, P. A., Lehner, P. J., Sissons, J. G., and Sinclair, J. H. (2005). Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4140-4145.
- Reischig, T., Jindra, P., Hes, O., Bouda, M., Kormunda, S., and Treska, V. (2009). Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation* *87*, 436-444.
- Reischig, T., Jindra, P., Hes, O., Svecova, M., Klaboch, J., and Treska, V. (2008). Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* *8*, 69-77.
- Renneson, J., Dutta, B., Goriely, S., Danis, B., Lecomte, S., Laes, J. F., Tabi, Z., Goldman, M., and Marchant, A. (2009). IL-12 and type I IFN response of neonatal myeloid DC to human CMV infection. *Eur J Immunol* *39*, 2789-2799.
- Rentenaar, R. J., Gamadia, L. E., van DerHoek, N., van Diepen, F. N., Boom, R., Weel, J. F., Wertheim-van Dillen, P. M., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. (2000). Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin Invest* *105*, 541-548.
- Revello, M. G., and Gerna, G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev Med Virol*.
- Reyburn, H. T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D. M., Pazmany, L., and Strominger, J. L. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* *386*, 514-517.
- Ribot, J. C., deBarros, A., Pang, D. J., Neves, J. F., Peperzak, V., Roberts, S. J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A. C., Pennington, D. J., and Silva-Santos, B. (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.
- Rice, G. P., Schrier, R. D., and Oldstone, M. B. (1984). Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 6134-6138.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., and Greenberg, P. D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* *257*, 238-241.
- Rossol, R., Dobbmeyer, J. M., Dobbmeyer, T. S., Klein, S. A., Rossol, S., Wesch, D., Hoelzer, D., Kabelitz, D., and Helm, E. B. (1998). Increase in Vdelta1+ gammadelta T cells in the peripheral blood and bone marrow as a selective feature of HIV-1 but not other virus infections. *Br J Haematol* *100*, 728-734.
- Russano, A. M., Bassotti, G., Agea, E., Bistoni, O., Mazzocchi, A., Morelli, A., Porcelli, S. A., and Spinozzi, F. (2007). CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta+ T lymphocytes. *J Immunol* *178*, 3620-3626.
- Sagedal, S., Hartmann, A., Nordal, K. P., Osnes, K., Leivestad, T., Foss, A., Degre, M., Fauchald, P., and Rollag, H. (2004). Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* *66*, 329-337.
- Sagedal, S., Nordal, K. P., Hartmann, A., Degre, M., Holter, E., Foss, A., Osnes, K., Leivestad, T., Fauchald, P., and Rollag, H. (2000). A prospective study of the natural course

of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation* 70, 1166-1174.

Sagedal, S., Nordal, K. P., Hartmann, A., Sund, S., Scott, H., Degre, M., Foss, A., Leivestad, T., Osnes, K., Fauchald, P., and Rollag, H. (2002). The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2, 850-856.

Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H. N., and Tonegawa, S. (1984). A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 312, 36-40.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

Samani, N. J., Boulby, R., Butler, R., Thompson, J. R., and Goodall, A. H. (2001). Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 358, 472-473.

Samanta, M., Harkins, L., Klemm, K., Britt, W. J., and Cobbs, C. S. (2003). High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 170, 998-1002.

Sampaio, K. L., Cavignac, Y., Stierhof, Y. D., and Sinzger, C. (2005). Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements. *J Virol* 79, 2754-2767.

Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E., and Britt, W. J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* 74, 975-986.

Santin, A. D., Hermonat, P. L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Cannon, M. J., Hiserodt, J. C., Pecorelli, S., and Parham, G. P. (1999). Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology* 200, 187-204.

Schrier, R. D., Rice, G. P., and Oldstone, M. B. (1986). Suppression of natural killer cell activity and T cell proliferation by fresh isolates of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 153, 1084-1091.

Sedmak, D. D., Knight, D. A., Vook, N. C., and Waldman, J. W. (1994). Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Transplantation* 58, 1379-1385.

Seki, S., Abo, T., Masuda, T., Ohteki, T., Kanno, A., Takeda, K., Rikiishi, H., Nagura, H., and Kumagai, K. (1990). Identification of activated T cell receptor gamma delta lymphocytes in the liver of tumor-bearing hosts. *J Clin Invest* 86, 409-415.

Senechal, B., Boruchov, A. M., Reagan, J. L., Hart, D. N., and Young, J. W. (2004). Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* 103, 4207-4215.

Sester, M., Gartner, B. C., Sester, U., Girndt, M., Mueller-Lantzsch, N., and Kohler, H. (2003). Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 76, 1229-1230.

Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Heine, G., Girndt, M., Mueller-Lantzsch, N., Meyerhans, A., and Kohler, H. (2001). Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71, 1287-1294.

Sester, M., Sester, U., Gartner, B. C., Girndt, M., Meyerhans, A., and Kohler, H. (2002). Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol* 13, 2577-2584.

Sester, U., Gartner, B. C., Wilkens, H., Schwaab, B., Wossner, R., Kindermann, I., Girndt, M., Meyerhans, A., Mueller-Lantzsch, N., Schafers, H. J., *et al.* (2005). Differences in

CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 5, 1483-1489.

Sester, U., Presser, D., Dirks, J., Gartner, B. C., Kohler, H., and Sester, M. (2008). PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 8, 1486-1497.

Shahgasempour, S., Woodroffe, S. B., and Garnett, H. M. (1997). Alterations in the expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 after in vitro infection of endothelial cells with a clinical isolate of human cytomegalovirus. *Microbiol Immunol* 41, 121-129.

Shibata, K., Yamada, H., Nakamura, R., Sun, X., Itsumi, M., and Yoshikai, Y. (2008). Identification of CD25+ gamma delta T cells as fetal thymus-derived naturally occurring IL-17 producers. *J Immunol* 181, 5940-5947.

Shin, H., and Wherry, E. J. (2007). CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol* 19, 408-415.

Sinclair, J., and Sissons, P. (1996). Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* 39, 293-301.

Sindhu, S. T., Ahmad, R., Morisset, R., Ahmad, A., and Menezes, J. (2003). Peripheral blood cytotoxic gamma delta T lymphocytes from patients with human immunodeficiency virus type 1 infection and AIDS lyse uninfected CD4+ T cells, and their cytotoxic potential correlates with viral load. *J Virol* 77, 1848-1855.

Singh, N., Wannstedt, C., Keyes, L., Wagener, M. M., Gayowski, T., and Cacciarelli, T. V. (2005). Indirect outcomes associated with cytomegalovirus (opportunistic infections, hepatitis C virus sequelae, and mortality) in liver-transplant recipients with the use of preemptive therapy for 13 years. *Transplantation* 79, 1428-1434.

Sinzger, C., Eberhardt, K., Cavignac, Y., Weinstock, C., Kessler, T., Jahn, G., and Davignon, J. L. (2006). Macrophage cultures are susceptible to lytic productive infection by endothelial-cell-propagated human cytomegalovirus strains and present viral IE1 protein to CD4+ T cells despite late downregulation of MHC class II molecules. *J Gen Virol* 87, 1853-1862.

Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H., and Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76 (Pt 4), 741-750.

Sinzger, C., Plachter, B., Grefte, A., The, T. H., and Jahn, G. (1996). Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis* 173, 240-245.

Sis, B., Jhangri, G. S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., and Halloran, P. F. (2009). Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 9, 2312-2323.

Sissons, J. G., Bain, M., and Wills, M. R. (2002). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect* 44, 73-77.

Slobedman, B., and Mocarski, E. S. (1999). Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol* 73, 4806-4812.

Smith, M. S., Bentz, G. L., Alexander, J. S., and Yurochko, A. D. (2004). Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol* 78, 4444-4453.

Snyder, C. M., Cho, K. S., Bonnett, E. L., van Dommelen, S., Shellam, G. R., and Hill, A. B. (2008). Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity* 29, 650-659.

Snydman, D. R., Werner, B. G., Heinze-Lacey, B., Berardi, V. P., Tilney, N. L., Kirkman, R. L., Milford, E. L., Cho, S. I., Bush, H. L., Jr., Levey, A. S., and et al. (1987). Use of cytomegalovirus immune globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 317, 1049-1054.

Soderberg-Naucler, C. (2006). Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 259, 219-246.

Soderberg-Naucler, C., Fish, K. N., and Nelson, J. A. (1997a). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest* 100, 3154-3163.

Soderberg-Naucler, C., Fish, K. N., and Nelson, J. A. (1997b). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91, 119-126.

Soderberg-Naucler, C., Streblow, D. N., Fish, K. N., Allan-Yorke, J., Smith, P. P., and Nelson, J. A. (2001). Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J Virol* 75, 7543-7554.

Soderstrom, K., Bucht, A., Halapi, E., Gronberg, A., Magnusson, I., and Kiessling, R. (1996). Increased frequency of abnormal gamma delta T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases. *J Immunol* 156, 2331-2339.

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

Spada, F. M., Koezuka, Y., and Porcelli, S. A. (1998). CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 188, 1529-1534.

Speir, E., Modali, R., Huang, E. S., Leon, M. B., Shawl, F., Finkel, T., and Epstein, S. E. (1994). Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265, 391-394.

Spiller, O. B., Hanna, S. M., Devine, D. V., and Tufaro, F. (1997). Neutralization of cytomegalovirus virions: the role of complement. *J Infect Dis* 176, 339-347.

Stein, J., Volk, H. D., Liebenthal, C., Kruger, D. H., and Prosch, S. (1993). Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol* 74 (Pt 11), 2333-2338.

Stern, M., Elsasser, H., Honger, G., Steiger, J., Schaub, S., and Hess, C. (2008). The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 8, 1312-1317.

Strid, J., Roberts, S. J., Filler, R. B., Lewis, J. M., Kwong, B. Y., Schpero, W., Kaplan, D. H., Hayday, A. C., and Girardi, M. (2008). Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis. *Nat Immunol* 9, 146-154.

Strominger, J. L. An alternative path for antigen presentation: group 1 CD1 proteins. *J Immunol* 184, 3303-3305.

Sun, H. Y., Wagener, M. M., and Singh, N. (2008). Prevention of posttransplant cytomegalovirus disease and related outcomes with valganciclovir: a systematic review. *Am J Transplant* 8, 2111-2118.

Sun, J. C., Beilke, J. N., and Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557-561.

Sutmuller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G., and Adema, G. J. (2006a). Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 116, 485-494.

Sutmuller, R. P., Morgan, M. E., Netea, M. G., Grauer, O., and Adema, G. J. (2006b). Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 27, 387-393.

Sutton, C. E., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C., and Mills, K. H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, 331-341.

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

- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J. G., Borysiewicz, L. K., and Sinclair, J. H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 72 (Pt 9), 2059-2064.
- Tomasec, P., Braud, V. M., Rickards, C., Powell, M. B., McSharry, B. P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L. K., McMichael, A. J., and Wilkinson, G. W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031.
- Tong, C. Y., Bakran, A., Peiris, J. S., Muir, P., and Herrington, C. S. (2002). The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation* 74, 576-578.
- Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J., and Ploegh, H. L. (2000). Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 18, 861-926.
- Toulon, A., Breton, L., Taylor, K. R., Tenenhaus, M., Bhavsar, D., Lanigan, C., Rudolph, R., Jameson, J., and Havran, W. L. (2009). A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med* 206, 743-750.
- Toupance, O., Bouedjoro-Camus, M. C., Carquin, J., Novella, J. L., Lavaud, S., Wynckel, A., Jolly, D., and Chanard, J. (2000). Cytomegalovirus-related disease and risk of acute rejection in renal transplant recipients: a cohort study with case-control analyses. *Transpl Int* 13, 413-419.
- Trautmann, L., Rimbart, M., Echasserieau, K., Saulquin, X., Neveu, B., Dechanet, J., Cerundolo, V., and Bonneville, M. (2005). Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* 175, 6123-6132.
- Trzonkowski, P., Mysliwska, J., Szmit, E., Wieckiewicz, J., Lukaszuk, K., Brydak, L. B., Machala, M., and Mysliwski, A. (2003). Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine* 21, 3826-3836.
- Tu, W., Chen, S., Sharp, M., Dekker, C., Manganello, A. M., Tongson, E. C., Maecker, H. T., Holmes, T. H., Wang, Z., Kemble, G., *et al.* (2004). Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol* 172, 3260-3267.
- Tu, W., Potena, L., Stepick-Biek, P., Liu, L., Dionis, K. Y., Luikart, H., Fearon, W. F., Holmes, T. H., Chin, C., Cooke, J. P., *et al.* (2006). T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation* 114, 1608-1615.
- Ullrich, R., Schieferdecker, H. L., Ziegler, K., Riecken, E. O., and Zeitz, M. (1990). gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium. *Cell Immunol* 128, 619-627.
- Uyemura, K., Deans, R. J., Band, H., Ohmen, J., Panchamoorthy, G., Morita, C. T., Rea, T. H., and Modlin, R. L. (1991). Evidence for clonal selection of gamma/delta T cells in response to a human pathogen. *J Exp Med* 174, 683-692.
- Vaessen, L. M., Ouwehand, A. J., Baan, C. C., Jutte, N. H., Balk, A. H., Claas, F. H., and Weimar, W. (1991). Phenotypic and functional analysis of T cell receptor gamma delta-bearing cells isolated from human heart allografts. *J Immunol* 147, 846-850.
- Vaessen, L. M., Schipper, F., Knoop, C., Claas, F. H., and Weimar, W. (1996). Inverted V delta 1/V delta 2 ratio within the T cell receptor (TCR)-gamma delta T cell population in peripheral blood of heart transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 103, 119-124.
- van Dam, J. G., Damoiseaux, J. G., Christiaans, M. H., and Bruggeman, C. A. (2000). Acute primary infection with cytomegalovirus (CMV) in kidney transplant recipients results in the appearance of a phenotypically aberrant CD8+ T cell population. *Microbiol Immunol* 44, 1011-1017.
- van de Berg, P. J., Griffiths, S. J., Yong, S. L., Macaulay, R., Bemelman, F. J., Jackson, S., Henson, S. M., ten Berge, I. J., Akbar, A. N., and van Lier, R. A.

Cytomegalovirus infection reduces telomere length of the circulating T cell pool. *J Immunol* *184*, 3417-3423.

van de Berg, P. J., van Stijn, A., Ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2008). A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *J Clin Virol* *41*, 213-217.

van Leeuwen, E. M., de Bree, G. J., Remmerswaal, E. B., Yong, S. L., Tesselaar, K., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2005). IL-7 receptor alpha chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8+ T cells. *Blood* *106*, 2091-2098.

van Leeuwen, E. M., Gamadia, L. E., Baars, P. A., Remmerswaal, E. B., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2002). Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8+ T cells. *J Immunol* *169*, 5838-5843.

van Leeuwen, E. M., Koning, J. J., Remmerswaal, E. B., van Baarle, D., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. (2006a). Differential usage of cellular niches by cytomegalovirus versus EBV- and influenza virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* *177*, 4998-5005.

van Leeuwen, E. M., Remmerswaal, E. B., Heemskerk, M. H., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2006b). Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4+ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection. *Blood* *108*, 3121-3127.

van Leeuwen, E. M., Remmerswaal, E. B., Vossen, M. T., Rowshani, A. T., Wertheim-van Dillen, P. M., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. (2004). Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol* *173*, 1834-1841.

van Stijn, A., Rowshani, A. T., Yong, S. L., Baas, F., Roosnek, E., Ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2008). Human Cytomegalovirus Infection Induces a Rapid and Sustained Change in the Expression of NK Cell Receptors on CD8+ T Cells. *J Immunol* *180*, 4550-4560.

Varnum, S. M., Streblov, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D. G., 2nd, Rodland, K., Wiley, S., *et al.* (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* *78*, 10960-10966.

Venema, H., van den Berg, A. P., van Zanten, C., van Son, W. J., van der Giessen, M., and The, T. H. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol* *42*, 188-192.

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

Vescovini, R., Biasini, C., Fagnoni, F. F., Telera, A. R., Zanlari, L., Pedrazzoni, M., Bucci, L., Monti, D., Medici, M. C., Chezzi, C., *et al.* (2007). Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects. *J Immunol* *179*, 4283-4291.

Vescovini, R., Biasini, C., Telera, A. R., Basaglia, M., Stella, A., Magalini, F., Bucci, L., Monti, D., Lazzarotto, T., Dal Monte, P., *et al.* Intense antiextracellular adaptive immune response to human cytomegalovirus in very old subjects with impaired health and cognitive and functional status. *J Immunol* *184*, 3242-3249.

Viey, E., Fromont, G., Escudier, B., Morel, Y., Da Rocha, S., Chouaib, S., and Caignard, A. (2005a). Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* *174*, 1338-1347.

Viey, E., Laplace, C., and Escudier, B. (2005b). Peripheral gammadelta T-lymphocytes as an innovative tool in immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* *5*, 973-986.

Vliegen, I., Duijvestijn, A., Grauls, G., Herengreen, S., Bruggeman, C., and Stassen, F. (2004). Cytomegalovirus infection aggravates atherogenesis in apoE knockout mice by both local and systemic immune activation. *Microbes Infect* *6*, 17-24.

Volk, H. D., Reinke, P., Neuhaus, K., Fiebig, H., and von Baehr, R. (1989). Expansion of a CD 3+4-8- TCR alpha/beta- T lymphocyte population in renal allograft recipients. *Transplantation* 47, 556-558.

Wai, L. E., Fujiki, M., Takeda, S., Martinez, O. M., and Krams, S. M. (2008). Rapamycin, but not cyclosporine or FK506, alters natural killer cell function. *Transplantation* 85, 145-149.

Waldman, W. J., Knight, D. A., Adams, P. W., Orosz, C. G., and Sedmak, D. D. (1993). In vitro induction of endothelial HLA class II antigen expression by cytomegalovirus-activated CD4+ T cells. *Transplantation* 56, 1504-1512.

Walker, S., Fazou, C., Crough, T., Holdsworth, R., Kiely, P., Veale, M., Bell, S., Gailbraith, A., McNeil, K., Jones, S., and Khanna, R. (2007). Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis* 9, 165-170.

Waller, E. C., McKinney, N., Hicks, R., Carmichael, A. J., Sissons, J. G., and Wills, M. R. (2007). Differential costimulation through CD137 (4-1BB) restores proliferation of human virus-specific "effector memory" (CD28(-) CD45RA(HI)) CD8(+) T cells. *Blood* 110, 4360-4366.

Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., and Riddell, S. R. (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, 1038-1044.

Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N., and Huang, E. S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424, 456-461.

Weller, T. H., Hanshaw, J. B., and Scott, D. E. (1960). Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12, 130-132.

Wesch, D., and Kabelitz, D. (2003). Differential expression of natural killer receptors on Vdelta1 gammadelta T cells in HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33, 420-425.

Westall, G., Kotsimbos, T., and Brooks, A. (2006). CMV-specific CD8 T-cell dynamics in the blood and the lung allograft reflect viral reactivation following lung transplantation. *Am J Transplant* 6, 577-584.

Westall, G. P., Mifsud, N. A., and Kotsimbos, T. (2008). Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *Am J Transplant* 8, 1749-1754.

Whitelegg, A., and Barber, L. D. (2004). The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens* 63, 101-108.

Wills, M. R., Okecha, G., Weekes, M. P., Gandhi, M. K., Sissons, P. J., and Carmichael, A. J. (2002). Identification of naive or antigen-experienced human CD8(+) T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response. *J Immunol* 168, 5455-5464.

Wolfe, R. A., Ashby, V. B., Milford, E. L., Ojo, A. O., Ettenger, R. E., Agodoa, L. Y., Held, P. J., and Port, F. K. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 341, 1725-1730.

Wu, J., Groh, V., and Spies, T. (2002). T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol* 169, 1236-1240.

Yonekura, K., Ichida, T., Sato, K., Yamagiwa, S., Uchida, M., Sugahara, S., Ito, S., Abo, T., and Asakura, H. (2000). Liver-infiltrating CD56 positive T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Liver* 20, 357-365.

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D., and Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188, 2205-2213.

Zhou, J., Appleton, S. E., Stadnyk, A., Lee, T. D., and Nashan, B. A. (2008). CD8+ gammadelta T regulatory cells mediate kidney allograft prolongation after oral exposure to alloantigen. *Transpl Int* 21, 679-687.

Zhou, Y. F., Guetta, E., Yu, Z. X., Finkel, T., and Epstein, S. E. (1996a). Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 98, 2129-2138.

Zhou, Y. F., Leon, M. B., Waclawiw, M. A., Popma, J. J., Yu, Z. X., Finkel, T., and Epstein, S. E. (1996b). Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* 335, 624-630.

Zhou, Y. F., Yu, Z. X., Wanishawad, C., Shou, M., and Epstein, S. E. (1999). The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 608-613.

Zocchi, M. R., Ferrarini, M., Migone, N., and Casorati, G. (1994). T-cell receptor V delta gene usage by tumour reactive gamma delta T lymphocytes infiltrating human lung cancer. *Immunology* 81, 234-239.

Zocchi, M. R., Ferrarini, M., and Rugarli, C. (1990). Selective lysis of the autologous tumor by delta TCS1+ gamma/delta+ tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas. *Eur J Immunol* 20, 2685-2689.

CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

&

TITRES ET TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Mis à jour le 25-05-2010

Lionel Couzi

N° d'inscription à l'ordre des médecins : 33/12344
N° ADELI : 331123448
N° RPPS : 10002825411

CURRICULUM VITAE

Couzi Lionel

ADRESSE PERSONNELLE :

5, Avenue de Lestrille
33370 Artigues-près-Bordeaux
Téléphone : 05-56-74-70-17
06-88-79-55-38

Mail : lionel.couzi@free.fr

ADRESSE PROFESSIONNELLE :

Praticien Hospitalier

Service de Néphrologie
CHU de Bordeaux – Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba Léon
33076 Bordeaux cedex
Tel: 05 56 79 55 38
Fax: 05 56 79 61 07
Mail : lionel.couzi@chu-bordeaux.fr

Né le 9 décembre 1974 à Bergerac (24).

Nationalité Française.

Marié, 2 enfants

Libéré des obligations légales d'activité militaires le
27-06-2001

Dégagé des obligations légales d'activité militaire le
01-01-2003

MEMBRE

- Membre de la Société de Néphrologie depuis 2006
- Membre de la Société Francophone de Transplantation depuis 2007
- Secrétaire de l'ARIT (Association pour la recherche en Immunologie et en Transplantation)
- Membre de l'association : « Les assises du Don »

EDUCATION

Baccalauréat série C à Bordeaux (33) en 1992.

Etudes de Médecine à l'Université Victor Ségalen
Bordeaux II de 1992 à 1998.

Internat en Médecine à Bordeaux de 1998 à 2003.

TITRES UNIVERSITAIRES

Diplôme d'Etudes Approfondies « Relations Hôte - Greffon » en Transplantation, Université de Besançon en 2001.

Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine, Université Victor Ségalen Bordeaux II, en 2003.

Diplôme d'Etudes Spécialisées en Néphrologie, Université Victor Ségalen Bordeaux II, en 2003.

Chef de Clinique des Universités, Université Victor Ségalen Bordeaux II en novembre 2006.

Inscrit à l'école doctorale Biologie Santé option Immunologie de l'Université de Bordeaux2

TITRES HOSPITALIERS

Interne des Hôpitaux de Bordeaux en 2003

Assistant des Hôpitaux de Bordeaux en 2006

Assistant Hospitalier de Recherche en 2008

Nommé Praticien Hospitalier en Février 2009

STAGES DE RECHERCHE

Stage de DEA, du 01-11-2000 au 01-11-2001 sous la direction du Pr Pierre Merville au Laboratoire d'Immunologie UMR-CNRS 5164 (CIRID) du Pr Moreau (Bordeaux).

Stage de Doctorant du 02-11-2006 au 31-10-2008 dans le Laboratoire d'Immunologie UMR-CNRS 5164 (CIRID) du Pr Moreau (Bordeaux).

FORMATIONS

Participation au CUEN des internes (4 sessions) et aux 3 premiers CUEN des Chef de cliniques (Orateur en 2004 - Participant en 2005 et 2006)

Hesperis Course 2007-2008 (European Society for Organ Transplantation)

Formation ETAPE en Éducation Thérapeutique du Patient (Programme de formation continue 2009 en Aquitaine – 50 heures)

CONTRATS DE RECHERCHE OBTENUS

Appel d'offres interne de la Recherche Clinique du CHU de Bordeaux, 2003

Appel d'offres interne de la Recherche Clinique du CHU de Bordeaux, 2007

COMMUNICATIONS ORALES

- 1 La ciclosporine et le tacrolimus agissent différemment sur les lymphocytes T. Société Francophone de Transplantation 2005 (Tours). **Lionel Couzi**, Jean-Luc Taupin, Jean-François Moreau, Pierre Merville
- 2 Les lymphocytes T gamma delta ont un rôle potentiellement protecteur contre les cancers chez les patients transplantés rénaux. Société Francophone de Transplantation 2006 (Tunis). **Lionel Couzi**, Yann Le vaillant, Karine Martin, Régis Lassalle, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville et Pierre Merville
- 3 CMV-Specific CD8+ T Cells and $\gamma\delta$ T cells undergo parallel expansion and share the same cytotoxic phenotype in kidney transplant recipients affected by a CMV infection. American Transplant Congress 2007 (San Francisco). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Sonia Netzer, Isabelle Garrigue, Jean-François Moreau, Pierre Merville et Julie Déchanet-Merville.
- 4 L'absence d'infection par le Cytomégalovirus est un facteur de risque de cancer chez les patients transplantés rénaux. Société de Néphrologie 2007 (Lyon). **Lionel Couzi**, Abdellah Jamai, Régis Lassalle, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville et Pierre Merville.
- 5 Cytomegalovirus –induced gamma delta T cells have a potential protective role against malignancies in renal transplant recipients. Société Française d'Immunologie 2007 (Lyon). **Lionel Couzi**, Yann Le Vaillant, Abdellah Jamai, Régis Lassalle, Karin Martin, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville and Pierre Merville.

- 6 Le « crossmatch virtuel » améliore l'accès à la transplantation des patients immunisés (exemple de la liste d'attente rénale d'aquitaine). Société Francophone de Transplantation 2007 (Lyon). Taupin J.L., Lionel Couzi, Guidicelli G., Bordes C., Morel D., Moreau K., Fizet D. Merville P., Moreau J.F.
- 7 La dysfonction chronique du greffon est favorisée par l'infection à cytomegalovirus indépendamment de l'expansion des lymphocytes T gamma delta induits par ce virus. Société Francophone de Transplantation 2007 (Lyon). Rigother C., Combe C., Coureau G., Merville P., Lionel Couzi.
- 8 Analyse longitudinale de la réponse lymphocytaire T CD8+ et gamma delta chez des patients transplantés rénaux développant une infection à cytomegalovirus. Société Francophone de Transplantation 2007 (Lyon). **Lionel Couzi**, Pitard V., Netzer S., Garrigue I., Moreau J.F., Merville P., Déchanet-Merville J.
- 9 Les lymphocytes T gamma deltas induits par une infection à Cytomegalovirus ont un rôle potentiellement protecteur contre les cancers chez les patients transplantés rénaux. Société Francophone de Transplantation 2007 (Lyon). **Lionel Couzi**, Jamaï A., Lassalle R., Moreau J.F., Déchanet-Merville J., Merville P.
- 10 Cytomegalovirus-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells have a potential protective role against malignancies in renal transplant recipients. American Transplant Congress 2008 (Toronto). **Lionel Couzi**, Yann Le Vaillant, Abdellah Jamaï, Régis Lassalle, Karin Martin, Nicholas Moore, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville and Pierre Merville.
- 11 Cytomegalovirus-infected cells and tumour cells present similar TCR-ligands but distinct co-stimulatory molecules to activate gamma-delta T cells. World Gamma Delta T cell conference 2008 (Marseille). **Couzi Lionel**, Netzer Sonia, Martin Severine, Pitard Vincent, Moreau Jean-François, Déchanet-Merville Julie.
- 12 Cytomegalovirus-induced V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells have a potential protective role against malignancies in renal transplant recipients. Keystone symposia 2009. Lionel Couzi, Yann Le Vaillant, Abdellah Jamaï, Régis Lassalle, Karin Martin, Nicholas Moore, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville and Pierre Merville
- 13 High expression of CD16 by gamma delta T cells during cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients: implication in their anti-viral and anti-tumor function. CMV Workshop 2009 (Boston). Lionel Couzi, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville.
- 14 Optimisation of Mycophenolic Acid (MPA) Exposure for Early Steroid Withdrawal in Kidney Graft Recipients: The OPERA Trial. American Transplant Congress 2009 (Boston). Y. Le Meur, G. Touchard, F. Glowacki, J. P. Rerolle, V. Garrigue, N. Ouali, A. E. Heng, M. Delahousse, L. Albano, Lionel Couzi, P. Lang, P. F. Westeel, F. Allano, N. Tagieva, L. Rostaing.

- 15 A Virtual Crossmatch Approach to Transplant Sensitized Recipients across a Positive Flow Cytometry Crossmatch. American Transplant Congress 2009 (Boston). Jean-Luc Taupin, Lionel Couzi, Delphine Morel, Karine Moreau, Pierre Merville, Jean-François Moreau
- 16 Optimisation of Mycophenolic Acid (MPA) Exposure for Early Steroid Withdrawal in Kidney Graft Recipients: The OPERA Trial. ESOT 2009 (Paris). Y. Le Meur, G. Touchard, F. Glowacki, J. P. Rerolle, V. Garrigue, N. Ouali, A. E. Heng, M. Delahousse, L. Albano, Lionel Couzi, P. Lang, P. F. Westeel, F. Allano, N. Tagieva, L. Rostaing.
- 17 Morbidité et résultats à moyen terme de la transplantation rénale sur prothèse vasculaire aorto-bifémorale. AFU 2009. Hicham Elkentaoui, Hervé Wallerand, Lionel Couzi, Pierre Merville, Jean-Christophe Bernhard, Philippe Ballanger, Jean-Marie Ferrière, Grégoire Robert
- 18 Facteurs prédictifs de l'observance précoce en transplantation rénale chez des patients ayant accès au logiciel SITO (Système d'Information en Transplantation d'Organes). AFIDTN 2009 (Strasbourg). **Lionel Couzi**, E. Cassuto, B. Moulin, M.P Morin, B. Barrou, S. Barbier, E. Alamartine, E. Morelon, G. Sinnasse-Raymond, L. Mendes, D. Misdrahi, P. Merville
- 19 Facteurs prédictifs de l'observance précoce en transplantation rénale chez des patients ayant accès au logiciel SITO (Système d'Information en Transplantation d'Organes). AFIDTN 2009 (Paris). **Lionel Couzi**, E. Cassuto, B. Moulin, M.P Morin, B. Barrou, S. Barbier, E. Alamartine, E. Morelon, G. Sinnasse-Raymond, L. Mendes, D. Misdrahi, P. Merville
- 20 Interprétation d'un cross match positif en cytométrie en flux à l'ère de l'analyse des anticorps anti-HLA par la technique Luminex® « Single Antigen ». Société de Néphrologie 2009 (Toulouse). **Lionel Couzi**, C. Araujo, G. Guidicelli, T. Bachelet, J.F. Moreau, J.L Taupin and P. Merville.
- 21 Implication du CD16 dans l'activité anti-CMV et anti-tumorale des lymphocytes T gamma delta des patients transplantés rénaux ayant développé une infection à CMV. Société de Néphrologie 2009 (Toulouse). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville.
- 22 Interprétation d'un cross match positif en cytométrie en flux à l'ère de l'analyse des anticorps anti-HLA par la technique Luminex® « Single Antigen ». SFT 2009 (Nice). **Lionel Couzi**, C. Araujo, G. Guidicelli, T. Bachelet, J.F. Moreau, J.L Taupin and P. Merville
- 23 Hauts niveaux d'expression du CD16 sur les lymphocytes T gamma delta induits par le CMV chez les patients transplantés rénaux : Implication dans la réponse allogénique humorale SFT 2009 (Nice). T. Bachelet, Lionel Couzi, V. Pitard, X. Sicard, J.L. Taupin, P. Merville, J.F. Moreau, J. Déchanet-Merville

- 24 De l'hémodialyse à la greffe rénale : approche anthropologique des représentations des patients insuffisants rénaux chroniques. SFT 2009 (Nice)
A. Desseix, P. Merville, Lionel Couzi
- 25 Optimisation de l'exposition à l'acide mycophénolique (MPA) pour une épargne précoce en corticostéroïdes: Etude OPERA. SFT 2009 (Nice). Y. Le Meur, G. Touchard, F. Glowacki, J. P. Rerolle, V. Garrigue, N. Ouali, A. E. Heng, M. Delahousse, L. Albano, Lionel Couzi, P. Lang, P. F. Westeel, F. Allano, N. Tagieva, L. Rostaing.

MODERATION de SESSION

- 1 SFT Nice 2009 – Immunosuppression - Modérateurs : Lionel Couzi (Bordeaux)

COMMUNICATIONS SUR INVITATION

- 1 Imagerie du receveur : suivi à moyen terme et systématique. Symposium Gambro « imagerie en Néphrologie », 2007 (Bordeaux). **Lionel Couzi**
- 2 Education thérapeutique du patient et Accompagnement du patient sous inhibiteurs de m-TOR, 2010 (3^{ème} Journées Interdisciplinaires de la Transplantation, Paris) **Lionel Couzi**

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- 1 Evaluation of immunosuppression using a reporter gene assay in kidney transplant recipient. **Couzi Lionel**, Taupin Jean-Luc, Merville Pierre, Moreau Jean-François. ASN renal week 2004 (Saint-Louis).
- 2 Evaluation of immunosuppression using a reporter gene assay in kidney transplant recipient. **Couzi Lionel**, Taupin Jean-Luc, Merville Pierre, Moreau Jean-François. ATC 2004 (Boston).
- 3 Cyclosporin A and Tacrolimus act differently on IL2-producing T cells. **Couzi Lionel**, Taupin Jean-Luc, Jacqmin-Gadda Hélène, Bergougnot Loïc, Merville Pierre, Moreau Jean-François. ATC 2005 (Seattle)
- 4 Effect of preservation solution on early kidney graft function: comparison of University Wisconsin (UW) solution *versus* Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) solution. Rosier Emmanuelle, **Couzi Lionel**, Merville Pierre. ATC 2005 (Seattle)
- 5 Place du Lymphocyte T CD8+ dans la néphropathie lupique. **Couzi Lionel**, Merville Pierre, Deminière Colette, Moreau Jean-François, Pellegrin Jean-Luc, Viallard, Jean-François, Blanco Patrick. SN 2005 (Clermont-Ferrand).

- 6 Potential protective role of $\gamma\delta$ T cells against malignancies in renal transplant recipients. **Couzi Lionel**, Levailant Yann, Martin Karin, Lassalle Regis, Moreau Jean-François, Dechanet-Merville Julie, Merville Pierre. WTC 2006 (Boston).
- 7 Analyse des propriétés anti-tumorales des lymphocytes T gamma-delta Vdelta2-négatifs. Capone Myriam, Pitard Vincent, **Couzi Lionel**, Merville Pierre, Moreau Jean-François, Déchanet-Merville Julie. Journées du Cancéropole du Grand Sud Ouest 2006 (Toulouse).
- 8 Transfert de gènes codant pour des TCR $\gamma\delta$ réactifs contre des cellules tumorales coliques et des cellules infectées par le CMV. Martin Séverine, Netzer Sonia, **Couzi Lionel**, Pitard Vincent, Moreau Jean-François, Déchanet-Merville Julie. SFT 2006 (Tunis).
- 9 Analyse longitudinale de la réponse lymphocytaire T CD8+ et $\gamma\delta$ chez des transplantés rénaux développant une infection à cytomégalovirus. **Couzi Lionel**, Pitard Vincent, Garrigues Isabelle, Moreau Jean-François, Merville Pierre, Dechanet-Merville Julie. SFT 2006 (Tunis).
- 10 Human Cytomegalovirus genes natural polymorphism and quasispecies distribution in renal transplant recipients. Garrigue I, Faure-Della Corte M, Magnin N, **Couzi Lionel**, Dechanet-Merville J, Merville P, Fleury H, Lafon ME. ESCV 2007.
- 11 CMV-Specific CD8+ T Cells and $\gamma\delta$ T cells undergo parallel expansion and share the same cytotoxic phenotype in kidney transplant recipients affected by a CMV infection. **Couzi Lionel**, Pitard Vincent, Garrigues Isabelle, Moreau Jean-François, Dechanet-Merville Julie, Merville Pierre. CMV workshop 2007 (Toulouse).
- 12 Expansion conjointe des lymphocytes T CD8+ spécifiques du CMV et des lymphocytes T $\gamma\delta$ chez les patients transplantés rénaux après une infection à CMV. **Couzi Lionel**, Pitard Vincent, Garrigues Isabelle, Moreau Jean-François, Merville Pierre, Dechanet-Merville Julie. SN 2007 (Lyon).
- 13 Les lymphocytes T gamma delta des patients transplantés rénaux s'activent contre les cellules infectées par le cytomégalovirus après engagement de leur TCR et grâce à l'interaction ICAM1/LFA1. **Couzi Lionel**, Martin Séverine, Pitard Vincent, Netzer Sonia, Moreau Jean-François, Dechanet-Merville Julie. SN 2007 (Lyon).
- 14 Potential protective role of $\gamma\delta$ T cells against malignancies in renal transplant recipients. **Couzi Lionel**, Levailant Yann, Martin Karin, Lassalle Regis, Moreau Jean-François, Dechanet-Merville Julie, Merville Pierre. ESOT 2007 (Prague).
- 15 Les lymphocytes T gamma deltas induits par une infection à Cytomegalovirus ont un rôle potentiellement protecteur contre les cancers chez les patients transplantés rénaux. **Couzi Lionel**, Levailant Yann, Jamai Abdellah, Martin

- Karin, Lassalle Regis, Moreau Jean-François, Dechanet-Merville Julie, Merville Pierre. Journées du Cancéropole du Grand Sud Ouest 2007 (Bordeaux)
- 16 Cytomegalovirus-infected cells and tumour cells present similar TCR-ligands but distinct co-stimulatory molecules to activate gamma-delta T cells. **Couzi Lionel**, Netzer Sonia, Martin Severine, Pitard Vincent, Moreau Jean-François, Déchanet-Merville Julie. Société Française d'immunologie 2007 (Lyon).
 - 17 La réactivité croisée anti-virale et anti-tumorale des lymphocytes T gamma-delta de patients transplantés requière le même engagement du TCR mais des signaux de co-stimulation distincts. **Couzi Lionel**, Martin S., Pitard S., Moreau V., Déchanet-Merville J. SFT 2007 (Lyon).
 - 18 The immunosuppressive agent mycophenolate mofetil kills lymphocytes through the induction of an active necrotic signalling pathway. Benjamin Chaigne-Delalande, Gwendaline Guidicelli, **Couzi Lionel**, Pierre Merville, Stéphane Boucher, Mathieu Molimard, Jean-François Moreau and Patrick Legembre. American Transplant Congress 2008 (Toronto).
 - 19 Human Cytomegalovirus (HCMV) UL40 variability in renal transplant recipients. Lafon Marie-Edith, Faure-Della Corte Muriel, Magnin Noël, **Couzi Lionel**, Dechanet-Merville Julie, Merville Pierre, Fleury Hervé, Garrigue Isabelle. European society of Virology 2008.
 - 20 Human Cytomegalovirus (HCMV) compartmentalization in pulmonary transplant recipients. Lafon Marie-Edith, Faure-Della Corte Muriel, Samot Johan, Magnin Noël, **Couzi Lionel**, Dechanet-Merville Julie, Merville Pierre, Fleury Hervé, Garrigue Isabelle. European society of Virology 2008.
 - 21 Rôle antiviral et anti-tumoral des lymphocytes T gamma deltas induits par une infection à Cytomegalovirus chez les patients transplantés rénaux. **Couzi Lionel**, Moreau Jean-François, Dechanet-Merville Julie, Merville Pierre. Journées du Cancéropole du Grand Sud Ouest 2008 (Montpellier).
 - 22 Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Identified Using Flow Beads Single Antigen Assays Predict Acute Rejection in Kidney Graft Recipients Transplanted across a Positive Flow Cytometry Crossmatch. American Transplant Congress 2009 (Boston). **Lionel Couzi**, Caroline Araujo, Gwendaline Guidicelli, Thomas Bachelet, Jean-Francois Moreau, Pierre Merville, Jean-Luc Taupin
 - 23 Observational Study on Compliance after Renal Transplantation in Patients with Access to OTIS Software (Organ Transplant Information System): Interim Results at 3 Months. American Transplant Congress 2009 (Boston). **Lionel Couzi**, Marie-Pascale Morin, Elisabeth Cassuto, David Misdrahi, Bruno Moulin, Stephane Barbier, Eric Alamartine, Benoit Barrou, Emmanuel Morelon, Gilles Sinasse-Raymond, Laurence Mendes, Pierre Merville
 - 24 High Expression of CD16 by gamma delta T Cells during Cytomegalovirus

- Infection in Kidney Transplant Recipients: Implication in Their Anti-Viral and Anti-Tumor Function. American Transplant Congress 2009 (Boston). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-Francois Moreau, Julie Dechanet-Merville
- 25 Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Identified Using Flow Beads Single Antigen Assays Predict Acute Rejection in Kidney Graft Recipients Transplanted across a Positive Flow Cytometry Crossmatch. ESOT 2009 (Paris). **Lionel Couzi**, Caroline Araujo, Gwendaline Guidicelli, Thomas Bachelet, Jean-Francois Moreau, Pierre Merville, Jean-Luc Taupin
- 26 Observational Study on Compliance after Renal Transplantation in Patients with Access to OTIS Software (Organ Transplant Information System): Interim Results at 3 Months. ESOT 2009 (Paris). **Lionel Couzi**, Marie-Pascale Morin, Elisabeth Cassuto, David Misdrahi, Bruno Moulin, Stephane Barbier, Eric Alamartine, Benoit Barrou, Emmanuel Morelon, Gilles Sinasse-Raymond, Laurence Mendes, Pierre Merville
- 27 High Expression of CD16 by gamma delta T Cells during Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients: Implication in Their Anti-Viral and Anti-Tumor Function. ESOT 2009 (Paris). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-Francois Moreau, Julie Dechanet-Merville
- 28 High Expression of CD16 by gamma delta T Cells during Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients: Implication in Their Anti-Viral and Anti-Tumor Function. European congress of immunology 2009 (Berlin). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-Francois Moreau, Julie Dechanet-Merville.
- 29 Facteurs prédictifs de l'observance précoce en transplantation rénale chez des patients ayant accès au logiciel SITO (Système d'Information en Transplantation d'Organes). Société de Néphrologie 2009 (Toulouse). **Lionel Couzi**, E. Cassuto, B. Moulin, M.P Morin, B. Barrou, S. Barbier, E. Alamartine, E. Morelon, G. Sinnasse-Raymond, L. Mendes, D. Misdrahi, P. Merville
- 30 Implication du CD16 dans l'activité anti-CMV et anti-tumorale des lymphocytes T gamma delta des patients transplantés rénaux ayant développé une infection à CMV. SFT 2009 (Nice). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-François Moreau, Julie Déchanet-Merville
- 31 Facteurs prédictifs de l'observance précoce en transplantation rénale chez des patients ayant accès au logiciel SITO (Système d'Information en Transplantation d'Organes). SFT 2009 (Nice). **Lionel Couzi**, E. Cassuto, B. Moulin, M.P Morin, B. Barrou, S. Barbier, E. Alamartine, E. Morelon, G. Sinnasse-Raymond, L. Mendes, D. Misdrahi, P. Merville
- 32 High Expression of CD16 by gamma delta T Cells during Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients: Implication in Their Anti-Viral and

Anti-Tumor Function. American Transplant Congress 2010 (San Diego). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-Francois Moreau, Julie Dechanet-Merville

- 33 High level of CD16 expression on CMV-induced gamma delta T Cells in kidney transplant recipients: Implication in the humoral allo-immune response. American Transplant Congress 2010 (San Diego). T. Bachelet, Lionel Couzi, V. Pitard, X. Sicard, J.L. Taupin, P. Merville, J.F. Moreau, J. Déchanet-Merville.
- 34 Interpretation of Positive Flow Cytometric Crossmatch in the Era of Single Antigen Flow Bead Analysis. American Transplant Congress 2010 (San Diego). **Lionel Couzi**, Caroline Araujo, Gwendaline Guidicelli, Thomas Bachelet, Jean-Francois Moreau, Pierre Merville, Jean-Luc Taupin.
- 35 Complication urologique d'un neuroblastome : la fibrose rétropéritonéale.. M.Hennion, O Lapouge , L Couzi, N Grenier, C Deminière, C Vérité, Y Perel. CHU Pellegrin, Bordeaux, France. Société française des cancers de l'enfant 2010.
- 36 High Expression of CD16 by gamma delta T Cells during Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients: Implication in Their Anti-Viral and Anti-Tumor Function. Gamma delta T cell conference 2010 (Kiel). **Lionel Couzi**, Vincent Pitard, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-Francois Moreau, Julie Dechanet-Merville

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

1. Pellegrin I, Garrigue I, Ekouevi D, Couzi L, Merville P, Merel P, Chene G, Schrive MH, Trimoulet P, Lafon ME, Fleury H. New molecular assays to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. **J Infect Dis.** 2000 Jul;182(1):36-42.
2. Bonnet S, Mercie P, Lacape G, Viallard JF, Faure I, Martel J, Couzi L, Leng B, Pellegrin JL. [Macro-CK disclosing disseminated epidermoid carcinoma of the pyriform sinus in a patient with dermatomyositis]. **Rev Med Interne.** 2001 Mar;22(3):292-6.
3. Couzi L, Cluzeau J, Skopinski S, Constans J, Conri C. [Henoch-Schonlein purpura and prostate cancer]. **Rev Med Interne.** 2002 Aug;23(8):717-9.
4. Viallard JF, Bonnet S, Couzi L, Deminiere C, Miossec V, Mercie P, Aparicio M, Pellegrin JL. Glomerulonephritis caused by Actinobacillus actinomycetemcomitans mimicking c-ANCA-positive vasculitis. **Nephrol Dial Transplant.** 2002 Apr;17(4):663-5.
5. Contin C, Couzi L, Moreau JF, Dechanet-Merville J, Merville P. [Immune dysfunction of uremic patients: potential role for the soluble form of CD40].

Nephrologie. 2004;25(4):119-26.

6. Couzi L, Morel D, Deminiere C, Merville P. An unusual endocarditis-induced crescentic glomerulonephritis treated by plasmapheresis.

Clin Nephrol. 2004 Dec;62(6):461-4.

7. Couzi L, Morel D, Merville P, Trimoulet P, Fleury H. Acute hepatitis associated with hepatitis G virus primo-infection in a renal transplant recipient.

Transplantation. 2004 Sep 27;78(6):951-3.

8. Chabchoub K, Lopez L, Turpin F, Couzi L, Merville P, Pariente JL, Ferriere JM. [Radical prostatectomy for clinically localised prostate cancer on renal transplant].

Prog Urol. 2005 Dec;15(6 Suppl 1):1236-9.

9. Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M, Tabrizi R, Schrive MH, Fleury H, Lafon ME. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients.

J Clin Virol. 2006 May;36(1):72-5.

10. Letavernier E, Couzi L, Delmas Y, Moreau K, Murcott O, de Precigout V. Verapamil and mild hyperkalemia in hemodialysis patients: a potentially hazardous association.

Hemodial Int. 2006 Apr;10(2):170-2.

11. Couzi L, Merville P, Deminiere C, Moreau JF, Combe C, Pellegrin JL, Viallard JF, Blanco P. Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis.

Arthritis Rheum. 2007 Jul;56(7):2362-70.

12. Garrigue I, Corte MF, Magnin N, Couzi L, Capdepon S, Rio C, Merville P, Dechanet-Merville J, Fleury H, Lafon ME. Variability of UL18, UL40, UL111a and US3 immunomodulatory genes among human cytomegalovirus clinical isolates from renal transplant recipients.

J Clin Virol. 2007 Oct;40(2):120-8.

13. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, Merville P, Mahfouf W, Bouchet S, Molimard M, Pinson B, Moreau JF, Legembre P. The immunosuppressor mycophenolic acid kills activated lymphocytes by inducing a nonclassical actin-dependent necrotic signal.

J Immunol. 2008 Dec 1;181(11):7630-8.

14. Couzi L, Contin-Bordes C, Marliot F, Sarrat A, Grimal P, Moreau JF, Merville P, Fremeaux-Bacchi V. Inherited deficiency of membrane cofactor protein expression and varying manifestations of recurrent atypical hemolytic uremic syndrome in a sibling pair.

Am J Kidney Dis. 2008 Aug;52(2):e5-9.

15. Couzi L, Thiebaut R, Carron JC, Moreau JF, Merville P, Taupin JL. Immunological monitoring of calcineurin inhibitors for predicting cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients.
Transplantation. 2008 Oct 27;86(8):1060-7.
16. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, Merville P, Fleury H, Lafon ME, Thiebaut R. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients.
J Clin Microbiol. 2008 Feb;46(2):493-8.
17. Garrigue I, Faure-Della Corte M, Magnin N, Recordon-Pinson P, Couzi L, Lebrette ME, Schrive MH, Roncin L, Taupin JL, Dechanet-Merville J, Fleury H, Lafon ME. UL40 human cytomegalovirus variability evolution patterns over time in renal transplant recipients.
Transplantation. 2008 Sep 27;86(6):826-35.
18. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, Lafon ME, Merville P, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection.
Blood. 2008 Aug 15;112(4):1317-24.
19. Chaigne-Delalande B, Guidicelli G, Couzi L, Legembre P. An atypical necrotic signal induced by immunosuppressive and anti-viral agents.
Autophagy. 2009 Apr;5(3):425-7.
20. Chauveau P, Couzi L, Vendrely B, de Precigout V, Combe C, Fouque D, Aparicio M. Long-term outcome on renal replacement therapy in patients who previously received a keto acid-supplemented very-low-protein diet.
Am J Clin Nutr. 2009 Oct;90(4):969-74.
21. Couzi L. OTIS: a promising tool that needs to be evaluated in large studies.
Patient Educ Couns. 2009 Jan;74(1):132.
22. Couzi L, Levaillant Y, Jamai A, Pitard V, Lassalle R, Martin K, Garrigue I, Hawchar O, Siberchicot F, Moore N, Moreau JF, Dechanet-Merville J, Merville P. Cytomegalovirus-Induced $\gamma\delta$ T Cells Associate with Reduced Cancer Risk after Kidney Transplantation.
J Am Soc Nephrol. 2009 Aug 27.
23. Couzi L, Pitard V, Netzer S, Garrigue I, Lafon ME, Moreau JF, Taupin JL, Merville P, Dechanet-Merville J. Common Features of $\gamma\delta$ T Cells and CD8(+) $\alpha\beta$ T Cells Responding to Human Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients.
J Infect Dis. 2009 Nov 1;200(9):1415-24.
24. Nurden P, Tandon N, Takizawa H, Couzi L, Morel D, Fiore M, Pillois X, Loyau S, Jandrot-Perrus M, Nurden AT. An acquired inhibitor to the GPVI platelet collagen receptor in a patient with lupus nephritis.
J Thromb Haemost. 2009 Sep;7(9):1541-9.

25. Robert G, Elkentaoui H, Pasticier G, Couzi L, Merville P, Ravaud A, Ballanger P, Ferriere JM, Wallerand H. Laparoscopic radical prostatectomy in renal transplant recipients.
Urology. 2009 Sep;74(3):683-7.
26. Rodder S, Scherer A, Raulf F, Berthier CC, Hertig A, Couzi L, Durrbach A, Rondeau E, Marti HP. Renal allografts with IF/TA display distinct expression profiles of metzincins and related genes.
Am J Transplant. 2009 Mar;9(3):517-26.
27. Desseix A, Merville P, Couzi L. [Analysis of hemodialysis and graft representations in patients with chronic renal failure: an anthropological approach].
Nephrol Ther. 2010 Apr;6(2):111-20.
28. Elkentaoui H, Robert G, Pasticier G, Bernhard JC, Couzi L, Merville P, Ravaud A, Ballanger P, Ferriere JM, Wallerand H. Therapeutic management of de novo urological malignancy in renal transplant recipients: the experience of the French Department of Urology and Kidney Transplantation from Bordeaux.
Urology. 2010 Jan;75(1):126-32.
29. Fakhouri F, Roumenina L, Provot F, Sallee M, Caillard S, Couzi L, Essig M, Ribes D, Dragon-Durey MA, Bridoux F, Rondeau E, Fremeaux-Bacchi V. Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations.
J Am Soc Nephrol. 2010 May;21(5):859-67.
30. Faure-Della Corte M, Samot J, Garrigue I, Magnin N, Reigadas S, Couzi L, Dromer C, Velly JF, Dechanet-Merville J, Fleury HJ, Lafon ME. Variability and recombination of clinical human cytomegalovirus strains from transplantation recipients.
J Clin Virol. 2010 Feb;47(2):161-9.
31. Behr C, Capone M, Couzi L, Taupin JL and Déchanet-Merville J. $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T Cells, a Multi-Reactive Tissue Subset: from Innate to Adaptive Altered-Self Surveillance.
The Open Immunology Journal, 2009, 2

SERVICES RENDUS

Lionel Couzi

N° d'inscription à l'ordre des médecins : 33/12344

N° ADELI : 331123448

N° RPPS : 10002825411

**FONCTIONS
HOSPITALIERES**

Interne des Hôpitaux

Néphrologie - Transplantation Rénale, Pr Potaux, du 01-11-1998 au 30-04-1999,
Néphrologie - Hémodialyse, Pr Combe, du 01-05-1999 au 31-10-1999,
Médecine interne, Pr Pellegrin, du 01-11-1999 au 30-04-2000,
Cardiologie, Pr Bonnet, du 01-05-2000 au 31-10-2000,
Hémodialyse, Pr Combe, du 01-11-2001 au 30-04-2002,
Néphrologie - Transplantation Rénale, Pr Merville, du 01-04-2002 au 31-10-2002,
Réanimation polyvalente, Dr Badia (Pau), du 01-11-2002 au 30-04-2003,
Immunologie biologique, Pr Moreau, du 01-05-2003 au 01-10-2003.

Chef de Clinique

Assistant des hôpitaux

Néphrologie -Transplantation Rénale, Pr Merville, du 01-11-2003 au 31-10-2006

**FONCTIONS
D'ENSEIGNEMENT**

Participation à l'enseignement de la Néphrologie aux élèves de l'école de sages femmes de Pellegrin (2004, 2005, 2006).

Participation à l'enseignement de la Néphrologie aux élèves de l'institut de formation en soins infirmiers de Xavier-Arnoz (2004).

Participation aux conférences d'internat organisée par l'université, destinées aux étudiants en DCEM4 (Néphrologie)

Participation à la formation continue des Infirmières diplômées d'état dans le cadre de l'association SAISIR. Elaboration d'un diaporama d'information sur la transplantation rénale (2006).

Participation à l'enseignement du DIU Rein et maladies systémiques en collaboration avec Pierre Merville (module diagnostic et manifestation rénale de la néphropathie lupique)

Participation à l'enseignement de la Néphrologie aux étudiants en DCEM 3 à l'université Bordeaux 2

Participation à l'enseignement de la Néphrologie aux étudiants en médecine du service de Néphrologie du CHU de Bordeaux (Cours et cas cliniques).

DIRECTION DE THESES

- 1 Place des lymphocytes T CD8+ dans la néphropathie lupique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine soutenue le 24 mai 2006 par Amélie Sacreste-Ploux (Bordeaux).
- 2 Impact du monitoring immunologique des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2 négatif le jour de la greffe sur le risque de survenue d'infection ou de maladie à CMV dans la première année post-greffe soutenue le 19 octobre 2009 par Thomas Bachelet (Bordeaux)

PARTICIPATION A DES CONFERENCES

- Organisateur de la Réunion annuelle d'information sur la transplantation rénale destinée aux Infirmières de néphrologie d'Aquitaine : 2006, 2007, 2008, 2009, 2010
- Réunion d'information sur la transplantation rénale à la Clinique Saint-Martin (2005)
- Réunion d'information sur la transplantation rénale à la clinique Delay (2005)
- Réunion d'information sur la transplantation rénale avec l'AIRG (2006 - Bordeaux)
- Réunion d'information sur la transplantation rénale au CA3D (2006)
- Réunion d'information sur la transplantation rénale au CA3D (2008)
- Réunion d'information sur la transplantation rénale à la clinique Aressy (PAU 2008)
- FMC urologie (28-03-2009) donneur vivant
- Réunion d'information sur la transplantation rénale avec la FNAIR (2009 - Bordeaux)
- Participation à la journée de formation continue de l'AURAD le mardi 16 février 2010 - Bordeaux (Education thérapeutique en transplantation rénale).
- Participation à la réunion du pôle de médecine du CHU de Bordeaux : Observance en transplantation rénale. Lionel Couzi et Sylvie Morin (jeudi 18 mars 2010 – Bordeaux).

ENCADREMENT du DIPLOME D'ETUDE SPECIALISE de NEPHROLOGIE

- 1 Les lymphocytes T gamma deltas induits par une infection à Cytomegalovirus ont un rôle potentiellement protecteur contre les cancers chez les patients transplantés rénaux. Abdellah Jamai (Bordeaux) en 2007.