



Exploration fonctionnelle de l'activité cytotoxique de lymphocytes T humains en contexte de pathologie et de thérapie

Delphine Guipouy

► To cite this version:

Delphine Guipouy. Exploration fonctionnelle de l'activité cytotoxique de lymphocytes T humains en contexte de pathologie et de thérapie. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30263 . tel-01941126

HAL Id: tel-01941126

<https://theses.hal.science/tel-01941126>

Submitted on 30 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Delphine Guipouy

le lundi 18 décembre 2017

Titre :

Exploration fonctionnelle de l'activité cytotoxique de lymphocytes T humains
en contexte de pathologie et de thérapie

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie

Unité de recherche :

Inserm U1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr Loïc Dupré

Dr Julie Gertner-Dardenne

Jury :

Prof. Roland Liblau, Président du jury

Prof. Francine Jotereau, Rapporteuse

Dr Gaël Ménasché, Rapporteuse

Prof. Nicolas Larmonier, Rapporteur

Remerciements

Cette partie est, comme son nom l'indique, dédiée à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de me construire, mais aussi qui m'ont aidée, soutenue, entourée et aimée au cours de ces 3 ans de thèse, ainsi que le master. J'ai été fortement entourée avec toute la famille, les amis, le laboratoire « Valitutti » et celui de TxCell. Je m'excuse donc d'avance mais cela risque d'être long. Je vais essayer de n'oublier personne mais surtout de faire court sinon je vais avoir besoin de beaucoup de mouchoirs (vous me connaissez, j'ai déjà les larmes qui me montent aux yeux).

Premièrement, je tiens à remercier les membres de mon jury sans qui ma soutenance n'aurait pu avoir lieu. Je remercie le Professeur **Roland Liblau** pour avoir accepté d'être président du jury, qui m'a répondu positivement très rapidement après l'avoir contacté par mail. Je remercie très chaleureusement la Professeure **Francine Jotereau**, **Gaël Ménasché** et le Professeur **Nicolas Larmonier** pour avoir tout d'abord accepté de lire de manuscrit puis de l'avoir lu et analysé en détails. Vos critiques ont toutes été positives et constructives afin de rendre meilleur ce manuscrit.

J'en viens aux chefs maintenant, ceux du CPTP d'abord : **Salvatore** et **Loïc**, je suis très reconnaissante envers vous pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire, où règne une très bonne ambiance. Ensuite, celles de TxCell : **Nathalie** et **Julie**, je suis heureuse d'avoir pu faire partie d'un bout de l'aventure qu'est TxCell, merci de m'avoir permis de faire cette collaboration et de l'avoir menée jusqu'au bout.

Je suis aussi reconnaissante envers **Hans Yssel** et **Ludovic Martinet** pour avoir suivi mon évolution dans cette thèse en ayant accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. J'ai beaucoup aimé nos discussions scientifiques mais aussi personnelles lors de nos différentes rencontres aux congrès ICI à Melbourne ou les 50 ans de la SFI. Je remercie également mon parrain, **Renaud Lesourne**, pour avoir prêté une oreille à mes galères de thèse et m'avoir rassurée. **Cécile Malnou**, merci d'avoir aussi participé au comité de suivi de thèse.

Un bon travail ne peut être effectué que dans un bon environnement, pour cela j'ai eu la chance d'être dans l'équipe « Valitutti » ! Grâce à cet environnement, j'ai toujours eu une personne avec qui discuter, que ce soit un problème scientifique ou personnel, et ainsi d'avoir

les idées claires et avancer. J'ai ri et pleuré (de joie, tristesse ou colère) avec vous. Je n'aurai jamais assez de « Merci » pour vous tous.

Je vais commencer par ceux qui sont dans mon bureau : le « bureau des thésards » que l'on chauffe à chaleur humaine. **Liza**, tu as été bien plus qu'une collègue et tu es devenue une grande amie. On peut discuter de tout avec toi : les résultats étranges, nos chéris, nos week-ends/vacances, etc. Tu as pu être là pour moi dans les bons (EVJF) comme les mauvais moments (mes colères par exemple). Je te souhaite une excellente continuation dans ta vie personnelle avec Simon, ta famille et tes amis mais aussi un épanouissement dans ta thèse. **Romain**, je te remercie beaucoup pour ton soutien qui était présent dans tes blagues et moments de pause, mais aussi les mots d'encouragement dans la dernière ligne droite. Je te souhaite aussi de réussir à t'épanouir dans ta thèse et vie personnelle avec Marie et Pollen (pour ceux qui ne le savent pas, c'est son chat. Eh oui il a craqué ! Personne ne peut résister à ces petites bêtes). **Yolla**, dernière arrivée au bataillon des thésardes « Dupré », Merci aussi pour ton soutien, tu t'es bien occupée de mes « bébés » pendant l'écriture de ce manuscrit. Pour toi, je te souhaite beaucoup de courage, pense positif, prends les opportunités qui viennent à toi et épanouis-toi.

Je continue avec le bureau du chef, où le fauteuil bleu me fait de l'œil dès que j'ai envie de faire une sieste. **Sabina**, peu importe le problème ou la question, tu as toujours su m'aider en trouvant une solution. Je suis reconnaissante de tous les conseils, forts de ton expérience, que tu as pu me donner. **Marie-Pierre**, j'adoooooore ta couleur de cheveux ! Toujours souriante, ça a été très agréable de te côtoyer au quotidien et de papoter avec toi.

Ensuite, le bureau du fond, qui pour moi est « indéfinissable » de par sa composition hétéroclite. **Eric**, merci pour les discussions scientifiques et tes conseils au cours des labmeeting ou à table. Mais celle que j'ai préférée est bien sûr notre discussion sur nos chats respectifs (Eh oui et c'est même la même race : Sibérien !). **Pauline**, comment te décrire ? Plus qu'une postdoc, tu es aussi devenue la « psy » des thésards et réponds/discutes sur tous nos doutes sur l'avenir ou la situation présente. Merci de m'avoir éclairée quand j'étais perdue, mais aussi pour toutes les discussions ordinaires du quotidien. Je suis heureuse de t'avoir connue. **Yoan**, alors si on a moins d'une heure d'incubation, il ne vaut mieux pas te demander ce que tu as fait le week-end sinon on risque de rater le timing. Je te taquine, j'ai beaucoup aimé tous nos papotages au labos mais aussi les sorties Trio d'impro etc. Pour la suite, je te

souhaite beaucoup de courage pour ta fin de thèse et de réussir à choisir ta voie où tu t'épanouiras. J'en profite pour préciser : le Lindy Hop c'est plus classe que le Rock ! **Laurène**, en toi j'ai trouvé une sœur aussi folle des chats que moi ! Je suis heureuse d'avoir pu te transmettre les bases du labo pendant ton master 2 et je suis fière de voir à quel point tu gères rien que sur ta première année de thèse. Que la force des « minouchats » soit avec toi pour finir en beauté ! Je te souhaite du bonheur, autant dans le boulot que le perso (continue le japonais !!) et toujours entourée de chats. **Alice**, toujours mignonne et souriante, je suis contente de t'avoir rencontrée. La pause-café/thé du matin en arrivant au labo avec toi va me manquer (déjà que maintenant, le mercredi, Noélie passe avant). **Edouard**, petit dernier de l'équipe, tu deviens « M. Sandwich » bis, fais attention ! Tu débutes ta thèse donc bonne continuation pour la suite.

Mais l'équipe ne se résume pas seulement à ça, il y a aussi tous ceux qui nous ont quittés trop tôt. **Raïssa**, on s'est suivies et soutenues mutuellement dans nos galères : le master 2, l'été qui a suivi (le pire de ma vie !) et la thèse : Qu'est-ce qu'on a partagé ensemble ! Le must était quand même nos fous rires à la Cantina, décompression garantie. **Javier**, il nous manque ta touche espagnole ! Toujours positif sur tout, c'était super agréable d'être ta « best colleague ». Merci beaucoup pour toutes tes petites blagues (pas toujours comprises) au quotidien. **Zilton**, je suis plus que reconnaissante pour tout ce que tu m'as appris avant même que je commence mon master 2 : ça a été le ciment de ma thèse. **Roxana** et **Régis**, merci pour votre aide et conseils, particulièrement lors de mon master. Mais aussi ceux qui ont été de passage pour un stage comme **Susanne**, ton sourire et ton bonheur était super communicatif, ou encore « mes » stagiaires **Gladys** et **Fanny** qui m'ont donné goût à la pédagogie et la transmission de mes connaissances.

Au bâtiment F, nous avons la chance d'être proches des plateaux techniques, mais pas seulement, nous sommes proches de celles qui les font tourner. Un grand merci à **Fatima**, **Valérie**, **Anne-Laure**, **Sophie**, **Danièle** et **Astrid**. Je suis heureuse d'avoir pu papoter de tout et de rien au quotidien avec vous. C'est rassurant de travailler dans cet environnement.

En revanche, ma vie au laboratoire n'était pas fermée au seul bâtiment F. Je suis reconnaissante envers **Abdel Saoudi** de m'avoir accueillie en stage de master 1 et merci à **Christophe** de m'avoir encadrée à cette époque. Cela a marqué mes débuts dans la pratique de l'Immunologie. Un énorme merci à tous les thésards de ma promo de master 2: **Julie**,

Agathe, Mélanie, Michaël, et Pierre-Paul (la fameuse « Team Mojito » !!). Je suis heureuse de vous avoir rencontrés et d'avoir partagé avec vous des moments riches en émotions : du stress, voire de la panique, mais aussi de la joie et des rires que ce soit en cours, le midi, ou en soirées.

Sur ce, je termine le tour des scientifiques, mais ce n'est pas le seul « corps de métier » qui fait tourner la recherche. Je souhaite donc adresser un grand merci aux services qui font tourner le CPTP : les gestionnaires, le service technique, le magasin et la laverie.

Pour déconnecter de mes journées, je peux toujours compter sur tous mes amis, aussi appelés « la bande des tripodiens » et qui s'est agrandie au fur et à mesure des années et des soirées toulousaines. J'ai rarement su vous dire à quel point je suis heureuse de vous avoir rencontrés et tous les moments partagés avec vous resteront gravés dans ma mémoire. La liste est longue avec **Poppy, Paul, Pauline, Antho, Mili, Lolo, JM, Elo, Zigou, Tatiana, PA, Seb, Velkjo, David, Coralie, Flo, Manon, et Léa** (j'ai l'impression d'oublier quelques personnes, je m'excuse par avance). **Poppy**, *alias* « my valentine », mon cupidon mais aussi ma partenaire de Volley-ball et témoin pour mon mariage. Merci pour tout ce que tu as pu faire pour moi, pour ton soutien et ton amitié. **Pauline**, merci aussi pour ton soutien, pour avoir été une de mes témoins et les discussions interminables en soirée ou au salon de thé où l'on a toujours du mal à s'arrêter et à se dire au revoir. Au cours de la licence et du master, j'ai aussi fait de très bonnes rencontres (Poppy tu en fais aussi partie) avec **Suzanne, Raph', Marie et Popo**. J'ai pu vivre de grands fous rires avec vous, en amphi (oups !), au RU2 piste 2 (re-oups !), aux soirées (ouais !) et aussi en vacances à l'océan (youhou !). **Suzanne**, *alias* ma coloc (ou plutôt ex-coloc), mon petit ourson à la guimauve, et aussi témoin, tu m'as beaucoup apporté sur toutes les années que nous avons partagées ensemble, merci pour tout ! **Raph'**, j'espère que tu as toujours ta passion débordante pour la science qui nous contamine (eh oui, après une heure avec toi on peut finir par se dire que le poisson zèbre c'est génial !). **Marie**, toujours pétillante et prête à faire la fête, ça fait (trop) longtemps que l'on ne s'est pas revues, dommage que l'on ne puisse pas faire le nouvel an ensemble ! **Popo**, la végétarienne (bientôt vegan ?), ah ça tu aimes les plantes, tu fais même une thèse dessus !

Pour finir, je tiens à remercier tous les membres de ma famille sans exception, que ces personnes soient encore là ou pas, parce que je ne serai pas celle que je suis sans votre entourage. Tout d'abord, **Papa**, merci pour tout ce que tu as pu me transmettre au cours de

ma vie, de m'avoir fait confiance dans mes choix et soutenue dans les bons moments mais aussi ceux qui sont difficiles. Je sais que je peux toujours me tourner vers toi en cas de problèmes. Mes sœurs, **Madeleine**, **Murielle**, **Lucile** et **Mélina**, je ne vous le dis pas assez (ou même très rarement) mais je vous aime. Vous êtes toutes uniques et belles et votre soutien pour cette thèse s'est présenté sous de multiples formes qui m'ont aussi permis d'avancer. Un merci particulier à **Mélina** qui a corrigé les fautes d'orthographe de ce manuscrit. A mamie **Louise**, qui, même si elle pense toujours que je cultive des bactéries au lieu de cellules, a toujours eu des mots d'encouragements. Merci à toi, et merci de m'avoir dit que tu étais fière de mon parcours et que maman le serait aussi. Merci aux cousins-cousines **Gjini** pour les encouragements dans la phase finale.

Je vais conclure sur la personne la plus chère à mon cœur : mon amour, mon doudou, et aussi mon mari, **Francis**. Je suis bien plus qu'heureuse d'avoir croisé ton chemin depuis 6 ans maintenant et de construire notre avenir ensemble. Cela a débuté par un PACS lorsque tu es parti pour travailler 2 ans en Angleterre. Ça n'a pas toujours été facile malgré les rendez-vous skype au quotidien et les week-ends allers-retours, mais ça n'a fait que nous renforcer et nous convaincre que nous voulions vivre ensemble. Une fois ton retour, nous avons donc passé une étape supérieure, d'abord par l'adoption de notre « bébé » chat Mallow, puis encore une par notre union de mariage cet été. L'année 2017 aura donc été belle et forte en émotions mais nous avons encore de belles choses à découvrir et à vivre.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
RESUME.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCTION	10
 I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET SON ARME DE DEFENSE MASSIVE : L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE	13
<i>I.1. Vue générale du système immunitaire et présentation des acteurs cellulaires aux capacités cytotoxiques.....</i>	13
I.1.a Les principaux acteurs :	16
I.1.b Les acteurs moins populaires :	17
I.1.c Les nouveaux :	19
<i>I.2. Les multiples rôles de l'activité cytotoxique</i>	21
I.2.a Défense contre les infections virales, bactériennes et parasitaires	21
I.2.b Activité anti-tumorale	22
I.2.c Contrôle de l'homéostasie immunitaire.....	22
I.2.d Implication dans les réponses auto-immunes	24
 II. ASPECTS FONDAMENTAUX DES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES (CLASSIQUES ET NON CLASSIQUES)	25
<i>II.1. Activation et différenciation des lymphocytes T cytotoxiques</i>	25
II.1.a Les lymphocytes T CD8 ⁺	25
II.1.b Les lymphocytes T CD4 ⁺	28
<i>II.2. Fonctions effectrices des lymphocytes T cytotoxiques</i>	30
II.2.b La synapse lytique	30
II.2.a Les granules lytiques	31
II.2.c Les cytokines	33
II.2.d Les voies alternatives de l'activité cytotoxique	34
<i>II.3. Questions ouvertes</i>	35
 III. DEFAUT D'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DANS LE CONTEXTE DU SYNDROME DE WISKOTT-ALDRICH	37
<i>III.1. Le syndrome de Wiskott-Aldrich.....</i>	37
III.1.a Impact sur le système immunitaire inné.....	39
III.1.b Impact sur le système immunitaire adaptatif	40

III.2. Défauts d'activité cytotoxique (NK et CTL)	41
III.2.a Les cellules NK	43
III.2.b Les CTL.....	43
III.3. Questions ouvertes	44
III.3.a Stabilité de la synapse	44
III.3.b Activation de l'intégrine LFA-1	45
IV. ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS : APPLICATION THERAPEUTIQUE.....	47
IV.1. Vue générale des thérapies cellulaires à base de lymphocytes T.....	48
IV.1.a Thérapie cellulaire anti-tumorale	48
IV.1.b Thérapie cellulaire anti-inflammatoire	49
IV.2. Thérapie cellulaire Ovasave®	53
IV.2.a Démarche de développement thérapeutique de l'entreprise TxCell	53
IV.2.b Ovasave® : un produit thérapeutique ciblé pour la maladie de Crohn	54
IV.3 Hypothèses de travail sur le mécanisme d'action des Tr1 Ovasave®.....	56
IV.3.a Activité suppressives « classiques ».....	57
IV.3.b Activité cytotoxique	57
OBJECTIFS.....	59
RESULTATS	61
PARTIE 1. HETEROGENEITE INDIVIDUELLE INTRA-CLONALE DE LYMPHOCYTES T CD8 ⁺ CYTOTOXIQUES LORS D'UNE ACTIVITE DE LYSE SOUTENUE.....	63
Discussion et perspectives (partie 1)	89
PARTIE 2. LA PROTEINE DU SYNDROME DE WISKOTT-ALDRICH CONTROLE LE RING DE NANOCLOUDS DE LFA-1 A LA SYNAPSE LYTIQUE	92
Discussion et perspectives (partie 2)	133
PARTIE 3. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS OVASAVE® SONT DOTES D'UNE ACTIVITE CYTOTOXIQUE ALTERNATIVE VIA LA GRANULYSINE ET LES GRANZYMES.....	136
Discussion et perspectives (partie 3)	170
CONCLUSION.....	174
BIBLIOGRAPHIE.....	176
ANNEXES	195

Liste des abréviations

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
Ag	Antigen
AICD	Activation-induced cell death
APC	Antigen presenting cell
ARP2/ARP3	Actin-related protein2/ Actin-related protein3
ASTrIA	Antigen-Specific Treg for Inflammation and Autoimmunity
CAR	Chimeric antigen receptor
CATS1	Cronh's And Treg cells Study 1
CD	Cluster of differentiation
CDC42	Cell division control protein 42 homolog
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRTAM	Class-I MHC-restricted T-cell associated molecule
cSMAC	Central supramolecular activation cluster
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
DNAM-1	DNAX accessory Molecule-1
dSMAC	Distal supramolecular activation cluster
dSTORM	Direct stochastic optical reconstruction microscopy
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
ENTrIA	Engineered Treg for Inflammation and Autoimmunity
FasL	Fas-ligand
FcR	Fc receptor
Foxp3	Fork-head winged helix transcription factor 3
GBD	GTPase-binding domain
GvHD	Graft versus Host Disease
GzB	Granzyme B
HD	Healthy donor
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN	Interferon

IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cell
iNKT	Invariant natural killer T cell
KAR	Killer activation receptor
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
MTOC	Microtubule organizing center
NK	Natural killer cell
NKG2D	NKG2 C-type lectin-like receptor D
Ova	Ovalbumin
PHA	Phytohemagglutinin
PID	Primary immunodeficiency
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PPP	Polyproline domain
pSMAC	Peripheral supramolecular activation cluster
PSTPIP1	Proline-Serine-Threonine phosphatase interacting protein 1
PTPN12	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12
SIM	Structured illumination microscopy
T _{CM}	Central memory T cell
TCR	T cell receptor
T _{EM}	Effector memory T cell
Tfh	Follicular T helper
Th	T helper
TIL	Tumor-infiltrating lymphocytes
T _N	Naïve T cell
Tr1	Type 1 Treg
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Treg	Regulatory T cell
T _{SCM}	Stem cell-like memory T cell
VCA	Verprolin, cofilin, acidic domain
WAS	Wiskott-Aldrich syndrome
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein

WH1	WASP homology 1 domain
WIP	WASP-interacting protein

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Le système immunitaire inné et adaptatif.

Figure 2. Représentation schématique de l'activation et différenciation des lymphocytes T en réponse à l'activation d'une APC.

Figure 3. Représentation schématique des populations cellulaires immunitaires possédant une activité de lyse.

Figure 4. Modèle progressif de différenciation des lymphocytes T naïfs après reconnaissance de l'antigène présenté par une APC.

Figure 5. Modèle discontinu de différenciation des lymphocytes T.

Figure 6. Modèle de différenciation des CD4 CTL proposé par Takeuchi et Saito.

Figure 7. Architecture de la synapse immunologique conventionnelle

Figure 8. L'activation de WASP, ses partenaires moléculaires et le remodelage du cytosquelette d'actine.

Figure 9. Les fonctions de la protéine WASP au niveau des cellules immunitaires.

Figure 10. Défauts des populations lymphocytaires T CD4+.

Figure 11. Représentation schématique des marqueurs de surface et intracellulaire ainsi que des mécanismes d'actions caractérisant les deux populations Treg : Foxp3⁺ Treg et Tr1.

Figure 12. Recherche et Développement des produits thérapeutiques de TxCell.

Figure 13. Représentation schématique du procédé de production des Tr1 ova-spécifiques pour la thérapie cellulaire Ovasave[®].

Figure 14. Modèle de lyse multiple impliquant plusieurs synapses lytiques avec la repolarisation séquentielle des granules lytiques pour chaque synapses.

Figure 15. Modèle de réflexion sur le rôle de WASP à la synapse lytique.

Tableau 1. Récapitulatif des pourcentages de chacune de populations immunitaires ayant une capacité cytotoxique.

Tableau 2. Récapitulatif des principales protéines composant les granules lytiques.

Tableau 3. Essais cliniques de thérapie cellulaires à base de Treg terminés.

Résumé

Exploration fonctionnelle de l'activité cytotoxique de lymphocytes T humains en contexte de pathologie et de thérapie

Plusieurs populations de cellules immunitaires possèdent une activité cytotoxique permettant l'élimination de cellules altérées. Cette fonction cellulaire est ainsi déterminante dans le contrôle des infections, des processus tumoraux, ou encore des maladies inflammatoires chroniques.

Mon projet de thèse se concentre sur des aspects fondamentaux de l'activité lytique de deux populations de lymphocytes T cytotoxiques : les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs de type 1. Pour cela, l'exploration des mécanismes de cette activité a été conduite au travers de deux modèles, pathologique et thérapeutique, à différentes échelles biologiques : au niveau de la population ou de la cellule individuelle, mais aussi différentes échelles d'organisations moléculaires : cellulaire et nanoscopique.

Nous avons pu démontrer que l'activité de lyse de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques face à un excès de cellules cibles est efficace sur des temps prolongés, reposant sur une capacité individuelle fortement hétérogène à effectuer une lyse multiple. L'importance de cette activité de lyse soutenue a été renforcée par l'identification d'un défaut lytique particulièrement prononcé sur le long-terme chez des lymphocytes T CD8⁺ issus de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich. Ce défaut est lié à une activation réduite de l'intégrine LFA-1 et un délai dans la délivrance du coup létal. De plus, la protéine WASP permet de restreindre LFA-1 de haute-affinité en nanoclusters denses ainsi que de permettre l'organisation en un ring de LFA-1 et la localisation des granules lytiques à l'intérieur de celui-ci.

Par ailleurs, les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs de type 1 développés dans le cadre d'une thérapie cellulaire (Ovasave®) démontrent une capacité de lyse envers les cellules myéloïdes, en complément d'une activité immunosuppressive sur les lymphocytes T conventionnels. Cette activité est mise en place sur du long-terme, jusqu'à atteindre une efficacité optimale, lié à un délai dans la délivrance du coup létal. De manière surprenante, malgré une spécificité pour l'ovalbumine, l'activité cytotoxique semble être indépendante de l'activation du TCR. En outre, la lyse est granzyme-dépendante mais perforine-indépendante. Ainsi ces lymphocytes T thérapeutiques manifestent une activité cytotoxique alternative.

Pour conclure, mon projet de thèse a permis de caractériser une activité de lyse soutenue basée sur une capacité individuelle hétérogène. Cette habilité à soutenir une lyse sur du long-terme implique une stabilité de la synapse, où WASP joue notamment un rôle clé pour l'activation et l'organisation de LFA-1. Les lymphocytes T régulateurs thérapeutiques démontrent aussi une activité de lyse soutenue, cependant les acteurs moléculaires sont non conventionnels. De manière générale, une activité de lyse soutenue permettrait de calibrer une réponse cytotoxique prolongée en rapport à la taille de la population cible, ainsi que le partage avec d'autres fonctions cellulaires comme la sécrétion de cytokines.

Mots-clefs : Activité cytotoxique, lymphocytes T CD8⁺, lymphocytes T régulateurs, syndrome de Wiskott-Aldrich, Thérapie cellulaire.

Abstract

Functional exploration of the cytotoxic activity of human T lymphocytes in the context of pathology and therapy

During different pathological conditions such as infections, tumoral processes or chronic inflammation diseases, altered cells are eliminated through a cytotoxic activity mediated by several immune cell populations. This cellular function is therefore crucial for carrying out the action of the immune system.

My thesis project focuses on fundamental aspects of the lytic activity of two cytotoxic lymphocyte populations: CD8⁺ T cells and type-1 CD4⁺ regulatory T cells. To explore the mechanisms of this activity, this study has been driven on two cases, pathological and therapeutic models, at the population and single-cell levels and also at the cellular and nanoscopic scales of the molecular organisation.

We have been able to demonstrate that the CD8⁺ T cell lysis activity against an excess of target cells is effective over prolonged periods, relying on a highly heterogeneous individual capacity to perform multiple lysis. The importance of this sustained cytotoxic activity was reinforced by the identification of a lytic defect, particularly pronounced on a long time period, of CD8⁺ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. This defect is related to a reduced activation of the LFA-1 integrin and delay in the lethal hit delivery. In addition, the WASP protein allows to restrict high affinity LFA-1 to dense nanoclusters as well as the assembly of LFA-1 ring and the localization of the lytic granules inside this ring. Moreover, type-1 CD4⁺ regulatory T cells from a cellular therapy (Ovasave®) demonstrated a cytotoxic activity toward myeloid cells, additionally to an immunosuppressive activity on conventional T cells. This activity is implemented over long time periods, until reaching optimal efficiency, and is related to a delay in the lethal hit delivery. Surprisingly, despite a specificity for ovalbumin, the cytotoxic activity measured in absence of the antigen suggests a TCR independence. In addition, lysis is not mediated by perforin but is exclusively granzyme-dependent. Thus, these therapeutic T cells exhibit an alternative cytotoxic activity.

To conclude, my thesis project permits to characterize a sustained lysis activity relying on a heterogeneous individual capacity. This ability to sustain a lytic activity involves stability of the synapse, where WASP plays a key role towards the activation and organization of LFA-1. The therapeutic regulatory T lymphocytes also demonstrated a sustained cytotoxic activity, however the molecular actors are unconventional. On the whole, sustained lytic activity would be key to the calibration of cytotoxic responses in relation to the size of the target population, as well as sharing with other cellular functions such as cytokine secretion.

Key words: Cytotoxic activity, CD8⁺ T cells, Regulatory T cells, Wiskott-Aldrich syndrome, Cellular therapy.

Introduction

Avant-propos

Lorsque j'ai commencé à étudier l'immunologie, j'ai eu un coup de cœur pour les cellules « Natural killer » (NK), pour leur capacité à effectuer le « kiss of death ». J'ai alors été fortement attirée par la fonction cytotoxique : par la précision des cellules tueuses pour reconnaître leurs cibles et ensuite l'action de tuer par délivrance du coup létal. Au fur et à mesure des cours, une multitude de types cellulaires ayant cette capacité cytotoxique s'est ouverte à moi. Parmi ces populations j'ai choisi de commencer par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, qui pour moi représentent une armée importante dédiée à l'élimination efficace des cellules transformées de l'organisme. C'est pourquoi j'ai choisi de faire mon stage de M2R dans l'équipe du Professeur Salvatore Valitutti, expert de la synapse lytique, afin d'en savoir plus sur les mécanismes de cette fonction cytotoxique. Ainsi, sous la responsabilité de Loïc Dupré et avec l'aide de Zilton Vasconcelos, j'ai pu faire mes premiers pas dans la caractérisation d'un aspect fondamental de l'activité lytique de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques : quantifier la participation de chaque cellule individuelle à l'activité de lyse globale. Ensuite pour la construction de mon projet de thèse, j'ai décidé d'appliquer mon nouveau savoir-faire dans deux contextes : pathologique avec le syndrome de Wiskott-Aldrich et thérapeutique au travers d'une collaboration avec l'entreprise TxCell. Pour l'application dans le contexte pathologique, j'ai collaboré avec Raïssa Houmadi, dont l'expertise porte sur les techniques de microscopie de super-résolution. Nous avons ainsi pu appréhender l'impact de la déficience en WASP à différentes échelles biologiques : à la fois au niveau de la population sur deux échelles de temps (court et long), mais aussi au niveau cellulaire et nanoscopique. Enfin, pour l'application au contexte thérapeutique, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec Nathalie Belmonte et Julie Gertner-Dardenne de l'entreprise TxCell. Cette dernière développe différentes plateformes d'immunothérapies cellulaires à base de lymphocytes T régulateurs pour le traitement de maladies inflammatoires auto-immunes, ainsi que les troubles inflammatoires liés à la transplantation. Leur produit thérapeutique le plus avancé, Ovasave[®], est développé pour traiter des patients atteints de la maladie de Crohn et a brillamment passé la première phase clinique chez l'Homme. Ce fut alors un nouveau challenge que de décortiquer le mécanisme de l'activité cytotoxique de ces cellules thérapeutiques.

Ainsi, dans les prochaines pages, je souhaite apporter une vue d'ensemble du système immunitaire en mettant l'accent sur la multiplicité des acteurs cellulaires ayant une capacité lytique et les multiples rôles que celle-ci implique. Ensuite je rentrerai plus en détails sur le défaut de lyse des cellules provenant de patients WAS, et enfin sur la thérapie cellulaire Ovasave® et le mécanisme de lyse potentiel de ces cellules régulatrices thérapeutiques.

I. Le système immunitaire et son arme de défense massive : l'activité cytotoxique

La toute première ligne de défense contre les agents extérieurs est composée de barrières tissulaires physiques comme la peau. En cas d'échec de celle-ci, l'organisme animal a développé au cours du temps un système de défense efficace : le système immunitaire.

I.1. Vue générale du système immunitaire et présentation des acteurs cellulaires aux capacités cytotoxiques

Le système immunitaire de l'Homme est composé d'un réseau complexe d'organes lymphoïdes, tissus, cellules, facteurs humoraux et cytokines qui ont évolué simultanément avec notre environnement afin de permettre de nous défendre contre les agents pathogéniques. Dans son rôle protecteur, la surveillance de notre corps l'amène aussi à détecter et éliminer les cellules cancéreuses. D'autre part, il joue aussi un rôle majeur dans l'initiation de processus de réparation tissulaire pour le maintien de l'homéostasie, ainsi que la symbiose avec des micro-organismes bénéfiques constituant le microbiote.

Depuis des décennies, la communauté d'immunologistes a classifié le système immunitaire en deux parties : l'immunité « innée » et l'immunité « adaptative ». Cette classification est justifiée à la fois par le type de cellules engagées dans chacune d'elle mais aussi par la rapidité, la spécificité, la durée et les fonctions effectrices impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire (**figure 1**). Cependant, cette dichotomie entre immunité innée et adaptative tend à s'amenuiser au fur et à mesure de la recherche actuelle montrant que ces deux pans de l'immunité sont étroitement interconnectés, par un dialogue important et une forte complémentarité. En outre, de plus en plus de cellules immunitaires se trouvent à l'interface entre immunités innée et adaptative.

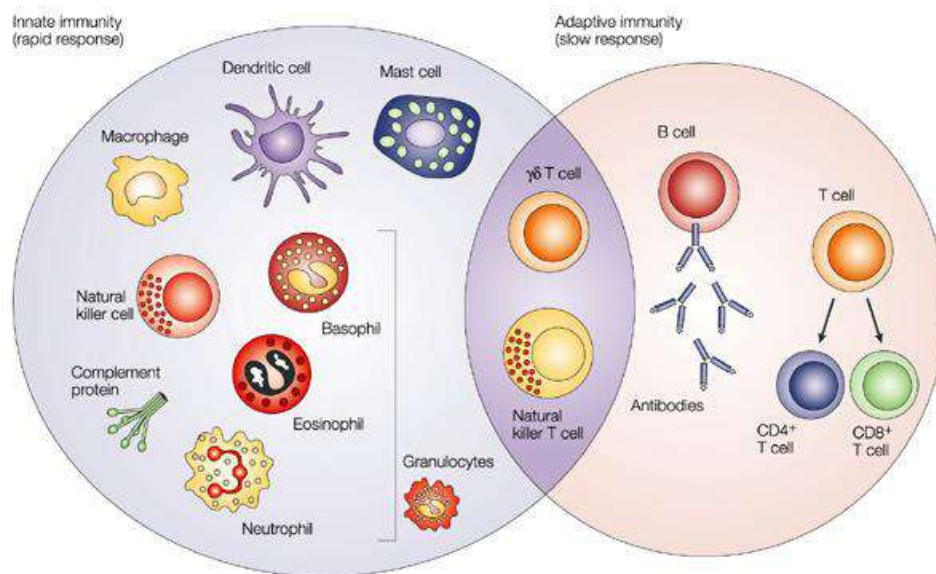


Figure 1. Le système immunitaire inné et adaptatif¹.

L'immunité innée est une réaction quasi-immédiate après une reconnaissance dite non-spécifique permettant ainsi une réponse face à une grande variété de microorganismes différents. De nombreux acteurs cellulaires sont engagés lors de cette réponse. Parmi ces cellules, on retrouve des cellules résidentes des tissus comme les macrophages ou les mastocytes, mais aussi les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques, les basophiles, les éosinophiles, et les cellules NK. Plus récemment, de nouvelles populations lymphoïdes innées ont été caractérisées et nommées ILC comportant 3 sous catégories (ILC1, ILC2 et ILC3). Ensemble, elles constituent la première ligne de défense cellulaire en déclenchant l'attaque initiale et appellent en renfort les cellules de l'immunité adaptative pour « terminer le travail ».

A l'opposé, l'immunité adaptative demande une mise en place plus longue permettant d'identifier les cellules spécifiques du pathogène, avec la capacité de garder en mémoire les pathogènes rencontrés. Cette réponse immunitaire adaptative est conduite par les lymphocytes T et les lymphocytes B. De ce fait, cette réponse est composée d'une réponse cellulaire par l'action des lymphocytes T coordonnant l'action des cellules immunitaires et éliminant les cellules infectées ou tumorales, et d'une réponse humorale basée sur les immunoglobulines produites par les cellules plasmiques. La mise en place de cette immunité adaptative est dépendante de l'immunité innée. En effet, des cellules présentatrices de l'antigène (APC) compétentes, les cellules dendritiques, vont migrer vers les organes

lymphoïdes afin de rencontrer les lymphocytes T et activer ceux étant spécifiques des antigènes présentés. Grâce aux réarrangements génétiques advenus lors de leur développement, la plupart des lymphocytes T $\alpha\beta$ possèdent un récepteur T (TCR) unique, correspondant à un antigène spécifique. De plus, ces lymphocytes T sont caractérisés à la fois par l'expression du marquage de lignage CD3 avec CD4 ou CD8, récepteurs intimement liés à la reconnaissance de la cible. Les lymphocytes T représentent une grande famille de sous-populations incluant les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, les lymphocytes T CD4+ auxiliaires conventionnels (Th1, Th2 et Th17), les lymphocytes T folliculaires (Tfh) et un groupe hétérogène de lymphocytes T régulateurs (Treg) (**figure 2**). Cependant, d'autres sous-populations de lymphocytes T existent ayant une diversité de répertoire du TCR plus réduite : les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les NKT. Toutefois, ces populations cellulaires T se situent à l'interface entre les immunités innée et adaptative.

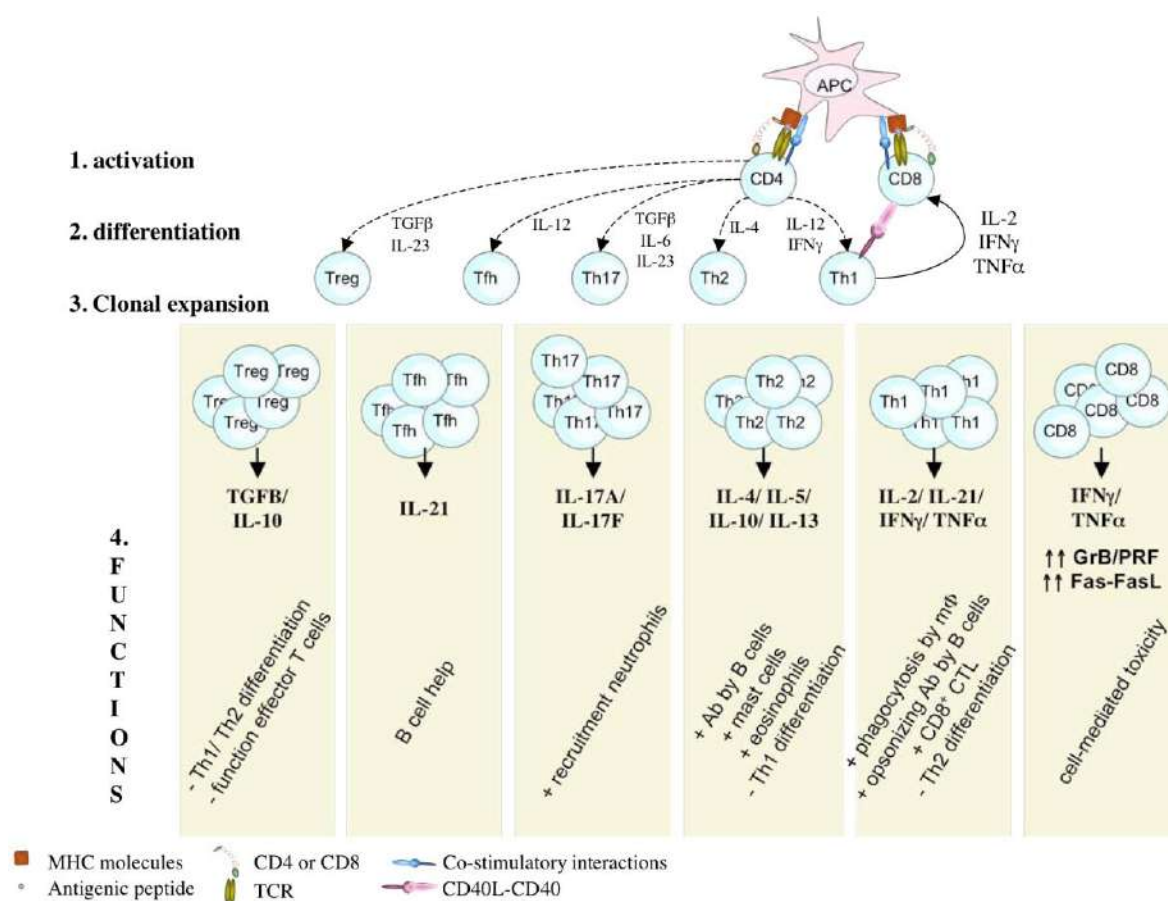


Figure 2. Représentation schématique de l'activation et différenciation des lymphocytes T en réponse à l'activation d'une APC. La reconnaissance de complexes peptide/CMH en combinaison avec les signaux costimulateurs et les cytokines produites par l'APC, entraîne la stimulation du TCR et ainsi l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs. Concernant les T CD4+, le choix du lignage effecteur

conventionnel (Th1, Th2, Th17 et Tfh) ou régulateur se fait selon le contexte cytokinique. Les cellules effectrices subissent ensuite une expansion clonale pour assurer la défense de l'organisme. *Adaptée de la thèse de Julie De Meester, 2011.*

Par ailleurs, un des points communs entre ces deux catégories d'immunité est la fonction cytotoxique qu'arborent plusieurs populations de cellules immunitaires (**Figure 3**). Les acteurs cytotoxiques principalement décrits dans la littérature sont les cellules NK et les lymphocytes T CD8+, mais les lymphocytes $\gamma\delta$ et NKT possèdent aussi une activité lytique. De plus, l'activité suppressive des Treg sur les T conventionnels peut, parmi une multitude de mécanismes identifiés, être effectuée de manière indirecte via l'élimination de l'APC par lyse. Enfin, de nouvelles sous-populations de cellules cytotoxiques ont récemment été caractérisées parmi les lymphocytes T CD4+ : les CD4 CTL.

1.1.a Les principaux acteurs :

Malgré une fonction cytotoxique commune, les cellules NK et les lymphocytes T CD8+ sont des populations cellulaires bien différentes l'une de l'autre, permettant probablement une complémentarité de leur efficacité face au danger.

Premièrement, les cellules NK ont été caractérisées depuis des décennies comme étant des cellules lymphocytaires non T et non B ayant une cytotoxicité naturelle envers des cellules tumorales^{2,3}. Cellules effectrices de l'immunité innée, elles n'ont pas besoin d'activation préalable pour assurer leurs fonctions et remplissent ainsi un rôle important dans l'immuno-surveillance contre les infections virales et les processus tumoraux. Elles n'expriment pas de récepteurs spécifiques de l'antigène, en revanche elles possèdent un large éventail de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui ont pour fonction de différencier le « soi » du « non-soi » (ou soi altéré). L'intégration de tous ces signaux reçus à travers ses récepteurs détermine la réponse des cellules NK⁴. Parmi les signaux activateurs, la perte de l'expression du CMH de classe I est un signal fort ainsi que l'activation synergique de NKG2D et DNAM-1⁵. De plus, les cellules NK sont capables d'effectuer une cytotoxicité anticorps-dépendante (ADCC) grâce à un récepteur de la partie constante des anticorps (Fc γ R), comme CD16 (Fc γ RIII), reconnaissant les anticorps liés aux antigènes de la cellule cible^{6,7}. L'importance de l'activité de lyse des cellules NK sera notamment abordée plus loin dans ce chapitre (*les multiples rôles de l'activité cytotoxiques*) ainsi que le chapitre III (*le syndrome de Wiskott-Aldrich*).

Au contraire des cellules NK, les lymphocytes T CD8⁺ expriment un grand répertoire de TCR spécifiques d'antigènes mais ceux-ci n'ont pas de potentiel lytique au stade naïf, ils l'acquièrent après activation lors de la reconnaissance de peptides présentés par une APC *via* le CMH de classe I. Ceux ayant effectué cette reconnaissance spécifique vont alors subir une forte expansion clonale afin de former une armée de cellules effectrices. Au cours de ce processus, l'expression des molécules lytiques, comme la perforine et le granzyme B ainsi que FasL, augmente afin d'obtenir des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) armés. Pour plus de détails sur l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en CTL, je vous invite à lire le chapitre II de ce manuscrit. Les mécanismes effecteurs de ces CTL y seront aussi précisés.

La comparaison de ces deux populations cytotoxiques au sein d'une même étude a été réalisée par l'équipe de Bousso. Ils ont démontré une différence dans la dynamique de migration dans la tumeur et dans le temps de contact avec les cibles, avec les CTL qui diminuent leur vitesse lorsqu'ils entrent dans la région tumorale et effectuent des contacts plus long avec leurs cibles, comparés aux cellules NK⁸. Par ailleurs, le contenu en molécules lytiques, granzymes et perforine, est très similaire mais avec une quantité plus importante de granulysine est exprimée par les cellules NK⁹. Ainsi, par leur différence de mécanismes de reconnaissance, ces deux populations lytiques peuvent éliminer une grande variété de cibles et suggèrent une complémentarité de fonction de ces cellules.

1.1.b Les acteurs moins populaires :

Cependant, même si les CTL et les cellules NK ont été les premiers à être identifiés comme cellules dont la fonction principale est la cytotoxicité, d'autres populations cellulaires possédant cette activité ont été caractérisées et peuvent compléter l'élimination des cellules altérées de l'organisme telles que les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules iNKT.

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été nommés ainsi du fait de la composition de leur TCR par les chaînes γ et δ . Cette population représente 1 à 10% des lymphocytes T circulants et est abondamment présente au niveau des tissus comme la peau ou la muqueuse intestinale. Contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$, les T $\gamma\delta$ sont capables d'initier rapidement la réponse immunitaire sans passer par des phases d'expansion clonale ou de différenciation¹⁰. D'un autre côté, ces cellules subissent aussi un réarrangement du TCR, avec un répertoire plus limité pour la chaîne γ ¹¹, et une mémoire immunologique comme lors d'une réponse

immunitaire adaptative^{12,13}. Ces cellules sont qualifiées de non conventionnelles car elles reconnaissent des antigènes sous forme native, phosphorylés ou des lipides, et sans restriction aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)¹⁴⁻¹⁶. Leurs mécanismes effecteurs sont similaires aux lymphocytes T $\alpha\beta$ avec une capacité à éliminer les cellules infectées par des récepteurs de la mort (ex Fas/FasL) ou *via* le couple de molécules lytiques granzyme B/perforine ou encore *via* la production de cytokines. En revanche, par une reconnaissance d'antigènes généralement non vus par les lymphocytes T $\alpha\beta$, les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle non redondant dans l'immunosurveillance des tissus.

D'autre part, les cellules iNKT, signifiant cellules NKT « invariantes », représentent une population particulière de lymphocytes T issus du thymus qui expriment à la fois des marqueurs de cellules NK avec un TCR semi-invariant (une chaîne α strictement conservée combinée avec un nombre limité de chaînes β). Ces cellules agissent comme des sentinelles immunitaires reconnaissant des antigènes lipidiques présentés par CD1d (une molécule similaire au CMH de classe I)^{17,18}. Les iNKT sont rapidement activés lors d'une infection et orchestrent à la fois le système immunitaire inné et adaptatif par leur production cytokinique. Elles jouent un rôle clef dans le contrôle de l'infection et l'immuno-surveillance anti-tumorale^{19,20}. Enfin, elles sont aussi impliquées dans la protection contre certaines maladies auto-immunes²¹.

Par ailleurs, n'oublions pas les lymphocytes T régulateurs (Treg) ayant un rôle primordial pour le maintien de la tolérance périphérique. Ils ont été caractérisés chez l'Homme comme des lymphocytes T CD4⁺ exprimant constitutivement et fortement la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 2, CD25²². Suite à leur identification, ils ont été amplement étudiés permettant l'identification du facteur de transcription Foxp3 caractéristique de cette population et clef dans leur fonction suppressive²³. Cette fonction suppressive se révèle être médiée par différents mécanismes d'actions. Quatre grands modes d'action sont possibles avec (i) les cytokines immunosuppressives (comme l'IL-10), (ii) la perturbation métabolique (comme la production d'adénosine via les ectoenzymes CD39/CD73), (iii) l'immunosuppression directe de la maturation et fonction des cellules présentatrices de l'antigène (via CTLA-4 par exemple), ou encore (iv) la cytolyse directe afin d'éliminer des APC, mais aussi des lymphocytes T effecteurs²⁴. Cette dernière est possible grâce aux molécules lytiques granzyme B et perforine. En revanche, la reconnaissance pour l'induction de cette lyse par les molécules lytiques n'est

pas claire (en lien avec la figure 3), pour les APC, cela pourrait être médié par une reconnaissance *via* le TCR et le complexe peptide-CMH, mais il a aussi été démontré que la lyse peut être déclenchée par les récepteurs Trail²⁵ ou DNAM-1²⁶.

1.1.c Les nouveaux :

Aux côtés des fonctions « helper » ou suppressive, les lymphocytes T CD4⁺ présentant une activité cytotoxique directe en réponse à des agents pathogènes variés ont été identifiés chez l'Homme et la souris. Ces cellules pourraient potentiellement contribuer, au même titre que les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, à la surveillance immune des cancers en induisant la lyse spécifique des cellules malignes. Ce qui représente un nouvel intérêt en tant qu'alternative aux traitements anti-cancéreux que ce soit en thérapie cellulaire ou dans la conception d'immunothérapies. L'activation et différenciation de lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques (CD4 CTL) seront abordés plus en détails dans le chapitre II.

Afin de pouvoir comparer toutes ces populations immunitaires présentant une activité cytotoxique, leurs nombres relatifs et absolus dans le sang ont été répertoriés (**Tableau 1**). En outre, une représentation schématique reprend les principaux mécanismes de reconnaissance de la cible et les principaux médiateurs de leur activité cytotoxique (**Figure 3**).

Type cellulaire	Nombre absolu (x10 ⁹ /L de sang)	Nombre relatif (%)
Lymphocytes T (totaux)	0.78-3.0	50-91 ^a
Cellules NK	0.10-1.2	5-49 ^a
Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques	0.2-1.2	12-40 ^a
Lymphocytes Tγδ	0.025-0.2	0.83-11 ^a
Cellules NKT	0.023-0.41	1-18 ^a
Lymphocytes T régulateurs	0.025-0.18	4-17 ^b
Lymphocytes T CD4 ⁺ cytotoxiques	N.A	N.A

Tableau 1. Récapitulatif des pourcentages de chacune de populations immunitaires ayant une capacité cytotoxique. Ces chiffres ont été obtenus à partir d'une étude sur les populations lymphocytaires T sur une cohorte de 13 à 21 personnes saines²⁷. a : % parmi la population totale de lymphocytes périphériques ; b : % parmi les lymphocytes T CD4⁺

Ainsi, les acteurs principaux de l'activité cytotoxique immunitaire, cellules NK et CD8⁺ CTL, représentent les populations les plus importantes en nombre au niveau du sang périphérique.

En revanche, même si l'induction de l'apoptose se fait principalement *via* le couple perforine/granzyme B ou le récepteur de mort Fas, la reconnaissance de la cible est quasiment unique à chaque type cellulaire. Par exemple, cette reconnaissance peut être effectuée par une reconnaissance spécifique, restreinte au CMH de classe I ou II, ou d'autres molécules similaires au CMH, en lien avec une nature de l'antigène reconnu différente, ou par la combinaison d'autres récepteurs activateurs et inhibiteurs (KAR et KIR). De ce fait, chaque population cytotoxique démontre peu de redondance dans la reconnaissance de leurs cibles, impliquant une complémentarité dans la fonction cytotoxique globale lors de contextes pathologiques comme les infections ou le processus tumoral.

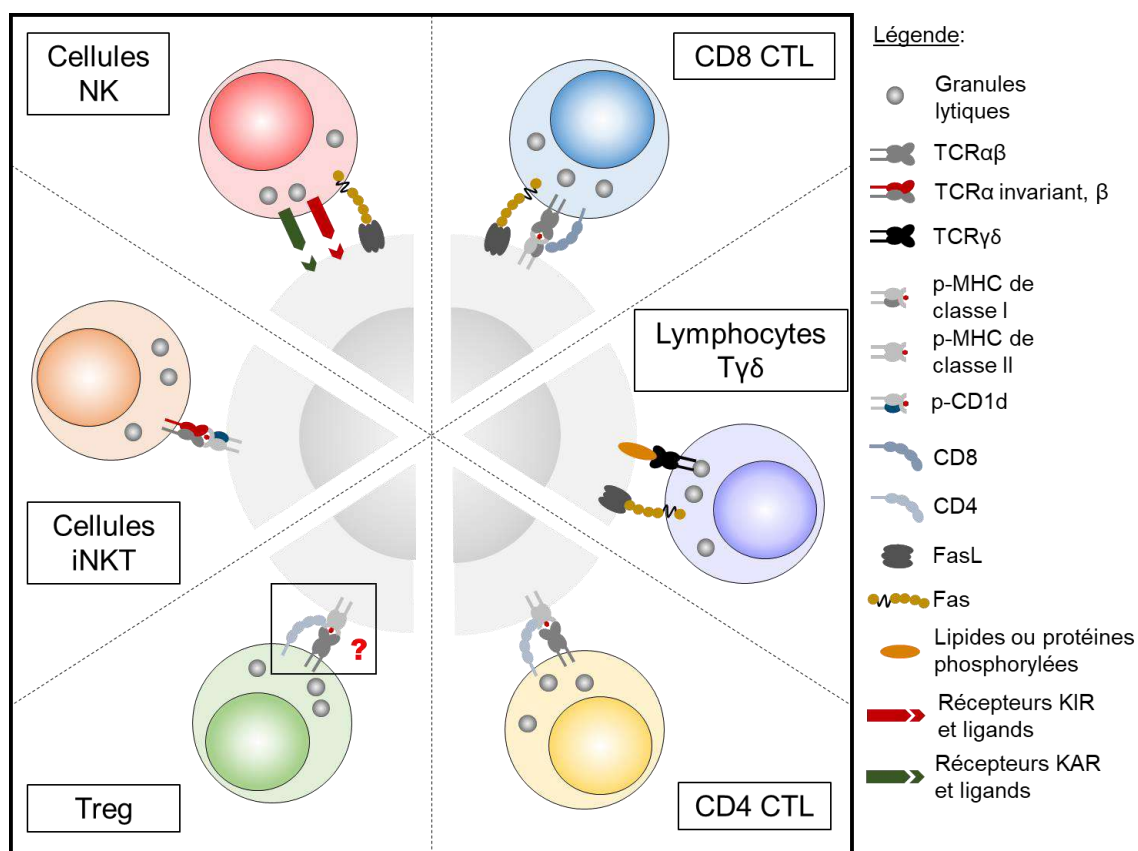


Figure 3. Représentation schématique des populations cellulaires immunitaires possédant une activité de lyse. Ici est représenté la reconnaissance de la cellule cible (grise) pour sa lyse contact-dépendante *via* la délivrance des granules lytiques ou le récepteur de mort Fas. Certaines sous-populations, parmi les cellules NK ou les lymphocytes T $\gamma\delta$, expriment le FcR CD16 permettant la lyse par un phénomène appelé ADCC. De plus, un point commun aux cellules NK, CD8 CTL, CD4 CTL, T $\gamma\delta$, et iNKT est l'expression du récepteur activateur NKG2D (faisant parti des KAR représentés ici pour les cellules NK).

Par ailleurs, la présentation des cellules immunitaires ayant une capacité cytotoxique dans ce manuscrit n'est pas exhaustive. Parmi les cellules immunitaires composant l'immunité innée,

il a été décrit que les neutrophiles²⁸, les monocytes/macrophages²⁹ mais aussi une sous-population de cellules dendritiques³⁰ expriment une molécule lytique clé, le granzyme B, et peuvent exercer une activité cytotoxique.

En outre, récemment Wang et collaborateurs ont identifiés une nouvelle population appelée « NKB » pour des cellules B « NK-like ». En effet ces cellules expriment à la fois CD19 et un BCR mais aussi un marqueur de cellule NK, NK1.1³¹. Les auteurs ont caractérisé une action innée très rapide avec une sécrétion de cytokines (IL-18 & IL-12). En revanche ils n'ont pas décelé d'activité cytotoxique face à une lignée de lymphome. Néanmoins, ces cellules pourraient se révéler lytiques dans d'autres contextes que le cancer, comme les infections ou encore l'auto-immunité.

Pour conclure, la multiplicité des types cellulaires présentant une activité cytotoxique suggère que celle-ci est au cœur de notre système immunitaire.

1.2. Les multiples rôles de l'activité cytotoxique

Etant donné le rôle de défense du système immunitaire, cette activité cytotoxique a évidemment un rôle bénéfique envers l'organisme par l'élimination des agents pathogènes, la surveillance de processus tumoraux mais aussi pour l'homéostasie des cellules effectrices afin que la réponse immunitaire ne dégénère pas une fois le danger passé. D'un autre côté, si mal contrôlées, ces cellules cytotoxiques peuvent attaquer le soi, entraînant des maladies auto-immunes. Ainsi, j'adresserai ici les rôles de l'activité cytotoxique médiée par les cellules immunitaires précédemment présentées, avec une accentuation particulière sur les acteurs principaux, et les plus étudiés : les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les cellules NK.

1.2.a Défense contre les infections virales, bactériennes et parasitaires

Une réponse immunitaire protectrice contre l'invasion de pathogènes, qu'ils soient d'origines virale, bactérienne ou parasitaire, consiste en un effort concerté d'une multitude de cellules effectrices innées et adaptatives. Ainsi les cellules cytotoxiques vont contribuer à la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées de l'organisme. Les populations cellulaires plus connues pour leur activité lytique directe des cellules infectées sont les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Les cellules NK entrent en action rapidement, puis une fois l'armée de clones effecteurs CD8⁺ spécifiques activés, ceux-ci vont compléter

l'action des cellules NK. Les cellules NKT ne sont pas en reste, elles jouent aussi un rôle dans l'élimination de cellules infectées par cytotoxicité directe, dans un contexte d'infections virales^{32,33,34}. Mis à part une activité cytotoxique bien identifiée envers les cellules infectées, la fonction lytique est aussi utilisée contre les cellules immunitaires afin de mener à bien l'infection. En effet, l'activité de lyse des cellules NK joue aussi un rôle dans l'élimination de lymphocytes T régulateurs, afin de moduler leur présence et ainsi leur activité suppressive, dans le contexte d'une infection à *mycobacterium tuberculosis*³⁵. De plus, les cellules NK sont aussi capables de tempérer la réponse des lymphocytes T par lyse de ces derniers³⁶. En effet, en l'absence de cellules NK, la réponse antivirale est plus rapide et efficace mais cela aboutit à l'émergence d'auto-immunité³⁷. Ainsi en cas d'infection chronique, l'activité de lyse des NK permet aussi de réguler la réponse T afin d'éviter des dommages collatéraux sur les tissus sains.

1.2.b Activité anti-tumorale

Burnet a été le premier scientifique à émettre le concept d'immuno-surveillance tumorale en 1970³⁸. Depuis, il a été largement admis que les mécanismes cytotoxiques exercés à la fois par des cellules immunitaires innées (comme les cellules NK) et des cellules immunitaires adaptatives (comme les CTL) contribuent à l'immunité anti-tumorale en éliminant les cellules du soi transformées ou en créant un environnement local empêchant la croissance tumorale. Cette notion est renforcée par l'observation de souris déficientes pour le gène codant la perforine : en effet, celles-ci développent spontanément des tumeurs avec l'âge, en particulier des lymphomes B³⁹. De même, chez l'Homme, il a été suggéré que des mutations bi- ou mono-alléliques du gène codant la perforine perturbent les mécanismes d'immuno-surveillance basés sur l'activité cytotoxique, favorisant ainsi l'émergence de lymphoproliférations malignes, telles des lymphomes B et T et la maladie de Hodgkin⁴⁰. Ainsi les cellules lytiques exprimant la perforine, incluant les CTL, les cellules NK, les cellules NKT⁴¹ et les $T\gamma\delta$ sont nécessaires dans la surveillance immunitaire anti-tumorale.

1.2.c Contrôle de l'homéostasie immunitaire

Les lymphocytes T ayant une spécificité antigénique donnée sont présents en un nombre très réduit dans des conditions non pathologiques. En effet, de nombreuses études chez la souris établissent un nombre de lymphocytes T spécifiques d'un antigène compris entre 50 et 100

cellules/rates (définis chez la souris)⁴²⁻⁴⁶. En revanche, une fois l'expansion clonale effectuée, une armée de clones effecteurs prêts à tuer sont formés. Blattman et collaborateurs ont notamment estimé que suite à une infection (LCMV), les lymphocytes T CD8⁺ subissent plus de 14 divisions en 1 semaine, générant ainsi une population d'environ 10 millions d'effecteurs⁴⁴. Une fois le pathogène éliminé de l'organisme, les cellules réactives doivent retourner au nombre initial (homéostasie des lymphocytes T) tout en gardant un pool de cellules mémoires. La perforine semble être impliquée dans le processus d'élimination des lymphocytes T CD8⁺ après une infection aiguë à un pathogène. En effet, les souris déficientes pour la perforine montrent une expansion clonale élevée et une persistance de lymphocytes T spécifiques du virus⁴⁷. La disparition des cellules effectrices T est essentielle car sa persistance cause le syndrome hémophagocytaire résultant d'une activation et d'une prolifération incontrôlées des lymphocytes T, ce qui entraîne une activation excessive des macrophages et de multiples effets délétères⁴⁸⁻⁵⁰. Ce phénomène, aussi appelé phase de contraction, implique également la mort induite par l'activation (AICD) ou par les récepteurs de mort comme Fas. Ces notions seront évoquées dans le chapitre II. D'autres hypothèses de régulation ont été avancées, comme l'infection des lymphocytes T eux-mêmes qui mènerait à la lyse fratricide. En effet, certains virus lymphotropiques (ex CMV, HTLV-1) infectent naturellement les lymphocytes T CD8⁺⁵¹. Un autre mécanisme consisterait en l'acquisition, par transfert suite à ses actions de lyse directe, d'une forte quantité de complexes p-CMH à la surface du lymphocytes T CD8⁺, permettant ainsi la diminution de la réponse CTL par fratricide^{52,53}. Enfin, de manière indirecte, l'élimination perforine-dépendante des APC agirait comme un mécanisme régulateur afin d'empêcher l'accès des APC au nœud lymphatique et l'activation de lymphocytes T spécifiques additionnels⁵⁴. Par ailleurs, les CTL ne sont pas les seuls à participer à leur propre homéostasie cellulaire, il a aussi été démontré plus récemment que les cellules NK participaient au contrôle de l'homéostasie des CTL dans le cadre d'une infection pour prévenir du développement du syndrome hémophagocytaire⁵⁵. Ainsi, en plus d'une activité sécrétoire cytotoxique essentielle pour éliminer les cellules infectées ou tumorales, les cellules cytotoxiques NK et CTL sont capables d'utiliser cette sécrétion lytique afin de réguler l'homéostasie immunitaire, complétant les mécanismes non-sécrétoires comme Fas^{48,56,57}.

En contrepartie de leur rôle protecteur, les cellules cytotoxiques sont parfois aussi impliquées dans le déclenchement de maladies auto-immunes. Cela a été clairement démontré dans des modèles de souris de diabète spontané ou d'encéphalomyélite expérimentale (EAE). En effet, malgré une infiltration lymphocytaire au niveau du pancréas, la déficience en perforine éliminait, ou diminuait fortement, la sévérité de la réponse auto-immune envers les cellules β du pancréas^{58,59}. Dans la pathogénicité de la sclérose en plaque et l'EAE, plusieurs populations cytotoxiques sont impliquées : les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques²⁹, mais aussi les lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques³⁰, ainsi que les cellules NK principalement responsables de la destruction des tissus⁶⁰.

D'autre part, dans le contexte de la mise en place d'une maladie auto-immune, la fonction cytotoxique des différentes populations immunitaires n'est pas seulement pathogénique, elle joue aussi un rôle dans la régulation des cellules pathogéniques. Comme introduit précédemment, les lymphocytes T régulateurs peuvent avoir une fonction cytotoxique mais la part de celle-ci dans l'auto-immunité n'a pas encore été étudiée. En revanche, il a été démontré que les lymphocytes T CD8⁺ possèdent aussi une activité régulatrice, par leur fonction cytotoxique sur les lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs, dans le cadre de la sclérose en plaque^{61,62}. De même, les cellules NK ont aussi une activité régulatrice, notamment dans l'EAE, par une activité lytique dirigée contre les lymphocytes T auto-réactifs et les APC⁶⁰.

En conclusion, parmi les différents contextes pathologiques auxquels est confronté notre organisme (infections, tumeurs et auto-immunité), ainsi que pour l'homéostasie cellulaire, **la fonction cytotoxique est majoritairement bénéfique.**

II. Aspects fondamentaux des lymphocytes T cytotoxiques (classiques et non classiques)

La fonction des CTL a longtemps été étudiée comme une propriété exclusivement effectuée par la population de lymphocytes T CD8⁺. Cependant, des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ aux capacités cytotoxiques ont également été identifiées. J'ai donc choisi de présenter dans ce chapitre ces deux populations de lymphocytes T cytotoxiques ayant un TCR, dit « conventionnel » : $\alpha\beta$.

II.1. Activation et différenciation des lymphocytes T cytotoxiques

Avant d'aborder l'activation et la différenciation des lymphocytes T en cellules cytotoxiques, je souhaite faire un bref rappel sur le développement de ces lymphocytes T.

Les progéniteurs lymphoïdes, issus de la cellule souche hématopoïétique, vont quitter la moelle osseuse afin de pénétrer dans le thymus et y poursuivre leur différenciation. Les cellules en différenciation dans le thymus, aussi appelés thymocytes, subiront une sélection positive et une sélection négative qui permettront de s'assurer que les lymphocytes T qui sortiront du thymus : seront, premièrement, capables de reconnaître les cellules présentatrices de l'antigène et deuxièmement, ne réagiront pas contre le soi. À la sortie du thymus, les lymphocytes T qui sont alors naïfs (n'ayant jamais rencontrés l'antigène dont ils sont spécifiques) vont gagner, *via* la circulation sanguine, les organes lymphoïdes secondaires. Ces sites favorisent la rencontre entre les lymphocytes T et les antigènes provenant de pathogènes présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène, en condition pathologique. En absence d'interaction antigénique spécifique, les lymphocytes T naïfs vont circuler entre les différents organes lymphoïdes secondaires.

II.1.a Les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ constituent une branche puissante du système immunitaire adaptatif, permettant une éradication spécifique de cellules infectées ou encore de cellules tumorales. Dès 1975, l'importance de la fonction cytotoxique médiée par des cellules a été démontrée par la déplétion des lymphocytes exprimant CD8 α et CD8 β par des anticorps^{63–65}. Par la suite, la restriction au CMH de classe I pour leur sélection, activation et fonction a été identifiée⁶⁶.

Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs ne sont pas encore armés pour exercer leur activité effectrice. Ce n'est qu'au contact de cellules présentatrices d'antigènes et à l'aide de lymphocytes T CD4⁺

Th1 *via* les cytokines IL-2 et IFN γ ⁶⁷ ou l'interaction CD40/CD40L⁶⁸, que les lymphocytes T CD8⁺ s'activent pour produire les molécules effectrices telles que les molécules lytiques⁶⁹, les cytokines ou encore les récepteurs de mort. S'en suit une expansion clonale. Cette expansion est conduite par des quantités importantes d'IL-2 produites par les lymphocytes T eux-mêmes. L'IL-2 fonctionne alors dans un mode autocrine et paracrine en se fixant sur le récepteur à l'IL-2, celui-ci étant sur-exprimé lors de l'activation.

Par ailleurs, suite à l'activation d'un lymphocyte T naïf, une génération d'une multitude de sous-populations ayant différents phénotypes et propriétés fonctionnelles est mise en place. Un modèle linéaire et progressif de différenciation a alors été proposé sur la base de l'expression de CCR7, CD45RA et CD45RO (Figure 4).

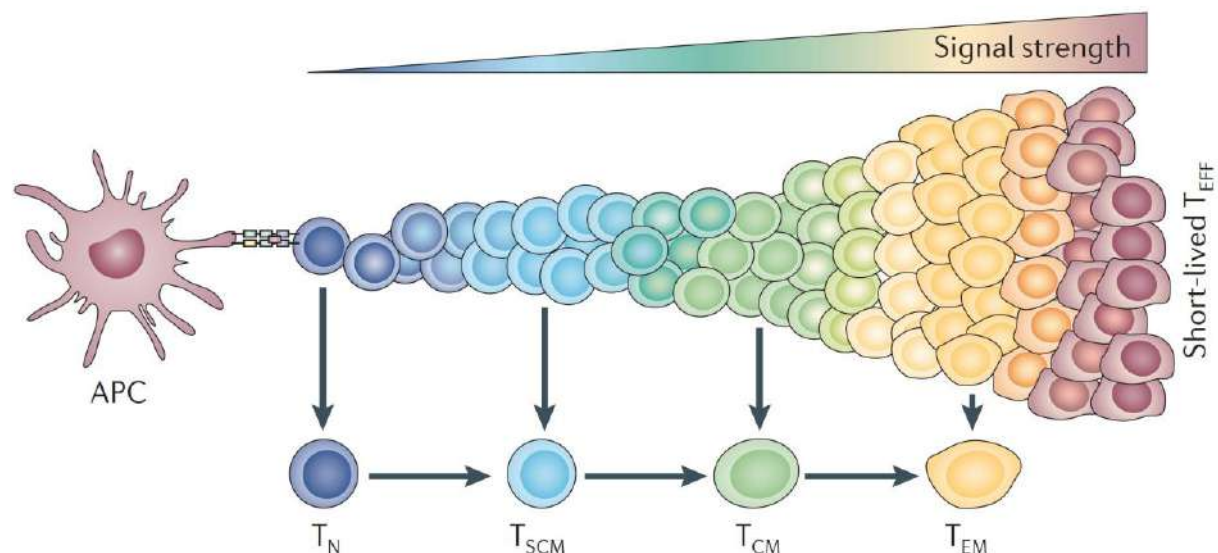


Figure 4. Modèle progressif de différenciation des lymphocytes T naïfs après reconnaissance de l'antigène présenté par une APC⁷⁰.

Les lymphocytes T naïfs (T_N) expriment l'isoforme CD45RA, CD62L et CCR7, permettant leur circulation mais aussi l'entrée dans les organes lymphoïdes secondaires⁷¹. Le signal TCR lors de la reconnaissance de l'antigène présenté par l'APC, mais aussi des signaux de co-stimulation, sont intégrés par le lymphocyte T afin d'initier le programme de prolifération et de différenciation. Une première étape de différenciation est le changement d'isoforme de CD45 en CD45RO⁷². Parmi les deux sous-populations exprimant CD45RO, l'une correspond aux lymphocytes T centraux mémoires (T_{CM}) exprimant CCR7, tandis que l'autre perd l'expression de celui-ci et correspond aux lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM})⁷³. Du côté fonctionnel, cette différence phénotypique permet aux T_{CM} et T_{EM} de patrouiller à la recherche de cibles

au niveau des organes lymphoïdes et des tissus périphériques, respectivement⁷⁴. Enfin, au bout de la chaîne de différenciation se trouve les lymphocytes T effecteurs (T_{EFF}) à courte durée de vie en grande quantité. Plus récemment, l'identification d'une nouvelle sous-population a été décrite, il s'agit des lymphocytes T mémoires de type cellule souche (T_{SCM}). En effet, ces cellules ont la capacité de se renouveler ainsi que la possibilité de générer toutes les sous-populations mémoires et effectrices⁷⁵. Par ces capacités et leur phénotype proche des cellules naïves, le modèle de différenciation débute à partir des T_N qui se différencient en T_{SCM} , puis T_{CM} et T_{EM} pour finir en T_{EFF} (**Figure 5**).

Ce modèle progressif s'est enrichi au fur et à mesure de l'identification de nouveaux marqueurs permettant l'identification de nouvelles sous-populations ou la proposition de nouveaux modèles. Le modèle retenant mon attention est une différenciation des lymphocytes T $CD8^+$ naïfs à la fois en cellules effectrices CTL et en T_{SCM} . Les T_{SCM} enclenchent les voies de différenciations des différents types de cellules mémoires, mais ces voies ne sont pas complètement linéaires avec un retour possible des CTL vers T_{SCM} . Il est aussi possible que des T en transition (T_{TM}) peuvent se différencier en CTL sans passer par T_{EM} ⁷⁶.

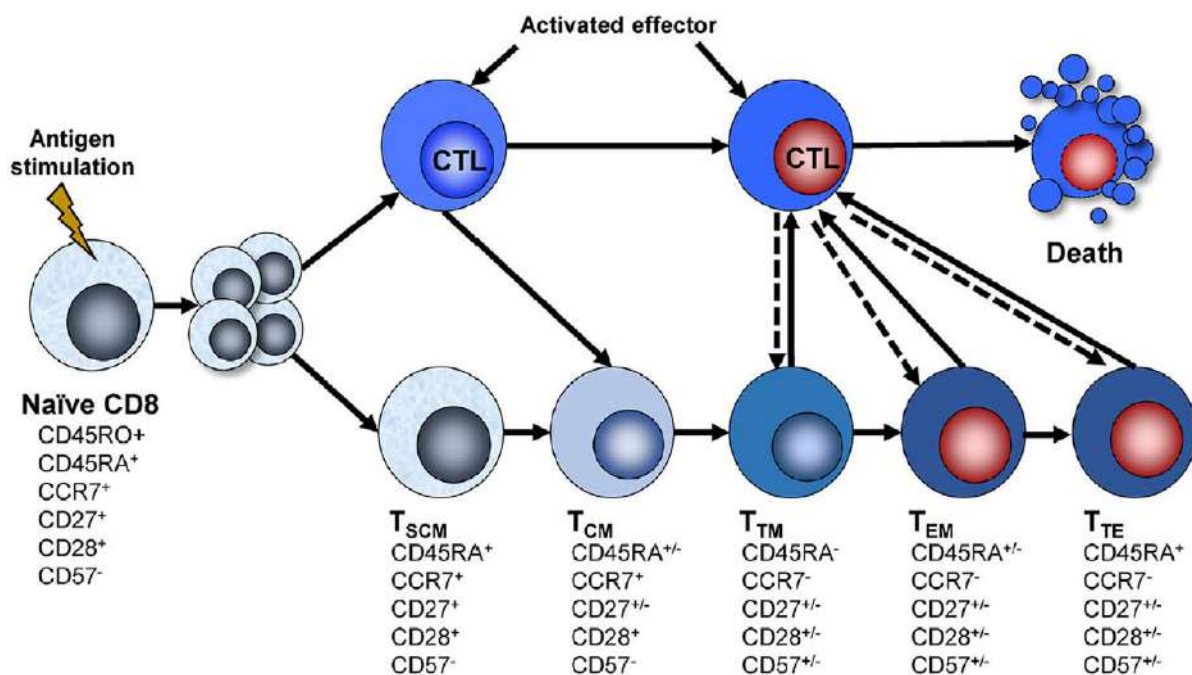


Figure 5. Modèle discontinu de différenciation des lymphocytes T^76 .

Enfin, cette armée de lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs antigène-spécifiques, ayant acquis l'expression des molécules lytiques, quitte le tissu lymphoïde pour migrer sur le site de

l'inflammation. Ainsi les CTL peuvent alors tuer les cellules altérées en dégranulant leurs molécules lytiques de manière polarisée^{77,78} ou par fixation de récepteurs de mort exprimés à la surface des cellules cibles et/ou par la sécrétion de cytokines ayant des actions antivirales et anti-tumorales. Ces différentes voies de cytotoxicité possibles seront décrites plus en détails dans la partie II.2 portant sur les fonctions effectrices des lymphocytes T cytotoxiques.

Une fois l'inflammation contrôlée, un phénomène de contraction opère afin de retrouver un nombre basal de lymphocytes T CD8⁺, tout en gardant un pool de cellules mémoires afin que le système immunitaire soit réactif en cas de réponse secondaire au pathogène en question.

II.1.b Les lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ ont initialement été décrits comme ayant essentiellement un rôle de « helpers ». Puis des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ « régulateurs » ont été découvertes. Même si prépondérantes parmi l'ensemble des lymphocytes T CD4⁺, et fortement décrites dans la littérature, une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ possède aussi une fonction cytotoxique. En effet, l'identification de lymphocytes T CD4⁺ dotés d'un potentiel cytotoxique direct, dans un contexte antigénique CMH de classe II restreint, remonte aux années 1970⁷⁹. Tout d'abord, cette fonctionnalité a été considérée comme un artefact, les clones CD4⁺ à activité lytique étant issus d'une culture *in vitro* à long terme⁸⁰ ou générés *in vivo* chez des souris déficientes en CD8⁸¹. Par la suite, l'identification de CD4 CTL *ex vivo* dans le sang périphérique de patients infectés de manière chronique par des virus divers tels que le cytomegalovirus (CMV), le virus d'Epstein Barr (EBV) ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a prouvé l'existence de ces cellules dans l'organisme⁸²⁻⁸⁴. La présence de ces dernières a été également mise en évidence dans d'autres pathologies, dans certaines infections bactériennes⁸⁵, dans des maladies inflammatoires et également des pathologies auto-immunes⁸⁶. Enfin, l'activité cytotoxique de lymphocytes T CD4⁺ a aussi été démontrée envers des cellules tumorales (mélanome) exprimant le CMH de classe II⁸⁷. Ainsi la génération de cette population ne semble pas liée à un type de maladie mais à la chronicité de celle-ci. En effet, ces CD4 CTL sont décrits comme présentant un phénotype de cellules « terminalement » différenciées, ce qui est caractéristique d'une stimulation antigénique prolongée.

Concernant la différenciation de ces lymphocytes T CD4⁺, plusieurs études ont révélé des origines variées. Vraisemblablement, les CD4 CTL peuvent se développer à partir de Th0^{88,89}, Th1^{90,91}, Th2⁹², Th17⁹³, et Treg⁹⁴. Néanmoins, les CD4 CTL dérivés de Th1 représentent la plus grande majorité des CD4 CTL. Afin d'éclaircir l'origine des CD4 CTL, une étude récente a identifié la molécule CRTAM comme étant un marqueur précoce de cette population⁹⁵. Après stimulation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs, les auteurs ont purifié la population CRTAM⁺ et l'ont caractérisée comme étant capable de sécréter de l'IFN γ mais aussi granzyme B et perforine. De plus, ces cellules présentent une activité cytotoxique, ce sont donc des CD4 CTL. Malheureusement, l'expression de CRTAM est transitoire et à ce jour aucun marqueur spécifique des CD4 CTL n'a été identifié. Les auteurs ont ainsi proposé un modèle de différenciation des CD4 CTL dans une revue (**Figure 6**).

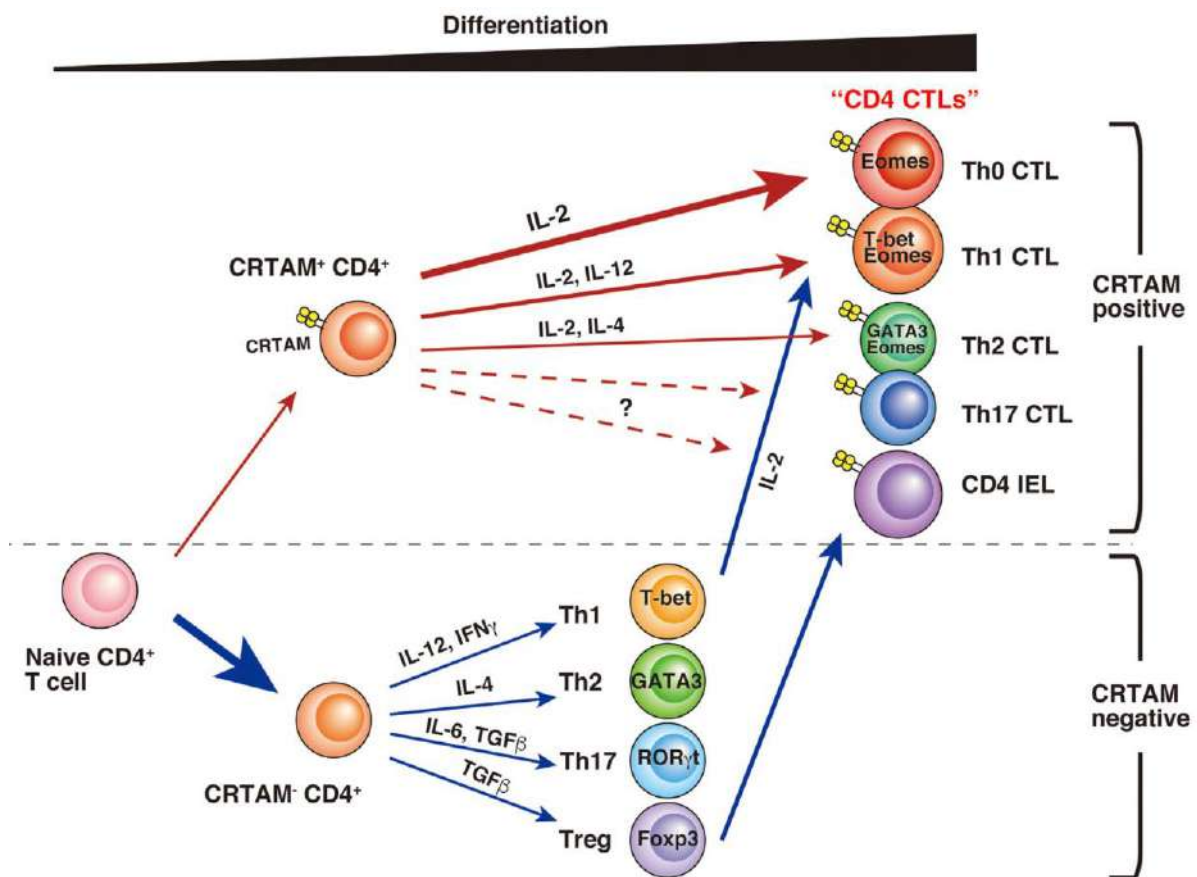


Figure 6. Modèle de différenciation des CD4 CTL proposé par Takeuchi et Saito⁹⁶.

Dans l'ensemble, les mécanismes de lyse des lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques semblent fortement similaires à ceux des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. En revanche, comparés aux CD8 CTL, les CD4 CTL présentent un délai dans leur activité de lyse avec une efficacité sur des

temps plus long⁹⁷. Ainsi, dans le cas de cellules altérées exprimant le CMH de classe II, les CD4 CTL vont pouvoir suppléer l'action cytotoxique des CD8 CTL. Ils pourraient même agir comme une « roue de secours » en cas d'un défaut de mise en place ou d'activité des CD8 CTL.

II.2. Fonctions effectrices des lymphocytes T cytotoxiques

Les outils pour éliminer les cellules cibles sont multiples avec une possibilité de tuer par contact direct (la synapse lytique) ou indirect (les cytokines). Toutefois l'arme principale utilisée par les CTL est le contact direct avec la délivrance des granules contenant les molécules lytiques.

II.2.b La synapse lytique

La synapse lytique est une synapse immunologique spécialisée dans la fonction cytotoxique. La synapse immunologique a fortement été étudiée pour le contact entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène (APC), ce qui a permis de définir son architecture. Ainsi cette synapse est caractérisée par une structure en forme d'œil avec au centre le c-SMAC puis en périphérie le p-SMAC et enfin le d-SMAC (**figure 7**)⁹⁸⁻¹⁰⁰. Les composants majeurs du c-SMAC sont les molécules clefs pour la reconnaissance et l'activation des lymphocytes T, comme l'interaction TCR/CD3 avec le complexe peptide/CMH, et le co-récepteur CD28 ou CTLA4 avec CD80/CD86. En revanche, le p-SMAC est composé de molécules d'adhésion permettant le maintien de la structure de la synapse, avec par exemple LFA-1 interagissant avec ICAM-1 et CD2 avec CD48/CD58. Le d-SMAC est défini comme étant une région enrichie en molécules possédant des domaines extracellulaires très longs, comme CD45¹⁰¹ et CD43¹⁰². Il a été déterminé que l'alignement de ces récepteurs est initialement dû à la taille de leur ecto-domaine, supporté par le modèle de ségrégation¹⁰³. Ainsi le concept général de l'organisation synaptique est que le c-SMAC permet la reconnaissance de l'APC suivie par l'activation du lymphocyte T, tandis que le p-SMAC et le d-SMAC permettent la conjugaison T-APC et la stabilisation de l'architecture de la synapse immunologique.

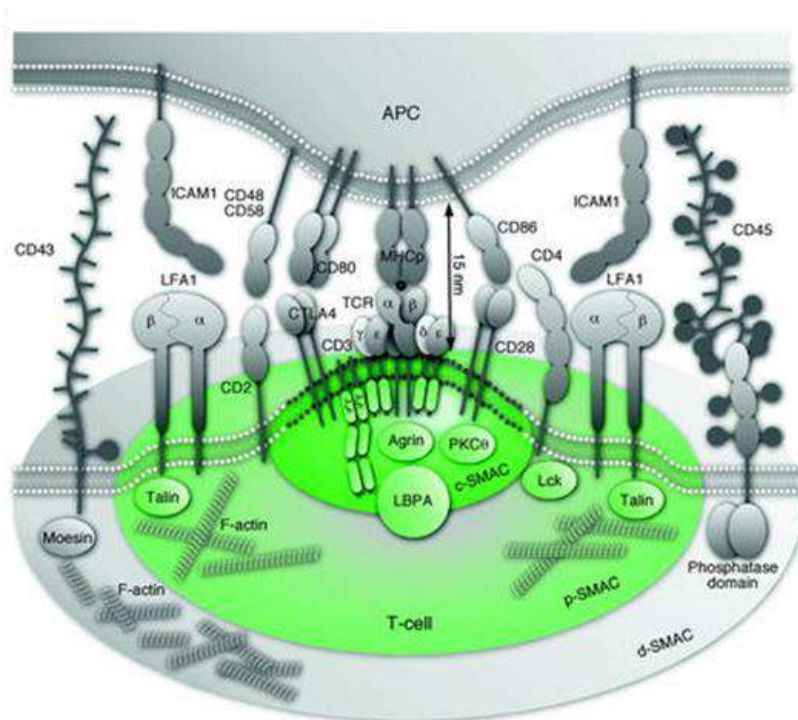


Figure 7. Architecture de la synapse immunologique conventionnelle.

Représentation schématisique des principaux composants clés de la structure de la synapse immunologique dans le c-SMAC (vert intense), le p-SMAC (vert) et le d-SMAC. Adapté de Yokosuka T. et Saito T.

Toutefois, la structure de la synapse lytique formée par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques n'est pas complètement similaire à la synapse immunologique formée par les lymphocytes T CD4⁺. En effet, il a été démontré qu'à la synapse entre un lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique et sa cible, deux domaines distincts sont formés : un domaine de signalisation (correspondant au c-SMAC) et un domaine sécrétoire où convergent le centre organisateur des microtubules (MTOC) et les granules lytiques⁷⁷.

En outre, l'équipe de Griffiths a récemment démontré un rôle clef de la dynamique du cytosquelette d'actine dans la synapse lytique. Dans un premier temps, un fort enrichissement de l'actine corticale est observé au contact de la cible, puis très rapidement, une « déplétion » de l'actine au centre de la zone de contact est effectuée afin de permettre le docking du MTOC et le passage des granules lytiques pour leur exocytose¹⁰⁴. Effectivement, il a été démontré, pour les cellules NK, que les granules lytiques présents au niveau de l'aire synaptique passaient au travers des mailles du cytosquelette d'actine¹⁰⁵.

II.2.a Les granules lytiques

La délivrance des granules lytiques est un mécanisme rapide pouvant advenir en l'espace de quelques minutes. Ceux-ci sont des endo-lysosomes spécialisés contenant de multiples protéines (**Tableau 2**).

Contenu protéique des granules lytiques	Fonctions relatives	Proteines lysosomales membranaires	Fonctions relatives
Perforine	Formation de pores	Lamp 1 & 2	Glycoprotéines
Granulysine	Agent antimicrobien, activation de la caspase 9	CD63	Traffic vésiculaire
Calreticuline	Fixation au Calcium et à la perforine	H ⁺ -ATPase	Acidification du granule
Granzymes (A, B, H, K & M)	Sérines protéases	Cathepsine D & L	Protéases
Cathepsine C	Activation des granzymes	Récepteur au mannose 6-phosphate	Traffic protéique
Cathepsine B	Protection envers la perforine	β-hexosaminidase	Enzymes
		β-glucuronidase	

Tableau 2. Récapitulatif des principales protéines composant les granules lytiques.

Les molécules lytiques contenues dans ces vésicules spécialisées sont la perforine, la granulysine et les granzymes. La dégranulation peut être détectée par l'exposition au niveau de la membrane cellulaire de glycoprotéines lysosomiales comme Lamp-1¹⁰⁶.

La perforine joue un rôle décisif dans l'induction de la lyse des cellules cibles. L'importance de cette molécule est attestée à la fois par des études sur des modèles de souris KO et chez des patients atteints de mutations sur le gène correspondant. Les souris déficientes en perforine développent des lymphomes spontanés³⁹ tandis que les patients déficients en perforine développent des réponses immunes cytotoxiques diminuées mais des réponses cytokiniques exacerbées face à des infections par des pathogènes intracellulaires¹⁰⁷. La perforine a une forte homologie de séquence avec la protéine C9 du complément qui est connue pour former des pores dans les membranes cellulaires¹⁰⁸. Il a donc été proposé que la perforine induit la mort des cellules cibles en créant des pores dans les membranes plasmiques permettant l'entrée d'autres molécules lytiques dans la cellule cible^{109,110}. La formation de ces pores n'est pas suffisante pour entraîner la mort de la cellule cible mais permet l'entrée des granzymes et de la granulysine dans celle-ci. Différents modèles d'entrée des granzymes et granulysine ont été proposés : le premier étant l'entrée par les pores de perforine, le deuxième serait une internalisation des molécules lytiques¹¹¹ et le dernier serait une entrée de calcium par les pores de perforine déclenchant la fonction de réparation cellulaire de la cible permettant l'internalisation des molécules lytiques^{112,113}.

Les granzymes sont des sérines protéases impliqués dans les détériorations cellulaires des cellules cibles. Une fois entrés dans la cellule cible, par un mécanisme discuté plus haut, les granzymes induisent l'apoptose rapide de la cellule cible¹¹⁴. A ce jour, 5 granzymes ont été

identifiés chez l'Homme : A, B, H, K et M. Les principaux sont les granzymes A et B ayant une forte activité pro-apoptotique.

Le granzyme A induit un processus apoptotique au sein de la cellule cible *via* une voie indépendante de caspases¹¹⁵. Il agit *via* de multiples mécanismes parmi lesquels l'induction de cassure dans l'ADN cellulaire, l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN ou encore la destruction de la laminine ou de l'histone 1. Son action majeure réside dans le clivage d'un complexe associé au réticulum endoplasmique appelé le complexe SET. Ce clivage va libérer des protéines telles que NM23-H1 (nonmetastatic protein 23 homologue 1) qui vont induire la dégradation de l'ADN¹¹⁶.

Les granzymes B humains et murins, bien que tous deux très pro-apoptotiques, agissent *via* des mécanismes différents¹¹⁷. Le granzyme B humain agit majoritairement *via* le clivage de la molécule Bid (membre de la famille des molécules pro-apoptotiques)¹¹⁸. Ce clivage entraîne, entre autre, la libération par les mitochondries de cytochrome c¹¹⁹ qui conduit à l'activation d'un grand nombre de caspases¹²⁰. Le granzyme B peut également agir directement sur la caspase-3 et la caspase-8 induisant, entre autre, la fragmentation de l'ADN cellulaire¹²¹⁻¹²⁴.

Les granzymes H, K et M sont appelés granzymes orphelins. Leurs fonctions chez l'Homme ne sont pas encore complètement définies. Par exemple le granzyme K est une protéase qui induit l'apoptose par un mécanisme Bid-dépendant¹¹² tandis que le granzyme M semble induire la mort cellulaire *via* le clivage des Ezrins (des protéines liant l'actine à la membrane plasmique) et l' α -tubuline¹²⁵.

Enfin, la granulysine, exprimée 3 à 5 jours après l'activation des CTL, a une activité cytotoxique sous la forme protéique de 9 kDa envers les bactéries intracellulaires et les cellules tumorales^{126,127}. Elle pourrait agir *via* la libération de cytochrome c par les mitochondries et l'activation de la caspase-3¹¹². De plus, par une homologie aux protéines « saposine-like », elle posséderait aussi une action « perturbatrice » de la membrane¹²⁸. Ainsi différents modèles d'entrée de la granulysine ont été proposés : une entrée par les pores formés par la perforine mais aussi une entrée de manière perméante à la membrane¹²⁹.

II.2.c Les cytokines

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sécrètent des cytokines comme l'IFN γ et le TNF α qui ont une action cytotoxique quand elles sont sécrétées à proximité des cellules cibles.

L'**IFN γ** est une cytokine produite majoritairement par les cellules NK, les cellules NKT, les lymphocytes Th1 et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Sa nécessité dans le système immunitaire est illustrée par l'occurrence de tumeurs et phénomènes inflammatoires ou auto-immuns quand sa production et/ou sécrétion^{130,131,132} est déficiente, de même si son récepteur est déficient¹³³. L'IFN γ peut directement inhiber la réplication virale et possède des propriétés anti-tumorale, immuno-stimulatrice et immuno-modulatrice¹³⁴. Cette cytokine peut aussi promouvoir la présentation antigénique et l'activité lysosomale des macrophages, l'activation des APC, l'up-régulation des molécules du CMH de classe I, l'adhésion et la fixation nécessaire pour la migration leucocytaire, l'activité des cellules NK et la différenciation Th1 (par l'up-régulation du facteur de transcription T-bet)^{135,136}.

Le premier rôle du **TNF α** est l'orchestration des cellules immunitaires lors de l'inflammation. Le TNF α est aussi capable d'induire l'apoptose et l'inflammation, ainsi que d'inhiber la réplication virale et le développement tumoral. Cette cytokine est majoritairement produite par les macrophages mais aussi par d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes T. Une augmentation locale de la concentration en TNF α cause les signes typiques de l'inflammation : *rubor, calor, tumor, dolor* (rougeur, chaleur, gonflement et douleur respectivement)¹³⁷. Une régulation anormale de la production de TNF α peut causer une variété de pathologies humaines, dont des cancers¹³⁸. La fixation du TNF α au récepteur du TNF de type 1 (exprimé par la plupart des cellules) peut amener à l'activation des domaines de mort, induisant ainsi l'apoptose dans la cellule cible¹³⁹. En particulier, cette cytokine semble être impliquée dans la mort des lymphocytes T CD8⁺ induite par l'activation (AICD), régulant ainsi la conclusion de la réponse immunitaire pour retourner à l'état d'homéostasie cellulaire. Cependant, la mort induite par le TNF joue seulement un rôle mineur comparé à ses autres fonctions dans le processus inflammatoire.

II.2.d Les voies alternatives de l'activité cytotoxique

La deuxième voie majoritairement impliquée dans l'activité cytotoxique des CTL CD8⁺ est la voie Fas/FasL (Fas-ligand)¹⁴⁰. FasL est un récepteur de mort appartenant à la super-famille des récepteurs au TNF¹⁴¹. Cette molécule est exprimée à la surface cellulaire ou sécrétée suite au clivage de la forme membranaire par une metalloprotéinase zinc-dépendante : la matrilysine¹⁴². L'interaction du récepteur Fas exprimé par la cellule cible avec FasL induit la cascade d'activation des caspases et l'apoptose de la cellule cible¹⁴³. FasL est très peu exprimé

à l'état basal par les CTL mais son expression est induite quelques heures après la stimulation du TCR. Cette cinétique d'expression est à l'origine des 2 moyens d'action de cette voie. L'équipe de Griffiths suggère, en 1999, que FasL est stocké et sécrété avec la perforine et les granzymes et peut par conséquent induire la mort des cellules cibles¹⁴⁴. Cependant, l'expression basale de FasL étant réduite, ce mécanisme est minoritaire et la cytotoxicité optimale induite par cette voie a lieu lorsque de nouveaux ligands sont synthétisés, soit quelques heures après la stimulation du TCR¹⁴⁵.

De manière générale, il a été clairement démontré qu'à la fois les lignées cellulaires CD8⁺ et CD4⁺ humaines et murines cultivées peuvent utiliser à la fois les voies Fas/FasL et perforine/granzymes^{88,146,147}. Cependant, les expériences de transplantation *in vivo* et les maladies de greffe contre l'hôte (GvHD) dépendant du CMH de classe I ou de classe II (effecteurs CD8 et CD4 respectivement) suggèrent que la voie perforine/granzymes domine l'activité cytotoxique dépendante du CMH classe I et que la voie Fas/FasL domine l'activité lytique dépendante du CMH classe II^{148,149}.

II.3. Questions ouvertes

Suite à ce chapitre peignant une vue générale sur l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que leurs mécanismes effecteurs, je choisis d'aborder ici les questions de mesures de l'activité cytotoxique de ces cellules effectrices. A l'heure actuelle, plusieurs tests de cytotoxicité ont été mis en place avec différents « readouts », mais de manière globale, tous ces tests permettent la mesure de l'activité de lyse au niveau de la population effectrice face à la population cible (exemples : relargage du chrome, marquage des cellules mortes en cytométrie en flux, etc.). En revanche, ils ne permettent pas d'identifier la participation de chaque cellule individuelle à l'activité de lyse mesurée. Ce qui soulève la question : est-ce que tous les lymphocytes T cytotoxiques participent de manière homogène à l'activité de lyse globale ? C'est-à-dire, est-ce qu'ils éliminent le même nombre de cibles au cours du temps ? Nous formulons l'hypothèse d'une hétérogénéité dans la capacité de lyse des CTL pour la mise en place, à la fois d'un partage entre les fonctions de lyse et de sécrétions de cytokines, mais aussi en rapport à la différenciation des lymphocytes T en cellules mémoires. En effet, une fois l'élimination complète de la population cible, n'y aurait-il pas un

lien entre une capacité de lyse importante ou réduite et la capacité de garder un pool de cellules mémoires ?

Par ailleurs, afin d'étudier plus en profondeur les acteurs moléculaires impliqués dans l'activité de lyse de lymphocytes T humains, les immunodéficiences primaires correspondant à une déficience naturelle d'une protéine représentent des modèles de choix. En effet, l'importance de la perforine et des molécules impliquées dans son acheminement a notamment été révélée par l'étude d'immunodéficiences primaires^{150,151}. Mon laboratoire étudie depuis longtemps l'impact de la déficience de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich, notamment au niveau des lymphocytes T CD4⁺ provenant de patients. Qu'en est-il de la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ ?

III. Défaut d'activité cytotoxique dans le contexte du syndrome de Wiskott-Aldrich

Le rôle central du système immunitaire dans la survie de l'organisme face à la survenue d'infections et de cancers est souligné par les cas d'immunodéficiences primaires (PID), pathologies rares d'origine génétique dans lesquelles des défauts moléculaires entraînent des dysfonctionnements du système immunitaire. Les PID sont à distinguer des immunodéficiences secondaires, acquises suite aux conséquences d'une autre maladie (comme lors d'une infection par le VIH) ou suite à des facteurs environnementaux (cas de malnutrition), ou encore suite aux effets secondaires de certaines interventions médicales (comme la chimiothérapie). Au travers de l'étude des PID, l'identification de plusieurs centaines de gènes, ainsi que leurs implications dans le système immunitaire inné et/ou adaptatif a pu être effectuée¹⁵². Parmi ces pathologies je me suis plus particulièrement intéressée au syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). En effet, cette pathologie liée à des défauts de remodelage du cytosquelette d'actine est étudiée depuis 15 ans par mon laboratoire d'accueil¹⁵³ et elle présente un intérêt particulier par rapport à mon optique d'élucidation des mécanismes régissant l'activité cytotoxique. En effet les CTL de ces patients présentent une efficacité réduite de lyse des cellules cibles, sans que l'on comprenne encore les mécanismes sous-jacents¹⁵⁴.

III.1. Le syndrome de Wiskott-Aldrich

Le syndrome de Wiskott-Aldrich a été initialement décrit par Alfred Wiskott en 1937 puis par Robert Aldrich en 1954. Ces deux médecins ont respectivement rapporté les symptômes caractéristiques de cette maladie rare (thrombocytopénie, eczéma, et otites répétées) et identifié qu'il s'agissait d'une maladie génétique liée au chromosome X^{155,156}. Actuellement, WAS est défini comme étant une immunodéficiência primaire récessive liée au chromosome X et caractérisée par un tableau clinique complexe associant microthrombocytopénie, eczéma, infections récurrentes et une évolution vers des atteintes auto-immunes et tumeurs d'origine hématopoïétique (lymphomes B majoritairement)^{157,158}. L'étude de cette pathologie a ainsi permis de découvrir le gène *WAS*, localisé sur le bras court du chromosome X, dont des mutations conduisent à une expression défectueuse de la protéine WASP¹⁵⁹ chez les patients affectés. L'expression de cette protéine est restreinte au système hématopoïétique dans lequel elle régule la réorganisation du cytosquelette d'actine¹⁶⁰.

Une analyse approfondie de WASP révèle une protéine structurée en 5 domaines (**Figure 8**). Le rôle principal de WASP est actine-dépendant avec la nucléation de nouveaux filaments d'actine en réponse à une multitude de récepteurs, comme les récepteurs aux chimiokines ou le TCR, menant à plusieurs réponses cellulaires. Pour une analyse approfondie des rôles de WASP, au sein des lymphocytes T, je vous invite à lire la revue à laquelle j'ai contribué, se trouvant en annexe.

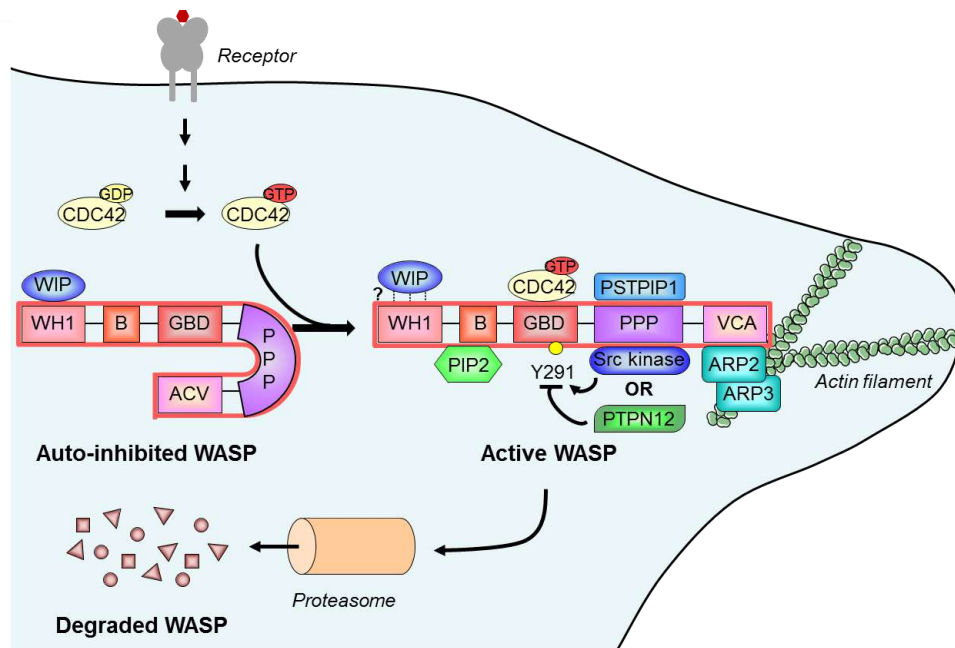


Figure 8. L'activation de WASP, ses partenaires moléculaires et le remodelage du cytosquelette d'actine. Dans son état basal, la protéine WASP est sous forme auto-inhibée en raison de l'interaction intramoléculaire de son domaine d'homologie au domaine verproline (VCA) et de son domaine de liaison à la GTPase (GBD). L'association de la protéine WIP sur le domaine WH1 stabilise la forme auto-inhibée. Lors de l'activation d'une large gamme de récepteurs de surface cellulaire (comme le TCR ou les récepteurs aux chimiokines), la GTPase de la famille Rho (CDC42) se lie au domaine GBD, ce qui provoque la libération du VCA. Les activateurs WASP supplémentaires incluent la protéine PSTPIP1 et le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) qui, respectivement, lient le domaine de la polyproline (PPP) et le domaine de base (B). La stabilité de WASP actif dépend de l'état de phosphorylation du résidu de tyrosine 291 (Y291), qui est régulé par les tyrosines kinases de la famille Src et la tyrosine-protéine phosphatase 12 (PTPN12). WASP sous forme active se lie, *via* son VCA, aux protéines liées à l'actine 2 et 3 (ARP2-ARP3) et l'actine monomérique pour produire une nouvelle branche d'actine. Le remodelage dynamique de l'actine repose sur un équilibre entre l'activation et la dégradation de WASP, cette dernière étant régulée par ubiquitination et médiée par le protéasome.

Le cytosquelette d'actine étant nécessaire pour de multiples mécanismes allant de la signalisation cellulaire à la formation de podosomes en passant par la migration cellulaire, l'impact sur le système immunitaire devient alors multifactoriel.

III.1.a Impact sur le système immunitaire inné

La protéine WASP est requise pour de nombreuses fonctions à la fois au niveau des cellules immunitaires myéloïdes et lymphoïdes. Les principaux défauts sont répertoriés ci-dessous sous forme de schéma (**Figure 9**).

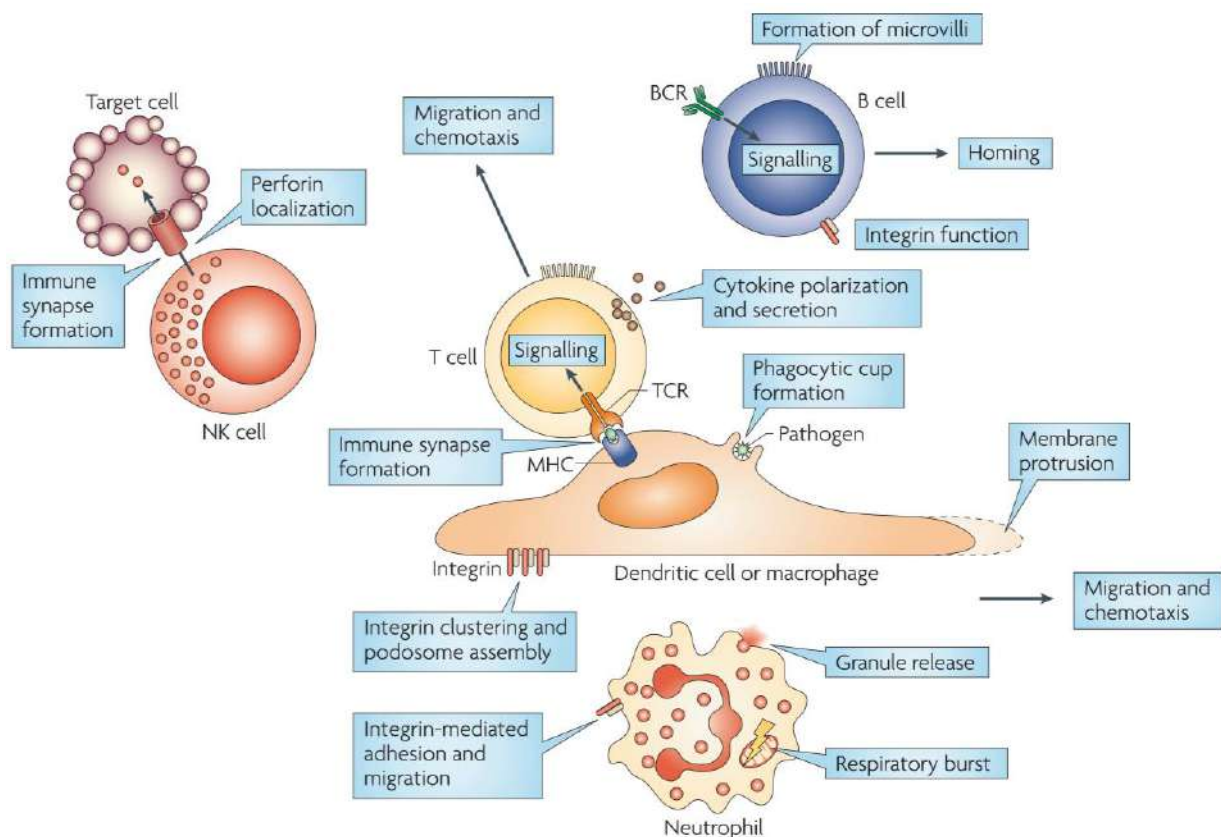


Figure 9. Les fonctions de la protéine WASP au niveau des cellules immunitaires¹⁶¹.

Représentation schématique des principales fonctions cellulaires affectées par la déficience en WASP dans les cellules de l'immunité innée (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques) et de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B).

Les cellules du lignage myéloïde des patients WAS présentent des défauts de phagocytose liés à une incapacité à former des protrusions riches en actine et nécessaires à l'internalisation des pathogènes¹⁶²⁻¹⁶⁴. Ces cellules ont également des défauts dans la formation des podosomes et du lamellipode requis pour la migration cellulaire¹⁶⁵. Ce défaut de formation du lamellipode conduit à un défaut dans le chimiotactisme de ces cellules¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. En plus du défaut

dans la formation des protrusions riches en actine, les cellules myéloïdes déficientes en WASP ont aussi une réponse aux intégrines anormale^{169,170}. En conséquence, ces cellules présentent des défauts d'adhésion, de migration mais aussi de dégranulation et de relargage de radicaux libres concernant les neutrophiles. Par conséquence de défauts d'interactions cellulaires liés à une mauvaise organisation des synapses immunologiques, les cellules NK des patients WAS ont une activité cytotoxique réduite^{171,172}. En outre, il a été montré chez la souris que les défauts des cellules dendritiques déficientes en WASP impriment un défaut d'activation des lymphocytes T^{173,174}.

III.1.b Impact sur le système immunitaire adaptatif

Les lymphocytes T et B des patients WAS présentent également de nombreux défauts fonctionnels intrinsèques.

Les patients atteints de WAS présentent un nombre réduit de lymphocytes B circulants, des défauts de formation des follicules B dans les organes lymphoïdes secondaires et une réponse anticorps perturbée (faible taux d'IgM et fort taux d'IgA et IgE)¹⁷⁵. Tout comme les cellules du lignage myéloïde, les lymphocytes B des patients WAS ont des défauts de migration, d'adhésion et d'interactions cellulaires. La formation de protrusions riches en actine s'avère également défectueuse^{176,177}. Cependant bien que le développement des lymphocytes B ne semble pas être affecté par la déficience en WASP, cette dernière impacte fortement leur homéostasie et leur maturation en périphérie^{178,179}.

D'autre part, un paramètre décisif dans l'activation des lymphocytes T est la formation de la synapse immunologique⁷⁸. Or, WASP est recrutée à la synapse immunologique et son absence entraîne un défaut de la formation de celle-ci^{153,180}. Ainsi en réponse à la stimulation du TCR, l'assemblage localisé de l'actine filamenteuse et le recrutement de protéines ayant un rôle à la synapse immunologique, incluant le TCR et les molécules de signalisation associées, sont défectueux en l'absence de WASP¹⁸¹. Ceci a des répercussions sur la signalisation du TCR menant à des défauts fonctionnels spécifiques pour chaque sous population T^{182,183} (**Figure 7**). D'une part, l'absence en WASP mène à une réponse des lymphocytes T auxiliaires Th1 altérée et ainsi à un déséquilibre de la balance Th1/Th2¹⁸⁴. Ceci est non seulement dû à un défaut de formation de la synapse immunologique lors de l'activation, mais aussi au rôle nucléaire de WASP, jusqu'alors démontré comme spécifique des Th1, pour la promotion de l'expression de T-bet¹⁸⁵. Quant aux lymphocytes T régulateurs (Treg) déficients pour WASP, leur activation et

leurs fonctions suppressives sont défectives^{186,187}. Après stimulation, les Treg de patients WAS sont anergiques et ne prolifèrent pas. Par ailleurs, ces Treg ont un défaut de leurs fonctions suppressives sur la prolifération et la production d'IFN γ de lymphocytes T CD4⁺ à la fois dans un contexte allogénique et autologue.

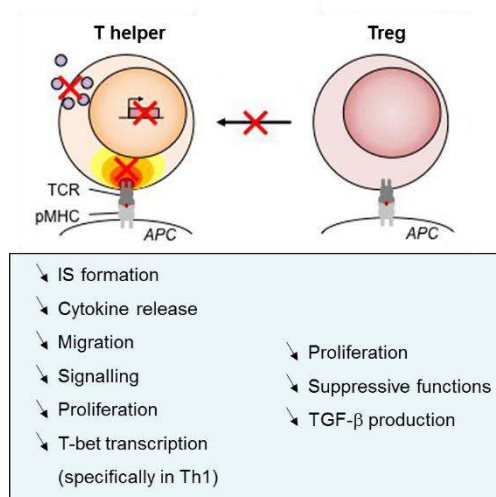


Figure 10. Défauts des populations lymphocytaires T CD4⁺. Etant donné que WASP est requise pour plusieurs fonctions, son absence résulte en des défauts de fonctions cellulaires. Ici sont énumérés les défauts observés dans la littérature pour les lymphocytes T CD4⁺ primaires humains. La flèche indique la fonction exercée par les Treg et les croix rouges indiquent le défaut majeur des cellules WAS concernées. Adapté de Cotta-de-Almeida et al. 2015¹⁸⁸.

Les défauts des lymphocytes T CD4⁺, présentés ici, peuvent expliquer en partie les manifestations cliniques liées au syndrome, notamment la survenue de réponses inflammatoires exacerbées et la prédisposition à l'auto-immunité. En revanche, à eux seuls, ces défauts n'expliquent pas la susceptibilité aux infections virales récurrentes et la survenue anormalement élevée de tumeurs. Une section plus détaillée sera dédiée à la description de l'impact de la déficience en WASP dans l'activité cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ dans différents contextes pathologiques.

Ainsi, cette déficience naturelle au niveau de cellules immunitaires primaires humaines a permis l'identification du rôle de WASP au sein d'une multitude de populations et de fonctions cellulaires. La déficience naturelle en WASP constitue donc un modèle de choix pour approfondir le rôle de la dynamique du cytosquelette d'actine dans le soutien aux fonctions des cellules immunitaires, notamment pour l'étude de la fonction cytotoxique. Ce modèle est plus physiologique que les expériences basées sur l'utilisation de drogues interférant avec la dynamique du cytosquelette ou même que les souris KO.

III.2. Défauts d'activité cytotoxique (NK et CTL)

Comme introduit dans la première partie, la fonction cytotoxique, *via* les acteurs cellulaires immunitaires, est essentielle pour de multiples aspects liés à la défense et l'intégrité de

l'organisme : élimination des cellules infectées, contrôle des cellules tumorales, l'homéostasie et l'auto-immunité.

Les patients WAS ont une récurrence accrue aux infections bactériennes (comme des otites, abcès cutané, pneumonie, entérocolite, ou infection urinaire), virales (comme le virus de l'herpès HSV et le cytomégalovirus CMV) ou encore de type fongique (causant la candidose, aspergillose et la pneumocytose due à *Pneumocystis carinii*)^{189,190}.

Par ailleurs, le développement de tumeurs a une occurrence fréquente dans la mise en place du syndrome de Wiskott-Aldrich. Sullivan et collaborateurs ont notamment observé que 13% des patients WAS développent des tumeurs à un âge moyen de 9 ans et demi¹⁹¹. Les lymphomes sont les tumeurs les plus communément observées.

Tout comme le développement tumoral, l'auto-immunité a une occurrence fréquente chez les patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich. Il a notamment été estimé qu'environ 40% des patients développent de l'auto-immunité et beaucoup d'entre eux développent plusieurs manifestations de maladies auto-immunes¹⁹². Par exemple, Sullivan et collaborateurs ont reporté que les deux tiers des patients ayant des manifestations auto-immunes lié à WAS ont de multiples désordres auto-immuns¹⁹¹. Les manifestations les plus communes inclues l'anémie hémolytique (14%), la vasculite (13%), les atteintes rénales (12%) et l'arthrite chronique (10%). Dans le développement du syndrome, la cause de ces manifestations auto-immunes pourrait être liée à la formation d'auto-anticorps ou à la présence de lymphocytes B et T auto-réactifs. Dans le cas de développement de l'auto-immunité, comme complication du WAS, cela pourrait aussi être en lien avec les perturbations de l'homéostasie des lymphocytes B et des lymphocytes T régulateurs^{179,193}.

En revanche, les cas d'infections récurrentes et d'apparitions de tumeurs suggèrent aussi un défaut d'activité cytotoxique envers les cellules infectées et tumorales. Les acteurs principaux étant les cellules NK et les CTL, quel est l'impact de la déficience en WASP sur leur fonction lytique ? Il a été démontré que l'expression de WASP participe à l'activité cytotoxique des cellules NK¹⁷¹ et des CTL¹⁵⁴. En revanche, la fonction cytotoxique semble être plus profondément affectée dans les cellules NK déficientes en WASP que dans les CTL WASP-déficients^{172,194}.

III.2.a Les cellules NK

Le défaut d'activité cytotoxique des cellules NK a été démontré initialement pour 2 patients. Ce défaut fonctionnel peut être en partie compensé en augmentant le nombre de cellules NK pour ces patients WAS¹⁷¹. Gismondi et collaborateurs ont démontré qu'en plus du défaut d'enrichissement de l'actine, le défaut de conjugaison aux cellules cibles contribue aussi au défaut cytotoxique des cellules NK¹⁷². L'ajout de grande quantité d'IL-2 exogène restaure les défauts fonctionnels pour les cellules de patients WAS, suggérant que l'IL-2 puissent entraîner une voie de signalisation indépendante de WASP qui pourrait compenser son absence. Par ailleurs, les cellules NK provenant de patients ayant une mutation du gène WAS, conduisant à une expression partielle de WASP (maladie de thrombocytopénie liée à l'X ou XLT), montrent un défaut d'enrichissement de l'actine et de formation de conjugués, mais le défaut cytotoxique est moins prononcé¹⁷².

D'autre part, un modèle de souris WASP déficientes a démontré, non pas un défaut de réponse primaire, mais un défaut de réponse secondaire au virus influenza^{195,196}. Cela laisse supposer une forte importance des lymphocytes T cytotoxiques dans les phénomènes d'infections récurrentes des patients.

III.2.b Les CTL

La question de l'activité cytotoxique des CTL dans le contexte de WAS a été très peu étudiée. La première étude dédiée à cette question a été menée par mon laboratoire d'accueil et a révélé un défaut profond de prolifération des lymphocytes T CD8⁺ lors d'une stimulation à base d'anticorps, alors que l'activité lytique était préservée envers des blasts PHA allogéniques et des cellules B autologues transformées par l'EBV¹⁸⁴.

Dans une seconde étude, notre laboratoire a montré que les CTL de patients WASP déficients ont une capacité lytique réduite vis-à-vis de cibles de type lymphome de Burkitt, pouvant être restaurée en rétablissant l'expression de WASP au moyen d'un vecteur lentiviral¹⁵⁴. Ce défaut a été associé à l'organisation des granules lytiques qui semblait ne pas se polariser complètement vers le centre de la zone de contact entre le CTL et la cellule cible tumorale. En revanche, la capacité de dégranulation des molécules lytiques, évaluée par l'exposition de LAMP-1, n'était pas impactée par la déficience en WASP, de même que la polarisation du

centre organisateur des microtubules (MTOC). Ces observations soulèvent la question : que se passe-t-il à la synapse immunologique en l'absence de WASP ?

III.3. Questions ouvertes

Un large éventail de questions peut s'ouvrir. En continuant sur la lancée de l'identification du rôle de WASP dans l'activité cytotoxique, nous serions tentés de l'étudier dans d'autres types cellulaires cytotoxiques comme les lymphocytes T $\gamma\delta$, les cellules NKT, et les CD4 CTL, ou encore l'activité cytotoxique des Treg. De même, qu'en est-il de cette fonction cytotoxique, pour chacune des populations aux capacités lytiques, dans tous les contextes pathologiques (infections, cancers, auto-immunité) ou d'homéostasie ?

À l'heure actuelle, une seule étude a montré que, malgré une augmentation du nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ ¹⁹⁷, ces cellules provenant de patients WAS ont un défaut de lyse¹⁹⁸.

J'ai choisi ici d'ouvrir sur des questions portant sur la synapse lytique des CTL et le rôle de WASP dans celle-ci. En effet la synapse lytique, et sa stabilité, est une structure de haute importance afin de polariser les granules lytiques pour délivrer le coup létal de manière focalisée, afin d'effectuer une fonction lytique efficace.

III.3.a Stabilité de la synapse

Précédemment décrit dans le laboratoire, les lymphocytes T de patients WAS, en contact avec une APC, montrent différentes morphologies allant de normale à aberrante (protrusions d'actine)¹⁸¹. Cela pourrait avoir pour origine des cellules anormalement dynamiques qui oscillent entre différents états synaptiques, passant ainsi de synapses d'aspect normal à des synapses allongées de type « kinapse »¹⁰⁰. La dynamique de la synapse des CTL WAS face aux cibles, ou encore la stabilité de celle-ci, n'a pas encore été évaluée. Des expériences de microscopie sur du vivant permettraient de déterminer le défaut de stabilité de leur synapse au contact des cibles, par exemple dans leur phase d'arrêt comme l'a démontré Fanny Lafouresse, de notre laboratoire, pour les lymphocytes T CD4⁺¹⁹⁹. Un manque de temps d'arrêt approprié sur la cible pourrait ainsi expliquer le défaut de polarisation des granules lytiques¹⁵⁴ et donc le défaut lytique.

Est-ce que la protéine WASP joue un rôle dans la stabilité de la synapse lytique ?

En effet, en posant l'hypothèse d'une instabilité de contact des CTL WASP-déficients avec la cellule cible, pouvant être de type « kinaptique » plutôt que synaptique, cela permettrait d'expliquer que malgré une capacité à dégranuler les molécules lytiques¹⁵⁴, celle-ci n'est pas effectuée de manière polarisée. Les granules lytiques seraient relargués à côté de la cellule cible et ainsi les molécules lytiques pourraient avoir plus de difficulté à atteindre celle-ci.

Par ailleurs, l'hypothèse d'une instabilité de la synapse suggère que l'attachement à la cellule cible n'est pas suffisamment solide. L'intégrine principalement impliquée dans la conjugaison de la cellule effectrice à la cellule cible est LFA-1 et par la formation d'un « ring » (au niveau du p-SMAC). En effet, LFA-1, par son activité adhésive en liant son ligand ICAM-1, est central dans l'ancrage des CTL à leurs cibles et pour la délivrance du coup létal.

III.3.b Activation de l'intégrine LFA-1

Nous posons ainsi la question suivante : la protéine WASP aurait-elle un rôle dans l'activation de LFA-1 afin de permettre une adhésion ferme à la cellule cible pour promouvoir la stabilité de la synapse ?

Tout d'abord, LFA-1 est une intégrine pouvant se présenter sous 3 formes : une première en conformation fermée, puis intermédiaire ayant une faible affinité pour le ligand ICAM-1 et enfin une conformation ouverte de haute-affinité²⁰⁰. Sachant que l'inside-out signaling, suite à la stimulation du TCR, entraîne l'activation de LFA-1, est-ce que WASP est impliqué dans ce phénomène ? Nous formulons l'hypothèse que oui, en partie parce qu'il a été démontré, pour les cellules NK de patients WAS, que la voie Cdc42/WASP est essentielle à l'activation de LFA-1 en réponse aux chimiokines pour l'augmentation de son adhésion par un changement conformationnel et donc la migration¹⁷⁰. Si cette hypothèse se vérifie, il conviendra de comprendre s'il s'agit d'une action directe ou indirecte de WASP. La protéine WASP, activée par des récepteurs aux chimiokines ou par la signalisation du TCR, pourrait ainsi interagir directement avec LFA-1 et permettre son activation. Sachant qu'il existe un activateur de LFA-1 associé au cytosquelette d'actine, la taline²⁰¹, il semble cependant plus probable que WASP favoriserait le recrutement de la taline au niveau de LFA-1. Etant donné que la taline et WASP sont recrutés à la SI^{202,203}, WASP pourrait interagir directement avec celle-ci. En outre, la taline joue un rôle dans la formation des « clusters » de LFA-1 qui régulent la force d'adhésion²⁰¹. Il serait donc approprié de mesurer la taille des clusters de LFA-1 à la synapse, ainsi que leur

nombre et leur densité dans le contexte des CTL de patients WAS. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des techniques de super-résolution comme le SIM (Structured Illumination Microscopy) ou le dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy).

IV. Activité cytotoxique des lymphocytes T régulateurs : application thérapeutique

Ma passion pour les lymphocytes T ayant une activité cytotoxique m'a amenée à m'intéresser à leurs mécanismes non seulement dans des contextes sains et pathologiques, mais également dans le cadre d'applications thérapeutiques. Par définition, l'immunothérapie permet la prévention ou le traitement de maladies avec des substances stimulant la réponse immunitaire. Elle s'est tout d'abord présentée sous la forme de thérapies vaccinales ou à base d'anticorps, majoritairement pour lutter contre les infections virales ou bactériennes. Ces progrès de la médecine ont permis d'accroître considérablement la longévité de la population humaine. Cependant, l'allongement de la vie combiné à des facteurs environnementaux ont résulté en la recrudescence de cas de cancers et de maladies auto-immunes. Ces pathologies soulèvent de nouveaux challenges pour l'immunothérapie. Le développement de l'immunothérapie anti-tumorale commence dans les années 1960 par des greffes de moelle osseuse permettant un transfert de cellules immunitaires, avec un grand engouement dans les années 1980/1990 grâce à la découverte de CTLA-4²⁰⁴ et PD-1²⁰⁵ ainsi que l'effet de leur blocage permettant de lever le « frein » à l'activation des lymphocytes T^{206,207}. Ainsi les techniques de vaccinations et d'anticorps ont été appliquées au traitement anti-cancéreux, avec des résultats prometteurs en clinique avec l'exemple de thérapies à base d'anticorps anti-CTLA-4 (Ipilimumab et Tremelimumab) pour le mélanome²⁰⁸. Par ailleurs, face à la diversité des tumeurs, de nouveaux concepts ont vu le jour avec, par exemple, la stimulation des lymphocytes T *in vivo* par le transfert de cellules présentatrices de l'antigène chargées avec des antigènes tumoraux^{209–211}. De même, dans le contexte de pathologies auto-immunes, de nouvelles stratégies ont été développées comme l'induction de l'anergie des lymphocytes T réactifs²¹², l'induction de la tolérance immunitaire^{213,214} ou encore la déviation phénotypique^{215,216}.

Une technique plus récente de thérapie à base de transferts de lymphocytes T, en cours d'évaluation clinique, semble prometteuse^{217–219}. En effet, un apport direct par l'injection de cellules correctement éduquées et armées, l'élimination des cellules tumorales ou le contrôle de l'inflammation pourraient être plus efficaces.

IV.1. Vue générale des thérapies cellulaires à base de lymphocytes T

Ainsi, deux grandes catégories de thérapies cellulaires ont vu le jour : une première visant à éliminer les cellules cancéreuses et une seconde visant à atténuer les inflammations exacerbées comme dans le cas de maladies auto-immunes, inflammatoires chroniques ou encore le rejet de greffe. Ces immunothérapies cellulaires sont encore actuellement en essais cliniques impliquant un large éventail de populations immunitaires qui couvrent l'immunité innée et adaptative. Je consacrerai les prochaines sous-parties aux populations lymphocytaires T utilisées dans le cadre de thérapies cellulaires anti-tumorales, puis dans le contexte anti-inflammatoire.

IV.1.a Thérapie cellulaire anti-tumorale

De manière générale, au cours de l'histoire naturelle du développement tumoral, la réponse immunitaire se révèle inefficace. Ce constat est à l'origine de nombreux travaux de recherche dont l'objectif à terme est de concevoir de nouvelles approches thérapeutiques du cancer. Les populations immunitaires connues pour leur activité anti-tumorale, notamment par leur fonction cytotoxique, sont les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les lymphocytes Tγδ devenant ainsi un choix tactique préférentiel. Le concept de base est alors d'amplifier sur le plan qualitatif et quantitatif, *ex vivo* ou *in vitro*, ces effecteurs de la réponse anti-tumorale.

L'équipe de Rosenberg a pu démontrer dès 1984, par une expérimentation pionnière, l'efficacité d'injections de lymphocytes activés permettant la réduction du nombre et de la taille des métastases dans plusieurs modèles de tumeurs murines²²⁰.

Depuis, ce procédé a été amélioré pour une adaptation en clinique. Concernant les lymphocytes T γδ, plusieurs études ont indiqué la sûreté et une efficacité dans le cadre des cancers des poumons et des métastases rénales^{221–223}. Malgré cela, les stratégies en immunothérapie des tumeurs se fondent principalement sur l'activation de la réponse lymphocytaire T spécifique.

Certaines équipes de recherches ont mené des essais cliniques avec des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Par exemple, dans les cancers du rein métastasés, ces essais ont donné des réponses partielles à complètes. Dans le cas de l'équipe de Belldegrun, un essai de phase II, la moitié des patients a reçu des suspensions cellulaires enrichies en T CD8 (plusieurs milliards

de cellules) et c'est dans ce groupe que le plus grand nombre de réponses a été observé²²⁴. Des essais cliniques pour le traitement des mélanomes par des lymphocytes activés ont également été menés en France. En 2003, un essai à Nantes montre une augmentation significative de la survie sans rechute des patients traités par des lymphocytes activés, par rapport au groupe témoin²²⁵. Une corrélation est observée entre l'efficacité clinique et le pourcentage de lymphocytes T spécifiques des antigènes de tumeur.

En effet, la spécificité pour des antigènes tumoraux est primordiale, c'est pourquoi la récupération de lymphocytes T CD8⁺ naïfs spécifiques, pour une amplification *in vitro*, est aussi une stratégie. En revanche celle-ci se révèle particulièrement difficile par leur quantité faible et variable d'une personne à une autre. C'est pourquoi une nouvelle stratégie a été mise en place : des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un TCR modifié ou un récepteur de l'antigène chimérique (CAR), afin de contrôler leur reconnaissance spécifique²²⁶. Très récemment, en août 2017, une thérapie à base de lymphocytes CAR a été approuvée, par la FDA (Food and Drug Administration, Etats-Unis) pour le traitement d'enfants atteints de la leucémie lymphoïde aiguë^{227,228}.

IV.1.b Thérapie cellulaire anti-inflammatoire

Les pathologies inflammatoires sont très répandues et sont principalement des maladies chroniques dévastatrices, incluant des maladies auto-immunes (ex diabète de type 1) ou des maladies inflammatoires de l'intestin (ex maladie de Crohn), ainsi que les troubles inflammatoires liés à la transplantation (lors d'un rejet de greffe). Connaissant le fonctionnement de la réponse immunitaire, les premières thérapies étaient basées sur des drogues anti-inflammatoires afin de tempérer celle-ci. Ainsi, le développement de thérapies plus ciblées sur l'inflammation due à la pathologie chronique devient nécessaire. Les avantages théoriques de la thérapie cellulaire à base de lymphocytes T régulateurs (Treg) pour les maladies auto-immunes sont perceptibles. En effet, les cellules, en particulier des Treg antigène-spécifiques, devraient contrôler l'inflammation sans induire de suppression immunologique systémique ou la suppression massive de cellules immunitaires non spécifiques comme cela se produit avec les traitements immunosuppresseurs actuels.

Etant donné que la grande famille des populations de lymphocytes T régulateurs est décrite comme ayant un fort potentiel de régulation de l'inflammation par leur activité suppressive, il semble alors naturel de vouloir les potentialiser dans le cadre de ces pathologies inflammatoires. Malheureusement, la survenue de la plupart des pathologies chroniques inflammatoires citées précédemment ont pour point commun un échappement à la vigilance des Treg et/ou un dysfonctionnement de celles-ci²²⁹. Différentes stratégies ont alors émergé, soit pour induire ou booster les Treg *in vivo*, soit pour expandre les Treg *in vitro* afin de les transférer aux patients. Parmi la multitude de populations Treg qui a été identifiée, deux populations ont été fortement étudiées et bien caractérisées : les Treg exprimant le facteur de transcription Foxp3 (Foxp3⁺ Treg) et les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) (**Figure 11**). Les Foxp3⁺ Treg peuvent dériver du thymus (tTreg) ou être induits en périphérie (pTreg)^{230,231}. Indépendamment de leur origine, les deux sous-populations sont caractérisées par l'expression constitutive de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), l'absence de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127) et l'expression du Foxp3²³². Au fur et à mesure des années, plusieurs molécules ont été identifiées à la surface des Treg humains, en lien avec leur fonction suppressive, avec par exemple : CTLA-4²³³, GITR²³⁴, et CD39²³⁵. En revanche, l'expression de ces molécules n'est pas exclusive aux Treg étant donné que celles-ci sont parfois aussi exprimées par les lymphocytes T conventionnels activés. Les mécanismes supplémentaires de suppression décrits pour les Treg incluent aussi la sécrétion de cytokines immunosuppressives, comme l'IL-10²³⁶, le TGF- β ²³⁷ et l'IL-35²³⁸, mais aussi la cytolyse directe des T effecteurs et des APC *via* le couple granzyme/perforine²³⁹, la diminution de la capacité de stimulation des APC *via* CTLA-4²⁴⁰, la privation cytokinique²⁴¹, et la génération de métabolites immunosuppresseurs comme l'adénosine²⁴² et l'AMP cyclique (AMPC)²⁴³. Ainsi, les Foxp3⁺ Treg ont une grande variété d'armes à leur disposition.

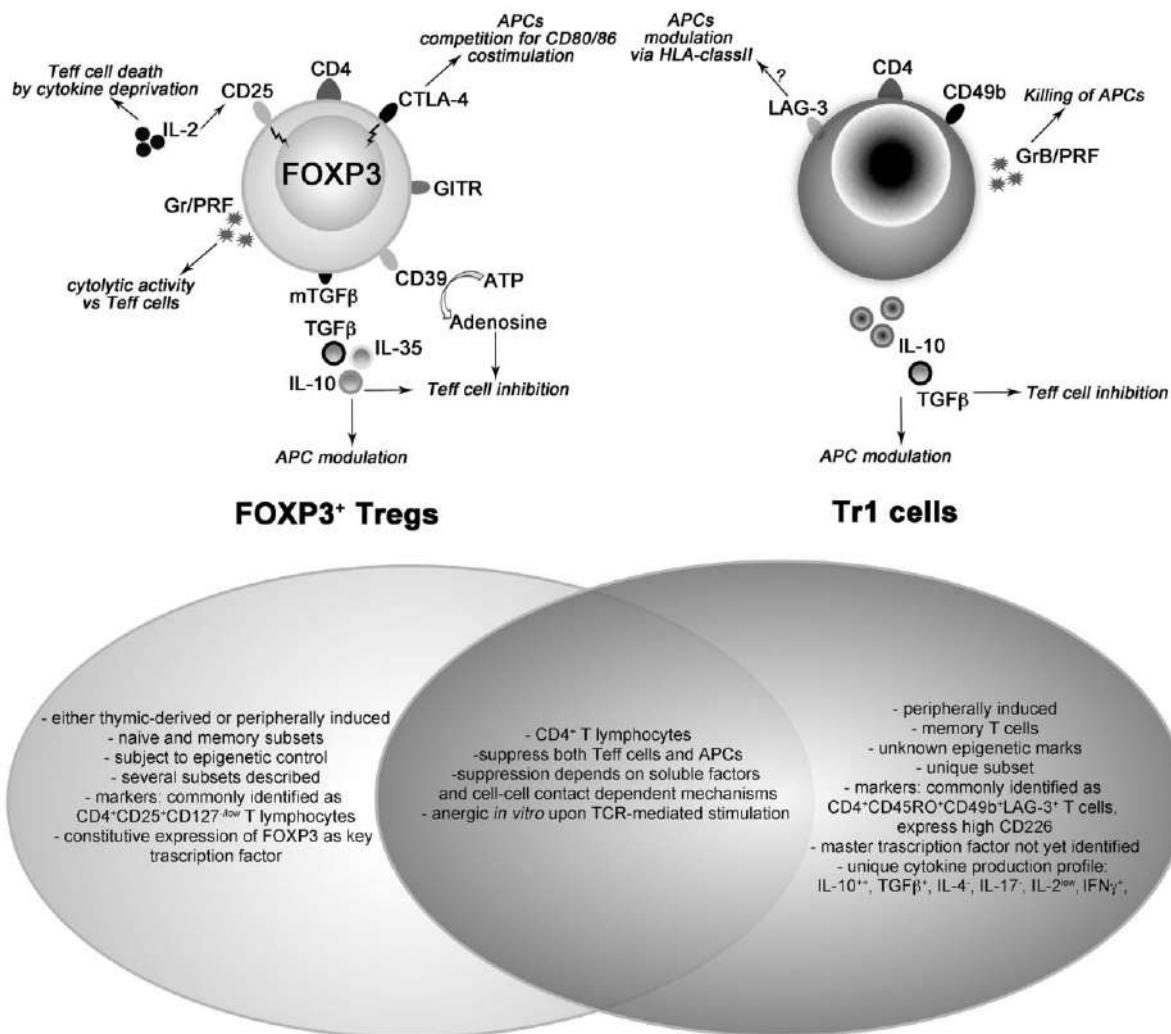


Figure 11. Représentation schématique des marqueurs de surface et intracellulaire ainsi que des mécanismes d'actions caractérisant les deux populations Treg : Foxp3⁺ Treg et Tr1²⁴⁴. Les caractéristiques uniques et partagées des deux types cellulaires sont listées dans les cadres.

Concernant les Tr1, ils sont principalement caractérisés par une forte production d'IL-10, de TGFβ, de quantités variables d'IFNγ et peu d'IL-2 et d'IL-4^{245,246}. De cette manière, une multitude de sous-populations a été identifiée au cours des années mais l'une d'entre elles a été particulièrement étudiée : ces Tr1 expriment à leur surface CD49b et LAG-3²⁴⁷. De manière similaire aux Foxp3⁺ Treg, ils expriment CTLA-4²⁴⁸, ICOS²⁴⁹, CD39 et CD73²⁵⁰. En revanche, ils n'expriment pas Foxp3 de manière constitutive²⁵¹. Toutefois, ils peuvent l'exprimer de manière transitoire lors de leur activation, même si le niveau d'expression n'atteint pas celui des Foxp3⁺ Treg²⁵²⁻²⁵⁴. Le mécanisme principal par lequel les Tr1 contrôlent la réponse immunitaire est réalisé par la sécrétion d'IL-10 et de TGFβ. De plus, de nouvelles études

suggèrent une régulation immunitaire par une activité de lyse envers les APC *via* le couple granzyme B/perforine²⁶.

Enfin, des résultats prometteurs venant d'études précliniques chez la souris ont permis de convaincre le monde de la recherche que les Treg peuvent être utilisés afin de contrôler la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), de même que le rejet d'organes ou les maladies auto-immunes²⁵⁵⁻²⁵⁷. Le défi actuel des essais cliniques chez l'Homme est alors la purification de ces populations Treg et leur expansion *in vitro* tout en gardant leur phénotype régulateur stable. En 2004, des études ont démontré le potentiel de l'isolation de Treg CD4⁺ CD25^{bright} (Foxp3⁺ Treg) à partir du sang périphérique et de leur expansion *in vitro* pour une réinjection aux patients sous des conditions cliniquement contrôlées^{258,259}. Une expansion *in vitro* efficace de Treg humains a été précédemment décrite, celle-ci est effectuée grâce à une stimulation à base de billes coatées avec les anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28 et de fortes doses d'IL-2 permettant aussi le maintien du phénotype régulateur²⁵⁸.

Ainsi, de nos jours, plusieurs équipes de recherches et entreprises, implantées dans différents pays comme les Etats-Unis, l'Italie, la Pologne ou la France, ont terminé les premières phases d'essais cliniques (**Tableau 3**). La majorité de ces études cliniques impliquent la population de Foxp3⁺ Treg, soit fraîchement purifiée, soit amplifiée *in vitro* préalablement au transfert adoptif. Le contexte pathologique de ces études regroupe deux grandes catégories : la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) suite à des transplantations de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) de donneurs compatibles au niveau HLA (HLA-HSCT) ou seulement compatibles à 50% (« haplo-identique », Haplo-HSCT) ; ainsi que le diabète de type 1. Par ailleurs, à l'heure actuelle, une seule étude, CATS1, a été terminée sur le potentiel des Tr1 en thérapie cellulaire pour le traitement d'une maladie auto-immune inflammatoire chronique. Il s'agit du produit thérapeutique Ovasave® développé en France par l'entreprise TxCell.

Identification de l'essai	Produit cellulaire	Maladie	Sûreté	Efficacité	Référence
N.A	Treg CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁻ dérivés du sang d'un donneur, prolifération <i>in vitro</i>	GvHD après HLA-HSCT pour des tumeurs hématopoïétiques	Oui	N.A	260
NCT00602693	Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ dérivés du sang de cordon ombilical, prolifération <i>in vitro</i>	GvHD après DUCBT pour des tumeurs hématopoïétiques	Oui	Oui	261
CEAS Umbria Protocole N° 01/08 2008	Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ fraîchement purifiés du sang d'un donneur	GvHD après haplo-HSCT pour des tumeurs hématopoïétiques	Oui	Oui	262
CEAS Umbria Protocol N° 0108	Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ fraîchement purifiés du sang d'un donneur	GvHD après haplo-HSCT pour des tumeurs hématopoïétiques	Oui	Oui	263
NKEBN/8/2010	Treg CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁻ autologues, prolifération <i>in vitro</i>	Diabète de type 1	Oui	N.A	264
ALT-TEN	Lymphocytes T anergisés avec l'IL10 provenant d'une infusion de lymphocytes d'un donneur	GvHD après haplo-HSCT pour des tumeurs hématopoïétiques	Oui	N.A	265
N.A	Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ autologues, prolifération <i>in vitro</i>	Diabète de type 1	Oui	N.A	266
CATS1	Ovasave®, Clones autologues Tr1 ova-spécifiques	Maladie de Crohn réfractaire	Oui	Oui	267

Tableau 3. Essais cliniques de thérapies cellulaires à base de Treg terminées. *Adapté de Gregori et al.*²⁴⁴

IV.2. Thérapie cellulaire Ovasave®

Avant de vous détailler le produit thérapeutique Ovasave®, je souhaite présenter brièvement l'entreprise TxCell ainsi que ses objectifs de développements thérapeutiques.

IV.2.a Démarche de développement thérapeutique de l'entreprise TxCell

TxCell SA, « spin-off » de l'Inserm, a été créée en 2001. TxCell est une société de biotechnologies qui développe des plateformes d'immunothérapies cellulaires T personnalisées innovantes pour le traitement de maladies inflammatoires et auto-immunes sévères. TxCell cible différentes maladies auto-immunes dont la maladie de Crohn, le lupus rénal, la pemphigoïde bulleuse et la sclérose en plaques, ainsi que les rejets de greffe. TxCell est la seule société de thérapie cellulaire au stade clinique qui soit focalisée exclusivement sur les lymphocytes T régulateurs (Treg). Contrairement aux approches classiques basées sur des Treg polyclonaux non-spécifiques, TxCell ne développe que des Treg spécifiques d'antigène.

Cette spécificité antigénique peut provenir soit de modifications par génie génétique pour ajouter un récepteur dit chimérique (CAR), soit du récepteur des cellules T (TCR) naturellement présent à la surface des Treg. TxCell développe ainsi deux plateformes technologiques, ENTrIA et ASTrIA (**Figure 12**).

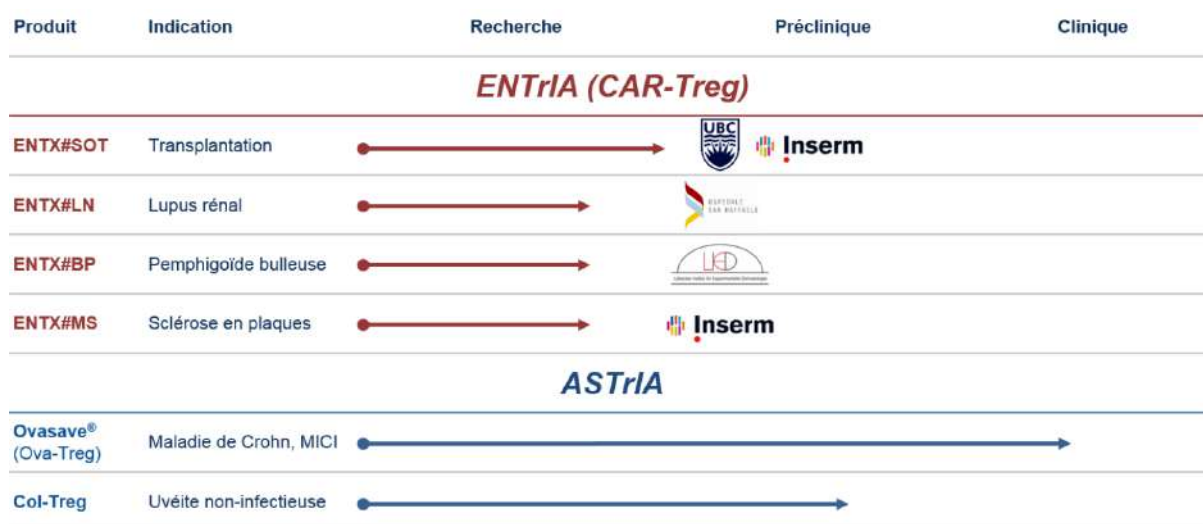


Figure 12. Représentation schématique du portefeuille de recherche & développement de TxCell. Adapté du site www.txcell.com.

La plateforme ENTrIA (Engineered Treg for Inflammation and Autoimmunity) repose sur le développement de Foxp3⁺ Treg génétiquement modifiés (CAR-Treg), tandis que la plateforme ASTrIA (Antigen-Specific Treg for Inflammation and Autoimmunity) est basée sur les Tr1 sélectionnés pour leur spécificité à un antigène donné. Le produit thérapeutique le plus avancé actuellement fait notamment partie de la plateforme ASTrIA ; il s'agit de l'Ovasave®.

IV.2.b Ovasave® : un produit thérapeutique ciblé pour la maladie de Crohn

La thérapie cellulaire Ovasave® a été développée pour des patients atteints de la maladie de Crohn qui se sont avérés réfractaires à tous les autres traitements disponibles. Cette pathologie affecte à la fois des hommes et des femmes avec une estimation d'environ 1 million de patients atteints au sein de la communauté européenne, et une incidence de 50 800 nouveaux cas par an²⁶⁸. La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire récurrente de la muqueuse gastro-intestinale qui peut affecter l'ensemble du tractus gastro-intestinal de la cavité buccale jusqu'à l'anus. L'inflammation chronique de la paroi intestinale conduit à la perte de fonction physiologique de l'intestin. À l'heure actuelle, la cause exacte de la maladie n'est pas encore entièrement élucidée. Cette pathologie est multifactorielle et de nombreuses

composantes semblent être étroitement intriquées pour provoquer ce phénotype complexe. Cela a notamment été bien indiqué dans plusieurs revues^{269,270}. Afin de poser le diagnostic de cette pathologie, un seul test ne suffit pas, il est nécessaire d'intégrer l'ensemble des découvertes physiques, comme les douleurs abdominales, diarrhées, perte de poids, nausées, et vomissements, ainsi que les données venant d'études d'imageries, du laboratoire ou d'histopathologie²⁷¹. En effet, par endoscopie et analyses de biopsies, les trois phénotypes : inflammation, structure et pénétration sont évalués. Une fois le diagnostic posé, le suivi de l'état des patients est principalement fait par le dosage de la protéine C réactive, et le bien-être du patient est suivi par l'index d'activité de la maladie de Crohn (CDAI)^{272,273}. Un CDAI inférieur à 150 correspond à une maladie de Crohn inactive, compris entre 150 et 450 à la maladie active et supérieur à 450 à une maladie sévère.

A l'heure actuelle, une multitude de médicaments sont déjà présents sur le marché, allant des anti-inflammatoires (ex Mésalazine) aux corticostéroïdes (ex prednisone, prednisolone) jusqu'aux immunosuppresseurs comme les anti-TNF²⁷⁴. Le désavantage de ces traitements, mis à part les effets secondaires potentiels, est la perte de réponse à ceux-ci. Les patients développent une résistance, on parle alors de maladie de Crohn réfractaire. Ceci représente donc un nouveau challenge auquel TxCell répond par la thérapie cellulaire Ovasave®.

TxCell propose une thérapie cellulaire autologue dont le procédé d'obtention des cellules repose sur un seul échantillon de sang du patient (**Figure 13**). Ensuite, après purification des PBMCs, ceux-ci sont mis en culture en présence de l'antigène, l'ovalbumine (Ova), afin de l'enrichir en populations lymphocytaires spécifiques de cet antigène. Une étape de clonage par dilution limite est par la suite effectuée pour permettre la sélection de clones ayant un profil de lymphocytes Tr1 en réponse à l'Ova. Une expansion cellulaire *in vitro* est ensuite nécessaire afin d'obtenir un grand nombre de lymphocytes (au moins 450 millions), stockés par la suite sous forme de produits médicaments congelés. L'administration au patient se fait ensuite par intraveineuse, immédiatement après décongélation. De manière concomitante, le patient doit manger une meringue par jour afin d'être sûr de la présence de l'antigène Ova au niveau du tractus digestif.

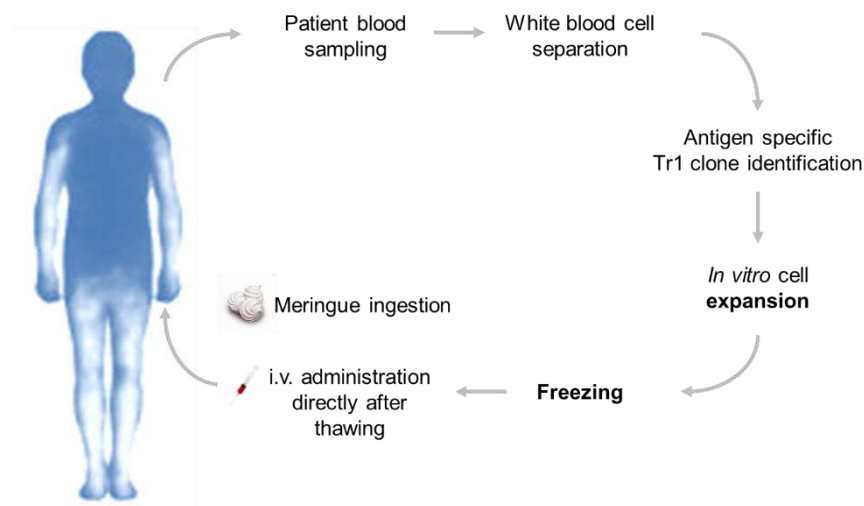


Figure 13. Représentation schématique du procédé de production des Tr1 Ova-spécifiques pour la thérapie cellulaire Ovasave®.

La première phase d'essai clinique I/IIa, nommée CATS1 (Crohn's And Treg cells Study 1), a été conduite sur 20 patients atteints de la maladie de Crohn réfractaire²⁶⁷. Cette étude a été menée sur 12 semaines, avec une seule injection par patients et 4 groupes de patients ayant chacun une dose croissante : 10^6 , 10^7 , 10^8 et 10^9 de Ova-Tr1 autologues. Comme indiqué dans le tableau 3, cette étude a permis de démontrer la sûreté du produit thérapeutique, mais a aussi permis d'obtenir des indications d'efficacité. En effet, la réduction de l'activité de la maladie de Crohn s'est produite chez 40% de tous les patients à 5 semaines et 8 semaines après l'injection. Dans le groupe recevant la plus faible dose de cellules, 75% ont eu des réponses et une réduction marquée de l'activité de la maladie de Crohn pendant la période d'étude, 38% étaient en rémission à 5 semaines et 25% étaient encore en rémission à 8 semaines.

IV.3 Hypothèses de travail sur le mécanisme d'action des Tr1 Ovasave®

Sachant que l'activité effectrice des lymphocytes T régulateurs peut être effectuée par de multiples mécanismes d'actions introduits précédemment, nous posons la question du mécanisme principal des cellules thérapeutiques composant l'Ovasave®. En première partie, je vais aborder les mécanismes d'activités suppressives dits classiques et en second, le mécanisme d'activité cytotoxique.

IV.3.a Activité suppressives « classiques »

Les lymphocytes T régulateurs de type 1 sont de forts producteurs de la cytokine immunosuppressive IL-10, et il a été proposé que leur fonction suppressive est principalement basée sur celle-ci²⁴⁵. Notamment, TxCell sélectionne les clones Tr1 de patients sur la base de leur réponse cytokinique (dont l'IL-10) ce qui suggère que ces cellules utilisent cette cytokine afin de contrôler l'inflammation, particulièrement sur les lymphocytes T effecteurs. Les cellules thérapeutiques sélectionnées pour chaque patient ont ainsi une capacité de sécrétion comparable, pour autant tous les patients ne sont pas répondeurs à cette thérapie. Ceci pourrait suggérer que ce mécanisme n'est pas le seul impliqué dans la réponse des patients.

Pour une action directe sur les lymphocytes T effecteurs, les Tr1 peuvent effectuer une perturbation métabolique par la production d'adénosine à l'aide des ecto-enzymes CD39 et CD73. De plus, une activité immunosuppressive indirecte sur les cellules présentatrices de l'antigène *via* CTLA-4 ou GITR n'est pas à exclure. Les molécules permettant ces mécanismes sont exprimées de manière variable selon les clones, et pour certains, très peu exprimées. Cela suggère que si ces mécanismes interviennent dans le contrôle de l'inflammation, ceux-ci seraient minoritaires.

Dans ce chapitre IV, j'ai présenté les thérapies cellulaires à base de transferts adoptifs de lymphocytes T. D'un côté, il y a les thérapies de lymphocytes T aux capacités cytotoxiques pour le traitement des cancers, de l'autre les lymphocytes T aux capacités immunosuppressives pour le traitement de maladies inflammatoires. Or, pourquoi la fonction cytotoxique ne pourrait-elle pas participer elle aussi à l'inflammation ?

IV.3.b Activité cytotoxique

Parmi les mécanismes d'actions décrits pour les Tr1²⁴⁶, l'activité cytotoxique envers les cellules APC myéloïdes en fait partie. Celle-ci a notamment été démontrée par Magnani et collaborateurs²⁶. La reconnaissance de la cible est effectuée par DNAM-1, CD2 et le CMH de classe I de manière antigène-non-spécifique, puis la fonction lytique est médiée par le couple granzyme B et perforine. Les cellules thérapeutiques expriment notamment un cocktail de molécules lytiques (présentées en détails dans la partie résultats). Par ailleurs, les résultats de l'étude CATS1 démontrent, pour la dose la plus efficace de 10^6 cellules injectées, une diminution du score CDAI avec en parallèle une diminution du nombre de monocytes pro-

inflammatoires circulants. Ces données suggèraient qu'une élimination des monocytes pro-inflammatoires aurait pu advenir par l'action des Ova-Tr1.

Nous formulons ainsi l'hypothèse que les Tr1 thérapeutiques ont pour principal mécanisme d'action, une activité **cytotoxique** dirigée préférentiellement envers **les cellules myéloïdes de type monocytaire**.

Objectifs

La capacité à éliminer des cellules cibles par une activité directe de lyse me passionnant, j'ai souhaité développer de nouvelles méthodes de mesure et d'analyse de celle-ci au cours de ma thèse.

Le premier défi a été d'aller au-delà des tests de cytotoxicité classiques sur des temps courts, comme 4h, avec un ratio de cellules effectrices en excès par rapport aux cellules cibles. En effet, cela a eu pour objectifs de (i) se mettre dans des conditions plus proches de la physiologie avec des temps prolongés et un excès de cibles, et de (ii) tester la capacité des CTL à effectuer une lyse soutenue dans le temps. De plus, nous avons voulu répondre à la question fondamentale de la participation de chaque CTL individuel à l'activité de lyse globale.

Une fois ces outils de mesure de l'activité de lyse soutenue mis en place, en cytométrie en flux et en microscopie en temps réel, je les ai appliqués à deux contextes : l'un pathologique par l'étude de CTL issus de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), et l'autre thérapeutique par l'étude de lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) produits dans le cadre d'une thérapie pour la maladie de Crohn (Ovasave®). D'un côté, l'objectif a été de caractériser le défaut d'activité cytotoxique des CTL WAS, et ainsi le niveau d'implication moléculaire de la protéine WASP dans l'activité de lyse. De l'autre, l'objectif a été de mettre en évidence la capacité d'utilisation d'une activité cytotoxique par des lymphocytes T régulateurs à visée thérapeutique, et d'explorer les mécanismes moléculaires de cette lyse.

L'exposition des résultats obtenus au cours de mon séjour au sein du laboratoire se présenteront donc en trois parties, suivant mes trois principaux objectifs :

- I- Caractérisation de la lyse soutenue sur des temps prolongés en présence d'un excès de cellules cibles, ainsi que la participation individuelle des CTL à cette lyse.
- II- Application au contexte pathologique : Caractérisation du défaut lytique de CTL issus de patients WAS.
- III- Application au contexte thérapeutique : Mise en évidence d'une capacité cytotoxique de lymphocytes Tr1 à visée thérapeutique pour le contrôle de l'inflammation dans le cadre de la maladie de Crohn.

Résultats

En accord avec les objectifs introduits précédemment, les résultats seront présentés en trois parties correspondant à mes trois contributions scientifiques publiées ou sur le point d'être publiée. Celles-ci sont en anglais, langue dédiée pour la communication scientifique, mais un résumé du contexte scientifique, de l'objectif et des résultats, en français, précèdera chaque article. En outre, une discussion des perspectives à ces études, en français, succèdera chaque article.

Afin de clarifier ma contribution à chaque article présenté ici, un encadré comme celui-ci sera présent à la fin de la présentation du contexte, de l'objectif et des résultats en français.

Partie 1. Hétérogénéité individuelle intra-clonale de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques
lors d'une activité de lyse soutenue

Individual human cytotoxic T lymphocytes exhibit intracлонаl heterogeneity during sustained killing

Zilton Vasconcelos, Sabina Müller, Delphine Guipouy, Wong Yu, Claire Christophe, Sébastien Gadat, Salvatore Valitutti, and Loïc Dupré.

publié en 2015 dans la revue Cell Reports

L'importance de l'activité cytotoxique de lymphocyte T CD8⁺ a été amplement décrite et évaluée depuis la mise en place du test de lyse par relargage du chrome (Cr⁵¹) en 1968²⁷⁵. Ainsi, l'activité de lyse au niveau de populations polyclonale et clonale a pu être appréhendée dans différentes conditions mimant des contextes pathologiques comme l'infection ou le processus tumoral. En revanche, au sein d'une population, le degré d'implication de chaque cellule tueuse à l'activité de lyse globale n'a pas encore été étudié.

L'objectif de ce travail était donc de déterminer l'activité de lyse individuelle au sein d'une population clonale de lymphocytes T CD8⁺ humains.

Pour réaliser cette étude, nous avons produit des lignées clonales de lymphocytes T CD8⁺ primaires ayant une spécificité pour un peptide de la protéine p65 du cytomégalo virus. Ce modèle d'étude a pour avantage de (i) avoir une population de CTL identique génétiquement et (ii) une reconnaissance des cibles *via* le complexe peptide/CMH-I, similaire aux conditions physiologiques. Afin d'étudier la participation de chaque cellule individuelle à la lyse globale, nous avons mis en place une combinaison de tests de lyse, à la fois en cytométrie en flux et en microscopie, où les CTL sont face à un excès de cibles sur des temps prolongés (au-delà du test classique réalisé en 4h). Ceci permet donc de défier leur capacité de lyse multiple et de mesurer la cinétique de l'élimination des cibles au cours du temps.

Notre étude démontre une importante capacité des CTL à contrôler un excès de cellules cibles sur des temps prolongés (jusqu'à 72h). De manière individuelle, les CTL sont capables

d'éliminer jusqu'à 12 cellules cibles en 12h. En revanche, la contribution individuelle des CTL à l'activité de lyse globale est très hétérogène. Des analyses statistiques plus approfondies ont permis de révéler, au sein d'une population clonale, qu'une sous-population de CTL a fait preuve d'une capacité de lyse élevée. Le développement de cette sous-population nécessite une forte activation du TCR et démontre un comportement de lyse « accéléré ». La mise en place de ce comportement est différée dans le temps. Ainsi, l'activité cytotoxique des CTL est un processus cumulatif reposant sur une capacité individuelle hétérogène de lyse permettant d'effectuer de la lyse multiple et sur la mise en place différée d'une activité de lyse « accélérée ».

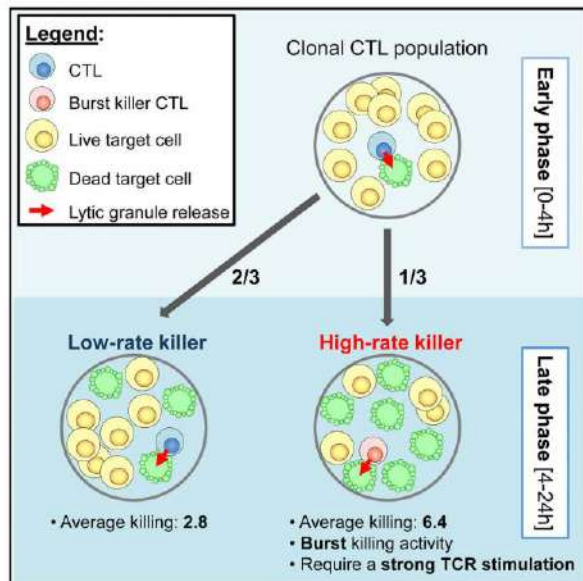
Un tel processus pourrait permettre aux CTL de calibrer leur réponse au niveau de la population face à un excès de cibles.

J'ai eu l'opportunité de travailler sur ce projet pendant mon année de Master où j'ai beaucoup appris au côté de Zilton, surtout sur les côtés techniques comme ses vidéomicroscopies en micromesh et les tests de lyse sur des temps prolongés. Ma contribution qui apparaît dans cet article est une analyse approfondie des résultats de vidéomicroscopies obtenues pour les CTL individuels. Je cherchais alors à identifier ce qui pouvait différencier les CTL à forte capacité cytotoxique *versus* ceux qui en démontrent peu. J'ai alors exploré une multitude de paramètres comme la vitesse, chaque événement de lyse, le nombre de contact avec les cibles, le lien entre nombre de cibles en contact et événement de lyse ou alors j'ai suivi le tracé du CTL et essayé de déterminer son caractère « exploratoire » ou non envers les cibles. Cette étude approfondie a pu mettre en évidence les événements de lyse accélérés, une des caractéristiques des CTL à forte capacité cytotoxique (**Figure 5**). En parallèle, j'ai souhaité expliquer la survenue de ces derniers par plusieurs hypothèses dont un métabolisme plus élevé avec une forte consommation de glucose mais ces recherches-ci n'ont pas abouti. Pour finir, j'ai tout de même pu participer aux révisions finales permettant la publication de cet article.

Cell Reports

Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing

Graphical Abstract



Authors

Zilton Vasconcelos, Sabina Müller, ..., Salvatore Valitutti, Loïc Dupré

Correspondence

salvatore.valitutti@inserm.fr (S.V.),
loic.dupre@inserm.fr (L.D.)

In Brief

Cytotoxicity is viewed as a rapid and homogeneous response of CTLs to antigen-bearing target cells. Vasconcelos et al. report that human CTL clones are endowed with a sustained cytotoxic activity when facing an excess of target cells. Such activity relies on a high heterogeneity of individual CTL killing performances, whereby only a subset of high-rate killer CTLs develop with time. The authors propose that these CTL traits are key to the calibration of cytotoxic responses.

Highlights

- Sustained killing activity allows CTLs to control an excess of target cells
- The multiple killing performance of individual CTLs is highly heterogeneous
- High-rate killing is delayed in time and requires strong antigenic stimulation



Vasconcelos et al., 2015, Cell Reports 11, 1474–1485
June 9, 2015 ©2015 The Authors
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.002>

CellPress

Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intracлонаl Heterogeneity during Sustained Killing

Zilton Vasconcelos,^{1,2,3,4} Sabina Müller,^{1,2,3} Delphine Guipouy,^{1,2,3} Wong Yu,⁵ Claire Christophe,^{2,6} Sébastien Gadat,⁷ Salvatore Valitutti,^{1,2,3,8,*} and Loïc Dupré^{1,2,3,8,*}

¹INSERM, UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, 31300 Toulouse, France

²Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31062 Toulouse, France

³CNRS, UMR 5262, 31300 Toulouse, France

⁴Fernandes Figueira Institute, Fiocruz, 22250-020 Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA

⁶Institut de Mathématiques de Toulouse, UMR 5219, 31062 Toulouse, France

⁷Toulouse School of Economics, Université Toulouse I Capitole, 31000 Toulouse, France

⁸Co-senior author

*Correspondence: salvatore.valitutti@inserm.fr (S.V.), loic.dupre@inserm.fr (L.D.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.002>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

SUMMARY

The killing of antigen-bearing cells by clonal populations of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) is thought to be a rapid phenomenon executed uniformly by individual CTLs. We combined bulk and single-CTL killing assays over a prolonged time period to provide the killing statistics of clonal human CTLs against an excess of target cells. Our data reveal efficiency in sustained killing at the population level, which relied on a highly heterogeneous multiple killing performance at the individual level. Although intracлонаl functional heterogeneity was a stable trait in clonal populations, it was reset in the progeny of individual CTLs. In-depth mathematical analysis of individual CTL killing data revealed a substantial proportion of high-rate killer CTLs with burst killing activity. Importantly, such activity was delayed and required activation with strong antigenic stimulation. Our study implies that functional heterogeneity allows CTL populations to calibrate prolonged cytotoxic activity to the size of target cell populations.

INTRODUCTION

The major mechanism by which cytotoxic T lymphocytes (CTLs) kill specific target cells relies on the secretion of lytic molecules contained in specialized granules. Upon antigen recognition at the surface of target cells, CTLs assemble a lytic synapse that allows stable adhesion and secretion of lytic molecules (Dustin and Long, 2010). Lethal hit delivery can occur within a few minutes after the initial contact between CTLs and target cells (Poenie et al., 1987), and in addition, it is triggered at antigen concentrations much lower than those required for full activation and cytokine production (Faroudi et al., 2003; Purbhoo et al., 2004; Valitutti et al., 1996). Another distinct feature of CTLs is their propensity to kill multiple target cells (Macken and Perelson,

1984; Perelson and Bell, 1982; Rothstein et al., 1978), either simultaneously or serially by bouncing from one target cell to another (Wiedemann et al., 2006). Together, the above reported CTL features contributed to put forth the notion that CTL-mediated cytotoxicity is a binary response, rapidly elicited via the release of small lytic quanta, sufficient to annihilate individual target cells.

Recent studies have brought to light the concept that during the activation of naive CD8⁺ T lymphocyte populations, individual precursors display heterogeneous responses in terms of expansion rate and differentiation (Beutheu et al., 2010; Buchholz et al., 2013; Gerlach et al., 2013), with diversification occurring both at interclonal and intracлонаl levels (Lemaître et al., 2013). Rather than being a source of inconsistent T cell responses, heterogeneous individual behaviors appear to give rise to robust T cell responses at a population level by an averaging process (Buchholz et al., 2013).

In this context, we asked what level of heterogeneity individual CD8⁺ T cells might display in their cytotoxic function. This question can be best addressed by studying CTL multiple killing capability in conditions in which individual CTLs are challenged by an excess of target cells. CTL killing efficiency is usually evaluated by measuring the percentage of dead target cells resulting from a 4-hr incubation with CTLs at a relatively high cell density and effector to target (E:T) ratio (Thorn and Henney, 1976; Zeijlmaaker et al., 1977). Although useful in estimating and comparing the killing potential of different CTL populations, the conventional assays fail to consider individual CTL behavior.

We developed here a combination of flow-cytometry- and microscopy-based assays to provide kinetic measurements of target cell elimination by individual human CTLs belonging to clonal populations. Our data reveal that CTLs are endowed with a previously unappreciated ability to control an excess of target cells over prolonged time frames. Individual CTLs were able to eliminate up to 12 target cells in 12 hr. However, the contribution of individual CTLs to the control of target cells was very heterogeneous. A similar variability of individual killing performance was measured in different clones. In-depth statistical analysis revealed that within a clone, only a subset of CTLs

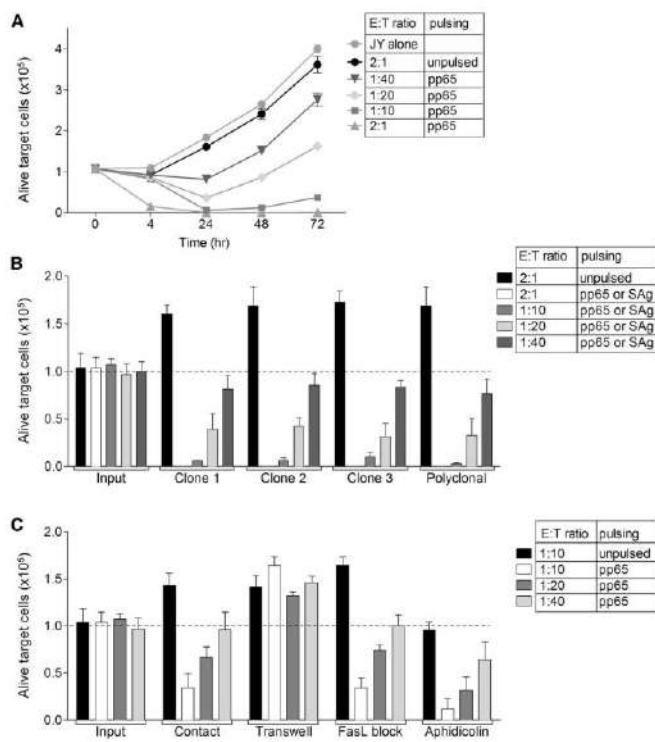


Figure 1. CTLs Control an Excess of Target Cells over Prolonged Time Periods

JY cells (targets) were pulsed with 100 nM pp65 or left unpulsed and were then seeded at 100,000 cells together with different numbers of CTLs (effectors, at E:T ratios of 2:1, 1:10, 1:20, and 1:40). (A) Absolute counts of residual live target cells (see Figure S1 for a description of methods) after 4-, 24-, 48-, and 72-hr co-culture with CTLs at the indicated ratios.

(B) Absolute counts of residual live target cells after 24-hr co-culture with three different CTL clones and a polyclonal CD8⁺ T cell line.

(C) Absolute counts of residual live target cells after 24 hr under the following conditions: direct contact with CTLs (as in A and B), separated from stimulated CTL via a transwell, treated with an anti-FasL blocking antibody, and treated with aphidicolin.

All graphical values represent the mean $\pm$ SD of triplicates from one representative experiment out of six performed. See also Figure S1.

target cells using beads as an internal reference (Figures S1A and S1B). When 100,000 peptide-pulsed target cells were incubated at a 2:1 E:T ratio, 15,020 target cells were found alive after 4 hr and only 1,833 after 24 hr (Figure 1A). Live target cells could no longer be detected at 48 and 72 hr, indicating that they had been fully eliminated. Unexpectedly, at a 1:10 E:T ratio, although 82,419 cells were still alive after 4 hr, only 5,854 target cells were found alive after 24 hr, implying that the outnumbered CTLs killed multiple target cells over this

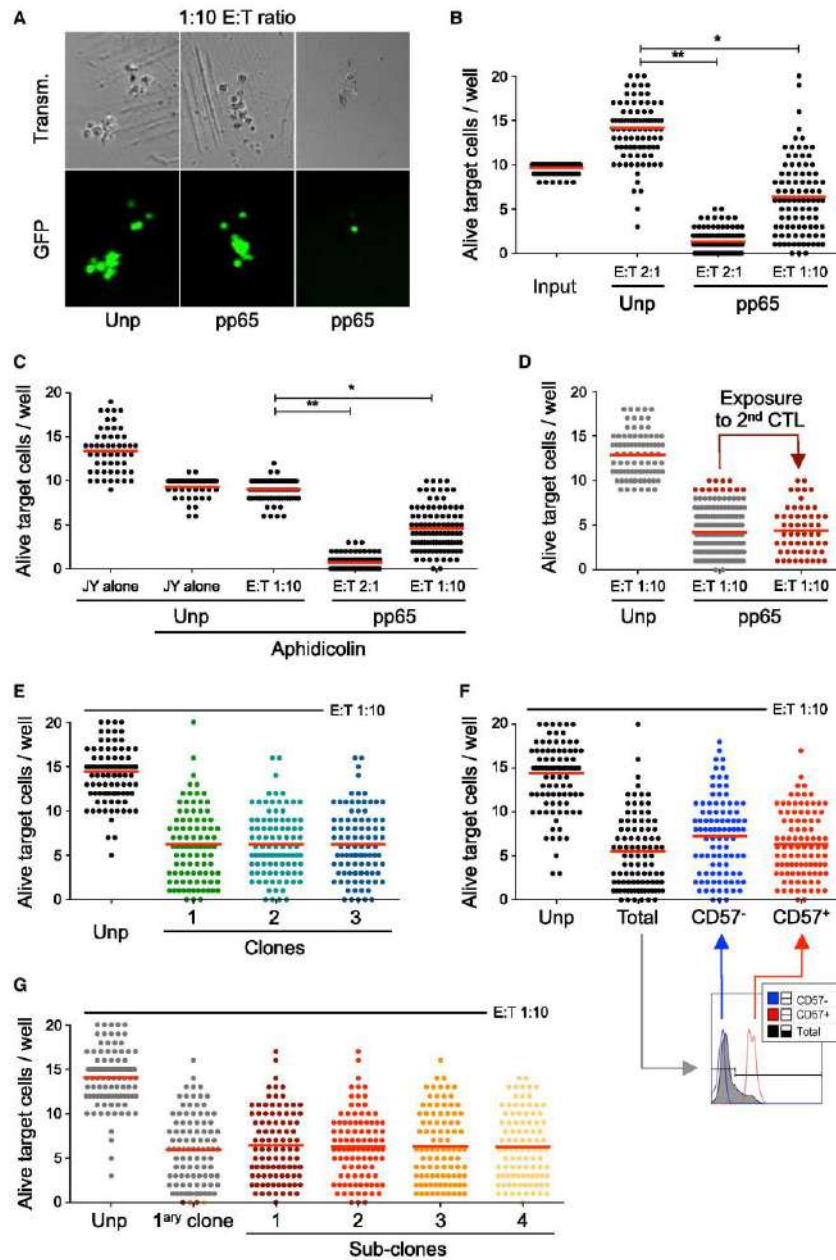
period. At later time points, moderate target cell growth was detected, indicating that the complete elimination of target cells was not reached at this ratio. At the 1:20 and 1:40 E:T ratios, a transient control of target cell number was observed at 24 hr, followed by an outgrowth of target cells. In control conditions, unpulsed target cells expanded over time to reach 361,250 cells after 72 hr, independently of the presence of CTL. We then compared the efficiency of different CMV-specific CTL clones at controlling target cell populations at low E:T ratios. The three clones tested exhibited a similar capability to control target cells over 24 hr (Figure 1B). This also applied to a polyclonal CTL line reacting to a cocktail of super-antigens presented by the same target cells, suggesting a very homogenous killing efficiency among effector CTL populations. The observed impact of outnumbered CTLs on target cells might operate via a contact-dependent cytotoxicity or via the release of soluble factors with cytotoxic or cytostatic effects. To test this latter possibility, CTLs were activated by peptide-pulsed cells in the upper well of a transwell (2:1 E:T ratio) and additional cells were placed in the lower well as targets. The survival of these cells was unaffected, indicating that in our model, the control exerted by CTLs requires either a contact or a proximity that was lost in the transwell

RESULTS

CTLs Control an Excess of Target Cells over Prolonged Time Periods

To investigate the killing potential of CTLs at low E:T ratios, we employed HLA-A2-restricted human CTL clones specific for the cytomegalovirus (CMV) pp65 peptide NLVPMVATV presented by HLA-A2-matched Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells (JY). The impact of CTL on target cells was assessed by counting, over time, the remaining number of live

period. At later time points, moderate target cell growth was detected, indicating that the complete elimination of target cells was not reached at this ratio. At the 1:20 and 1:40 E:T ratios, a transient control of target cell number was observed at 24 hr, followed by an outgrowth of target cells. In control conditions, unpulsed target cells expanded over time to reach 361,250 cells after 72 hr, independently of the presence of CTL. We then compared the efficiency of different CMV-specific CTL clones at controlling target cell populations at low E:T ratios. The three clones tested exhibited a similar capability to control target cells over 24 hr (Figure 1B). This also applied to a polyclonal CTL line reacting to a cocktail of super-antigens presented by the same target cells, suggesting a very homogenous killing efficiency among effector CTL populations. The observed impact of outnumbered CTLs on target cells might operate via a contact-dependent cytotoxicity or via the release of soluble factors with cytotoxic or cytostatic effects. To test this latter possibility, CTLs were activated by peptide-pulsed cells in the upper well of a transwell (2:1 E:T ratio) and additional cells were placed in the lower well as targets. The survival of these cells was unaffected, indicating that in our model, the control exerted by CTLs requires either a contact or a proximity that was lost in the transwell



(legend on next page)

system (Figure 1C). To discriminate between the Fas-L and perforin/granzyme B pathways, we blocked Fas-L with a specific antibody. The fact that this treatment did not alter the activity of CTLs in controlling the target cells implies that the observed effects are dependent on the perforin/granzyme B pathway. Cell-cycle blockage with aphidicolin resulted in an improvement of target cell control by the outnumbered CTLs, showing that at low E:T ratios, the expansion of residual target cells partly counteracts the global effect of CTLs. In conclusion, the above results show that a small number of CTLs can control a large excess of target cells over prolonged time frames, revealing that populations of human effector CTLs share a remarkably high multiple killing capacity.

Intraclonal Heterogeneity in Multiple Killing Efficiency by Individual CTLs

We then asked whether individual CTLs comprising a clonal population contributed equivalently to killing. We developed a cell-sorter-assisted approach, whereby ten GFP-expressing target cells were exposed to a single CTL. After 24 hr, the number of residual alive target cells was evaluated by counting GFP-positive cells by microscopy. Indeed, our preliminary experiments showed that GFP expression was lost by dead cells (Figure S2). In control wells containing 20 CTLs and 10 pulsed target cells, most target cells were eliminated after 24 hr, confirming our previous observation in bulk assays and indicating that our miniaturized assay did not hinder killing activity (Figures 2A and 2B). When the ten target cells were exposed to a single CTL, a broad distribution in the number of residual live target cells was measured in the different wells, suggesting a very heterogeneous ability of individual CTLs to eliminate multiple target cells. Heterogeneity in residual live target cells could however be related to differential target cell expansion among wells, as observed in wells containing unpulsed target cells. To rule out this possibility, we performed single-CTL assays in the presence of aphidicolin to block the target cell cycle. Under this condition, although the expansion of GFP-expressing target cells was prevented, most of the heterogeneity in residual live target cells was maintained (Figure 2C). We next challenged the possibility that the observed heterogeneity might be related to the uneven distribution among wells of target cells with distinct susceptibility

to CTL attack. To this end, wells containing nine or ten live target cells after incubation with a first CTL were re-exposed to a second CTL. Heterogeneous numbers of residual live target cells were counted from well to well, indicating that target cells surviving the first CTL were not intrinsically resistant to CTL attack (Figure 2D). These data demonstrate that, although most individual CTLs derived from a particular effector clone contribute to killing over a 24-hr time window, their efficiency in killing multiple target cells is highly heterogeneous.

We then addressed whether heterogeneity in multiple killing efficiency might be distinct from one CTL clone to another. In the three pp65-specific clones tested, very similar multiple killing heterogeneity was measured, as indicated by the range in the number of residual live target cells (Figure 2E). The observed killing heterogeneity might be linked to some degree of diversification of individual CTLs comprising a clone. Analysis of CD45RO, CCR7, CD27, CD28, IL7R α , PD-1, and perforin expression showed that individual CTLs uniformly belonged to the effector memory stage (Figure S3). In contrast, CD57, a marker of terminally differentiated CTLs associated with reduced proliferation and killing potential, was expressed with some level of heterogeneity. To test whether CD57 expression might be related to multiple killing efficacy, individual CD57⁺ and CD57⁻ CTLs were sorted and exposed to ten target cells (Figure 2F). A comparable multiple killing activity was observed in each subset, reproducing the killing-rate heterogeneity observed in the unsorted CTLs. We next asked whether the multiple killing activity of an individual CTL might be transmitted to its progeny. To that aim, we expanded individual CTLs that had been shown to eliminate ten target cells in the single-CTL killing assay. When exposed to ten target cells, the progeny of such multiple killers reproduced the individual cell heterogeneity previously observed (Figure 2G). Taken together, the above results show that different clones exhibit a similar intraclonal heterogeneity in multiple killing. They also reveal that this heterogeneity is reset in the progeny of individual CTLs.

Analysis of CTL Killing Kinetics Identifies High-Rate and Low-Rate Killer Cells

To first evaluate the kinetics of CTL multiple killing, we monitored the occurrence of killing events over 12 hr by detecting

Figure 2. Intraclonal Heterogeneity in Multiple Killing Capacity by Individual CTLs

GFP-expressing target JY cells, pulsed with 100 nM pp65 or left unpulsed, were seeded with a cell sorter at ten cells per well in U-bottom 96-well plates in the presence of a single CTL (E:T ratio 1:10) or 20 CTLs (E:T ratio 2:1). Wells were examined by fluorescence microscopy after 24-hr co-culture to count the number of residual GFP-positive cells.

(A) Representative 10 $\times$ magnification images of wells initially containing one CTL and either ten unpulsed target cells (left panels) or ten pp65 pulsed target cells (middle and right panels).

(B) Counts of GFP-positive cells in individual wells at input and following 24-hr co-culture with CTLs under the indicated pulsing and ratio conditions. Each dot represents a well, while the bar represents the mean of 96 wells per condition. The p values are results of t tests between the indicated conditions (*p < 0.05; **p < 0.001). One representative experiment out of four is presented.

(C) Counts of GFP-positive cells in individual wells following 24-hr co-culture with CTLs in the presence of aphidicolin, which was used to prevent target cell division. One representative experiment out of three is presented.

(D) Following an initial 24-hr co-culture, wells in which the ten target cells had best resisted the single CTL (and still contained nine or ten GFP-positive cells) were re-exposed for 24 hr to a new CTL (re-killing). Counts of GFP-positive cells in such wells stem from three pooled experiments.

(E) Counts of GFP-positive cells in individual wells following 24-hr co-culture with individual CTLs belonging to three pp65-specific CTL clones.

(F) Counts of GFP-positive cells in individual wells following 24-hr co-culture with individual CTLs expressing or not CD57 at their surface.

(G) Counts of GFP-positive cells in individual wells following 24-hr co-culture with individual CTLs from a primary clone and from four CTL sub-clones derived from wells in which a single CTL had eliminated all ten target cells.

See also Figures S2 and S3.

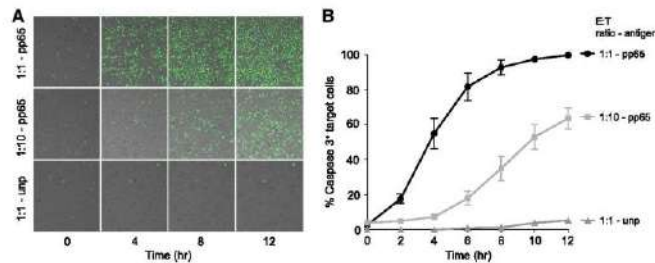


Figure 3. Distinct Killing Kinetics at High versus Low E:T Ratios

Target JY cells, pulsed with 100 nM pp65 or left unpulsed, were seeded at 100,000 cells in Lab-Tek chambers in the presence of CTLs at E:T ratios of 1:1 or 1:10. The NucView 488 caspase-3 substrate was used to track individual target cell killing by video-microscopy.

(A) Representative wide-field snapshots showing activation of caspase-3* at 0, 4, 8, and 12 hr after co-culture of target cells with CTLs in the indicated conditions.

(B) Quantification of videos as frequency of target cells activating caspase-3 over time. The mean $\pm$ SEM of three independent experiments is presented.

See also [Movies S1, S2, and S3](#).

caspase-3 activation in target cells by time-lapse microscopy. Wide-field analysis at a 1:1 E:T ratio demonstrated a rapid cumulative rise in the proportion of target cells positive for active caspase-3, reaching a plateau corresponding to the nearly complete elimination of target cells within 6 hr (Figures 3A and 3B; [Movies S1, S2, and S3](#)). In contrast, at a 1:10 E:T ratio, a phase of latency was initially observed, during which caspase-3 activation was limited to a few target cells. Subsequent to this phase, a rise in caspase-3* target cells was observed, reaching 60% in 12 hr. This is in agreement with the very modest effect of the 1:10 E:T ratio in 4 hr observed in the bulk killing assay (Figure 1A) and reveals that at a low ratio, most killing events arise in a 6- to 12-hr window. To then assess the kinetics of CTL killing at a single-cell level, we seeded a 1:10 E:T ratio mixture onto a polydimethylsiloxane (PDMS) meshwork array of 100- μ m-diameter microwells in a way to confine single CTLs and an excess of target cells in each microwell. Single-CTL killing kinetics confirmed the above-observed heterogeneity, since individual CTLs displayed a dispersed multiple killing performance ranging from 0 to 12 targets killed over 12 hr, with a mean of 4 target cells killed over 12 hr (Figures 4A and 4B; [Movies S4, S5, and S6](#)). The mean number of killed target cells was limited during the first 6 hr, while it progressively increased over the 6- to 12-hr time interval (Figure 4B). This single-CTL analysis therefore confirms that, in a context of an excess of target cells, the initial killing activity is relatively modest and is followed by an increased multiple killing activity in some CTLs.

We then aimed at characterizing the statistical nature of the heterogeneity of multiple killing observed in individual CTLs. Clearly, the killing time appears to follow an exponential law. As a consequence, the distribution of the killing time on the considered time window is a Poisson process whose unknown intensity is closely related to the parameter of the exponential law. With a dataset stemming from the analysis of 259 single CTLs in three independent experiments, we first evaluated with a chi-square test whether the cumulative number of killed target cells over 12 hr would distribute according to a single Poisson distribution ([Supplemental Statistical Methods](#)). Our analysis yielded a $T > 110$ (T is defined as a statistical quantity that indicates the goodness of fit of the null hypothesis to the data; see [Supplemental Statistical Methods](#)), leading to the rejection of this hypothesis with a type I error ≤ 0.001 . Instead, the applica-

tion of an expectation maximization algorithm indicated that the distribution of the 12-hr killing performance by the individual CTLs could be modeled by a mixture of two subsets (Figure 4C). Indeed, our data best fit with a mixed Poisson distribution composed by 66% of CTL killing in an average of 2.8 target cells and 34% of CTL killing in an average of 6.4 target cells. Our analysis yielded a $T < 8.9$, leading to the acceptance of the statistical assumption of a mixture of two Poisson distributions. Comparable results were obtained when considering the three data subsets separately (see [Supplemental Statistical Methods](#)). Our statistical analysis therefore implies that the intracolon heterogeneity in multiple killing can be explained, at least in part, by a split of the clonal population into high-rate and low-rate killer CTL subsets.

To further investigate how the heterogeneity of individual CTL killing performance is shaped over time, we developed and applied a breakpoint test aimed at identifying the time at which the two CTL subsets diverge. Our statistical testing procedure is inspired by previous work on the detection of change in the mean for stationary Gaussian processes (GPs) based on the record method ([Rychlik, 1990](#)). We adapted this method to the case of a Poisson processes (PPs) by first computing the empirical mean of the killing among the population of CTLs to convert the observed PP to an approximately stationary GP according to the central limit theorem. Then, we used the test of Azais and Genz ([Azais and Genz, 2013](#)) to detect changes in the mean by taking into account the correlation structure learned in the time series (see [Supplemental Information](#) for a detailed description). Our breakpoint test indicates that the baseline hypothesis, namely that homogeneity in the mean is maintained all along the killing process, is rejected when considering the compiled dataset. The analysis indicates a first type error test lower than $p_{\text{value}} = 5.7 \times 10^{-4}$ with a breakpoint in the homogeneity likely to occur at about 10 hr (Figure 4D). Comparable results were obtained when considering the three data subsets separately (see [Supplemental Information](#)).

The registration of the prolonged killing kinetics of individual CTLs facing an excess of target cells therefore confirms the high heterogeneity in the killing efficiency measured with the end-point assay. In-depth statistical analysis further suggests a functional dichotomy within the CTL clonal population. Our datasets can therefore be explained as follows: most CTLs initially

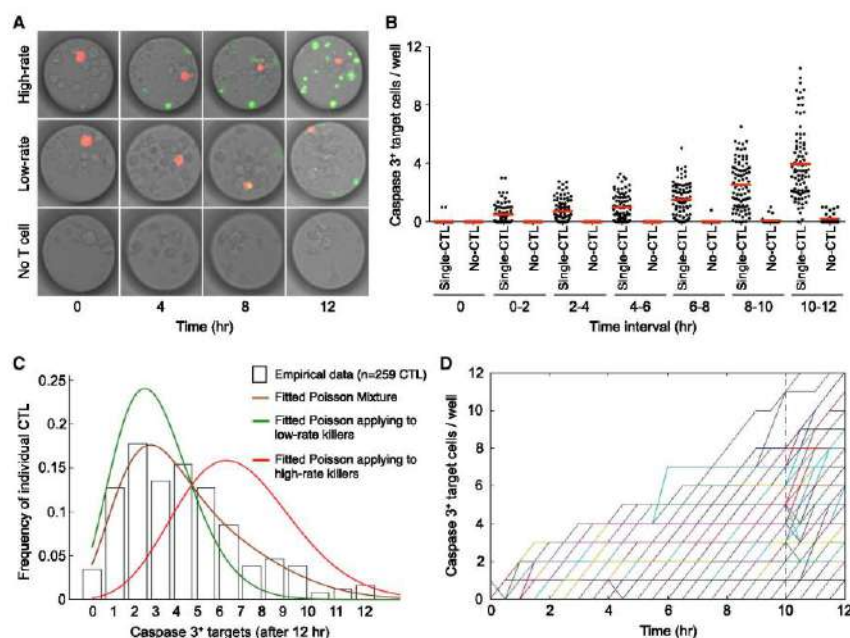


Figure 4. The Onset of High-Rate Killing Is Delayed and Restricted to a CTL Subset

Single calcein-stained CTLs were confined in 100- μ m-diameter microwells and co-cultured with an excess of target JY cells for 12 hr in the presence of the NucView 488 caspase-3 substrate.

(A) Representative snapshots of microwells showing the CTL (in red) and the activation of caspase-3 in target cells (in green) at 0, 4, 8, and 12 hr in the indicated conditions.

(B) Quantification over the indicated time intervals of caspase-3⁺ target cells from 88 microwells containing one CTL (gray dots) and 30 microwells without CTLs (brown dots). Data were pooled from three experiments. Bars indicate mean values.

(C) Frequency of individual CTLs according to the number of total caspase-3⁺ target cells measured in 12 hr. Histograms represent empirical data ($n = 259$), while curves represent the single Poisson distributions applying to the low-rate and high-rate killer CTL subpopulations (green and red curves, respectively) or the complex Poisson distribution resulting from a mixture of the 2 single distributions and applying to the entire CTL population (brown curve).

(D) Killing kinetics of individual CTLs ($n = 259$, represented by different colors) measured as the number of caspase-3⁺ target cells over 30-min time intervals. Although overlap does not allow visualization of each single CTL, the graph reveals accelerated killing pace in numerous CTLs after 10 hr (vertical dashed bar), which corresponds to the time at which the breakpoint analysis indicated the appearance of heterogeneity in the killing process.

See also Movies S4, S5, and S6.

behave as low-rate killer CTLs, while some of them develop as high-rate killer CTLs at later time points.

High-Rate Killing Relies on a Late Phase of Burst Killing Preceded by Isolated Killing Events

We then investigated which characteristics might distinguish the two subsets of CTLs. Based on the dataset comprising 259 single-CTL killing kinetics, we noticed that for most CTLs, the killing pace was highly irregular over the 12-hr period. In particular, some CTLs appeared to kill multiple target cells in a row with a burst kinetic (Figure 5A). To appreciate the killing pace of each CTL, we quantified the maximum killing rate reached during the 12-hr recording (considering a series of three consecutive killing events). Most CTLs killed with an irreg-

ular pace, as indicated by the fact that we detected killing-rate peaks above the theoretical average killing rate (Figure 5B). The maximum killing rates increased as a function of individual 12-hr killing performance to reach two to four killing events/hr in the CTLs managing to kill 9–12 targets cells over 12 hr. On the basis of this analysis, we defined burst killing as a serial killing of at least three targets at a rate of more than one target/hr, which is superior to the average killing rate of the best-performing CTLs (12 targets killed in 12 hr). The analysis of the compiled dataset revealed that 42% of the CTLs exhibited a burst killing phenotype. This CTL subset killed an average of 6.3 target cells over the 12-hr period. Furthermore, the distribution of the 12-hr killing performance according to the occurrence of burst killing revealed two subsets of CTLs that fitted the mixed Poisson

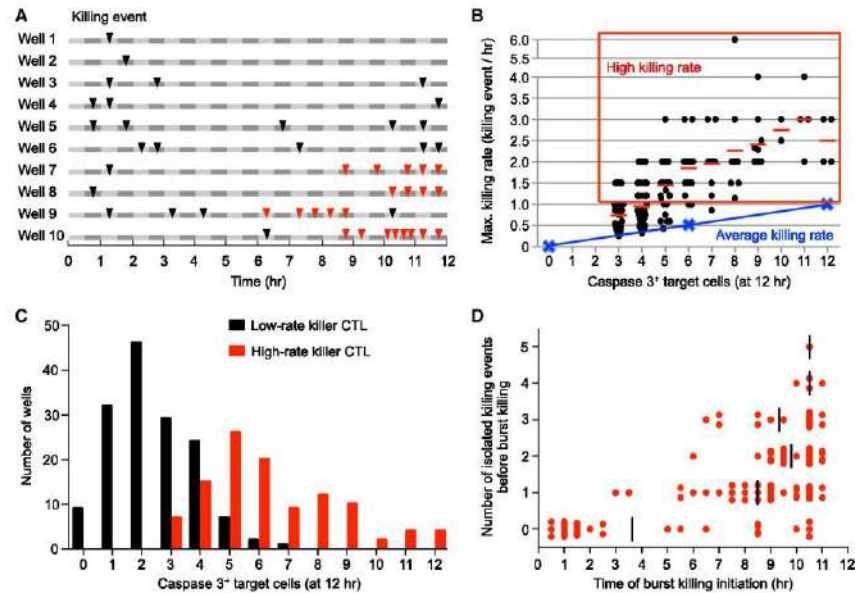


Figure 5. Burst Killing Is Preceded by Isolated Killing Events

(A) Schematic representation of killing events along the 12-hr observation interval in representative CTLs exposed to an excess of target cells in microwells. Black arrows represent isolated killing events, while red arrows represent burst killing events. (B) Quantification of the maximum killing rate reached by each CTL during the 12-hr recording, considering a series of three consecutive killing events. The maximum killing rate of individual CTLs is plotted as a function of the 12-hr killing performance (number of target cells killed after 12 hr). Bars represent mean values. The blue line indicates the theoretical average killing rate expected from CTLs that would kill at a regular pace. (C) Frequency of individual CTLs ($n = 259$) divided into basic killers (black, rate of one cell/hr or no target cells/hr) and burst killers (red, rate more than one target cell/hr) according to the number of total caspase-3⁺ target cells measured in 12 hr. (D) Distribution of the burst killer CTLs according to both the number of isolated killing events (rate one cell/hr or no target cells/hr) preceding burst killing and the time of burst killing initiation. Bars indicate mean values.

distribution identified by our statistical analysis (Figure 5C). Together, these data indicate that a hallmark of high-rate killer cells is their capacity to accelerate killing pace to kill multiple target cells over a limited amount of time. We then investigated when these events of burst killing occurred. Interestingly, a majority of the burst killing events were initiated in an 8- to 11-hr time window (Figure 5D), which fits with the results from the breakpoint test. Our analysis further shows that in most cases, these events were preceded by one to three isolated killing events.

We then reasoned that the delayed onset of the burst killing might result from differences in killing initiation. The time delay before the first killing event occurred was indeed widely distributed among individual CTLs (Figure 6A). Actually, the proportion of CTLs killing at least one target cell was 59.1% in the initial 4-hr time window, while it increased to 96.5% over the 12-hr time window. This clearly indicates that the proportion of individual CTLs actively contributing to killing increased over time. When the CTL killing records were synchronized on the

basis of the first killing event, a wide distribution in killing efficiency was observed after 4 or 6 hr (Figure 6B). This indicates that individual CTL killing heterogeneity cannot be explained by asynchrony in killing initiation. The synchronization of the killing records on the basis of the first killing event resulted in an anticipation of high-rate killing, as measured by the proportion of CTLs that displayed a burst killing activity (Figure 6C). This is in agreement with the above observation that burst killing events were preceded by isolated killing events. Interestingly, the synchronization abolished the lag phase, which was replaced by a progressive increase in the proportion of high-rate killer CTLs. These data show that the subset of high-rate killer CTLs is characterized by a burst killing process, which develops progressively over a period of 10 hr following the first killing event. The global killing activity of a clonal CTL population at a low E:T ratio is therefore a cumulative process relying on the progressive recruitment of actively killing CTLs over time and on the onset of a delayed high-rate killing activity in a fraction of the CTLs.

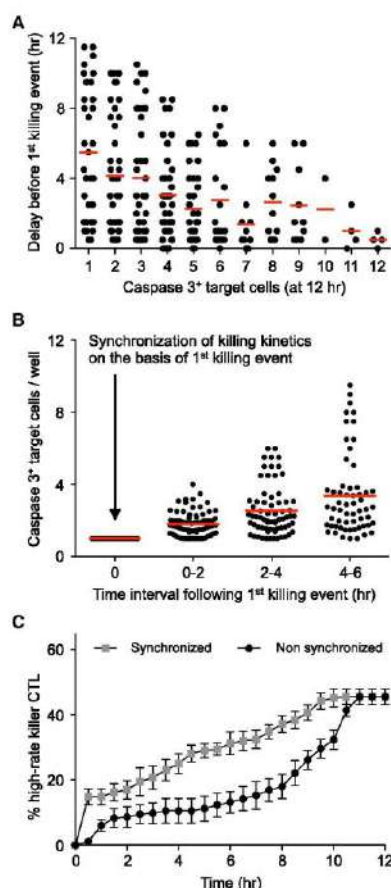


Figure 6. Variability of Delays in Killing Initiation Does Not Account for Heterogeneous Burst Killing
(A) Time delay before the first killing event analyzed for each CTL ($n = 259$) as a function of its 1-hr killing performance. Data represent mean values.
(B) Kinetics of multiple killing events following the first killing event is represented after alignment of the killing records so that time 0 corresponds in each well to the appearance of the first caspase-3⁺ target cell.
(C) Cumulative frequency of CTL displaying burst killing, with or without synchronization of the killing kinetics on the basis of the first killing event. Data represent mean $\pm$ SEM from three experiments.

CTL Activation Requirements for the Onset of High-Rate Killing

The delay in the onset of high-rate killing might be related to the requirement of a TCR-driven activation process upon interaction of the CTL with the first target cells it encounters. We and others have shown that CTL-mediated killing can be triggered at a very

low TCR stimulation threshold that does not lead to full activation (Huppa et al., 2003; Sykulev et al., 1996; Valitutti et al., 1996). We therefore asked whether picomolar concentrations of peptide sufficient to trigger early killing would be able to efficiently sustain killing over prolonged time frames. CTL stimulated with 10 pM failed completely to produce interferon- γ (IFN- γ) while partially maintaining the capacity to secrete perforin (Figure 7A). However, this low peptide concentration was sufficient to trigger a robust killing in 4 hr at a 2:1 E:T ratio (Figure S4). In contrast, this only led to a very limited sustainment of killing over 12 hr (Figure 7B). In agreement, the proportion of CTLs displaying a burst killing was drastically reduced (Figure 7C). To further assess the CTL activation requirements for the onset of the secondary phase of high-rate killing, CTL clones were cocultured with an excess of target cells in the presence of cyclosporin A (CsA) as a means to reduce CTL effector functions. As expected, CsA treatment strongly impaired the neo-synthesis of IFN- γ , while it did not affect the secretion of prestored perforin in CTLs stimulated for 4 hr by pulsed target cells (Figure 7A). Accordingly, CsA treatment did not interfere significantly with early killing potential, as measured after 4 hr at a 2:1 E:T ratio (Figure S4). However, CsA treatment reduced significantly the onset of the late-developing high-rate killing (Figures 7D and 7E). Together, these data show that the onset of high-rate killing is affected by suboptimal T cell stimulation.

DISCUSSION

By assessing prolonged killing kinetics of human CTL clones at a single-cell level in conditions of target cell excess, we reveal the ability of individual CTLs to perform multiple killing in a sustained manner. Remarkably, individual CTLs displayed highly heterogeneous multiple killing activity. This heterogeneity was mainly due to the delayed development of a burst killing activity, which was restricted to approximately one-third of the CTL population. Our study therefore reveals an aspect of CTL killing activity, whereby the basal killing activity shared among individual CTLs is followed by the emergence of a split behavior characterized by the initiation of burst killing activity in a subset of CTLs. Such heterogeneity, however, does not correspond to an inheritable specialization, since it is reset in the progeny of individual CTLs. The observed heterogeneity in the ability of individual CTLs to control an excess of target cells appeared to be mainly T cell intrinsic for the following reasons. First, killing heterogeneity was observed independently from the location of the CTL relative to the target cells. Second, a comparable level of heterogeneity was measured using wells of distinct geometry and confinement. Third, the micromesh experiments were not consecutive to a cell-sorting approach, therefore excluding the possibility that such procedure would affect CTL viability. Fourth, we considered for our analysis only wells in which the CTLs remained positive for calcein, thereby implying that the CTLs analyzed were still alive at the end of the experiments.

We show here that the sensitivity of CTL-mediated killing can be best appreciated by measuring, over prolonged time frames, the impact of limited CTL numbers on the survival of an excess of target cells. In our model of human CTL clones recognizing a CMV peptide presented by EBV-transformed B cells, a

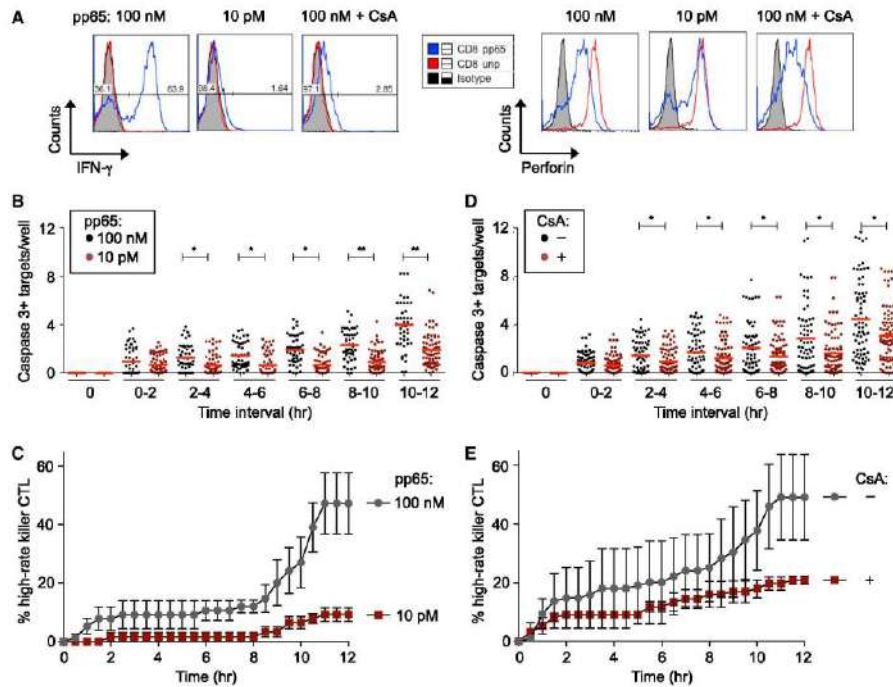


Figure 7. Strong CTL Activation Required for the Onset of High-Rate Killing

(A) Histogram plots representing the production of IFN- γ and the release of perforin by CTLs co-cultured with a 10-fold excess of target JY cells pulsed with 100 nM or 10 pM pp65, in the presence or absence of CsA.

(B) Quantification over the indicated time intervals of caspase-3⁺ target cells from 61 microwells with one CTL and target cells pulsed with 100 nM pp65 (gray dots) and 64 microwells with one CTL and target cells pulsed with 10 pM pp65 (brown dots). Data were pooled from three experiments. Bars indicate mean values. p values are results of t tests between indicated conditions (*p < 0.05; **p < 0.001).

(C) The effect of pp65 concentration on the occurrence of high-rate killer CTLs, as represented by the frequency of CTLs displaying burst killing. Data represent mean $\pm$ SEM from three experiments.

(D) Quantification over the indicated time intervals of caspase-3⁺ target cells from 56 microwells with one CTL and untreated pulsed target cells (gray dots) and 70 microwells with one CTL and CsA-treated pulsed target (brown dots). Data were pooled from three experiments. Bars indicate mean values. p values are results of t tests between indicated conditions (*p < 0.05; **p < 0.001).

(E) The effect of CsA treatment on the occurrence of high-rate killer CTLs, as represented by the frequency of CTLs displaying burst killing. Data represent mean $\pm$ SEM from three experiments.

See also Figure S4.

reproducible impact on the target cell population was measured at an E:T ratio as low as 1:40. Importantly, near-complete elimination of the target cell population was obtained with a 1:10 E:T ratio. Such a level of killing has not been reported previously for human CTLs. By revealing a previously undetected CTL killing efficiency, our assays might be more sensitive than classical 4-hr killing assays in predicting CTL efficiency in the context of CTL-based therapies. As compared to in vivo settings, our approaches, however, fail to reproduce the 3D environment encountered in tissues. Nevertheless, our data are comparable to those obtained with murine CTLs embedded in 3D collagen matrix (Weigelin and Friedl, 2010). This indicates that the multiple

killing activity measured here is intrinsic to CTLs and that the 3D matrix environment encountered in tissues should not fundamentally modify this property.

Beyond testing the limits of CTL killing efficiency, our study provides kinetic measurements of multiple killing events over time, both at the population and single-cell levels. Clearly, our data show that the killing activity of human CTL clones is a cumulative process, which results from a non-synchronized and non-linear accumulation of killing events. Following an initial phase of latency during which a relatively low number of target cells activated caspase-3, an accumulation of killing events was measured. Comparable kinetics were observed under bulk and

single-CTL settings, implying that they did not result from the initiation of synergistic cooperation among CTLs. We show that the delayed onset of an increased killing activity is preceded by isolated events of low-pace killing. Strikingly, similar burst kinetics have been recently described for natural killer (NK) cell killing activity, using a reporter of granzyme B activity in target cells (Choi and Mitchison, 2013). Together, these data suggest that upon a first kill, both CTLs and NK cells get primed for quicker successive kills. Such behavior might be facilitated by the high target cell density used in both models, allowing killer cells, once they have established multiple contacts, to kill neighbor targets cells at increased frequency.

Our work extends the recent findings on NK cells, since it demonstrates that functional heterogeneity applies to genetically identical clonal populations, which could not be defined in the NK cell models. Moreover, our statistical analysis suggests the emergence of a functional dichotomy in the killing behavior of CTLs belonging to a clonal population. The identification of high-rate killer CTLs is in agreement with our previous demonstration that CTLs can kill multiple target cells encountered simultaneously (Wiedemann et al., 2006). In vivo imaging has shown that CTLs and NK cells use distinct killing strategies, since, as compared to NK cells, CTL engage in more stable contacts with their target cells (Deguine et al., 2010). It will therefore be interesting to extend our observations to in vivo settings to measure the kinetics of multiple killing in killer cells using live microscopy.

Our study shows that a single CTL can kill up to 12 target cells sequentially within a time frame of 12 hr. The onset of such high-rate killing is dependent on efficient CTL activation via TCR engagement as revealed by the reduction of high-rate killing at low peptide concentrations and following CsA treatment. Our data clearly indicate that the killing activity of a single CTL is sustained over 12 to 24 hr. Although we did not measure multiple killing by individual CTLs beyond 24 hr, we cannot exclude that CTLs could keep killing beyond this time frame. However, the fact that, after 24 hr, residual target cells progressively escape the control exerted by CTLs strongly suggests that CTLs globally lose cytotoxic potential. Whether this is due to progressive exhaustion, limited refilling of lytic potential, or death will need to be addressed in further studies.

A major finding of this work is that genetically and phenotypically homogeneous CTL clonal populations are composed of individual CTLs harboring a wide range in ability to perform multiple killing over extended time frames. In a previous study, the isolation of primary CD8⁺ T cells specific for a HIV GAG epitope in single-cell arrays has shown that only a minority of CTLs could concomitantly kill and secrete IFN- γ (Varadarajan et al., 2011). Although highlighting the fact that not all effector CTLs might be equally efficient at killing target cells, this study assessed neither multiple killing over prolonged time periods nor the spread of individual CTL killing performance. Furthermore, the functional diversification reported might be linked to the polyclonal nature of the CD8⁺ T cells studied, since in our clonal model, most CTL were able to both kill and produce IFN- γ .

Importantly, the individual heterogeneity in cytotoxic activity parallels that recently described for expansion rate and differentiation of CD8⁺ T cell precursors (Buchholz et al., 2013; Gerlach

et al., 2013). Collectively, these data reveal that the key steps of CTL responses are established on the basis of a high variability of individual behaviors. Strikingly, individual heterogeneity in both expansion and killing results in a very constant output at the population level. Therefore, individual heterogeneity might have evolved as a way to guarantee reproducible CTL responses via an averaging process. The heterogeneity reported here appears to be intrinsic to the phenomenon of multiple killing.

A puzzling question is how the described distribution in killing performance of individual CTLs is produced. It is possible that individual differences in CTL motility and scanning will condition the ability to establish productive contacts with multiple target cells. However, such differences might be difficult to pick, since we observed that most CTLs within the microwells establish rosette-like cellular complexes with the target cells, independently of their multiple killing performance. The ability to develop as high-rate killer CTLs might depend on an activation threshold that is reached only for a fraction of the population. The described heterogeneity might also result from differences in the state or number of key molecules controlling the TCR-driven release of lytic molecules. Computational modeling has shown that phenotypic variability can be achieved in a controlled manner by regulated variation in the expression of a few key signaling molecules such as CD8, ERK, and SHP-1 (Feinerman et al., 2008). On the other hand, analysis of multiple genes at a single-cell level has highlighted how the coexpression of different effector genes in CD8⁺ T cells is associated to the functional activity of the corresponding cells (Peixoto et al., 2007). Our subcloning experiment indicates that CD8⁺ T cells reset functional heterogeneity following a few cycles of interaction with target cells. These individual cells do not appear to retain their specific properties in their progeny, excluding the possibility that such differences would be epigenetically imprinted. Maintaining heterogeneity therefore appears a key principle in CTL to guarantee that any given antigen-specific population will generate reproducible outcomes in terms of expansion dynamics, killing efficiency, and differentiation.

What is the advantage for the non-genetic inter-individual variability observed here for cytotoxic function? Our data and analysis support the following model: an initial low-rate killing activity is shared among most individuals. This may be sufficient to eliminate a sensitive target cell population at high E:T ratios. If target cells persist after the initial phase of cytotoxicity (low E:T ratio, or resistant target cells), the process of high-rate killing is launched in some of the CTLs. Therefore, the sustained cytotoxicity mediated by a CTL population is a non-linear cumulative process. It is tempting to speculate that such a gradual process might allow the calibration of CTL responses, allowing adaptation of the whole CTL population to the resistance of the opposing target cell population or to the persistence of the antigenic stimulus. The scalability of cytokine production by CD4⁺ T cell populations has recently been shown to depend on the proportion of individual T cells engaging digitally into cytokine output (Huang et al., 2013). Our study indicates that the regulation of the CTL response obeys a distinct rule. Indeed, the scalability of killing appears to depend on the proportion of individual T cells engaging into an increased lytic potential if required by the excess of target cells.

In conclusion, our study unravels a previously unappreciated level of functional heterogeneity in individual cells belonging to clonal populations of effector CTLs. Such heterogeneity appears to set the performance of CTLs to control an excess of target cells at the population level. We reveal that the prolonged CTL activity relies on a dual strategy combining low-rate killing by a majority of cells and delayed onset of high-rate killing by a limited proportion of cells. In the context of CTL-based approaches, our findings on the intracolon heterogeneity of the killing rate of individual CTLs call for a re-evaluation of the precise performance of CTLs and identify individual heterogeneity as a key parameter in evaluating CTL performance in health and disease.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Human CD8⁺ T Cell Lines and Clones

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats of healthy donors obtained through the Etablissement Français du Sang (EFS Midi-Pyrénées, Purpan University Hospital, Toulouse, France). Blood samples were collected and processed following standard ethical procedures (Helsinki protocol), after obtaining written informed consent from each donor and approval for this study by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II). Human CD8⁺ T cell lines were purified from healthy donor blood samples using the RosetteSep Human CD8⁺ T Cell Enrichment Cocktail (STEMCELL Technologies). Cells were seeded at 5×10^5 cells/ml in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 8% human AB serum (PAA), minimum essential amino acids, HEPES, and sodium pyruvate (Invitrogen). For cloning, single HLA-A2-restricted CD8⁺ T cells specific for the NLVPMVATV peptide of the CMV pp65 protein were distributed in 96-well U-bottom plates using a BD FACSAria II cell sorter operating in "single-cell purity" sorting mode. CD8⁺ T cells were stimulated in the presence of 1×10^6 ml irradiated allogeneic PBMCs and 1×10^5 ml irradiated EBV-transformed JY cells and 2 μ g/ml phytohemagglutinin in the case of CD8⁺ T cell clones or SA9 mixture (100 ng/ml staphylococcal enterotoxin B, staphylococcal enterotoxins A, staphylococcal enterotoxin E, and toxic shock syndrome toxin-1 from Toxin Technology) in the case of CD8⁺ T cell lines. CD8⁺ T cells were supplied with 100 IU/ml human rIL-2 was added on day 3 and restimulated every 2 weeks.

Residual Live Target Cell Quantification

HLA-A2-matched EBV-transformed B cells (JY) were used as target cells and pulsed with pp65 (at 10 pM or 100 nM) when cocultured with CTL clones or 1 ng/ml of SA9 mixture when cocultured with CD8⁺ T cell lines. For cytotoxic assays, target cells were left unpulsed or pulsed during 2 hr at 37°C/5% CO₂, washed three times, and subsequently transferred to a 96 well plate U-bottom at 1×10^5 cells/100 μ l complete medium without interleukin-2 (IL-2). CD8⁺ T cells prestained with 0.1 μ M of CellTracker Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate from Invitrogen) for 20 min at 37°C/5% CO₂ were added to the target cells at indicated ratios in 100 μ l complete medium without IL-2. Cells were pelleted for 1 min at 1,500 rpm and incubated at 37°C/5% CO₂ from 4 to 72 hr. In some experiments, 10 μ g/ml anti-FasL antibodies (clone NOK-1; BD Pharmingen) or 0.05 μ g/ml aphidicolin (Sigma) treatment was performed during 24-hr assays. A 50- μ l solution made of PBS containing 10% 7-AAD (BD Pharmingen) and 5% BD CompBead (BD Pharmingen) was added 10 min before flow cytometry analysis to measure the percentage of lysed target cells or estimate the number of residual live cells. A reference tube consisting of 1×10^5 JY cells in 200 μ l plus 50- μ l bead solution was acquired until reaching 2,000 beads. In the experimental tubes, acquisition was also fixed to 2,000 beads. The absolute number of residual live target cells was calculated by multiplying the number of events collected in the CFMDA-7-AAD⁺ gate by the ratio set by the reference tube. All data were acquired on a BD FACSCalibur cytometer and analyzed using FlowJo software.

Fluorescence-Activated Cell Sorter-Assisted Clonal Killing Assay

Ten GFP-expressing target cells either unpulsed or pulsed with 100 nM pp65 were distributed in 96-well U-bottom low-cell-binding plates (Nunc Dishes) using a BD FACSAria II cell sorter operating in single-cell-purity sorting mode. Sequentially, 1 or 20 CD8⁺ T cell clones prestained with 0.5 μ M CellTrace calcein red-orange (Invitrogen) for 30 min at 37°C/5% CO₂ were distributed in the same microplate wells followed by 5-min centrifugation at 1,500 rpm. After 24-hr incubation at 37°C/5% CO₂, every well was then examined using an Apotome Axio-observer confocal microscope (Zeiss) with a 10 $\times$ Plan-Neofluar objective for residual GFP-expressing JY cell enumeration.

Confocal Video-Microscopy for Real-Time Caspase-3 Activation

For live cell imaging, 1×10^3 pulsed target cells were seeded into microchambers (Lab-Tek Chambered coverglass; Nalgen Nunc) previously coated with poly-D lysine (Sigma), followed by addition of 2 μ M NucView 488 caspase-3 substrate (Biotium) and CD8⁺ T cell clones prestained with 0.5 μ M CellTrace calcein red-orange (Invitrogen) in different ratios at the beginning of the recording. Where indicated, a confined single CD8⁺ T cell clone multiple killing evaluation was performed in microchambers pre-coated with PDMS micro-mesh arrays (Microsurfaces) containing 100- μ m-diameter wells. In some experiments, 1 μ g/ml CsA or 10pM pp65 pulsing was performed in parallel. Every 2 min, one image was acquired during 12 hr using either a LSM 510 or a 710 confocal microscope (Zeiss) with a 20 $\times$ Plan Apo objective equipped with an environmental chamber kept at 37°C and 5% CO₂ and the pinhole was opened to 10 μ m to capture maximum fluorescence.

Measurement of IFN- γ and Perforin Loss

Target cells were either unpulsed or pulsed with 100 nM pp65 were cocultivated with CD8⁺ T cell clones prestained with 0.1 μ M CellTracker Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate from Invitrogen) at 1:10 E:T ratio during 4 hr. In some experiments, 10 μ g/ml brefeldin A (Sigma) and/or 1 μ g/ml CsA was added to the culture. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% saponin (in PBS/3% BSA/HEPES), stained with AF700-labeled anti-IFN- γ monoclonal antibody (clone XMG1.2; BD Biosciences), and AF647-labeled anti-human perforin monoclonal antibody (clone 8G9; BioLegend). Data were acquired on a BD LSR Fortessa cytometer and analyzed using FlowJo software.

Image Data Analyses

For image analysis, the freeware ImageJ v1.47b and the LOCI plug-in were downloaded from the National Institutes of Health websites (<http://rsb.info.nih.gov/ij/> and <http://loci.wisc.edu/software/bio-formats>, respectively). To perform automated counting of caspase-3⁺ cells through time, images were binarized and further processed using the erosion, dilatation, and watershed ImageJ tools. For the single-CTL assay, microwells were selected on the basis of the presence of a single calcein-stained CTL all along the 12-hr movie by visual inspection. Killing scores were measured as mean of caspase-3⁺ cells over 2-hr time intervals.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Statistical Methods, four figures, and six movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.002>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Z.V. performed the experiments, analyzed the results, and wrote the paper; S.M. and W.Y. generated the CTL clones; C.C. and S.G. performed the statistical analysis; D.G. analyzed the single-CTL video-microscopy data; S.V. designed the research and wrote the paper; and L.D. designed the research, supervised the experiment analysis, and wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche, Delphine Lestrade, and Marion Farcé from the CPTP cytometry platform, as

well as Sophie Allart and Astrid Canivet from the CPTP microscopy platform. We are grateful to Eric Espinosa for helpful discussion and suggestions. We thank Nicolas Fazilleau and Corine Peralis for CTL clone characterization and discussion. We also thank Daniel Dunia for discussion. This work was supported by the Brazilian post-doctoral programs from CAPES (6486/10-0) and CNPq (237654/2012-1). Z.V. is supported by PAPER V and FAPERJ. W.Y. received funding support from the Damon Runyon Cancer Research Foundation (postdoctoral fellowship) and the NIH (grant 1K08DK093709-01). This work also benefited from funding from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grants EML2012090493 and SL220100601347), the Institut National du Cancer (Grant INCa 2012-054), and the Agence Nationale de la Recherche (Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Received: January 12, 2014
Revised: February 16, 2015
Accepted: May 1, 2015
Published: May 28, 2015

REFERENCES

- Azais, J.M., and Genz, A. (2013). Computation of the distribution of the maximum of stationary Gaussian processes. *Methodol. Comput. Appl. Probab.* 15, 969–985.
- Beuneu, H., Lemaître, F., Deguine, J., Moreau, H.D., Bouvier, I., Garcia, Z., Albert, M.L., and Bousso, P. (2010). Visualizing the functional diversification of CD8⁺ T cell responses in lymph nodes. *Immunity* 33, 412–423.
- Buchholz, V.R., Flossdorf, M., Hensel, I., Kretschmer, L., Weissbrich, B., Gräf, P., Verschoor, A., Schiemann, M., Höfer, T., and Busch, D.H. (2013). Disparate individual fates compose robust CD8⁺ T cell immunity. *Science* 340, 630–635.
- Choi, P.J., and Mitchison, T.J. (2013). Imaging burst kinetics and spatial coordination during serial killing by single natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 6488–6493.
- Deguine, J., Breart, B., Lemaître, F., Di Santo, J.P., and Bousso, P. (2010). Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8⁺ T cells during tumor regression. *Immunity* 33, 632–644.
- Dustin, M.L., and Long, E.O. (2010). Cytotoxic immunological synapses. *Immunol. Rev.* 235, 24–34.
- Faroudi, M., Utzny, C., Salio, M., Cerundolo, V., Guiraud, M., Müller, S., and Valitutti, S. (2003). Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14145–14150.
- Feinerman, O., Veiga, J., Dorfman, J.R., Germain, R.N., and Altan-Bonnet, G. (2008). Variability and robustness in T cell activation from regulated heterogeneity in protein levels. *Science* 321, 1081–1084.
- Gerlach, C., Rohr, J.C., Penä, L., van Rooij, N., van Heijst, J.W.J., Velds, A., Urbanus, J., Naik, S.H., Jacobs, H., Beltman, J.B., et al. (2013). Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8⁺ T cells. *Science* 340, 635–639.
- Huang, J., Brameshuber, M., Zeng, X., Xie, J., Li, Q.-J., Chien, Y.-H., Valitutti, S., and Davis, M.M. (2013). A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4⁺ T cells. *Immunity* 39, 846–857.
- Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C., and Davis, M.M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat. Immunol.* 4, 749–755.
- Lemaître, F., Moreau, H.D., Vedele, L., and Bousso, P. (2013). Phenotypic CD8⁺ T cell diversification occurs before, during, and after the first T cell division. *J. Immunol.* 191, 1578–1585.
- Macken, C.A., and Perelson, A.S. (1984). A multistage model for the action of cytotoxic T lymphocytes in multicellular conjugates. *J. Immunol.* 132, 1614–1624.
- Peixoto, A., Evaristo, C., Munitic, I., Monteiro, M., Charbit, A., Roche, B., and Veiga-Fernandes, H. (2007). CD8 single-cell gene coexpression reveals three different effector types present at distinct phases of the immune response. *J. Exp. Med.* 204, 1193–1205.
- Perelson, A.S., and Bell, G.I. (1982). Delivery of lethal hits by cytotoxic T lymphocytes in multicellular conjugates occurs sequentially but at random times. *J. Immunol.* 129, 2796–2801.
- Poenie, M., Tsien, R.Y., and Schmitt-Verhulst, A.M. (1987). Sequential activation and lethal hit measured by [Ca²⁺]_i in individual cytolytic T cells and targets. *EMBO J.* 6, 2223–2232.
- Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* 5, 524–530.
- Rothstein, T.L., Mage, M., Jones, G., and McHugh, L.L. (1978). Cytotoxic T lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography. *J. Immunol.* 121, 1652–1656.
- Rychlik, I. (1990). New bounds for the first passage, wavelength and amplitude density. *Stochastic Process. Appl.* 34, 313–339.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T.J., and Eisen, H.N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 4, 565–571.
- Thom, R.M., and Henney, C.S. (1976). Kinetic analysis of target cell destruction by effector T cells. I. Delineation of parameters related to the frequency and lytic efficiency of killer cells. *J. Immunol.* 117, 2213–2219.
- Valitutti, S., Müller, S., Dessing, M., and Lanzavecchia, A. (1996). Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.* 183, 1917–1921.
- Varadarajan, N., Julg, B., Yamanaka, Y.J., Chen, H., Ogunniyi, A.O., McAndrew, E., Porter, L.C., Piechocka-Trocha, A., Hill, B.J., Douek, D.C., et al. (2011). A high-throughput single-cell analysis of human CD8⁺ T cell functions reveals discordance for cytokine secretion and cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 121, 4322–4331.
- Weigelin, B., and Friedl, P. (2010). A three-dimensional organotypic assay to measure target cell killing by cytotoxic T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 80, 2087–2091.
- Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10985–10990.
- Zijllemaker, W.P., van Oers, R.H., de Goede, R.E., and Schellekens, P.T. (1977). Cytotoxic activity of human lymphocytes: quantitative analysis of T cell and K cell cytotoxicity, revealing enzyme-like kinetics. *J. Immunol.* 119, 1507–1514.

Cell Reports

Supplemental Information

**Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit
Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing**

Zilton Vasconcelos, Sabina Müller, Delphine Guipouy, Yu Wong, Claire Christophe,
Sébastien Gadat, Salvatore Valitutti, and Loïc Dupré

Statistical analysis of the distribution of individual CTL killing efficacy, Related to Figure 4

On the basis of the data obtained from the single-CTL killing assay, we assumed that each CTL (referred as c) has an individual ability of killing, which is distributed according to a time-inhomogeneous *Poisson Process*, whose intensity $(\lambda_c(t))_{t>0}$ is unknown. The experimental data indicate that $\lambda_c(t)$ increases with t , from the initialization 0 to the ending time $T_e=12$ hrs.

We were primarily interested in evaluating the homogeneity of the whole population of CTL with respect to the intensity λ_c . In order to assess this homogeneity, a statistical study was conducted. For each of the n CTL analyzed ($n=259$), we recorded the cumulative number of killed target cells during the first T_e hr after the initialization of the killing process. From the *Poisson Process* homogeneity assumption, the same intensity λ is commonly shared by each CTL and the cumulative number N_c of killed target cells is distributed according to a *Poisson Distribution* whose parameter Λ corresponds to the integral of $\lambda(t)$ between 0 and T_e :

$$\Lambda = \int_0^{T_e} \lambda(t) dt.$$

Hence, even though Λ is still unknown, we can test the homogeneity of the observations N_c when c varies: $0 < c < 260$. In this view, we applied a Chi-square test to the *Poisson Distribution*, whose parameter is the observed average value of the cumulative numbers of killed target cells :

$$S = n^{-1} (N_1 + N_2 + \dots + N_n).$$

Remark that an average value S of 4.06 was obtained. The Chi-Square statistics is :

$$T = n \sum_{0 \leq k \leq 12} (p_c(k) - p_s(k))^2 / p_s(k),$$

where k varies from 0 to 12. The empirical frequency that one CTL killed k target cells is designed as $p_c(k)$, it is the number of observations such that $N_c = k$ divided by n . The theoretical *Poisson* frequency $p_s(k)$ is the given by :

$$p_s(k) = e^{-(S)} S^k / k! \text{ if } k < 12 \text{ and } p_s(12) = e^{-(S)} [S^{12}/12! + S^{13}/13! + \dots].$$

The last theoretical frequency is the size of the *Poisson* upper tail after 12. We obtained that

the statistics T is greater than 113 in our numerical experiment. This statistics is much larger than the $1-10^{-8}$ quantile of the Chi-Square distribution of $13-2 = 11$ degrees of freedom (which is the reference distribution since we have to estimate the mean value of the *Poisson Distribution*). Hence, we reject the homogeneity assumption of the CTL population with a type I error lower than 10^{-8} .

We then reasoned that the collected data might fit a *mixture of two Poisson Distributions*.

Using an *Expectation Maximization algorithm (EM algorithm)*, the estimator of mixture parameter is :

$$*=(0.66,0.34,2.8,6.4).$$

This means that the CTL population is divided in two subpopulations : 66% of the CTL follow a *Poisson Distribution* with an average of 2.8 killed target cells over 12 hr, while 34% of the CTL follow a *Poisson Distribution* with an average of 6.4 killed target cells over 12 hr.

From a statistical point of view, the above formula may now be replaced by :

$$T' = n \sum_{0 \leq k \leq 12} (p_e(k) - p_{mix}(k))^2 / p_{mix}(k),$$

where $p_{mix}(k)$ is the theoretical frequency obtained with the above *Poisson mixture model*.

$$p_{mix}(k) = q p_{6.6}(k) + (1-q) p_{2.8}(k).$$

T' is significantly reduced ($T' = 8.9$ in our experiment), which yields the acceptance of the statistical assumption of a *mixture of two Poisson Distributions* (the type I error would be of about 45%).

As the 259 observations come from 3 independent experiments, Chi-square tests were applied separately to each data subset.

- The Chi-square test of homogeneity of the 88 CTL killing (first subset) is associated to a type I error lower than $= 0.003$, leading to the rejection of the homogeneity assumption of the CTL population. In addition the Chi-square statistics of goodness-of-fit test of the observations to the *mixture distribution* is lower than 12.33, which yields the acceptance of the assumption of a *mixture distribution* (the type I error would be of

15%).

The estimator of mixture parameter obtained using *EM algorithm* is :

$$*=(0.77,0.23,3.26,6.9).$$

. The Chi-square test of homogeneity of the 97 CTL killing (second subset) is associated to a type I error lower than $= 8.9 \cdot 10^{-4}$, leading to the rejection of the homogeneity assumption of the CTL population. In addition the Chi-square statistics of goodness-of-fit test of the observations to the *mixture distribution* is lower than 8.25, which yields the acceptance of the assumption of a *mixture distribution* (the type I error would be of 51%).

The estimator of mixture parameter obtained using *EM algorithm* is :

$$*=(0.6,0.4,2.45,7.1).$$

. The Chi-square test of homogeneity of the 75 CTL killing (third subset) is associated to a type I error lower than $= 0.066$. This does not clearly lead to reject the homogeneity assumption of the CTL population of homogeneity of the CTL population. Noting that the Chi-square statistics of goodness-of-fit test of the observations to the *mixture distribution* is lower than 8, which yields to the type I error would be of 0.20, then we favor the hypothesis of *mixture distribution* for the observations.

The estimator of mixture parameter obtained using *EM algorithm* is :

$$*=(0.97,0.03,3.5,4.84).$$

To the light of the estimator $*$, as one distribution has a proportion very low (0.03), that call into question the *mixture distribution* of the observations.

Statistical analysis of cumulative killing kinetics, Related to Figure 4

We describe below the statistical test for the detection of a change in the mean of the counting process involved in the CTL activity. For any CTL i among the n available ones, we denote

$X_i(t)$ the number of target cells killed at time t . The time t varies in our experiment between 0 and 12 hr, sampled every 30 min (one unit below corresponds to half an hour). The averaged killing process is then :

$$m_X(t) = [X_1(t) + X_2(t) + \dots + X_n(t)] / n, \quad t = \{1, 2, \dots, 24\} \text{ half an hours,}$$

and can be considered as an approximately GP thanks to the Central Limit Theorem (n is large enough for a such approximation since $n = \{88, 97, 74, 259\}$). We then use the statistical test of Azais & Genz (2013) and consider the centered process :

$$M_X(t) = m_X(t) - \mu, \text{ with } t = \{1, 2, \dots, 24\} \text{ half an hours,}$$

where μ is the mean killing each half an hours of the whole population during all the experiment. Recall that mathematically, μ is given by :

$$\mu = (m_X(1) + m_X(2) + \dots + m_X(24)) / 24.$$

Then, we compute for any time s between 1 and 24 half an hours the mean killing per unit of time before and after s . These two averages are thus :

$$M_-(s) = (m_X(1) + m_X(2) + \dots + m_X(s-1)) / (s-1),$$

and :

$$M_+(s) = (m_X(s+1) + m_X(s+2) + \dots + m_X(24)) / (24 - (s+1)).$$

To test the change in the mean of the time series, the difference between these two averages is a key mathematical ingredient, which must be normalized by the variance of the averaging before and after time s :

$$\Delta(s) = |M_-(s) - M_+(s)| / (\sqrt{s-1} + \sqrt{24 - (s+1)}).$$

The change in the mean test relies on the maximum of $(\Delta(s), 1 \leq s \leq 24)$. Following standard notations of extreme events theory, this maximum is denoted M^* .

Let us denote now H_0 the baseline assumption that no breakpoint in the mean occur in the time series $(X(t), 0 < t < 25)$, the statistical procedure relies on the value M^* : under the assumption that X follows a centered GP, the distribution of the random variable M^* can be

computed and especially the probability that M^* is greater than a given threshold u : $P(M^* > u)$ by using an intricate and very effective Quasi Monte Carlo integration, which is described by Genz (2012).

We then compute the observed statistics M^* in each of our situation and decide to reject the baseline hypothesis H_0 each time the p-value is lower than 5%. Using the Matlab package and the `qsimvnr` function, we obtained the following numerical results :

- The first data subset made up of 88 CTL killing kinetics presents a change in the average behavior of the CTL and the first type error of our test is lower than $p_{\text{value}}=1.5 \cdot 10^{-4}$, (meaning that our statistics would occur with a probability lower than p_{value} if no breakpoint occurs in the series). Moreover, this breakpoint is likely to occur at about 8.5 hr.
- The second data subset made up of 97 CTL killing kinetics is associated to a first type error test lower than $p_{\text{value}}=8.9 \cdot 10^{-4}$ with a breakpoint likely to occur at about 10 hr.
- The third data subset made up of 74 CTL killing kinetics is associated to a first type error test lower than $p_{\text{value}}=5.7 \cdot 10^{-4}$ with a breakpoint likely to occur at about 10 hr.
- The compiled dataset comprising 259 CTL killing kinetics is associated to a first type error test lower than $p_{\text{value}}=5.7 \cdot 10^{-4}$ with a breakpoint likely to occur at about 10 hr.

Whatever the data set considered, our statistical analysis leads to the rejection of the homogeneity in the time series. Note also that we have decided to pinpoint the breakpoint location at the time where $\Delta(s)$ reaches its maximal value.

References

- Azais & Genz (2013) Computation of the Distribution of the Maximum of Stationary Gaussian Processes. *Methodology and Computing in Applied Probability*, 15:969-985.
- Rychlik (1990) New bounds for the first passage, wavelength and amplitude density. *Stochastic Processes and their Applications*, 34:313-339.
- Genz (2012) Matlab software for multivariate normal probability computations.
www.math.wsu.edu/faculty/genz/software/software.html

Figure S1

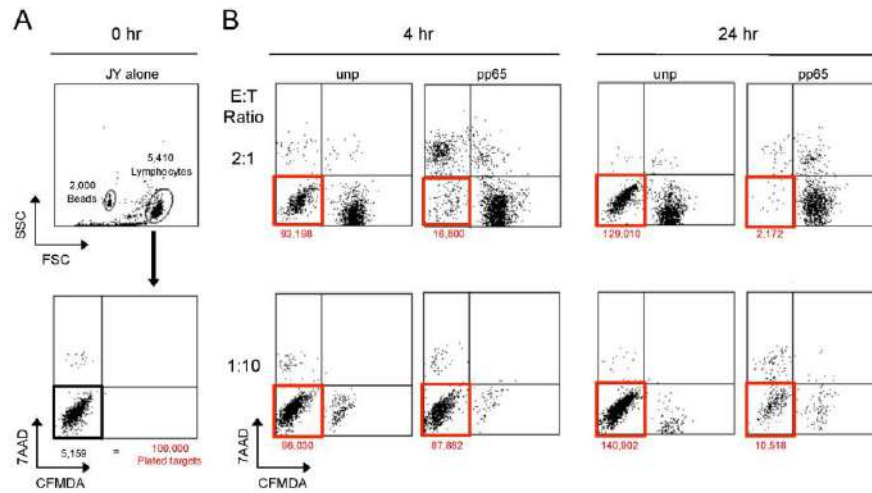


Figure S1, Related to Figure 1. Flow cytometry-based counting of alive target cells

JY cells (Targets) were pulsed with 100 nM pp65 or left unpulsed and co-cultured for 4 and 24 hr with CTL (Effectors), at E:T ratios of 2:1 and 1:10. Before flow cytometry analysis, microbeads were added to harvested cells to serve as internal control. (A) The upper left dot plot corresponds to the reference tube containing JY cells only, which was acquired until a number of 2,000 beads was reached. The lower left dot plot indicates how alive target cells were discriminated (7AAD negative and CFMDA negative) to establish a reference count corresponding to the initial 100,000 cells used. (B) Tubes corresponding to the indicated experimental conditions were also acquired until a number of 2,000 beads was reached. The 7AAD/CFMDA plots allow to discriminate target cells (CFMDA negative) from CTL (CFMDA positive) and alive cells (7AAD negative) from dead ones (7AAD positive). The numbers of alive target cells were calculated on the basis of the reference tube. The plots are from one representative experiment.

Figure S2

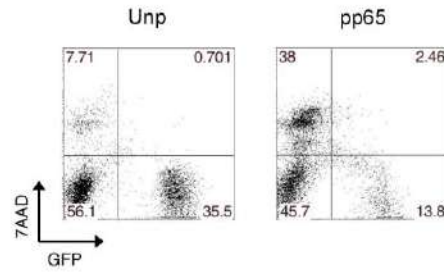


Figure S2, Related to Figure 2. Loss of GFP in target cells as a measurement of death

GFP-expressing target cells, pulsed with 100 nM pp65 or left unpulsed, were co-cultivated with CTL at a 2:1 E:T ratio for 4 hr and subsequently analyzed by flow cytometry for GFP expression and 7-AAD staining. CTL-mediated killing of target cells results in a loss of GFP, which is concomitant to 7-AAD uptake. Dot plots are representative of 3 experiments.

Figure S3

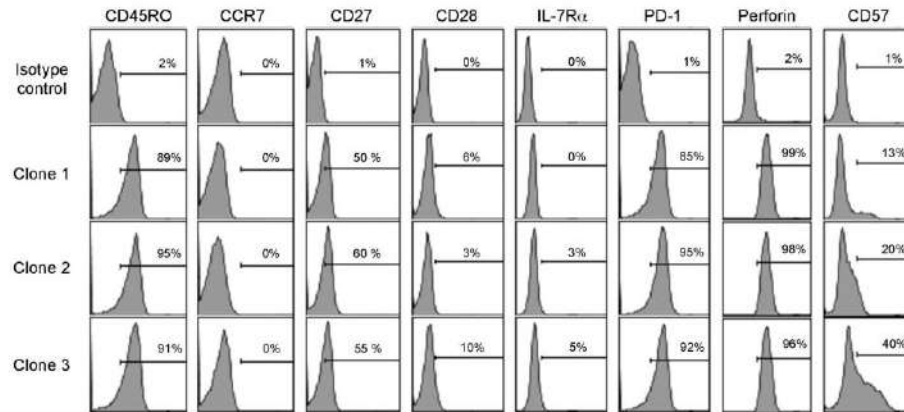


Figure S3, Related to Figure 2. Homogenous effector memory phenotype in the pp65-specific CTL clones

Representative flow cytometry analysis of the phenotype of three pp65-specific CD8⁺ CTL clones, based on the expression of CD45RO, CCR7, CD27, CD28, CD127 (IL-7R α), PD-1, Perforin and CD57.

Figure S4

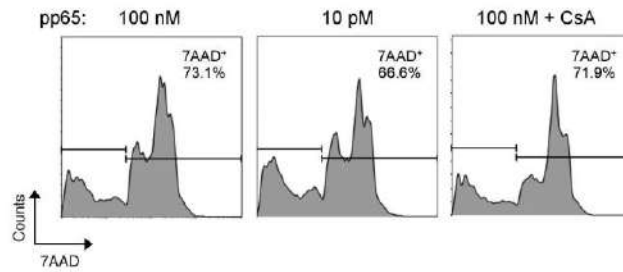


Figure S4, Related to Figure 7. Early CTL cytotoxicity under reduced activation conditions
CTL were incubated with JY cells pulsed with 100 nM or 10 pM pp65 at a 2:1 E:T ratio during 4 hr in the presence or absence of 1 μ g/mL CsA. Histogram plots showing percentage of target cells positive for 7-AAD are representative of 3 experiments.

Movie S1, Related to Figure 3. Rapid cumulative rise in caspase-3-positive target cells at 1:1 E:T ratio

Representative wide field of a Lab-Tek well showing the activation of Caspase-3 (with NucView 488 caspase-3 substrate) in JY target cells pulsed with 100 nM pp65 and incubated with specific CTL at a 1:1 E:T ratio. Images were taken over 12 hr at a frame rate of 1 image every 2 min.

Movie S2, Related to Figure 3. Substantial but delayed rise in caspase-3-positive target cells at 1:10 E:T ratio

Representative wide field of a Lab-Tek well showing the activation of Caspase-3 (with NucView 488 caspase-3 substrate) in JY target cells pulsed with 100 nM pp65 and incubated with specific CTL at a 1:10 E:T ratio. Images were taken over 12 hr at a frame rate of 1 image every 2 min.

Movie S3, Related to Figure 3. Low activation of caspase-3 in unpulsed target cells

Representative wide field of a Lab-Tek well showing the activation of Caspase-3 (with NucView 488 caspase-3 substrate) in unpulsed JY target cells incubated with specific CTL at a 1:1 E:T ratio. Images were taken over 12 hr at a frame rate of 1 image every 2 min.

Movie S4, Related to Figure 4. High-rate multiple killing by a single CTL

Selected microwell of a PDMS micromesh array showing a single CTL (prestained with CellTrace™ Calcein Red-Orange) displaying high cumulative killing, as evidenced by activation of Caspase-3 (with NucView 488 caspase-3 substrate) in multiple JY target cells pulsed with 100 nM pp65.

Movie S5, Related to Figure 4. Low-rate multiple killing by a single CTL

Selected microwell of a PDMS micromesh array showing a single CTL (prestained with CellTrace™ Calcein Red-Orange) displaying low cumulative killing, as evidenced by activation of Caspase-3 (with NucView 488 caspase-3 substrate) in few JY target cells pulsed with 100 nM pp65.

Movie S6, Related to Figure 4. Low activation of caspase-3 in the absence of CTL

Selected microwell of a PDMS micromesh array showing background activation of Caspase-3 (with NucView 488 caspase-3 substrate) in JY target cells pulsed with 100 nM pp65, in the absence of CTL.

Discussion et perspectives (partie 1)

Ainsi nous avons pu identifier que la lyse soutenue sur des temps prolongés, effectuée par une population clonale de CTL, repose sur une hétérogénéité dans la capacité de lyse individuelle, avec l'identification de deux sous-populations, dont l'une démontre une activité de lyse multiple élevée par rapport à l'autre. L'émergence de cette sous-population de CTL ayant un taux élevé de lyse nécessite une forte activation du TCR, et possède une caractéristique de lyse multiple « accélérée ».

L'avenir de cette étude serait alors d'identifier les mécanismes sous-jacents à cette hétérogénéité de lyse, **comment émerge une sous-populations de cellules aux capacités de lyse multiple plus élevée ?**

Une première hypothèse pourrait être une **capacité migratoire** différente permettant d'aller à la rencontre de plus ou moins de cellules cibles, favorisant ainsi la lyse multiple. Ces populations de CTL clonales semblent homogènes lors de phénotypage en cytométrie en flux. Pourtant, dans le laboratoire, Javier Rey-Barroso a pu démontrer, sur un autre type cellulaire supposé homogène, que chaque cellule possède une capacité migratoire propre, avec des cellules plus ou moins rapides en terme de vitesse ou de directionalité (Scientific Reports, article révisé re-soumis). Dans notre cas, parmi les expériences de CTL isolés en présence de plusieurs cibles (micromesh en microscopie en temps réel), nous avons pu observer, de manière qualitative, que les CTL éliminant peu de cibles semblaient très exploratoires sur la surface de 100µm de diamètre, tandis que les CTL ayant une grande capacité de lyse multiple semblaient couvrir moins de surface, tout en étant capables de rencontrer des cellules cibles. Nous souhaitons explorer ces possibilités en mesurant plusieurs paramètres comme : la vitesse individuelle des CTL, la longueur du trajet de migration, la surface occupée par ce trajet, une possible directionalité vers les cibles, quantifier le nombre de rencontres avec les cellules cibles au cours de leur trajet etc. Dans ce but, nous avons débuté une collaboration avec des bio-informaticiens de l'Université Leiden, Joost Beltman et Richard Beck, afin de comprendre et de modéliser le comportement migratoire des CTL au niveau individuel.

Suite à la migration pour aller à la rencontre des cibles, une différence possible serait la **capacité d'accrochage multiple** à plusieurs cibles, et ainsi d'effectuer **plusieurs synapses**

lytiques. Les évènements de lyse multiple « accélérée » étaient principalement observés lorsque le CTL était capable d'effectuer un accrochage à plusieurs cibles. Le CTL serait ainsi capable d'effectuer des synapses lytiques séquentielles où la repolarisation des granules lytiques serait rapide d'une synapse à l'autre. Ce modèle de lyse multiple grâce à des synapses lytiques séquentielles a été proposé en 2003 par J.B. Huppa et M.M. Davis⁹⁹ (**Figure 14**).

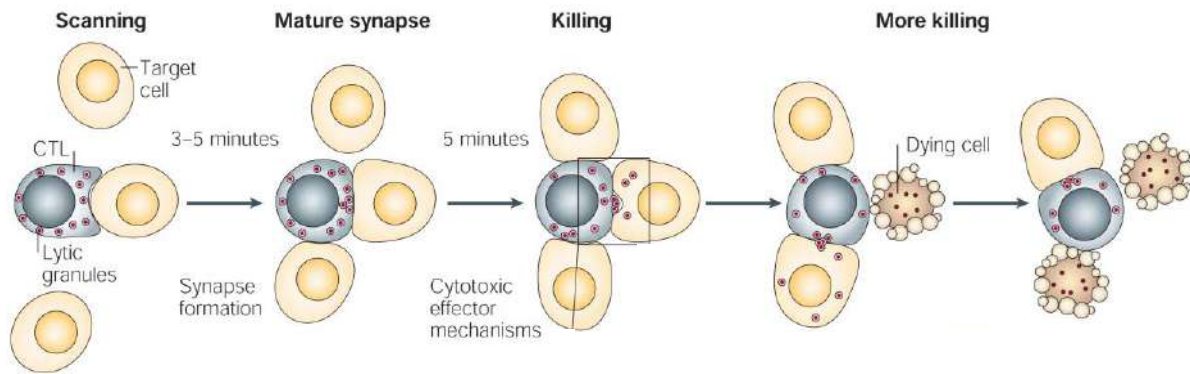


Figure 14. Modèle de lyse multiple impliquant plusieurs synapses lytiques avec la repolarisation séquentielle des granules lytiques pour chaque synapse.

Je formule alors l'hypothèse que chaque CTL individuel n'aurait pas la même capacité à effectuer des synapses lytiques multiples avec une re-polarisation des granules lytiques efficaces. Afin d'observer et quantifier ce phénomène, il serait possible de rajouter la sonde appelée « lysotracker » qui permet de marquer les lysosomes de cellules vivantes. Sachant que le compartiment lysosomal des CTL est majoritairement représenté par les granules lytiques, nous pourrions suivre en temps réel, lors de la rencontre de plusieurs cellules cibles en simultané, la re-polarisation des granules lytiques, en plus de nos paramètres actuels. Nous souhaitons ajouter cet élément pour notre collaboration avec Joost Beltman et Richard Beck. Si une capacité différentielle de polarisation séquentielle des granules lytiques est observée, il serait alors pertinent de mesurer la polarisation du MTOC et d'explorer au niveau moléculaire les protéines impliquées dans le transport des granules le long des microtubules.

De manière générale, même si notre population de CTL est identique génétiquement, la cause de l'hétérogénéité fonctionnelle, migratoire et/ou lyse multiple rapide, pourrait être liée à des différences au niveau **transcriptionnel** au cours de la lyse multiple. La mesure en temps réel de la transcription de gènes cibles lors d'un test de lyse soutenue, comme la perforine, à l'aide d'une sonde optique à base d'oligonucléotide²⁷⁶ pourrait être un nouveau challenge à

effectuer afin d'y répondre. Au sein du laboratoire, nous émettons une autre hypothèse : celle d'une division asymétrique à l'origine des deux sous-populations. Un étudiant en thèse de l'équipe, Romain Jugelé, a notamment pu identifier une répartition hétérogène de la perforine lors de la division des CTL (données non publiées). La démonstration du lien avec l'activité de lyse individuelle est en cours.

Par ailleurs, cette étude soulève de nouveau la question du **rôle de l'hétérogénéité dans les réponses immunitaires**. En effet de plus en plus d'études récentes, en particulier pour les lymphocytes T CD8⁺, suggèrent que l'hétérogénéité permettrait de **calibrer une réponse immunitaire efficace**²⁷⁷. Notamment, lors de l'activation de lymphocytes T CD8⁺ naïfs, les précurseurs montrent une réponse hétérogène au niveau individuel en terme d'expansion et de différenciation, avec une diversification intra- et inter-clonale²⁷⁷⁻²⁸⁰.

Ainsi, une hétérogénéité fonctionnelle de la capacité de lyse des CTL permettrait une réponse robuste pour une lyse soutenue face à un excès de cellules cibles. De plus, la capacité cytotoxique n'est pas la seule fonction des CTL. Ceux-ci sécrètent aussi des cytokines comme l'IFN γ . La relation entre ces deux fonctions au niveau de CTL individuels a été étudiée par Varadarajan et collaborateurs²⁸¹. Ils ont alors démontré que ces fonctions étaient indépendantes, c'est-à-dire que les CTL sécrétant fortement de l'IFN γ n'étaient pas cytotoxiques, et inversement. L'hétérogénéité fonctionnelle pourrait alors être le miroir d'un **partage des fonctions** exercées par une population cellulaire que l'on pense homogène.

Finalement, en vue du phénomène de contraction en fin de réponse inflammatoire, tout en gardant un pool de cellules mémoires, l'hétérogénéité fonctionnelle de lyse pourrait être impliquée dans ce phénomène. J'émetts l'hypothèse que la sous-population de CTL ayant une forte activité de lyse multiple aurait une survie moins importante que l'autre sous-population. Cette première sous-population serait plus sensible à l'AICD, et serait éliminée, tandis que l'autre pourrait correspondre aux cellules mémoires.

En résumé, ces travaux apportent de nouvelles connaissances fondamentales au niveau individuel de la fonction cytotoxique des CTL. Cependant, cette étude ouvre de nouvelles questions fondamentales à explorer pour de futures recherches.

Partie 2. La protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich contrôle le ring de nanoclusters de LFA-1 à la synapse lytique

The Wiskott-Aldrich syndrome protein controls the LFA-1 nanocluster belt at the lytic synapse

Raïssa Houmadi¹, Delphine Guipouy¹, Javier Rey-Barroso, Zilton Vasconcelos, Julie Cornet, Manoel Manghi, Nicolas Destainville, Salvatore Valitutti, Sophie Allart and Loïc Dupré.

¹ co-premier auteurs

Travail soumis dans Cell Reports

(accepté sous réserve de modifications mineures de texte)

La délivrance du coup létal, effectuée par les lymphocytes T CD8⁺, est permise par une stabilité du contact avec la cellule cible afin de polariser les granules lytiques et les relarguer de manière ciblée. Cette aire de contact spécialisée entre le CTL et sa cible correspond à la synapse lytique. Une molécule fondamentale à l'adhérence et à la stabilité de cette synapse est l'intégrine LFA-1. Son organisation à la synapse se présente sous la forme d'un anneau composé de nanoclusters. LFA-1 est notamment ancrée dans le cytosquelette d'actine, mais les mécanismes contrôlant l'organisation spatiale de LFA-1 en anneau et le confinement en nanoclusters n'ont pas encore été étudiés.

Afin d'appréhender cette question, nous avons utilisé des lignées de lymphocytes T CD8⁺ issues de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). L'avantage de ce modèle cellulaire est une déficience naturelle de la protéine WASP. Cette protéine est clé dans le remodelage du cytosquelette d'actine et est recrutée à la synapse lytique. Nous formulons donc l'hypothèse que WASP joue un rôle dans l'activation et l'organisation de LFA-1 à la synapse lytique des CTL.

Dans le but d'observer les structures fines de l'actine ainsi que les nanoclusters de LFA-1, nous avons utilisé une combinaison de microscopies de super-résolutions : le dSTORM et le SIM.

Premièrement, par cytométrie en flux, nous avons caractérisé un défaut de lyse soutenue des CTL WAS, confirmé par microscopie en temps réel, en lien avec un défaut de délivrance du coup létal. Ces CTL WAS présentent une morphologie aberrante, en relation avec un défaut de formation de l'anneau de LFA-1 sous conformation activée. De plus, les CTL WAS présentent un défaut d'activation de LFA-1, confirmé par une densité plus faible en surface du nombre de nanoclusters de LFA-1, mais aussi une densité plus faible en molécules de LFA-1 au sein des clusters. L'impact d'une malformation de l'anneau de LFA-1 semble induire un défaut de positionnement des granules lytiques à l'aire de contact synaptique. En effet, ceux-ci vont être, en terme de distance, à la limite de la bordure extérieure de l'anneau, voire à l'extérieur de celui-ci.

Ainsi, la protéine WASP semble essentielle au contrôle, à l'échelle nanoscopique, de la densité des nanoclusters de LFA-1 activés, et à l'échelle cellulaire, de la formation de l'anneau de ces nanoclusters afin de confiner la sécrétion des granules lytiques.

J'ai eu l'opportunité de débiter les travaux sur ce projet pendant mon année de Master. Lors du stage, j'ai pu adapter mes connaissances acquises avec Ziltron pour l'adapter à la cytolyse redirigée et caractériser le défaut de lyse soutenue de CTL issus de patients WAS (**Figure 1**). Sachant que ces CTL WAS ont un potentiel cytotoxique (**Figure S1**), j'ai exploré l'hypothèse d'une potentielle instabilité de la synapse. Pour cela LFA-1, molécule clé pour l'ancrage du CTL à sa cible, semblait un bon candidat. J'ai effectué la caractérisation du défaut d'activation de celui-ci mais aussi le délai de délivrance du coup létal (**Figure 1**). Suite à des observations de synapses anormales en microscopie confocale classique, Raïssa Houmadi s'est jointe au projet, en début de thèse, pour une caractérisation fine de la topologie de LFA-1 par microscopie de super-résolution. Je l'ai soutenue en effectuant des analyses sur ces images (**Figure 3C D E F, Figure 4C, Figure 5C et D, Figure S4B et Figure S5B**), ainsi que par la réalisation des tests statistiques et la mise en forme des figures. J'ai pu porter le projet jusqu'au processus de révision, ma part étant la réalisation de la partie cytométrie et vidéomicroscopie ainsi que leurs analyses (**Figure 6**). Ce projet a alors pu aboutir à une publication par la collaboration étroite établie avec Raïssa.

The Wiskott-Aldrich syndrome protein controls the LFA-1 nanocluster belt at the lytic synapse

**Raïssa Houmadi, MSc,^{1,2,3,*} Delphine Guipouy, MSc,^{1,2,3,4,*} Javier Rey-Barroso, PhD,^{1,2,3}
Zilton Vasconcelos, PhD,⁵ Julie Cornet, BSc,^{2,6} Manoel Manghi, PhD,^{2,6}
Nicolas Destainville, PhD,^{2,6} Salvatore Valitutti, MD, PhD,^{1,2,3,7} Sophie Allart, PhD,^{1,2,3} and
Loïc Dupré, PhD^{1,2,3,8,9,#}**

¹INSERM, UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, 31300 Toulouse, France

²Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31062 Toulouse, France

³CNRS, UMR 5282, 31300 Toulouse, France

⁴TxCell, Allée de la Nertière, Valbonne Sophia-Antipolis, France

⁵Fernandes Figueira Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁶CNRS, UMR 5152, Institut de Recherche sur les Systèmes Atomiques et Moléculaires Complexes,
Laboratoire de Physique Théorique, Toulouse, France

⁷Department of Pathology, Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse, Toulouse France

⁸Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria

⁹CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria

*RH and DG contributed equally to the study

#Correspondence:

Loïc Dupré, INSERM UMR 1043 - CPTP, Purpan University Hospital,

1 place du Dr Baylac, 31300 Toulouse, France

e-mail: loic.dupre@inserm.fr

Summary

T lymphocyte cytotoxicity relies on a synaptic ring of LFA-1, which permits polarized delivery of lytic granules. How LFA-1 organization is controlled by underlying actin cytoskeleton dynamics is poorly understood. We here explored the contribution of the actin cytoskeleton regulator WASP to the topography of LFA-1 using a combination of microscopy modalities. We uncover that the reduced cytotoxicity of Wiskott-Aldrich syndrome patient-derived CD8⁺ T lymphocytes lacking WASP is associated to reduced LFA-1 activation, unstable synapse and delayed lethal hit. At the nanometric scale, WASP constrains high-affinity LFA-1 into dense nanoclusters located in actin meshwork interstices. At the cellular scale, WASP is required for the assembly of a radial belt composed of hundreds LFA-1 nanoclusters and for lytic granule docking within this belt. Our study unravels the nanoscale topography of LFA-1 at the lytic synapse and identifies WASP as a molecule controlling individual LFA-1 cluster density and LFA-1 nanocluster belt integrity.

Key words

Wiskott-Aldrich syndrome protein, cytotoxic T lymphocytes, immunological synapse, actin cytoskeleton, LFA-1, lytic granules, super-resolution microscopy

Highlights

- High-affinity LFA-1 is organized into a nanocluster belt at the CD8⁺ T cell synapse
- LFA-1 nanoclusters locate in the interstices of the actin cytoskeleton meshwork
- WASP controls LFA-1 organization into individual nanoclusters and cluster belt

eTOC Blurp

A hallmark of the synapse between cytotoxic T cells and target cells is the assembly of a LFA-1 ring. Using super-resolution microscopy approaches, Houmadi et al. report that the LFA-1 ring is composed of nanoclusters embedded in the actin cytoskeleton and identify the pivotal role of WASP in LFA-1 topography.

Abbreviations

CTL: Cytotoxic T Lymphocytes, dSTORM: direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, gMFI: geometric Mean Fluorescence Intensity, LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen 1, SIM: Structured illumination microscopy, TIRFM: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, WAS: Wiskott-Aldrich Syndrome, WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

Introduction

The integrin LFA-1 was initially identified in a screen of antibodies that blocked the lytic activity of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Davignon et al., 1981). In these cells, LFA-1 is required both for the conjugation with antigen-presenting cells and for the confined delivery of cytotoxic molecules. Indeed, CTL lytic granules are delivered in a secretory domain lying between the center of the synapse enriched in signaling molecules and a peripheral ring of LFA-1 (Stinchcombe et al., 2001). In agreement with the requirement to confine lytic granule delivery with high fidelity, CD8⁺ T cells have been shown to form fivefold more LFA-1 ring junctions than CD4⁺ T cells (Somersalo et al., 2004). In the context of the T cell immunological synapse, LFA-1 clusters accumulate over time at the inner side of the lamellar actin network to form a peripheral ring (Anikeeva et al., 2005; Yi et al., 2012). The lateral force provided by the actin retrograde flow has been hypothesized to drive integrin activation by separating α - and β -integrin cytoplasmic tails (Zhu et al., 2008). In accordance, LFA-1 under the extended conformation localizes to the synapse outer ring, while the open conformation is enriched in a more central ring (Comrie et al., 2015). Initial analysis of LFA-1 topography at the surface of T cells has provided the view that LFA-1 activation results from the assembly of micrometer-scale domains (Kaizuka et al., 2007). However, recent super-resolution microscopy approaches have revealed that LFA-1 rather assembles into nanometer-scale clusters (Baumgart et al., 2016; Murugesan et al., 2016). The mechanisms that control the organization of LFA-1 into a ring-like structure and that confine LFA-1 into nanoclusters remain to be elucidated. In this work, we tested the hypothesis that the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) might be a major player in the control of LFA-1 activation and organization in CTL. WASP is a hematopoietic-specific actin cytoskeleton regulator that sets immunological synapse stability and TCR activation threshold in CD4⁺ T cells (Calvez et al., 2011; Dupré et al., 2002; Sims et al., 2007). Whether it controls the stability of the lytic synapse and whether this might explain its reported role in CTL killing activity (De Meester et al., 2010; Lang et al., 2013) remain unexplored. To test the role of WASP in lytic synapse organization, we investigated actin cytoskeleton ultrastructure and dynamics together with LFA-1 topography in patient-derived WASP-deficient CTL, using a combination of microscopy tools, including the super-resolution approaches dSTORM (Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2011) and SIM (Gustafsson, 2000). Our data show that the inefficacy of target cell killing by WAS CTL is associated with a reduced LFA-1 activation, non-radial spreading of the lytic synapse and delayed lethal hit delivery. These defects

can be explained by the additional finding that open-conformation LFA-1 nanoclusters are confined into actin meshwork interstices and that such clusters display reduced density in WASP-deficient CTL. At the cellular scale, WAS CTL display defects in LFA-1 cluster belt assembly and lytic granule positioning. In conclusion, our study identifies WASP as a key regulator of LFA-1 nanoscale topography in the context of CD8⁺ T cell cytotoxic activity.

Results

Decreased killing potential is associated to reduced LFA-1 activation in WAS CD8⁺ T cells

The mechanism underlying the reduced ability of CD8⁺ T cells from WAS patients to kill target cells (De Meester et al., 2010) has not been elucidated. We here reasoned that the role of WASP in stabilizing the synapse of CD4⁺ T cells (Calvez et al., 2011; Sims et al., 2007) might apply to CD8⁺ T cells and that such role would be mediated through LFA-1. The polyclonal CD8⁺ T cells expanded from WAS patients expressed normal levels of lytic molecules (**Fig S1A-C**), but as expected failed to express WASP (**Fig 1A** and **Fig S1D**). The ability of WAS CTL to rapidly eliminate P815 target cells, as well as to sustain prolonged killing activity was reduced (**Fig 1B** and **Fig S1E**). We then tested whether WASP might regulate CTL cytotoxicity via LFA-1, by measuring the expression of total and open LFA-1 conformations by flow cytometry (Theorell et al., 2011). The CTL from the healthy donors and the WAS patients expressed basally comparable levels of total LFA-1 (**Fig 1C**). They expressed similar levels of LFA-1 under the open conformation when facing uncoated target cells. However, upon encounter with the anti-CD3 Ab-coated target cells, the WASP-deficient CTL displayed a reduced capacity to up-regulate active LFA-1 (**Fig 1D**). We then sought to explore whether this reduced LFA-1 activation would be mirrored by abnormal dynamics of CTL to target cell contacts in the context of killing. Real-time imaging of CTL and anti-CD3 Ab coated target cell mixtures shows that although WASP-deficient CTL were highly motile and able to encounter target cells, killing efficiency was reduced as compared to that of control CTL (**Fig 1E** and **Movie 1-2**). The reduced ability of WAS CTL to kill targets over time (**Fig 1F**) was explained by an increased delay between initial contact and lethal hit delivery (**Fig 1G**). Together, these results strongly suggest that the reduced efficiency of WAS CTL to eliminate target cells is linked to reduced LFA-1 activation leading to a delayed lethal hit delivery.

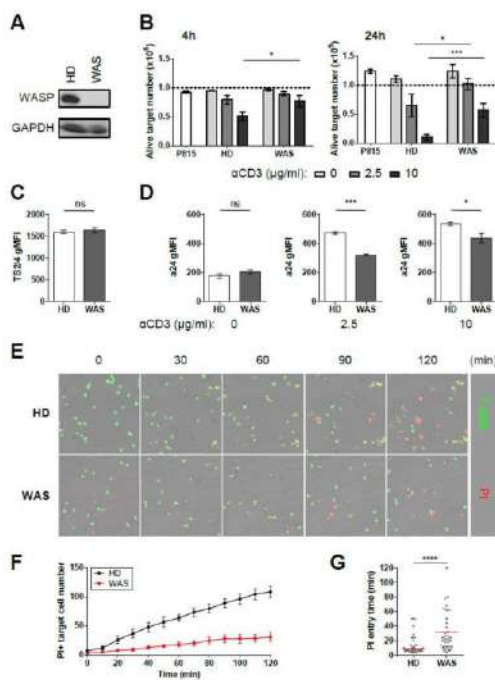


Figure 1. Defective killing by WASP-deficient CD8⁺ T cells is associated with reduced LFA-1 activation.

(A) Western blot analysis of WASP expression in CTL from a healthy donor (HD) and a WAS patient (WAS). (B) Number of residual alive target cells after 4 and 24 hours of a redirected killing assay at a 2:1 E:T ratio against P815 cells pre-coated with the indicated concentrations of anti-CD3 Ab. Dotted bars represent the reference number of target cells (mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments). (C) Total LFA-1 expression (TS2/4 Ab) in primary CTL from 4 HD and 3 WAS patients. (D) CTL were co-incubated during 60 minutes with P815 cells and analyzed for expression of high-affinity LFA-1 (a24 Ab). (E) Anti-CD3 Ab pre-coated target cells were seeded in the presence of HD or WAS CTL (green) at a 2:1 E:T ratio. PI (red) was used to track lethal hit delivery. Scale bar is set to 100 μ m. (F) Number of PI-positive target cells along time. (G) Time delay between the contact of target cells with a CTL and PI entry. 34 conjugates were analyzed for both HD and WAS CTL. Statistical significances were obtained with two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-tests. ns $P > 0.05$; * $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. See also Figure S1, Movie 1 and Movie 2.

Actin cytoskeleton dynamics is associated to non-radial spreading in WAS CD8⁺ T cells

Although WASP-deficiency has been reported to distort synapse morphology in primary human T cells (Calvez et al., 2011), its effect on actin dynamics at the immunological synapse remains to be characterized. For this purpose, we used the cell-permeant SiR-actin dye (Lukinavicius et al., 2014) to record F-actin dynamics by TIRFM, which allows to focus on the cell portion that lays at the immediate contact with the ICAM-1/anti-CD3 coated surface. As shown in a representative healthy donor CD8⁺ T cell, spreading occurred within 2 to 3 min and was characterized by a surrounding lamellipodium, shown in the transmitted images (Fig S2A) and a dense actin meshwork (Fig 2A). This network was not uniform since areas of reduced actin density were present towards the center of the synapse, while small actin patches were distributed all over the contact surface. Although the F-actin meshwork was highly dynamical at the synaptic plane the cell shape did not evolve beyond 3 min. In contrast, the WAS CTL displayed a reduced spreading area and lobular morphology, characterized by nascent lamellipodia on different sides of the cell (Fig S2B). The

WAS cell displayed a variable actin density along the considered observation time. Intermittently, areas of high intensity fluorescence were observed in the middle of the synapse, out of which actin cables appeared to emerge (Fig 2B). The time course of the aspect ratio (AR) indicated that HD cells rapidly assembled a circular synapse with an AR value evolving from 1.6 to 1 during the first minute (Fig 2C). However WAS CTL were unable to spread radially as confirmed by AR variations ranging from 1.5 to 1.8 along the acquisition. The mean AR of 9 HD and 19 WAS cells confirmed the non-circular morphology of WAS T cell synapses (Fig 2D).

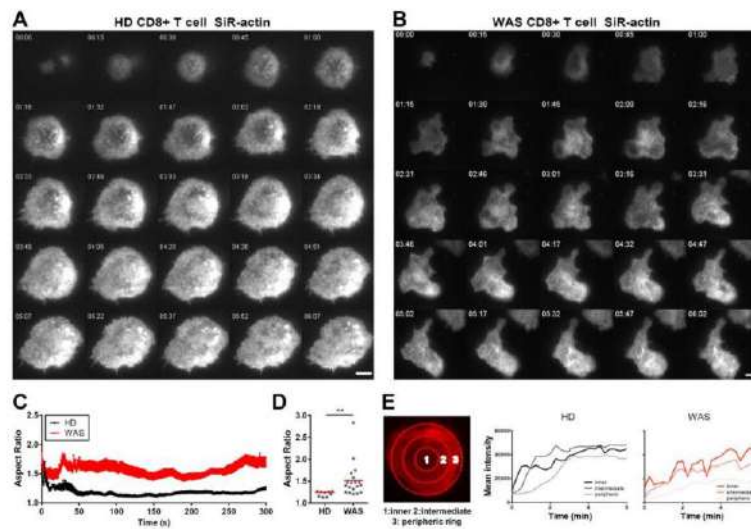


Figure 2. Abnormal synapse shape and F-actin dynamics in WAS CD8⁺ T cells.

(A) TIRFM imaging of F-actin dynamics at the contact of a representative healthy donor (HD) CTL adhering to an ICAM-1/anti-CD3 coated surface. Scale bar is set to 5 μ m. (B) TIRFM imaging of a representative WAS patient CTL as described in A. (C) Time course of the aspect ratio measured for 6 HD and 6 WAS CD8⁺ T cells adhering to an ICAM-1/anti-CD3 coated surface. (D) Mean aspect ratio of the cells analyzed in (C). (E) SiR-actin intensity was measured along the time in the 3 indicated concentric circles. This approach was applied to the representative cells displayed in (A) and (B). Statistical significances were obtained with a two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-test. ** 0.001 < P < 0.01. See also Figure S2.

To then assess F-actin dynamics during the initial phase of cell spreading, SiR-actin fluorescence intensity was quantified in concentric circles centered on the cell centroid (Fig 2E). In control T cells, F-actin intensity increased sharply over the first 2 min of contact at the center of the synapse and then in the intermediate and peripheral rings, indicating concomitant F-actin polymerization and spreading (Fig 2E and Fig S2C). After 2 min, the intensity of F-actin stabilized with the highest

intensity being measured at the intermediate ring. In contrast, WAS T cells failed to show this biphasic behavior and displayed a more progressive increase in SiR-actin staining over the 6 min observation period. Furthermore, WAS T cells displayed relatively more polymerized actin at the synapse center than at the intermediate ring and the central F-actin pool displayed high intensity fluctuations. In conclusion, the TIRFM study of F-actin dynamics in WAS CTL reveals a major defect in actin meshwork organization combined with the inability to spread radially and to establish a stable synapse.

Biased distribution of LFA-1 clusters in WAS T cells

We implemented a SIM approach to precisely locate active LFA-1 at the CTL synapse and elucidate how it interacts with the actin cytoskeleton meshwork. We also applied this approach to WAS CTL to understand which precise actin cytoskeleton aberrations might explain the LFA-1 activation defects identified in these cells. The normal CTL depicted in **Fig 3A** displayed an extended synaptic spreading with F-actin being enriched both at the periphery, as a thin lamellipodium, and within patches located towards the inner parts of the synapse. Active LFA-1 distributed as very distinct clusters organized into a belt-like structure lying inwards to the external F-actin area. Active LFA-1 clusters appeared to be positioned in the interstices of the actin cytoskeleton meshwork. This applied to both the actin-rich area corresponding to the LFA-1 ring and to the actin poor areas towards the synapse center (**Fig 3A**, zooms on the right panels). Sections along the z axis showed that the inner part of LFA-1 clusters localized to thin interstices of reduced F-actin density (**Fig 3A**, central lower panels), suggesting that LFA-1 nanoclusters are confined into the alveoli of the actin cytoskeleton meshwork. Parallel examination of a WAS CTL (**Fig 3B**) revealed that it spread over a reduced area. Although a very rich actin cytoskeleton meshwork composed of highly branched and spiky structures had assembled at the WAS T cell periphery, the synapse center was almost devoid of detectable actin structures. In this cell, active LFA-1 could be detected but they failed to assemble into a belt. At the ultrastructure level, the most external LFA-1 clusters were positioned in the interstices of the very dense actin cytoskeleton meshwork, while LFA-1 clusters localizing towards the synapse center appeared to not be connected to actin filaments and to distribute less evenly than in the control cell (**Fig 3B**, zooms on the right panels). Sections along the z axis of the WAS CTL confirmed both the asymmetry of the LFA-1 ring and the biased distribution of LFA-1 clusters in relationship with the actin meshwork (**Fig 3B**, central

lower panels). The partial decorrelation of active LFA-1 clusters from the areas of enriched actin density and the asymmetry of the WAS CTL was highlighted by an analysis of LFA-1 and F-actin intensity profiles within cell quadrants. In control cells, active LFA-1 was highly enriched at 8 μm from the cell center with a slight inner shift as compared to the peripheral F-actin rich area (**Fig 3C**).

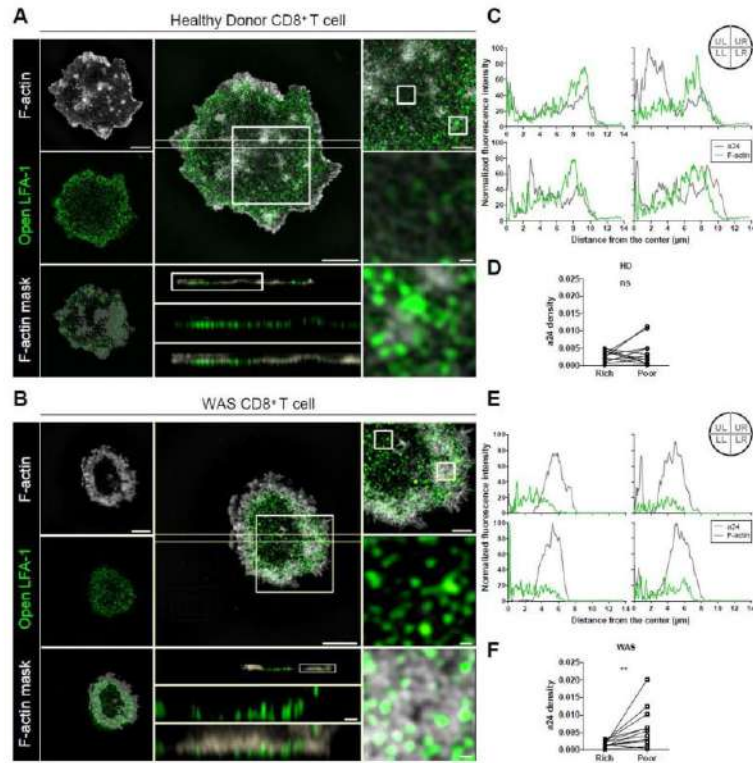


Figure 3. Open-conformation LFA-1 distributes as nanoclusters into actin meshwork interstices.

(A) Basal section of SIM imaging of a representative cell from a healthy donor (HD) adhering to ICAM-1/anti-CD3 coated surface for 10 min prior to fixation. In middle panels, an overlay of the two colors (xy) is represented with orthogonal views (xz). Right panels represent different zooms. Scale bars are set to 5, 2, 1 and 0.2 μm for whole cell images, intermediary zoom, orthogonal views and zoomed insets, respectively. (B) Basal section of SIM imaging of a representative cell from a WAS patient as described in A. (C) 90°-radial profile angle of open LFA-1 and F-actin, from the center to the periphery, of the HD CTL. Intensities were normalized based on the maximum intensity. (D) Open LFA-1 cluster density in ("rich") or out ("poor") the F-actin mask for HD CTL, n=12 cells. (E) 90°-radial profile angle of open LFA-1 and F-actin, like in (C) for the WAS CTL. (F) Open LFA-1 density in the "rich" F-actin versus "poor" F-actin area for WAS CTL, n=12 cells. Statistical significances were obtained with a two-tailed Wilcoxon paired test. ns $P > 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$.

In those cells, LFA-1 distributed evenly among the areas enriched in F-actin (IN) those devoid of F-actin (OUT) (see Methods) (**Fig 3D**). This distribution is probably attributable to the fact that although LFA-1 clusters are enriched in the inner side of the actin-rich lamellipodium, they locate in the interstices of the actin meshwork. In contrast to the control cells, the WAS CTL failed to display active LFA-1 peripheral enrichment (**Fig 3E**). The analysis of LFA-1 distribution according to F-actin intensity confirmed the biased distribution of the LFA-1 clusters towards areas devoid of detectable F-actin in the WAS CTL (**Fig 3F**). Together, our data provide the first characterization of the nanoscale topography of LFA-1 at the immunological synapse. They reveal that active LFA-1 distributes into hundreds of nanoclusters embedded into the actin cytoskeleton meshwork. They further indicate that the WASP-dependent actin meshwork organization is required to maintain a synaptic belt of active LFA-1 nanoclusters.

WASP controls LFA-1 organization and activation at the cellular and nanometric scales

Beyond the abnormal LFA-1 nanocluster distribution characterized in the WAS CTL by SIM, we sought to apply dSTORM to quantify whether the reduced LFA-1 activation in WAS CTL might be related to a reduced number or density of individual LFA-1 clusters. As observed above by TIRFM and SIM, WAS CD8⁺ T cells were able to spread, although in a less radial manner than control T cells (**Fig 4A-B**, left panels). In particular, the typical ring of active LFA-1 clusters was disrupted in numerous WAS CTL and those clusters appeared to distribute more centrally (**Fig 4A-B** and **Fig S3A-B**). At the nanometric scale, active LFA-1 in control CTL appeared to distribute almost exclusively into dense clusters (**Fig 4A**, second row of panels), in agreement with the SIM observations. This was confirmed by the DBSCAN analysis (Ester et al., 1996) on two representative ROI within the LFA-1 ring (**Fig 4A**, third row of panels). In WAS CTL, although active LFA-1 assembled into clusters, the compactness and distribution of those clusters appeared to be affected (**Fig 4B**, second row of panels). Indeed, the DBSCAN analysis on two representative ROI within the preserved section of the LFA-1 ring shows that active LFA-1 clusters in WAS CTL were less dense and less clearly delineated than those in control CTL (**Fig 4B**, third row of panels). Independently from its organization into clusters, the intensity of LFA-1 was measured along the LFA-1 ring. The WAS CTL harbored regions of poor to undetectable LFA-1 intensity (**Fig 4C**), highlighting the fact that it did not assemble a complete ring. To further characterize the LFA-1

activation defect associated to WASP deficiency, a number of cluster parameters were analyzed in representative ROI of the cluster ring. Although the distribution of the areas of active LFA-1 clusters was comparable in WAS and control CTL (**Fig 4D**), both the surface density of active LFA-1 cluster (**Fig 4E**) as well as their localization point density (**Fig 4F**) were reduced in the WAS T cells. In addition, the proportion of localization points belonging to clusters was significantly reduced in the WAS T cells as compared to the control T cells (**Fig 4G**). A further analysis applied to representative cells confirmed the reduction of cluster density at the synaptic belt in WAS T cells (**Fig S3C-E**). Together these data indicate that the reduced ability of WASP deficient $CD8^+$ T cells to activate LFA-1 corresponds, at the cellular scale, to an incomplete assembly or stabilization of the LFA-1 ring and, at the nanometric scale, to reduced numbers of active cluster and reduced LFA-1 molecule density within those clusters.

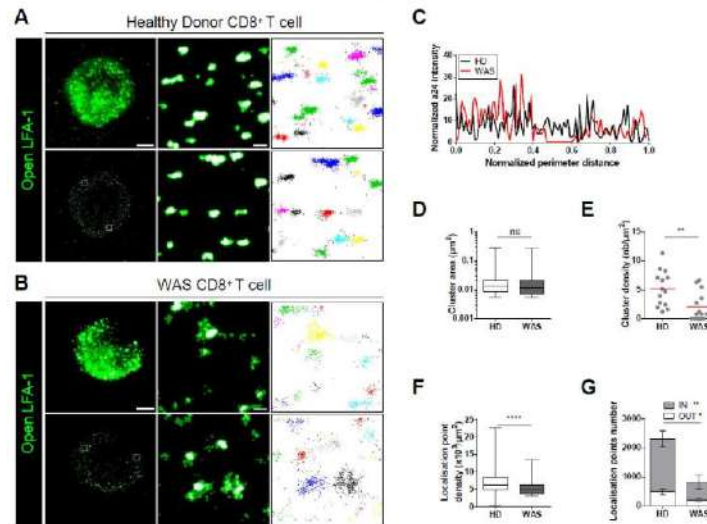


Figure 4. LFA-1 nanoclusters are relaxed and hypodense in WASP-deficient $CD8^+$ T cells.

(A) Open-conformation LFA-1 staining in a representative healthy donor (HD) CTL spreading on ICAM-1/anti- $CD3$ Ab for 10 min prior to fixation. From left to right, TIRFM image and dSTORM reconstruction, then 2 ROIs with the corresponding DBSCAN detection of clusters. Scale bars: 5 μm (whole cell) and 0.2 μm (ROI). (B) Open-conformation LFA-1 staining (a24 Ab) in a representative WAS patient CTL as described in A. (C) Open-conformation LFA-1 intensity profile along the LFA-1 ring. Intensities and distances were normalized based on the respective maximum values for each cell. (D) Open LFA-1 cluster area distribution within 2 ROI per cell in control versus WAS CTL. (E) Surface density of open LFA-1 clusters within 2 ROIs per cell in control versus WAS CTL. Mean is represented in red. (F) Localization point density within 2 ROIs per cell in control versus WAS CTL. (G) Number of localization points detected as part of clusters (IN) or out of the clusters (OUT), within 2 ROIs per cell, in control versus WAS CTL. N=7 cells for both HD and WAS CTL were analyzed with 2 ROIs per cell. Statistical significances

were obtained with two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-tests. ns $P > 0.05$; * $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; **** $P < 0.0001$. See also Figure S3.

WASP-dependent LFA-1 cluster belt structure is required to confine lytic granules

By controlling the integrity of the LFA-1 cluster belt, WASP might be required for the correct positioning of lytic granules. We therefore inspected CTL by a 3D-SIM analysis restricted to a thickness of 550 nm from the cell surface in order to focus on the lytic granules that were the most proximal to the synaptic area. In control CTL, lytic granule localized towards the inner layer of the high-affinity LFA-1 ring, at the edge of the actin rich area (**Fig S4A-B**). They were detected at a close vicinity to active LFA-1 clusters in interstices of the actin cytoskeleton meshwork suggesting that active LFA-1 clusters might control lytic granule docking at local sites of tight adhesion with the target cell. This approach was then applied to 11 control CTL and 12 WAS CTL. While the control CTL adopted a synapse morphology characterized by a radial spreading, an outer ring of F-actin and an inner ring of high-affinity LFA-1, the WAS CTL displayed either radial synapse, distorted synapse or elongated synapse (kinapse) morphologies (**Fig 5A**). This is in agreement with our live microscopy data and previous reports on WASP-deficient CD4⁺ T cells (Calvez et al., 2011; Lafouresse et al., 2012; Sims et al., 2007). The compilation of the control cells (see Methods) yielded a very clear topological picture composed by a thick peripheral ring of actin meshwork, followed by a partially overlapping belt of active LFA-1 clusters and by lytic granules dispersed within the confinement of the LFA-1 cluster belt (**Fig 5B**). Taking into account the morphological heterogeneity of WAS CTL, images were compiled separately, according to the 3 identified morphological categories (**Fig 5A**). WAS CTL forming synapses displayed a radial polarity similar to that observed in control cells, with correct confinement of the lytic granules within the LFA-1 cluster belt (**Fig 5B**). Differently, the cells with distorted synapses failed to reveal a clear radial organization and the lytic granules localized over the contact planes without any apparent localization bias. The cells forming a kinapse revealed a clear longitudinal polarization, with a wide actin-rich edge, a central LFA-1-rich area and dispersed lytic granules. To assess the lytic granule confinement function of the active LFA-1 cluster belt, the positions of individual perforin dots were overlaid on the LFA-1 mask and their distances to the edge of the LFA-1 masks were calculated (**Fig 5C-D**). In the cells assembling a radial LFA-1 cluster belt, most detected perforin dots were positioned on the LFA-1 cluster belt, at a mean distance of 3 μm from the outer edge of this belt (**Fig 5D**). In WASP-deficient T cells adopting distorted synapse or kinapse morphologies,

an increased proportion of perforin dots were positioned away from the LFA-1 belt (**Fig 5C**) or very close to its outer edge (**Fig 5D**). The comparison of the WAS-related morphologies is suggestive of an interplay between actin cytoskeleton organization, LFA-1 cluster distribution and lytic granule polarization.

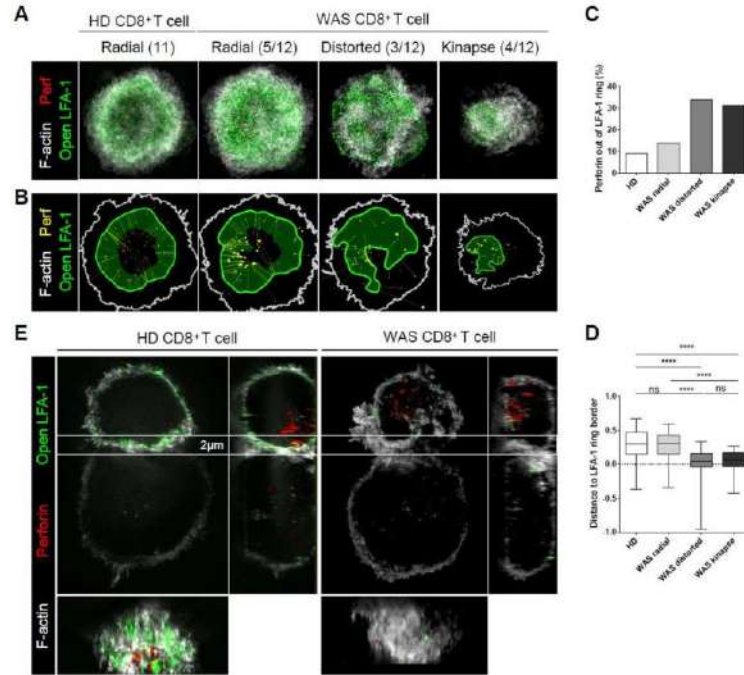


Figure 5. Defects of LFA-1 cluster belt assembly and lytic granule positioning in WASP-deficient CD8⁺ T cells.

(A) Compilation of SIM images of HD and WAS CTL spreading on ICAM-1/anti-CD3 Ab for 10 min prior to fixation. WAS CTL were split into “radial”, “distorted” and “kinapse” categories, according to morphological parameters. (B) Open LFA-1 mask corresponding to images shown in A, overlaid with a distance map of individual perforin dots to the outer border of LFA-1 mask and the outline of the F-actin. (C) Percentage of perforin dots detected outside of LFA-1 mask outer border. (D) Distance of all perforin dots to LFA-1 mask outer border reported to the radius distance of the corresponding compiled cell. (E) SIM imaging of a representative control and a WAS CTL in contact with a target cell pre-coated with anti-CD3 Ab. Bottom panels represent the synaptic area in contact with the target cell. Statistical significances were obtained with two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-test. ns $P > 0.05$; * $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; **** $P < 0.0001$. See also Figure S4.

We next aimed at examining by 3D-SIM the assembly of the LFA-1 cluster belt and lytic granule positioning using anti-CD3 mAb coated P815 cells. Control CTL forming a synapse with target cells displayed a flattened contact area enriched in F-actin (**Fig 5E**). The en-face view is in line

with our observations on stimulatory surfaces. It shows a ring of active LFA-1 lying inwards from the F-actin rich area and the docking of lytic granules within the inner confines of the high-affinity LFA-1 ring. Although WAS CTL formed conjugates with the anti-CD3 mAb coated P815 cells, their morphology displayed notable aberrations (**Fig 5E**), including the presence of lateral F-actin-rich protrusions and a non-symmetrical morphology. In the selected cell, active LFA-1 clusters were reduced in numbers and failed to form a ring. The few lytic granules detected in the synapse plane displayed a very peripheral distribution. Together, these observations confirm the role of WASP in assembling the high-affinity LFA-1 cluster belt at the CTL synapse. The WASP-deficiency model further suggests that the LFA-1 cluster belt controls the confined delivery of lytic granules and that non-optimal LFA-1 activation and organization at the synapse may reduce CTL cytotoxic activity.

Relationship between LFA-1 activation level and cytotoxic activity

To further explore the link between the LFA1 activation, nanocluster belt organization and cytotoxic activity independently from WASP, we sought to lower LFA-1 activation in normal cells by diluting the concentration of anti-CD3 mAb, which is expected to reduce the strength of the inside-out signaling (Mueller et al., 2004). Indeed, the use of different doses of 0.1 to 10 µg/ml anti-CD3 mAb to coat target cells resulted in a gradual increase of high-affinity LFA-1 on the surface of the CTL (**Fig 6A**). In particular, the concentration of 1 µg/ml anti-CD3 mAb was found to lead to an intermediate level of LFA-1 activation comparable to that reached by WAS T cells stimulated with the 10 µg/ml anti-CD3 mAb concentration.

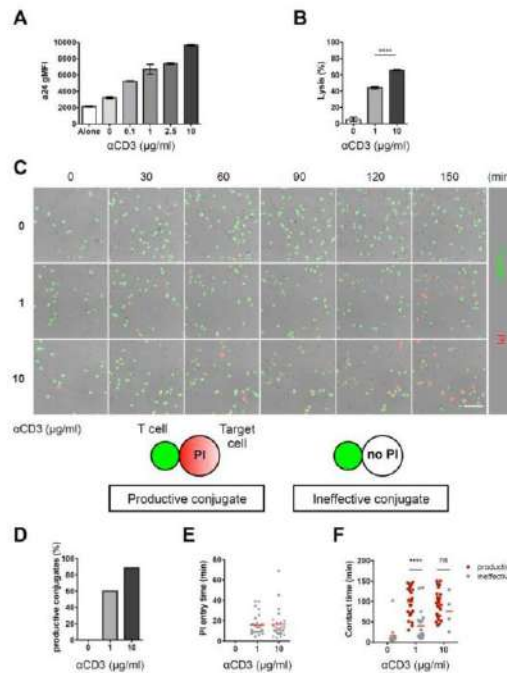


Figure 6. Sub-optimal TCR stimulation of normal CTL leads to reduced LFA-1 activation and killing efficiency

(A) LFA-1 activation measured by flow cytometry with the a24 Ab after 30 min interaction of HD cells with P815 cells pre-coated with the indicated anti-CD3 mAb concentrations. $n=3$ experiments, mean $\pm$ SEM. (B) Number of residual alive target cells after 4 hours of a redirected killing assay at a 2:1 E:T ratio against P815 cells pre-coated with 1 or 10 μ g/ml anti-CD3 mAb. (C) Target cells (coated with 0, 1 or 10 μ g/ml anti-CD3 mAb) were seeded in the presence of HD CTL (green) at a 2:1 E:T ratio. PI (red) was used to track lethal hit delivery. Scale bar is set to 100 μ m. (D) Proportion of productive CTL to target cell conjugates, based on the detection of PI within the observation time window of 150 min. (E) Within productive conjugates, time delay between initial CTL to target cell contact and PI entry. (F) Contact time between CTL and target cells, distinguishing productive conjugates from ineffective conjugates. Statistical significances were obtained with two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-test. ns $P>0.05$; * $0.01<P<0.05$; ** $0.001<P<0.01$; *** $P<0.0001$.

Sub-optimal activation of LFA-1 in control CTL was associated with a reduction in their killing activity (Fig 6B), therefore reinforcing the link between LFA-1 activation and killing activity. At the nanometric scale, active LFA-1 in control CTL stimulated with 1 μ g/ml anti-CD3 mAb distributed into dense and well-delineated clusters, as shown by the DBSCAN analysis on two representative ROI within the LFA-1 ring (Fig S6A). The main parameter that distinguished LFA-1 nanoclusters upon stimulation with the 1 μ g/ml and 10 μ g/ml anti-CD3 mAb concentrations was their surface (Fig S6B and Fig 4E), indicating that suboptimal LFA-1 activation corresponds to the assembly of smaller clusters and suggesting a concentration-dependent increase of active LFA-1 cluster size. Of note, active LFA-1 nanoclusters distributed into a belt-like structure, independently from the anti-CD3 mAb concentrations used. We next investigated by video-microscopy by which mechanism suboptimal activation of LFA-1 in normal CTL might result in reduced killing activity (Fig 6C). At the high anti-CD3 mAb concentration, most CTL entering in contact with a target cell were able to kill it over the 150 min observation time (Fig 6D). While the lethal hit delivery was rapid (<20 min), CTL remained attached to the dying target cells for a prolonged time (approx. 50

min), as previously reported (Wiedemann et al., 2006). Differently, at the intermediate anti-CD3 Ab concentration, about one third of the CTL entering in contact with a target cell failed to kill it over the observation time, which matches the reduced killing activity observed. Interestingly, ineffective and productive CTL diverged in their attachment stability, as revealed by the interaction time with the target cells (respectively, 20 and 50 min). This analysis therefore shows that lowering TCR triggering in normal cells reduces LFA-1 activation and results in an increased proportion of cells that display reduced ability to form stable contacts with target cells. Our analysis is also supportive of a direct link between contact stability and onset of killing in individual CTL.

Discussion

In this study, we set to explore the precise topography of LFA-1 at the immunological synapse of WAS patient-derived CD8⁺ T cells. A unique combination of advanced microscopy modalities allowed us not only to identify a defect in LFA-1 activation, but also to produce fundamental knowledge about the interplay between actin cytoskeleton meshwork organization, LFA-1 activation and lytic granule docking.

Since the initial description of the immunological synapse, the distribution of LFA-1 as a peripheral ring has been a hallmark of this structure (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). It is however only recently that the conformational state of LFA-1 at the immunological synapse has been unraveled with the use of conformation-specific antibodies (Comrie et al., 2015). Still, the precise topography of LFA-1 remained to be established. In agreement with a previous report in Jurkat cells (Kaizuka et al., 2007), we observed by TIRFM that upon synapse assembly, primary human CD8⁺ T cells appear to aggregate LFA-1 into microdomains. However, the 2 super-resolution microscopy approaches used in our study highlight that the structures appearing as microdomains correspond to areas densely populated by well-individualized nanoclusters. The diameter of the LFA-1 clusters detected here in T lymphocytes is approximately 100 nm, which is comparable to that measured by TEM at the surface of monocytes (Cambi et al., 2006). We report that LFA-1 clusters in the open conformation were concentrated into a belt-like structure, in line with the LFA-1 ring described previously (Comrie et al., 2015; Kaizuka et al., 2007). High-affinity LFA-1 molecules are expected to bind tightly the actin cytoskeleton (Cairo et al., 2006) to permit a tensile force-driven activation mechanism (Nordenfelt et al., 2016). In line with such central role of the actin cytoskeleton in the control of LFA-1 activation and distribution, our radial analysis of LFA-1 and F-actin intensities showed that closed LFA-1 clusters overlapped with the peripheral actin ring, while open LFA-1 laid in the inner layer of peripheral actin ring. More unexpectedly however, our 2D analysis revealed that the LFA-1 clusters were positioned into the interstices of the outer layer of the actin cytoskeleton meshwork. Our 3D imaging approach further revealed that the innermost sections of the LFA-1 clusters stood on a deeper layer of the actin cytoskeleton. Our analysis therefore posits the question of how LFA-1 clusters are coupled to the actin cytoskeleton. We favor the hypothesis that the most superficial layer of the actin cytoskeleton might provide a physical meshwork to laterally constrain LFA-1 nanoclusters, while the underlying layer might provide a site for physical coupling and force transmission via Talin-1 and Kindlin-3 (Evans et al.,

2009).

In accordance with this hypothesis, deficiency of the actin regulator WASP was found to affect both the molecular density of individual active clusters as well as their number. Interestingly, WASP is also involved in the assembly of F-actin foci beneath TCR microclusters to facilitate PLC γ 1 activation and calcium flux (Kumari et al., 2015). This suggests that distinct F-actin microarchitectures are associated to TCR and LFA-1 nanoclusters to sustain their specific activation patterns. Indeed, the use of micropatterns has revealed different actin cytoskeleton dynamics associated to the TCR and LFA-1 (Tabdanov et al., 2015). Importantly, we identified here WASP as a key protein to control the assembly of the circular belt of high-affinity LFA-1 clusters at the CTL synapse, which allowed us to investigate the role of this structure in controlling the cytotoxic activity. Our data indicate that while WASP appears to regulate the confinement and activation of LFA-1 clusters at the nanometric scale, it also controls their distribution at the cellular scale. It is probable that defective confinement of the LFA-1 nanoclusters leads to the different distribution patterns observed in the WAS CTL. Given the role of WASP in transducing TCR signals (Kumari et al., 2015), the LFA-1 defects associated with WASP deficiency reported here might originate from a lower TCR-evoked activation. We found that stimulation of normal CTL with an intermediate anti-CD3 mAb concentration led to reduced LFA-1 activation and killing efficiency. However, we failed to detect cells with a disrupted LFA-1 cluster belt and with central localization of clusters, as observed in numerous WAS CTL. At the nanometric scale, control CTL stimulated with 1 μ g/ml anti-CD3 Ab assembled smaller LFA-1, which compactness was however not affected as in the case of the WASP-deficient CTL. Together, these observations indicate that the WAS-related defect cannot be simply explained by a reduced LFA-1 activation. The perturbed morphology of the WAS CTL revealed here might result in a broad perturbation of the distribution of membrane receptor, beyond LFA-1. However, WASP deficiency does not appear to affect TCR microcluster distribution and dynamics (Kumari et al., 2015), nor the exclusion of CD45 from the synapse area (Calvez et al., 2011). Together, these observations suggest that WASP-controlled actin remodeling are particularly important for the control of LFA-1 distribution and activation.

Cytotoxic T cells assemble a LFA-1/talin ring junction through which lytic granules are secreted (Somersalo et al., 2004; Stinchcombe et al., 2001). Lytic granules have been shown to release their contents by fusing with an actin-depleted secretory domain located towards the synapse center (Ritter et al., 2015; Stinchcombe et al., 2001; Stinchcombe et al., 2006). An alternative model of

lytic granule secretion has recently been proposed, based on the observation that lytic granule secretion, visualized with a fluorescent probe, occurred in an intermediate domain of the synapse corresponding to the inner side of the F-actin ring (Basu et al., 2016). Interestingly, measurement of local mechanical forces with micropillars revealed that this domain is where the strongest forces are exerted. This model implies that lytic granules are secreted in synaptic areas containing the adhesive and cytoskeletal machinery required to transmit force. In support of this model, our experiments with healthy donor CTLs indicate that lytic granules would preferentially dock at the vicinity of high-affinity LFA-1 clusters in the inner side of the LFA-1 cluster belt associated to a relatively dense actin meshwork. In conjunction with this mechanism, local actin meshwork relaxation might be required for lytic granule exocytosis as described in NK cells (Brown et al., 2011; Rak et al., 2011). Taken together, these observations suggest that lytic granules would be preferentially secreted in the inner side of the LFA-1 cluster belt providing optimal local forces to control both secretion and target cell interaction. We argue that the reduced lytic activity of WASP CTL is primarily due to a reduced LFA-1 activation and symmetry. Indeed, we previously reported that both conjugate formation and LAMP-1 exposure are not affected by WASP deficiency (Calvez et al., 2011; De Meester et al., 2010). Similarly, the reduction of CTL cytolytic activity induced by LFA-1 with Fab fragments was not associated to granule release inhibition, but to non-polarized delivery (Anikeeva et al., 2005). In a physiological setting, the ability to dissolve and reform the adhesion ring would be required for CTL to execute multiple killing. Accordingly, our data point to an amplification of the WASP-associated killing defect in long-term assays, in which multiple killing is favored (Vasconcelos et al., 2015). Beyond the WASP-deficiency model, our study indicates that there is a direct link between LFA-1 activation and killing efficiency. Indeed, stimulation of CTL with an intermediate anti-CD3 mAb concentration leading to reduced LFA-1 activation is associated with a lower killing activity. This is explained by the increased frequency of individual CTL, which establish poorly stable contacts with target cells and fail to kill. Together, our data on the WASP-deficiency CTL model and the suboptimal activation of normal CTL suggest that both quantitative and qualitative aspects of LFA-1 activation at the nanoscale contribute to the tuning of killing efficacy.

In conclusion, our study provides the first characterization of LFA-1 nanoscale topography at the human T cell synapse. It provides insight into the activation of LFA-1 at the nanoscale and into its

interaction with the underlying actin cytoskeleton meshwork. It further identifies WASP as a key protein to control the LFA-1 cluster belt that confines lytic granule secretion.

Experimental procedures

Patients and cells

Blood samples from WAS patients and healthy donors were obtained following standard ethical procedures (Helsinki protocol) and as per French Bioethics law and with the approval of the local ethics committee. PBMC were isolated by density gradient centrifugation over a Ficoll gradient (PAA). CD8⁺ T cells were isolated by negative selection according to the manufacturer's instructions (Stem Cell). T cells were cultured in RPMI 1640 glutamax (Gibco) supplemented with 5% human serum (PAA) and stimulated every 2 weeks with irradiated PBMC and EBV-transformed JY cells in the presence of 1 µg/ml PHA, 100 IU/ml rhIL-2 and 5 ng/ml rhIL-15. WAS CTL were derived from the W2 patient described previously (Trifari et al., 2006), as well as patients WAS1 (De Meester et al., 2010) and WAS4 (Marangoni et al., 2007). The lack of WASP expression in the patient-derived CD8⁺ T cells was confirmed by Western blotting as previously reported (Trifari et al., 2006). GFP-expressing P815 cells were generated by lentiviral transduction and cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS (PAA).

Flow cytometry

CTL were stained with anti-CD8-FITC mAb and anti-CD4-PE mAb for 20 min at 4°C, Fixed with 3% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized with PBS 3% BSA 0.1% saponin. Intracellular staining of with anti-WASP 5A5 mAb was followed by PE-labeled secondary Ab. Granzyme B and perforin staining were performed with FITC-labeled mAb and AF647-labeled mAb (dG9). LFA-1 expression was revealed with mAb for total (TS2/4) or open conformations (a24). To measure LFA-1 activation, CTL were incubated with GFP-expressing target cells previously coated with anti-CD3 mAb (OKT3, eBioscience). Unlabeled a24 mAb was added at 2.5 µg/ml during a 1-hour incubation at 37°C. Cells were fixed with 3% PFA and the bound a24 mAb was revealed with AF647-labeled secondary Ab. Antibodies were purchased from BD Pharmingen. Data were acquired on the BD FACSCalibur cytometer and analyzed with FlowJo software.

Cytotoxic assays

For the flow cytometry-based assessment of CTL cytotoxic activity, GFP-expressing P815 target cells and CTL were prepared as described for LFA-1 activation. Cells were pelleted for 1 min at 1500 rpm and incubated at 37°C/5%CO₂ from 4 to 24 h. Aphidicolin (Sigma) was used at 0.1 µg/ml

during the duration of the assay to block target cell proliferation. Residual alive target cell acquisition and quantification were made as described previously (Vasconcelos et al., 2015). All data were acquired on a BD FACSCalibur cytometer and analyzed using FlowJo software.

For the microscopy-based assessment of CTL cytotoxic activity, 8-well IBIDI chambers were coated with 10 µg/ml of fibronectin (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C/5% CO₂. CTL were pre-stained with CellTracker green CMFDA dye (Invitrogen) for 30 min at 37°C/5% CO₂ and then transferred to an IBIDI chamber together with P815 cells pre-coated with anti-CD3 mAb as described for LFA-1 activation. A 200 µM concentration of PI was added in the medium and present during the acquisition on a Leica SP8 confocal microscope equipped with a chamber set at 37°C/5% CO₂.

TIRFM

1.5-glass of 8-well chamber Labteck were coated overnight with both recombinant ICAM-1/Fc chimera (4 µg/ml) (R&D Systems, USA) and anti-CD3 mAb (10 µg/ml) at 4°C. Cells were stained with 2 µM of SiR-actin for 1 h at 37°C before transferring onto Labteck. Acquisitions were performed by TIRFM illumination integrated within an iLas2 system (Roper, France) incorporated within an inverted motorized microscope (Nikon Ti, Japan) equipped with a Plan-Apo 100x 1.45NA objective and a perfect focus system. Live samples were imaged at 37°C with 5% CO₂. Images were acquired at 1.26-1.29 sec per frame for 10 min using Metamorph software (Molecular Devices, USA). The emitted photons were collected with a 512x512 EM-CCD camera (Evolve, Photometrics, USA).

dSTORM

1.5H circular coverslips were coated overnight with recombinant ICAM-1/Fc chimera and anti-CD3 mAb at 4°C. AF647-labeled a24 mAb was added to CTL during their attachment to the coverslips. After 10 min at 37°C, cells were fixed with 4% PFA. Acquisition was performed by TIRFM illumination on the system described above. Images were acquired at RT in a solution containing Cysteamine (Sigma, USA) and glucose oxidase (Sigma, USA) as oxygen scavenger. The AF647 fluorescence was converted into a dark state using a 640 nm laser. Upon obtaining the adequate density of blinking events per frame, 20,000 frames were acquired at 50-100 Hz. Images were reconstructed online using the WaveTracer module (Kechkar et al., 2013) integrated into Metamorph (20 nm pixel size). The minimal surface of a LFA-1 cluster was set as twice the mean

surface of the events detected outside the cells resulting in a value of $0.0055 \mu\text{m}^2$. On that basis, we used the DBSCAN algorithm to identify clusters in zoomed insets measuring $1.6 \mu\text{m} \times 1.6 \mu\text{m}$. The cluster detection was set as a minimum of 3 points within a radius of 20–40 nm (epsilon). Shape and area were extracted with ggplot2 and factoextra in R software. We wrote a C++ algorithm to determine the size of clusters in nm. Whole-cell cluster counts were measured using ImageJ with an intensity-based threshold. The ImageJ particle detection approach was validated by comparison to DBSCAN in test ROIs.

SIM

The staining procedure was comparable to that used for dSTORM with the following combination: AF568-labeled a24 mAb, phalloidin-AF647 and where indicated, anti-perforin mAb revealed with a AF488-labeled secondary Ab. For conjugates, CTL and P815 cells were seeded in U-bottom 96-well with AF-568-labeled a24 mAb then were transferred onto Poly-L-Lysine coated 1.5H-coverslips for 10 min at 37°C. Fixation and permeabilization were executed as before and F-actin and perforin were stained by phalloidin-AF488 and AF647-labeled anti-perforin mAbs for 1 h at RT. Coverslips were mounted in Vectashield H-1000 (Vector lab, USA). 3D-SIM images were acquired with a Zeiss ELYRA PS1 SR-SIM equipped with a Plan-Apo 63x/1.40NA oil DIC immersion objective using a sCMOS camera (Hamamatsu) and a 1.60x tube lens. A multicolor image was obtained with the 488 nm, 561 nm and 642 nm laser excitations, using respectively the 28 μm , 32 μm and 42 μm optical grids, which were rotated to three pre-aligned angles and translated to 5 positions per angle. The different channels were aligned using the PSF from multicolor beads. The lateral pixel size was 65 nm in the acquired images and 32 nm in the reconstructed images. The 3D-SIM images were reconstructed with the Zeiss ZEN software and further verified with SIMcheck (Image J, plugin). 3D-SIM images of 550-nm thickness were analyzed by ImageJ. Thresholds were performed on F-actin and a24 intensity to transform them into two masks, then number of a24 clusters in and out of the F-actin mask were extracted and reported to the surface area of the mask. Individual cells were normalized according to each cell area before compilation. LFA-1 ring mask was determined by a Gaussian blur and an intensity threshold. The closest distance of each perforin granule to the outer border of the ring was drawn manually and reported to the radius of the compiled cell.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad software. Statistical significance was determined by performing two-tailed non-parametric paired Mann-Whitney or unpaired Wilcoxon t tests. Graphs show mean values $\pm$ SEM. Resulting P values are indicated as follows: ns $P > 0.05$; * $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$.

Author contributions

R.H. performed the super-resolution microscopy experiments, analyzed the results and contributed to the manuscript preparation; D.G. performed the functional assays, analyzed the results and contributed to the manuscript preparation; J.R.-B. performed data analysis. Z.W. performed the initial characterization of LFA-1 activation at the CTL synapse; J.C., M.M. contributed to data analysis; N.D. contributed to data analysis and to manuscript editing. S.V. discussed data and ideas and edited the manuscript. S.A. contributed to the design of the study, supervised super-resolution microscopy experiments, analyzed data and contributed to the manuscript preparation; L.D. designed the research, supervised the experimental and analytical work and wrote the paper.

Acknowledgments

We wish to thank Astrid Canivet and Daniele Daviaud from the CPTP microscopy platform, as well as Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche and Anne-Laure Iscache from the CPTP cytometry platform. We are grateful for the support and advice of Frédérique Gaits-Iacovoni and Madjid Zanoun from the Cellular Imaging Facility Rangueil-I2MC/TRI platform. We wish to thank Nancy Hogg for generously providing the a24 antibody. We are grateful to Johannes Huppa, René Platzer, Jean-Baptiste Sibarita, Kaan Boztug, Sabina Müller, Liza Filali, Laurene Pfajfer, Yolla German, Marie-Pierre Puissegur, Fanny Lafouresse and Rana Mansour for technical advices and discussion. This work was supported by the Brazilian post-doctoral programs from CAPES (6486/10-0) and CNPq (237654/2012-1). This work also benefited from funding from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant EML2012090493), the Institut National du Cancer (Grant INCa 2012-054), the CNRS (Mission pour l'Interdisciplinarité, AAP Inter-Instituts) and the Agence Nationale de la Recherche (Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Conflicts of interest: none.

References

- Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T.N., Thomas, V.K., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 6437-6442.
- Basu, R., Whitlock, B.M., Husson, J., Le Floch, A., Jin, W., Oyler-Yaniv, A., Dotiwala, F., Giannone, G., Hivroz, C., Biais, N., *et al.* (2016). Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* *165*, 100-110.
- Baumgart, F., Arnold, A.M., Leskova, K., Staszek, K., Folser, M., Weghuber, J., Stockinger, H., and Schutz, G.J. (2016). Varying label density allows artifact-free analysis of membrane-protein nanoclusters. *Nat Methods* *13*, 661-664.
- Brown, A.C., Oddos, S., Dobbie, I.M., Alakoskela, J.M., Parton, R.M., Eissmann, P., Neil, M.A., Dunsby, C., French, P.M., Davis, I., *et al.* (2011). Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS biology* *9*, e1001152.
- Cairo, C.W., Mirchev, R., and Golan, D.E. (2006). Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* *25*, 297-308.
- Calvez, R., Lafouresse, F., De Meester, J., Galy, A., Valitutti, S., and Dupré, L. (2011). The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* *96*, 1415-1423.
- Cambi, A., Joosten, B., Koopman, M., de Lange, F., Beeren, I., Torensma, R., Fransen, J.A., Garcia-Parajo, M., van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G. (2006). Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity. *Molecular biology of the cell* *17*, 4270-4281.
- Comrie, W.A., Babich, A., and Burkhardt, J.K. (2015). F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *The Journal of cell biology* *208*, 475-491.
- Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kurzinger, K., and Springer, T.A. (1981). Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *78*, 4535-4539.

- De Meester, J., Calvez, R., Valitutti, S., and Dupre, L. (2010). The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *Journal of leukocyte biology* *88*, 1031-1040.
- Dupré, L., Aiuti, A., Trifari, S., Martino, S., Saracco, P., Bordignon, C., and Roncarolo, M.-G. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* *17*, 157-166.
- Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., and Xu, X. (1996). A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. *Knowledge, Discovery and Data Mining, Proceedings* *96*, 226-231.
- Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., and Hogg, N. (2009). Integrins in immunity. *J Cell Sci* *122*, 215-225.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* *285*, 221-227.
- Gustafsson, M.G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* *198*, 82-87.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl* *47*, 6172-6176.
- Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Varma, R., Dustin, M.L., and Vale, R.D. (2007). Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 20296-20301.
- Kechkar, A., Nair, D., Heilemann, M., Choquet, D., and Sibarita, J.B. (2013). Real-time analysis and visualization for single-molecule based super-resolution microscopy. *PLoS one* *8*, e62918.
- Kumari, S., Depoil, D., Martinelli, R., Judokusumo, E., Carmona, G., Gertler, F.B., Kam, L.C., Carman, C.V., Burkhardt, J.K., Irvine, D.J., *et al.* (2015). Actin foci facilitate activation of the phospholipase C-gamma in primary T lymphocytes via the WASP pathway. *eLife* *4*.
- Lafouresse, F., Cotta-de-Almeida, V., Malet-Engra, G., Galy, A., Valitutti, S., and Dupre, L. (2012). Wiskott-Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4+ T-cell

- motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* 137, 183-196.
- Lang, P.A., Shaabani, N., Borkens, S., Honke, N., Scheu, S., Booth, S., Brenner, D., Meryk, A., Barthuber, C., Recher, M., *et al.* (2013). Reduced type I interferon production by dendritic cells and weakened antiviral immunity in patients with Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131, 815-824.
- Lukinavicius, G., Reymond, L., D'Este, E., Masharina, A., Gottfert, F., Ta, H., Guther, A., Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., *et al.* (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods* 11, 731-733.
- Marangoni, F., Trifari, S., Scaramuzza, S., Panaroni, C., Martino, S., Notarangelo, L.D., Baz, Z., Metin, A., Cattaneo, F., Villa, A., *et al.* (2007). WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 204, 369-380.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Mueller, K.L., Daniels, M.A., Felthauer, A., Kao, C., Jameson, S.C., and Shimizu, Y. (2004). Cutting edge: LFA-1 integrin-dependent T cell adhesion is regulated by both ag specificity and sensitivity. *Journal of immunology* 173, 2222-2226.
- Murugesan, S., Hong, J., Yi, J., Li, D., Beach, J.R., Shao, L., Meinhardt, J., Madison, G., Wu, X., Betzig, E., *et al.* (2016). Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster movement at the immune synapse. *The Journal of cell biology* 215, 383-399.
- Nordenfelt, P., Elliott, H.L., and Springer, T.A. (2016). Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nature communications* 7, 13119.
- Rak, G.D., Mace, E.M., Banerjee, P.P., Svitkina, T., and Orange, J.S. (2011). Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS biology* 9, e1001151.
- Ritter, A.T., Asano, Y., Stinchcombe, J.C., Dieckmann, N.M., Chen, B.C., Gawden-Bone, C., van Engelenburg, S., Legant, W., Gao, L., Davidson, M.W., *et al.* (2015). Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity* 42, 864-876.

- Sims, T.N., Soos, T.J., Xenias, H.S., Dubin-Thaler, B., Hofman, J.M., Waite, J.C., Cameron, T.O., Thomas, V.K., Varma, R., Wiggins, C.H., *et al.* (2007). Opposing effects of PKC θ and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* 129, 773-785.
- Somersalo, K., Anikeeva, N., Sims, T.N., Thomas, V.K., Strong, R.K., Spies, T., Lebedeva, T., Sykulev, Y., and Dustin, M.L. (2004). Cytotoxic T lymphocytes form an antigen-independent ring junction. *The Journal of clinical investigation* 113, 49-57.
- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-761.
- Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462-465.
- Tabdanov, E., Gondarenko, S., Kumari, S., Liapis, A., Dustin, M.L., Sheetz, M.P., Kam, L.C., and Iskratsch, T. (2015). Micropatterning of TCR and LFA-1 ligands reveals complementary effects on cytoskeleton mechanics in T cells. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 7, 1272-1284.
- Theorell, J., Schlums, H., Chiang, S.C., Huang, T.Y., Tattermusch, A., Wood, S.M., and Bryceson, Y.T. (2011). Sensitive and viable quantification of inside-out signals for LFA-1 activation in human cytotoxic lymphocytes by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 366, 106-118.
- Trifari, S., Sitia, G., Aiuti, A., Scaramuzza, S., Marangoni, F., Guidotti, L.G., Martino, S., Saracco, P., Notarangelo, L.D., Roncarolo, M.G., *et al.* (2006). Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Journal of immunology* 177, 7451-7461.
- van de Linde, S., Loschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc* 6, 991-1009.
- Vasconcelos, Z., Muller, S., Guipouy, D., Yu, W., Christophe, C., Gadat, S., Valitutti, S., and Dupre, L. (2015). Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell reports* 11, 1474-1485.
- Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory

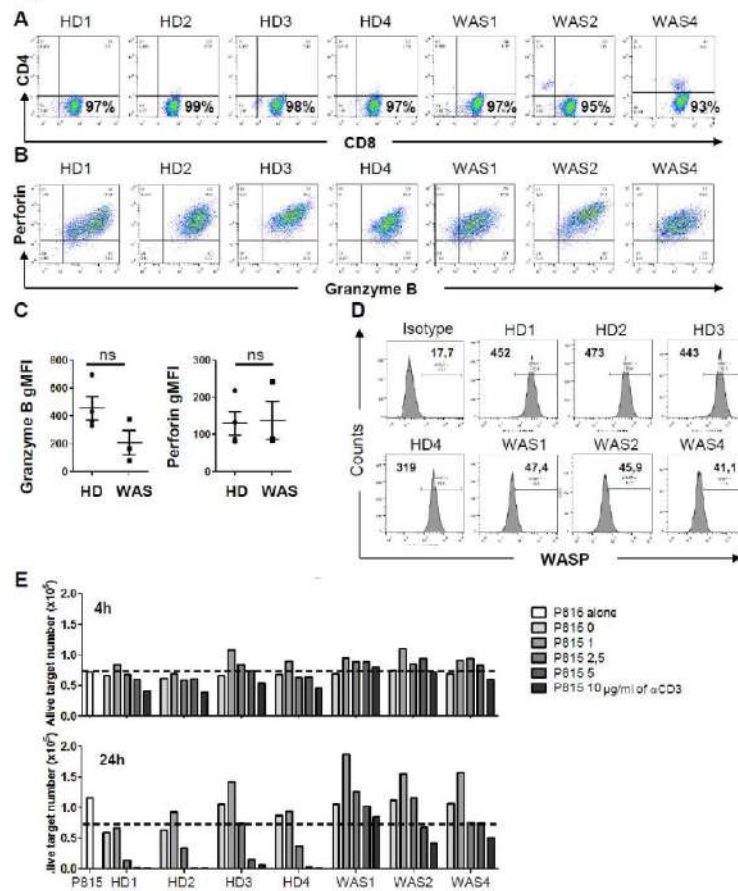
- synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10985-10990.
- Yi, J., Wu, X.S., Crites, T., and Hammer, J.A., 3rd (2012). Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Molecular biology of the cell* **23**, 834-852.
- Zhu, J., Luo, B.H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., and Springer, T.A. (2008). Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Molecular cell* **32**, 849-861.

The Wiskott-Aldrich syndrome protein controls the LFA-1 nanoclusters belt at the lytic synapse

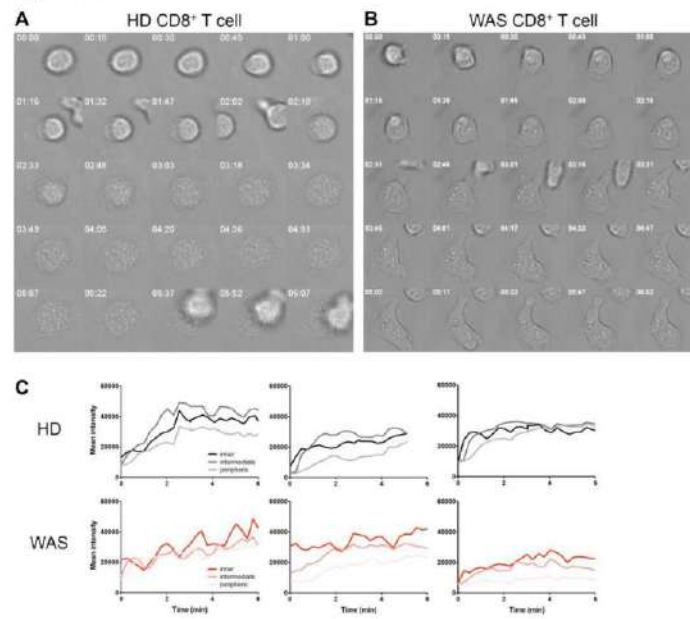
Supplemental section

Content:

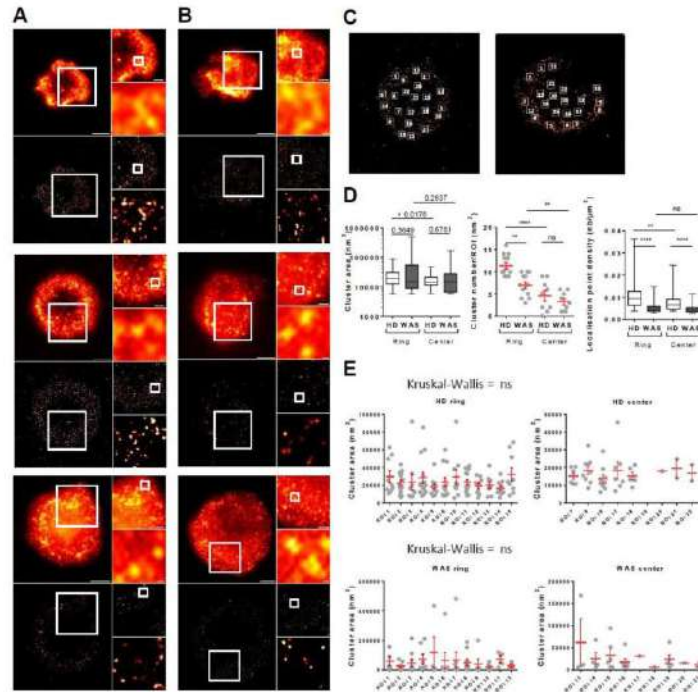
- supplemental figure legends (S1 to S6 and movies)

Figure S1**Figure S1. Phenotypic characterization of WASP-deficient CD8⁺ T cells**

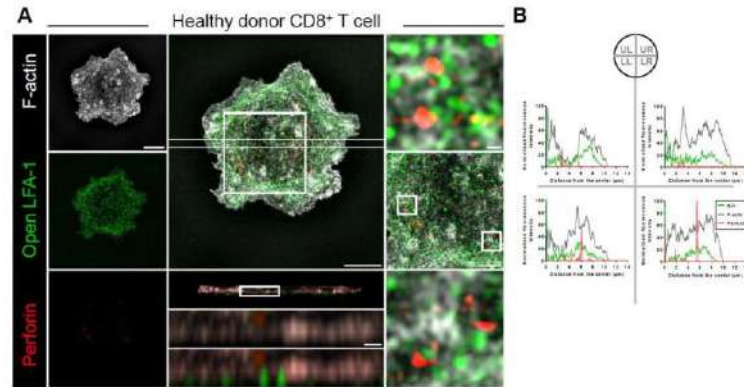
(A) Flow cytometry analysis of the surface markers CD4 and CD8 in untransformed CD8⁺ T cell lines generated from healthy donors (HD1 to 4) and WAS patients (WAS1, WAS2 and WAS4). WAS1 patient carries an exchange of nucleotides A>C at position 1509 leading to the deletion of the STOP codon of the WAS gene. WAS2 and WAS4 patients carry deletions (484-485del AG and 570del T respectively). (B) Flow cytometry analysis of the lytic molecules perforin and granzyme B. (C) The geomean fluorescence intensity of both lytic molecules was analyzed with a Mann-Whitney statistical test between all HD and all WAS CD8⁺ T cells. (D) Parallel analysis of WASP expression by flow cytometry. Bolded numbers indicate the geomean fluorescence intensity of WASP and light grey histograms correspond to the isotype control. (E) Flow cytometry measurement of the absolute number of residual alive target cells after 4 and 24 hours of a redirected killing assay at a 2:1 E:T ratio against P815 cells pre-coated with different doses of an anti-CD3 antibody. Dotted bars represent the reference number of target cells plated at the beginning of the assay.

Figure S2**Figure S2. Abnormal synapse shape in WAS CD8⁺ T cells**

(A) Transmitted light imaging of F-actin dynamics at the contact of a representative healthy donor (HD) CTL adhering to an ICAM-1/anti-CD3 coated surface. Scale bar is set to 5 μ m. (B) Transmitted light imaging of a representative WAS patient CTL as described in A.

Figure S3**Figure S3. LFA-1 activation abnormalities in WASP-deficient CD8⁺ T cells**

(A) TIRFM image of open LFA-1 in normal CTLs adhering to ICAM-1/anti-CD3 (top-panels) and dSTORM reconstruction of open LFA-1 in human primary CD8⁺ T cells (down-panels) of 3 representative cells. (B) Open LFA-1 in WASP-deficient CTLs, as described in A, of 3 representative cells. (C) 22 ROIs in dSTORM reconstruction images of open LFA-1 for normal (left) and WASP-deficient (right) CD8⁺ T cells. (Left) Numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, and 15 are on LFA-1 ring and numbers 7, 8, 16, 17, 18, 19, 20, 21 and 22 are in the center of LFA-1 ring. (Right) Numbers 1-12 are on LFA-1 ring and numbers 13-22 are in the center of LFA-1 ring. (D) Cluster area, number and localization point density in each open LFA-1 clusters for all ROIs shown in C (mean $\pm$ SEM is represented in red). Where indicated, statistical significances were obtained with two-tailed Mann-Whitney non-parametric t-tests. ns $P > 0.05$; * $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (E) Comparison of all ROIs by category. Statistical significances were obtained with an unpaired and non-parametric Kruskal-Wallis test.

Figure S4**Figure S4. Positioning of lytic granules in relationship with LFA-1 clusters and the actin cytoskeleton meshwork in WASP-deficient CD8⁺ T cells**

(A) SIM imaging showing the basal section (550 nm) of a representative control CTL (HD) adhering to ICAM-1/anti-CD3 coated surface. Left panels represent the F-actin, open LFA-1, and perforin. In the middle panels, an overlay of the three colors (xy) is represented with orthogonal views (xz). Right panels represent an intermediary zoom then two secondary zooms. Scale bars are set to 5, 2, 1 and 0.2 μm for whole cell images, intermediary zoom, orthogonal views and zoomed insets respectively. (B) 90°-radial profile angle of open LFA-1, F-actin and perforin, from the center to the periphery, of the control CTL shown in A. Intensities were normalized based on the maximum intensity of each color. (C) SIM imaging showing the basal section (550 nm) of a representative WAS CD8⁺ T cell adhering to ICAM-1/anti-CD3 coated surface. Panels are positioned as described in A. (D) 90°-radial profile angle of open LFA-1, F-actin and perforin, from the center to the periphery, of the WAS CD8⁺ T cell shown in B. Intensities were normalized based on the maximum intensity of each color.

Figure S5

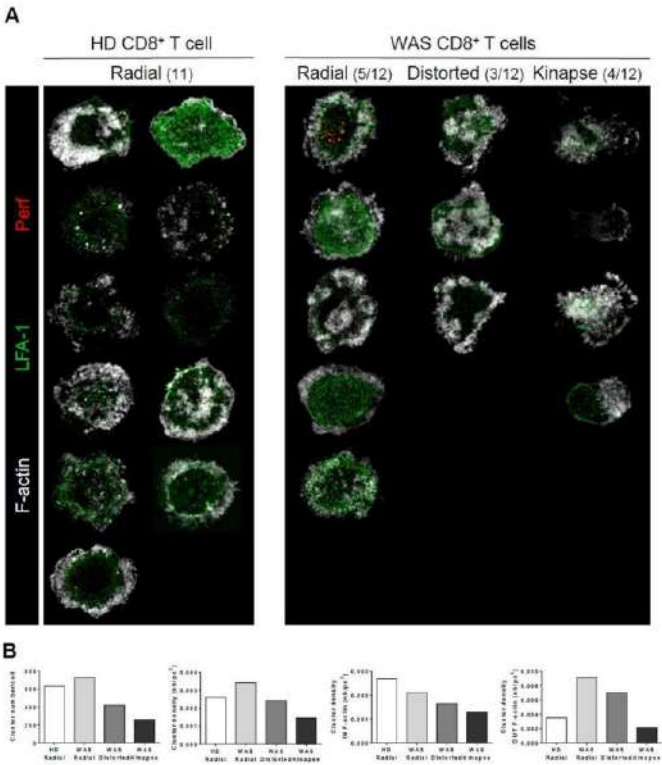
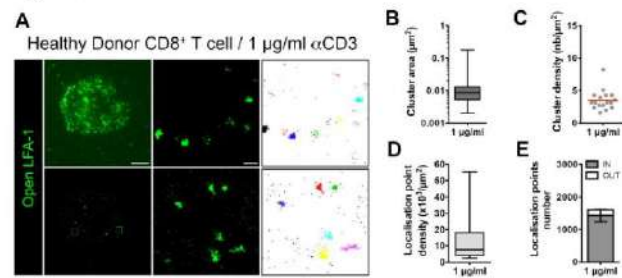


Figure S5. LFA-1 activation according to morphological types in WAS CD8⁺ T cells
(A) SIM imaging showing the basal section (550 nm) of all control CTL (HD) adhering to ICAM-1/anti-CD3 coated surface (left) and all WAS CTL corresponding with the 3 categories (right). The 3 categories are “radial”, “distorted” and “kinaptic” cells (as shown in figure 8). (B) Analysis of the number and density of open LFA-1 clusters in each category.

Figure S6**Figure S6. LFA-1 nanocluster organization in sub-optimally activated CD8⁺ T cells**

(A) dSTORM images of open conformation LFA-1 staining in a representative HD CD8⁺ T cell on ICAM-1 and anti-CD3 mAb coated surface (1 µg/ml). From left to right, TIRFM image and dSTORM reconstruction, then 2 ROIs with the corresponding DBSCAN detection of clusters. Scale bar: 5 µm (whole cell) and 0.2 µm (ROI). (B) Open LFA-1 cluster area distribution within 4 ROIs per cell. (C) Surface density of open LFA-1 clusters within 4 ROIs per cell. Mean is represented in red. (D) Localization point density within 4 ROIs per cell. (E) Number of localization points detected as part of clusters (IN) or out of the clusters (OUT), within 4 ROIs per cell. The open LFA-1 cluster metrics result from the analysis of 4 cells.

Movie 1.

Healthy donor CTL (green) encountering anti-CD3 mAb coated P815 cells in presence of propidium iodide (PI) at a 2:1 E:T ratio.

Movie 2.

WAS CTL (green) encountering anti-CD3 mAb coated P815 cells in presence of propidium iodide (PI) at a 2:1 E:T ratio.

Discussion et perspectives (partie 2)

Dans cette étude, nous avons entrepris d'identifier le rôle de WASP à la synapse lytique. Une combinaison unique de modalités de microscopie avancées nous a permis non seulement d'identifier un défaut d'activation de LFA-1 sous-jacent à l'activité cytotoxique réduite de ces cellules, mais aussi de produire des connaissances fondamentales sur l'interaction entre l'activation du LFA-1 et le positionnement des granules à l'aire synaptique.

Premièrement, par l'observation du défaut de lyse soutenue des CTL WAS, en lien avec un défaut d'activation de LFA-1 et des morphologies cellulaires aberrantes, j'avais émis un modèle de réflexion sur le rôle de WASP à la synapse lytique (**Figure 15**).

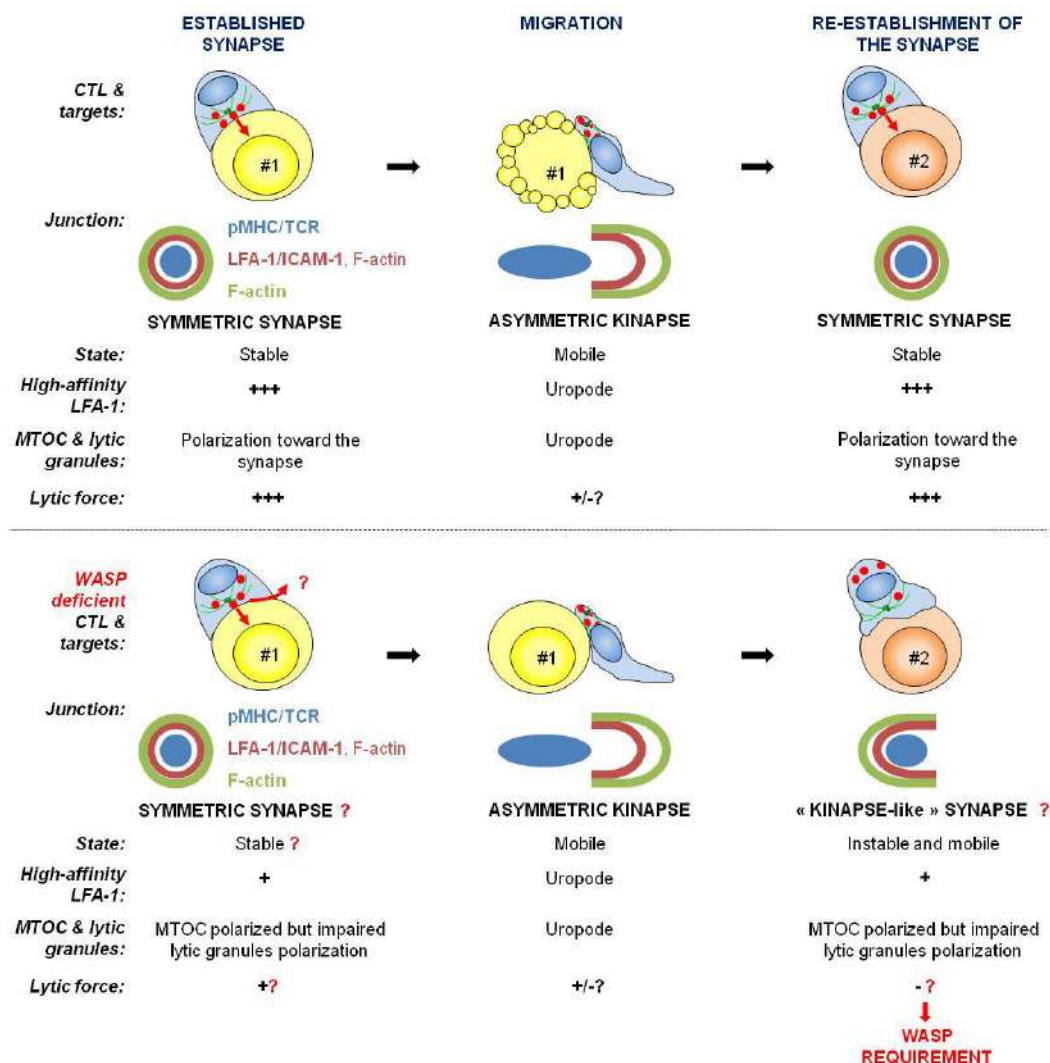


Figure 15. Modèle de réflexion sur le rôle de WASP à la synapse lytique. Lors de l'activité de scanning des cibles par le CTL, celui-ci est très mobile et forme des sites de contact de type kinapse. Une fois la reconnaissance d'un peptide antigénique, la signalisation TCR va permettre l'inside-out signaling afin d'activer LFA-1 et permettre une adhésion ferme pour la mise en place de la synapse lytique. Le CTL étant très dynamique, WASP semble requis pour la stabilité de cette synapse et la délivrance du coup létal.

L'hypothèse consiste en une structure synaptique affectée par l'absence de WASP, entraînant un défaut de stabilité de contact avec la cellule cible. En effet, une étude a précédemment démontré la nécessité de WASP à la synapse immunologique pour permettre la reformation de celle-ci après migration^{282,283}. Cette action pourrait être médiée par LFA-1 qui, par son adhérence au ligand ICAM-1, permettrait l'arrêt du CTL. Ainsi en l'absence de WASP, la synapse ne se reformerait pas de manière concentrique, et même si la polarisation des granules lytiques est effectuée¹⁵⁴, ceux-ci ne seraient pas contenus dans l'aire synaptique pour une délivrance ciblée (**Figure 15**).

Nos travaux démontrent au niveau fondamental que le diamètre des clusters de LFA-1 détectés ici dans les lymphocytes T est d'environ 100 nm (indépendamment de WASP), ce qui est comparable à celui mesuré par microscopie électronique à la surface des monocytes²⁸⁴. De plus, ces clusters de LFA-1 dans la conformation ouverte ont été concentrés dans une structure semblable à un anneau, en ligne avec le cycle de LFA-1 décrit précédemment²⁸⁵. En revanche, en lien avec notre modèle de réflexion, nous avons non seulement pu démontrer l'importance de WASP pour la formation d'une structure concentrique de LFA-1, mais aussi au sein des nanoclusters de LFA-1, WASP est impliquée dans leur densité moléculaire. En outre, en lien avec le défaut de formation d'un anneau de LFA-1, les granules lytiques sont moins confinés à l'intérieur de celui-ci. Pour autant, les CTL WAS sont capables de relarguer les granules lytiques¹⁵⁴. Ainsi les CTL WAS auraient un problème de stabilisation de leur synapse au fur et à mesure de leur rencontre avec les cibles, réduisant leur capacité de lyse multiple, ce qui entraînerait un défaut de lyse soutenue.

Mis à part l'identification d'éléments expliquant le défaut de CTL WAS, nos travaux soulèvent de multiples questions fondamentales comme : Comment LFA-1 est-il ancré dans le cytosquelette d'actine ? Pourquoi les granules lytiques ne sont pas centralisés dans un domaine sécrétoire comme décrit auparavant ?

Premièrement, l'ancrage de LFA-1 dans le cytosquelette d'actine avait été décrit comme sous-jacent à celui-ci, permettant de re-localiser cette intégrine à la synapse²⁸⁶. Or nous observons que les nanoclusters de LFA-1 sont ancrés dans les interstices du maillage d'actine, avec une colocalisation partielle avec celle-ci impliquant un contact. Par l'étude de protéines capables d'interagir avec le domaine intracytoplasmique de LFA-1 (comme la Talin, Vinculin, ou Kindlin) et avec le cytosquelette d'actine, cela permettrait de définir plus finement l'ancrage de LFA-1 dans le cytosquelette.

Enfin, les granules lytiques ont été initialement proposés pour libérer leur contenu en fusionnant avec un domaine sécrétoire sans actine situé vers le centre de la synapse^{77,104,287}. Cependant, dans nos expériences avec des CTL de donneurs sains, des granules lytiques apparaissaient préférentiellement localisés au voisinage des clusters de LFA-1 à haute affinité dans la face interne de l'anneau formé par LFA-1. Ceci est en accord avec la découverte récente que la sécrétion de granules lytiques, visualisée avec une sonde fluorescente, se produit dans un domaine intermédiaire de la synapse correspondant à la région de l'effort de force le plus fort^{288,289}.

En résumé notre étude a permis des découvertes fondamentales comme la topographie de LFA-1 mais aussi de caractériser l'implication de WASP à la synapse lytique, permettant d'expliquer à un degré plus fin le défaut de lyse des CTL de patients.

Partie 3. Les lymphocytes T régulateurs Ovasave® sont dotés d'une activité cytotoxique alternative *via* la granulysine et les granzymes

Granulysin- and granzyme-dependent elimination of myeloid cells by therapeutic ova-specific type-1 regulatory T cells

Delphine Guipouy, Julie Gertner-Dardenne, Nathalie Belmonte and Loïc Dupré.

Article soumis à The Journal of Immunology

Le développement d'immunothérapies à base de transfert adoptif de lymphocytes T fait preuve d'une forte croissance à l'heure actuelle. Grâce aux capacités cytotoxiques, mais aussi régulatrices, elles visent à éliminer les cellules tumorales ou à contrôler l'inflammation, respectivement. Dans ce contexte, TxCell a développé le produit thérapeutique Ovasave®, à base de lymphocytes T régulateurs de type 1 ayant une spécificité pour l'ovalbumin (ova-Tr1), pour la maladie de Crohn réfractaire.

L'essai clinique de phase I/IIa (CATS1) a démontré la sûreté de cette thérapie, et a également indiqué une efficacité par l'observation de la diminution du score CDAI des patients, en parallèle d'une diminution du nombre de monocytes pro-inflammatoires dans le sang des patients. Parmi les multiples mécanismes d'action potentiels d'un lymphocyte T régulateur, nous formulons l'hypothèse d'une activité directe des ova-Tr1 envers ces monocytes pro-inflammatoires, en les éliminant par cytotoxicité.

Afin d'explorer cette hypothèse, j'ai adapté différentes techniques développées dans mes précédents travaux pour l'étude de ces cellules ova-Tr1, comme la mesure par cytométrie en flux de l'activité de lyse sur des temps très prolongés et la microscopie en temps réel évaluant l'induction de l'apoptose par la sonde caspase-3.

Premièrement, en plus d'une capacité immunosuppressive *via* l'IL-10, les ova-Tr1 ont un potentiel lytique par l'expression de molécules lytiques, comme les granzymes A, B, H, M et la granulysine. Par une étude rétrospective des marqueurs exprimés par les ova-Tr1 utilisés dans l'étude CATS1, seule une forte expression de l'ensemble des molécules lytiques correspondait à la diminution du score CDAI observée chez les patients répondeurs. Ainsi, à l'aide de lignées cellulaires provenant du lignage myéloïde ou lymphoïde, nous avons pu démontrer une

capacité d'élimination préférentielle de cellules cibles myéloïdes par les ova-Tr1. Cette activité cytotoxique est mise en place progressivement, avec un délai dans la délivrance du coup létal, et est maintenue sur des temps très prolongés (jusqu'à 72h) permettant une élimination de la population cible. Par ailleurs, cette lyse est effectuée indépendamment de la reconnaissance de l'antigène ova par le TCR. L'activation de celui-ci permet tout de même de potentialiser leur activité lytique. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette lyse sont les granzymes avec une indépendance de la perforine. En revanche, en remplacement de la perforine, la granulysine est impliquée dans l'activité de lyse des ova-Tr1.

Ainsi, face à des cellules cibles myéloïdes de type monocyttaire, les ova-Tr1 sont capables d'exercer une activité de lyse alternative *via* la granulysine et les granzymes de manière TCR- et perforine-indépendante. Cette thérapie cellulaire à base de lymphocytes T régulateurs pourrait, en parallèle d'une activité suppressive classique envers les lymphocytes T effecteurs, permettre l'élimination de cellules myéloïdes, comme les cellules présentatrices de l'antigène ou les monocytes pro-inflammatoires par une activité cytotoxique, afin de contrôler l'inflammation présente chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

J'ai eu l'opportunité de travailler sur ce projet grâce à un financement Cifre, pour débiter ma thèse, me permettant de collaborer avec l'entreprise TxCell. Ainsi, Julie et Nathalie m'ont donné les bases du projet correspondant au matériel cellulaire et aux données de cytométrie de la figure 1. Ma contribution a alors été d'explorer le mécanisme de lyse avec toutes les connaissances que j'ai acquies lors de mes deux précédentes expériences, en les adaptant aux lymphocytes ova-Tr1, mais aussi en acquérant de nouvelles capacités et connaissances au cours de cette recherche (**Figures 2 à 5 et Figures S1 et S2**).

Granulysin- and granzyme-dependent elimination of myeloid cells by therapeutic ova-specific type-1 regulatory T cells

Delphine Guipouy^{1,2,3,4}, Julie Gertner-Dardenne⁴, Nathalie Belmonte⁴, and Loïc Dupré^{1,2,3,#}

¹ INSERM, UMR1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France

² Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France

³ CNRS, UMR5282, Toulouse, France

⁴ TxCell, Allée de la Nertière, Valbonne Sophia-Antipolis, France

Correspondence:

Loïc Dupré, INSERM UMR 1043 - CPTP, Purpan University Hospital,

1 place du Dr Baylac, 31300 Toulouse, France

e-mail: loic.dupre@inserm.fr

Abstract

The intrinsic immunosuppressive properties of regulatory T cells can be harnessed for therapeutic approaches aiming at down-modulating harmful immune reactions. In this context, expanded type 1 regulatory T cells (Tr1) specific for ovalbumin (ova-Tr1) have been tested for clinical efficacy in the treatment of autoimmune disorders such as refractory Crohn's disease (CD). The clinical use of these therapeutic products warrants exploration of their mechanism of action. Here, we identified a relationship between the CD activity index (CAI) and the expression of lytic molecules by the ova-Tr1 cells administered in the previously reported First-in-Man study (CATS1 study). Accordingly, ova-Tr1 cells were found to carry granules containing high levels of lytic molecules, including multiple granzymes and granulysin. These cells displayed a TCR-independent cytotoxic activity, which was selectively directed towards myeloid cell lines and monocyte-derived dendritic cells. The cytotoxic activity of ova-Tr1 cells was mediated via prolonged intercellular contacts that resulted in a perforin-independent and a granzyme/grnulysin-dependent apoptosis of the myeloid target cells. As compared to CD8⁺ cytotoxic T cells, ova-Tr1 cells required more time to lyse target cells and displayed a more gradual lytic activity over time. Notably, this activity was sustained over days resulting in the control of myeloid cell populations at a relatively low ratio. Our study reveals that ova-Tr1 cells are endowed with a sustained cytotoxic activity that relies on a unique combination of granulysin and granzymes and that specifically eliminates myeloid target cells in a TCR-independent manner.

Key words

Type 1 regulatory T cells, Cytotoxic activity, Myeloid cells, Immunotherapy, Granulysin

Abbreviations

Ab: antibody, CATS1: Crohn's And Treg cells Study 1, CD: Crohn's disease, CDAI: Crohn's disease activity index, CTL: cytotoxic T lymphocyte, DC: dendritic cells, Ova-Tr1: ovalbumin-specific type 1 regulatory T cell, PI: propidium iodide, Treg: regulatory T cell.

Introduction

Reinforcing and modulating the immune system has recently become an efficient strategy to tackle the challenges posed by cancers and chronic inflammatory diseases (Gregori et al., 2015; June, 2007; Perica et al., 2015). Autologous T-cell-based therapies represent one of the immunotherapy approaches being explored today. They include strategies relying on the transfer of either cytotoxic T cells for the elimination of cancer cells (Dudley et al., 2002; Mulé et al., 1984; Rosenberg et al., 2011) or regulatory T cells (Treg) to control autoimmune and inflammatory diseases (Marek-Trzonkowska et al., 2012; Trzonkowski et al., 2009). Treg cells are endowed with a suppressive activity (Sakaguchi et al., 1995), which operates through immunosuppressive cytokines (Nakamura et al., 2001, 2004), metabolism disruption (Deaglio et al., 2007) or inhibition of antigen-presenting cell maturation (Oderup et al., 2006). Interestingly, Treg cells can also mediate a cytotoxic activity toward both effector T cells (Gondek et al., 2005) and myeloid cells, including antigen presenting cells (Grossman et al., 2004a, 2004b). Importantly, such cytotoxic activity has been reported to be required for the regulatory activity of these cells *in vivo* (Cao et al., 2007). Type 1 Treg cells are an attractive subset of regulatory T cells for therapy since they can be generated *in vitro* (Gregori et al., 2012). They also share immunosuppressive and cytotoxic activities (Foussat et al., 2003; Groux et al., 1998; Magnani et al., 2011). Nevertheless, the relevance of these activities in the context of therapeutic approaches remains to be evaluated.

An autologous T-cell based approach consisting in the administration of *in vitro* expanded ovalbumin-specific type 1 Treg cells (ova-Tr1) has been developed for the treatment of Crohn's disease (CD) (Brun et al., 2009; Foussat et al., 2003). The phase I/IIa CATS1 clinical study showed the safety of this approach in the context of refractory disease and provided a significant clinical improvement in 8 of the 20 treated patients (Desreumeaux et al., 2012). This was paralleled by a reduction in pro-inflammatory monocytes in the blood of the patients 3 weeks after injection, suggesting that ova-Tr1 cells might dampen CD-associated inflammation via the control of monocytes. In the present study, we explored whether known Tr1 cell-associated mechanisms might concur to the control of monocytes by ova-Tr1 cells. The phenotypic analysis of markers of the regulatory and cytotoxic activities expressed by the cells administered to CD patients revealed a relationship between levels of cytotoxic molecules and CDAI reduction. This led us to focus on the cytotoxic potential of those cells using a combination of assays based on flow cytometry and quantitative video-microscopy (Vasconcelos et al., 2015). Our study demonstrates that therapeutic type-1 regulatory T cells

are endowed with an alternative cytotoxic activity that eliminates myeloid cells, independently of TCR-mediated signaling, *via* a granulysin- and granzyme-dependent mechanism.

Results

Expression of granzymes and granulysin by ova-Tr1 cells is linked to clinical response in Crohn's disease patients.

In order to get insight into the mechanism by which ova-Tr1 cells might control refractory Crohn's disease in the context of adoptive cell therapy, we analyzed expression of molecules known to mediate regulatory and cytotoxic activities in these cells. Ova-Tr1 cells were defined as CD4⁺ T cells expressing high levels of CD25 but low or undetectable expression of Foxp3 and CD62L, in contrast to thymus-derived Treg cells (**Fig1A**). As previously described, ova-Tr1 cells secreted high amounts of IL-10 and IL-13, low amounts of IFN γ , but no IL-4 (Desreumeaux et al., 2012). This analysis also confirms that these cells harbor a Tr1 cytokine profile (Bacchetta et al., 2002; Groux et al., 1998). Analysis of immune checkpoint surface molecules on ova-Tr1 cells showed expression of ICOS and GITR but low levels of CTLA-4 and PD-1. Furthermore, ova-Tr1 cells expressed high levels of the ATP-degrading ectonucleotidase CD39 (Mascanfroni et al., 2015). To test the suppressive ability of ova-Tr1 cells, we applied the culture supernatant of ova-Tr1 cells that had been stimulated for 48h with anti-CD3/CD28 coated beads onto purified CD4⁺ T cells cultured in Th17-skewing conditions (**Fig1B**). The supernatants of ova-Tr1 cells dampened the differentiation of CD4⁺ T cells into Th17 effector cells, revealing the contact-independent suppressive ability of ova-Tr1 cells.

Tr1 cells have been shown to also mediate their suppressive function via the release of lytic molecules, including granzyme B and perforin (Magnani et al., 2011). We sought to test the expression of all described granzymes (A, B, H, K and M), as well as perforin and granulysin in the ova-Tr1 cells (**Fig1C**). The tested clones consistently expressed high levels of granzymes A, B, H and M but almost no granzyme K. Interestingly, while the ova-Tr1 cells expressed very low levels of perforin, they expressed granulysin, a cytotoxic molecule able recently described to cooperate with granzymes to kill pathogens (Walch et al., 2014). We then studied these cells by confocal microscopy to investigate whether the identified lytic molecules would be localized in granules as expected for cytotoxic T cells. Our analysis confirms the expression of granzyme B and granulysin and shows that these molecules colocalized with the lysosomal marker LAMP-1 (**Fig1D**). Together, these data indicate that ova-Tr1 cells harbor a cytotoxic potential.

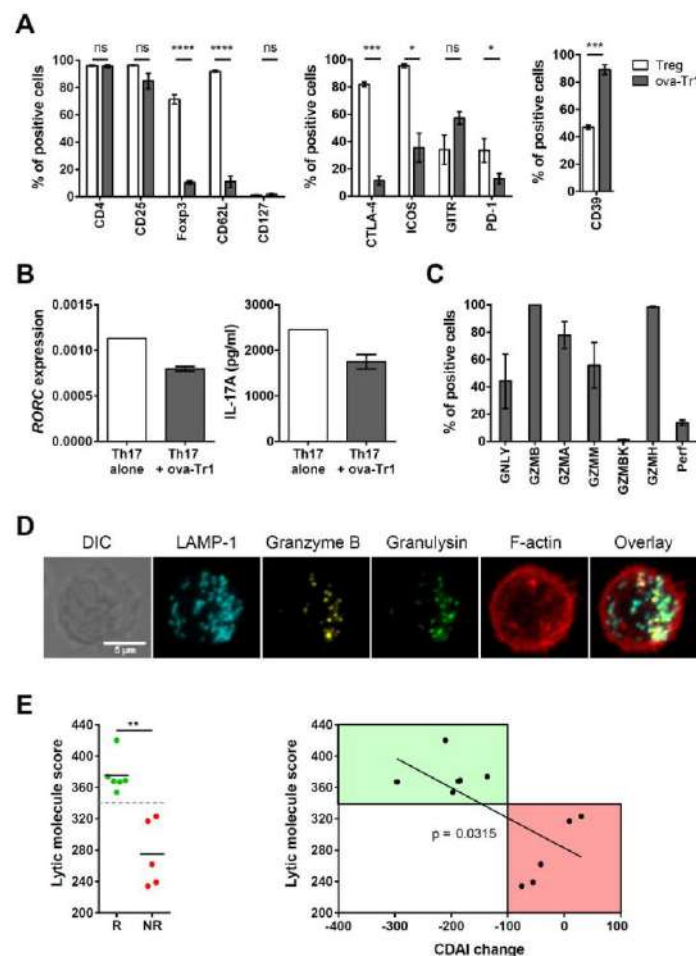


Figure 1. Phenotypic characterization of ova-Tr1 cells produced for cellular therapy. (A) Expression of characteristic markers of regulatory T cells, as indicated. Mean $\pm$ SEM, n=2 for Treg cell line and n=6 for ova-Tr1 clones. (B) Suppressive activity assay on Th17 cell differentiation. Mean $\pm$ SEM, n=4. (C) Expression of lytic molecules. Mean $\pm$ SEM, n=6 ova-Tr1 clones. (D) Visualization of granzyme B and granulysin together with LAMP-1 by confocal microscopy, represented as a maximum intensity projection of a z-stack acquisition through the entire cell. (E) Compiled expression of lytic molecules (addition of gMFI values) in ova-Tr1 cells transfused to responder (green) and non-responder (red) patients from the CATS1 phase I/IIa clinical trial. CDAI change corresponds to the difference of CDAI scores at the beginning and the end of the trial. Statistical significances were obtained with unpaired t-tests. ns P > 0.05; * 0.01 < P < 0.05; ** 0.001 < P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001.

Our characterization of the ova-Tr1 cells points to their potential to control inflammatory responses such as those underlying CD *via* contact-independent suppression of pathogenic T

cells and/or *via* a cytotoxic mechanism. We therefore investigated, retrospectively, in the remaining Drug products from CATS1 study patients whether the expression of markers of these activities might correlate with the change in CDAI scores. Ova-Tr1 cells infused to patients were studied for the expression of several markers corresponding to immunosuppressive and the cytotoxic functions, such as cosignaling molecules, CD39, various chemokines receptors, as well as IL-10 secretion. Moreover, the expression level of lytic molecules, including granzymes A, B, H, K and M, perforin, as well as granulysin, was monitored by flow cytometry and compiled into a lytic molecule score. This score was compared to the patient CDAI change reached at 5 weeks after injection, when the peak of response was observed in CATS1 (**Fig1E**). A clinical response was defined as a reduction of at least 100 points of the patient CDAI score. The analysis revealed that the lytic molecule score of the infused cells was associated with the clinical response. Indeed, responder patients displayed high lytic molecule scores. As opposite, non-responder patients displayed a lower lytic molecule scores than responder patients. While the expression of lytic molecules appeared to be related to the clinical response, we failed to detect any relationship between markers of immunosuppressive functions and the CDAI of the infused patients (data not shown). Together, these data indicate that the *in vivo* efficacy of ova-Tr1 cells in the context of CD might be related to the cytotoxic potential of these cells, based on their high expression of numerous granzymes and granulysin. This raises the question as to whether ova-Tr1 cells are endowed with a lytic activity and, if so, which pathogenic cells they might target.

Ova-Tr1 cells preferentially eliminate myeloid cells independently from TCR stimulation.

We tested the intrinsic cytotoxic activity of ova-Tr1 cells against various hematopoietic cell lineages using a cytometry-based method designed to assess both short-term and long-term cytotoxic activity at reduced effector to target cell ratios (Vasconcelos et al., 2015). Although ova-Tr1 cells displayed only minimal elimination of the myeloid cell lines U937 and THP1 in a 4h assay, they efficiently eliminated these cells over 24h, in a ratio-dependent manner (**Fig2A**). The ability of ova-Tr1 cells to eliminate myeloid cells was confirmed with the use of primary cells. Indeed, ova-Tr1 cells efficiently eliminated monocyte-derived dendritic cells, independently from their maturation status. Ova-Tr1 cells displayed only minimal effects on the viability of cells belonging either to the granulocytic series (K562 cells), the B cell lineage (JY cells) or the T cell lineage (primary CD8⁺ T cells) (**Fig2B**). Therefore, the cytotoxic activity

of ova-Tr1 cells appears to be restricted to cell lines and primary cells belonging to the monocytic lineage.

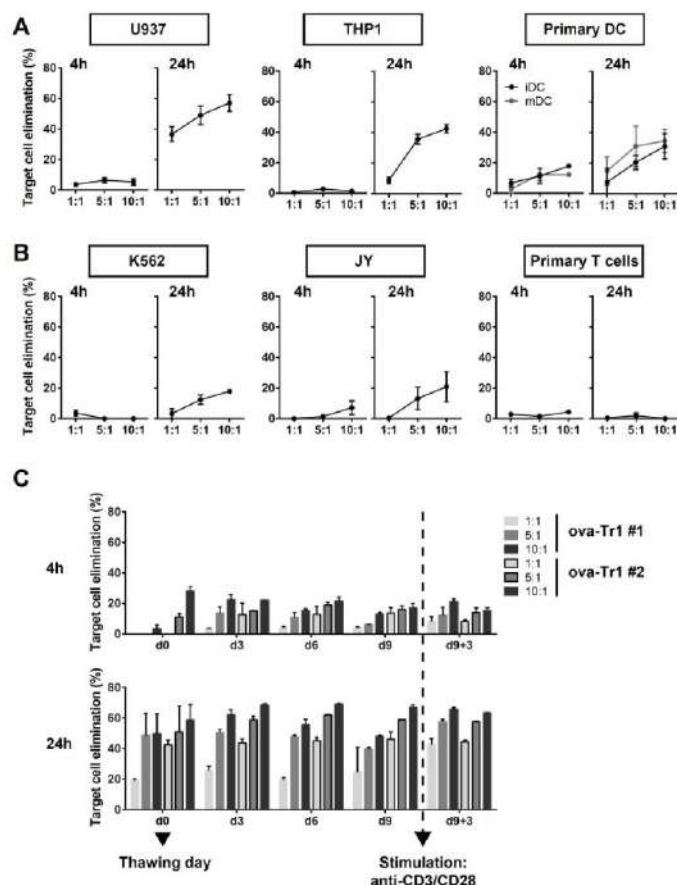


Figure 2. Ova-Tr1 cells preferentially kill myeloid cells. (A) Short-term (4h) and long-term (24h) killing assay against different myeloid cell lines (U937, THP1) and primary myeloid cells (iDC and mDC). Mean $\pm$ SEM n=4 ova-Tr1 clones. (B) Short-term (4h) and long-term (24h) killing assay against a granulocyte cell line (K562), a lymphoid cell line (JY) and primary CD8⁺ T cells. Mean $\pm$ SEM n=4 ova-Tr1 clones. (C) Sustainment of lytic activity by ova-Tr1 cells during a cycle of *in vitro* culture, from thawing up to after restimulation. Mean $\pm$ SD of an experiment in duplicates with n=2 ova-Tr1 clones.

To further dissect the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells, we chose to use the U937 cell line as a model. In the clinical setting, frozen batches of ova-Tr1 cells are thawed and directly administered to patients. We assessed how long the cytotoxic property of ova-Tr1 cells would be maintained in that setting (Fig2C). Upon thawing, ova-Tr1 cells displayed a low, but detectable, target cell reduction activity at 4h, which strongly increased at 24h. This cytotoxic activity was maintained over the 9 days of *in vitro* culture. To further evaluate their functional stability, ova-Tr1 cells were restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 coated beads. Three days after stimulation, ova-Tr1 cells remained as efficient at eliminating U937 cells as they were following thawing. The efficiency of the lytic activity and the independence of TCR stimulation might be explained by a tonic status of the TCR. In support of this possibility, ova-

Tr1 cells displayed a high level of phosphorylated form of Zap-70 upon thawing, after 9 days of *in vitro* culture and after restimulation (**FigS1A-B**). Together, these data indicate that the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells directed towards myeloid cells is a very stable property that is not affected by *in vitro* culture and TCR restimulation.

Gradual onset of lytic activity by ova-Tr1 cells against myeloid cells.

Given the increase in cytotoxic activity measured between 4h and 24h of co-culture with the target cells (from $\approx 20\%$ to 70% of target cell elimination), we investigated the kinetics of the ova-Tr1 cell cytotoxic activity by monitoring the events of U937 cell death by live-microscopy (**Fig3A-B**). For that purpose, U937 cells were loaded with the NucView fluorescent probe that reveals caspase-3 activation. We used this approach to compare in parallel the cytotoxic activity between ova-Tr1 cells, CD8⁺ cytotoxic cells (CTL) and Foxp3⁺ Treg cells. As expected, CTL did not display any cytotoxic activity toward U937 cells without an exogenous stimulus. However, in the presence of anti-CD3 Ab, expected to bind Fc receptors on the target cells (Scallon et al., 2007), they eliminated a high proportion of target cells within a few hours. Distinctly from CTL, ova-Tr1 cells were able to activate caspase-3 in U937 cells without addition of anti-CD3 Ab. This further demonstrates that ova-Tr1 cells are endowed with a cytotoxic activity leading to the apoptosis of myeloid target cells. The cytotoxic activity of ova-Tr1 cells was characterized by a slow onset followed by a gradual increase of apoptotic target cells. As an additional control, we tested the ability of Foxp3⁺ Treg cells to eliminate U937 cells. However, Foxp3⁺ Treg cells did not display any lytic activity in this experimental model system.

To further explore the mode of action of ova-Tr1 cell-mediated elimination of myeloid target cells, we performed live microscopy experiments in the presence of a high concentration of propidium iodide (PI) to reveal target cell membrane permeabilization consecutive to lethal hit delivery (Lopez et al., 2013). These experiments reveal that upon contact with U937 cells, ova-Tr1 cells were able to deliver a lethal hit, confirming their identity as genuine cytotoxic T cells (**Fig3C**). However, while every CTL forming a conjugate with a U937 cell, in the presence of an anti-CD3 Ab, led to an event of PI burst within 2h, only one fourth of the ova-Tr1 cells were able to do so (**Fig3D**). The limited proportion of ova-Tr1 cells demonstrating a killing activity within the 2h observation time frame might be explained by the increased delay with which they eventually killed target cells. Indeed, the time between contact and PI entry was on average

of 65 min for ova-Tr1 cells as compared to 20 min for CTL (Fig3E). The ova-Tr1 cells that did not kill within the 2h time frame formed conjugates with U937 cells that were as prolonged as some from killer cells, thereby excluding the failure to recognize target cells as a reason for the lack of cytotoxicity (Fig3F). As expected from the previous set of experiments, Foxp3 Treg cells failed to induce a detectable PI burst in the U937 cells, confirming the specificity of ova-Tr1 cells in the killing of myeloid target cells. In conclusion, the gradual onset of U937 cell lysis by ova-Tr1 cells observed at the population level might be explained, at least in part, by a delay between initial contact and lethal hit delivery.

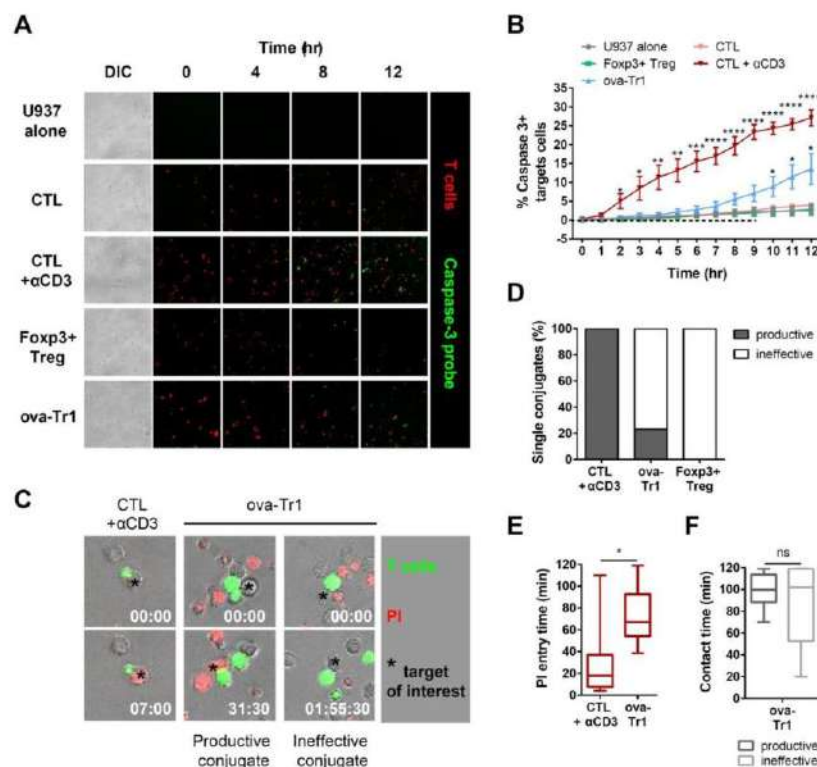


Figure 3. Killing kinetics of ova-Tr1 cells. Target U937 cells were seeded in the presence of either ova-Tr1 cells, Foxp3⁺ Treg cells or CTL (red) at an E:T ratio of 1:1 for 12h. The Nucview 488 caspase-3 substrate was used to track individual target cell apoptosis by live-microscopy. (A) Representative snapshots showing the activation of caspase-3⁺ target cells after co-culture with the indicated effector cells. (B) Quantification of videos as percentage of target cells activating caspase-3 over time. Mean $\pm$ SEM of n=2 experiments in triplicates. Same experiment for 2h, propidium iodide (PI) was used to track the lethal hit delivery by live-microscopy. (C) Representative snapshots showing conjugates triggering PI entry in the target cell. (D) Single conjugates (1 T cell and 1 target cell) were categorized as productive or ineffective depending on PI entry in the target cell. n= 26 conjugates per T

cell type. (E) Delay between the first contact with the target cell and PI entry. (F) Contact time with target cells, either for "productive" or "ineffective" contacts. Statistical significances were calculated with unpaired t-tests. ns $P > 0.05$; * $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Ova-Tr1 cells sustain their lytic activity towards myeloid cells over days.

Given the gradual onset of lytic activity in the ova-Tr1 cells, we investigated their ability to control myeloid cell populations over prolonged interaction times. For this purpose, ova-Tr1 cells were co-cultured with U937 cells for 4, 24, 48 and 72h at the E:T ratios of 1:1, 5:1 and 10:1. Several of the ova-Tr1 clones tested demonstrated a cumulative killing activity over 48 to 72h, leading to near elimination of the U937 cell population at the 10:1 ratio in the absence of exogenous TCR stimulation (**Fig4A**). A CTL clone tested in parallel as a control displayed only minor spontaneous killing activity towards the U937 cells. We then tested whether additional triggering of the TCR would further reinforce the sustained lytic activity of ova-Tr1 cells. Upon addition of anti-CD3 Abs, the 5 tested clones displayed increased cytotoxic activity towards the U937 cells (**Fig4B**). Indeed, the exogenous trigger of the TCR in ova-Tr1 cells raised their killing kinetics and increased their overall efficiency at low E:T ratio. Remarkably, 2 of the 5 tested clones displayed comparable killing kinetics and efficiency as the CTL clone tested in parallel. This analysis highlights the fact that the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells against myeloid cells is sustained over days and can be potentiated upon TCR triggering.

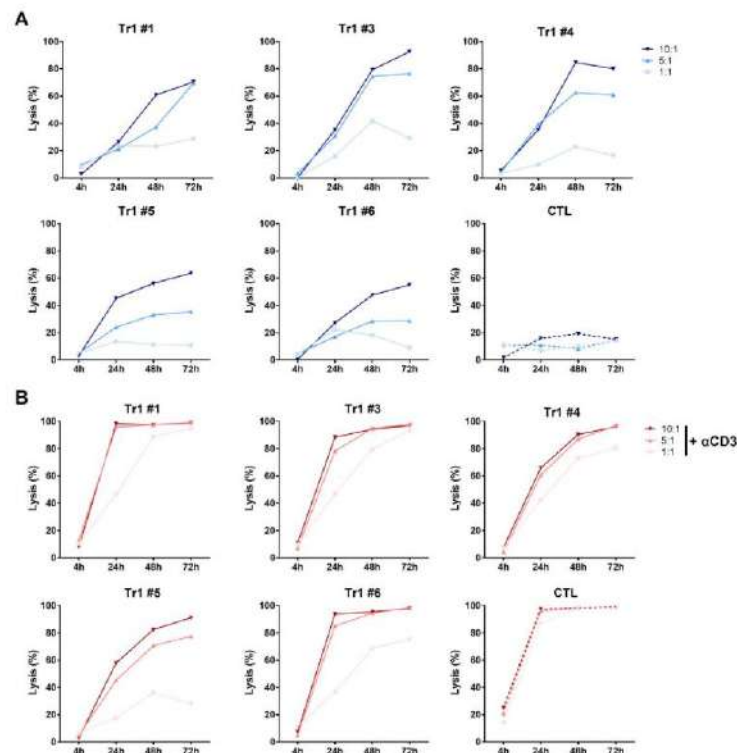


Figure 4. Sustained lytic activity of ova-Tr1 cells over prolonged time periods. (A) U937 target cells were co-incubated with different ova-Tr1 clones and CTL at the E:T ratios 1:1, 5:1 and 10:1. Absolute counts of residual live target cells were measured after 4, 24, 48, and 72h of co-culture. Lysis percentage was obtained based on the number of target cells alone. (B) Same experiments as in A with 10µg/ml anti-CD3 Abs added during the co-culture. Representative experiment of 2 (n=5 ova-Tr1 clones and n=2 ova-Tr1 clones).

The cytotoxic activity of Ova-Tr1 cells is mediated by granzymes and granulysin.

To further elucidate the mechanism of action of ova-Tr1 cells, we investigated which effector molecules might mediate their cytotoxic activity. The relatively slow, gradual and sustained activity is suggestive of a lytic molecular pathway relying on “low triggering” death receptors such as TRAIL or Fas/FasL. To test this hypothesis, we performed cytotoxic assays in the presence or absence of blocking antibodies against TRAIL and FasL (**Fig5A-B**). Neither Ab inhibited the cytotoxic activity of the ova-Tr1 cells, implying that the corresponding molecular pathways are not involved in this process. DNAM-1 has previously been identified as the major trigger of the lytic activity of Tr1 cells (Magnani et al., 2011). However, this receptor appeared

not to be involved in the cytotoxic activity of the ova-Tr1 cells since the blocking Ab approach also failed to affect this activity (Fig5C), although it was able to reduce the lytic activity of NK-92 cells used as a control (FigS2A).

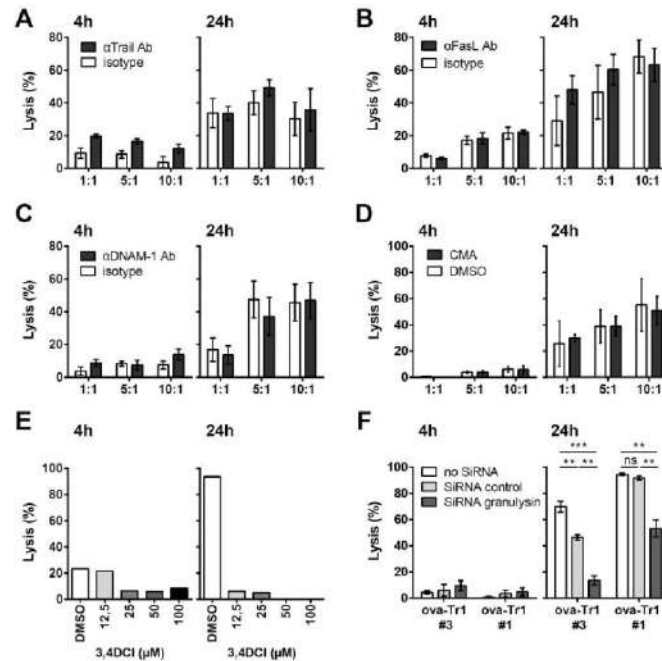


Figure 5. Identification of the molecular pathway for ova-Tr1 cell lytic activity. (A) Cytotoxic assay in the presence of a blocking Ab against TRAIL or isotype control. Mean $\pm$ SEM, n=4 ova-Tr1 clones. (B) Cytotoxic assay in the presence of a blocking Ab against FasL or isotype control. Mean $\pm$ SEM, n=4 ova-Tr1 clones. (C) Cytotoxic assay in the presence of a blocking Ab against DNAM-1 or isotype control. Mean $\pm$ SEM, n=4 ova-Tr1 clones. (D) Cytotoxic assay in the presence of concanamycin A or DMSO. Mean $\pm$ SEM, n=4 ova-Tr1 clones. (E) Cytotoxic assay only at a 5:1 E:T ratio in the presence of a serine proteases inhibitor (3,4 DCI) or DMSO. n=1 ova-Tr1 clone. (F) Cytotoxic assay at 5:1 ratio using electroporated ova-Tr1 cells (no SiRNA, control SiRNA or granulysin-specific SiRNA pools). This assay was initiated 48h after electroporation. Mean $\pm$ SD of a representative experiment out of 2, made in triplicates.

We have previously reported that the cumulative killing activity of CTL over a prolonged time is mediated by perforin and granzymes, rather than the Fas/FasL pathway (Vasconcelos et al., 2015). Given the expression of high levels of granzymes within vesicles resembling lytic granules, we tested their contribution to the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells. The serine protease inhibitor 3,4DCI, known to block the activity of granzymes, totally inhibited ova-Tr1

cell-mediated lysis of U937 cells (**Fig5E**), thereby identifying granzymes as major effectors of the cytotoxic activity of these cells. Unlike classical cytotoxic lymphocytes, ova-Tr1 cells express very low levels of perforin, which is required to allow membrane permabilization and delivery of granzymes in cytotoxic T cells and NK cells. We sought that those levels might however permit a slow release of granzymes in accordance with the killing kinetics of those cells. When concanamycin A was used to inhibit the maturation of perforin, it failed to affect the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells (**Fig5D**), although it was able to reduce the lytic activity of control CTL (**FigS2B**). This indicates that perforin is not involved in the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells. Our phenotypic characterization revealed that ova-Tr1 cells expressed high levels of granulysin, a molecule of activated cytotoxic lymphocytes that mediates killing of bacteria via membrane destabilization properties (Chun et al., 2007; Walch et al., 2014). Since no specific inhibitor of granulysin has been described, we tested its contribution to the cytotoxic activity of ova-Tr1 by inhibiting its expression with SiRNA (**FigS2C**). As assessed by flow cytometry, a substantial inhibition of granulysin expression (up to 70%) was reached 72h after electroporation of ova-Tr1 cells with specific SiRNA. Very clearly, the 24h lytic activity of ova-Tr1 cells was reduced (> 50%) upon electroporation with the SiRNA targeting granulysin as compared to the control SiRNA (**Fig5F**). We then plotted the level of cytotoxic activity and granulysin expression stemming from two independent experiments in which two ova-Tr1 clones were electroporated, either without SiRNA or with control or granulysin SiRNA (**FigS2D**). This analysis shows a positive relationship between granulysin expression in these different cells and their lytic activity, reinforcing the notion that granulysin is a key molecule to control Tr1 cell-mediated cytotoxic activity. Together, our data point to a combined action of granulysin and granzymes as the mechanism by which ova-Tr1 cells kill myeloid target cells.

Discussion

We here explored the biology of therapeutic ova-Tr1 cells and identified cytotoxicity towards myeloid cells as a clinically relevant activity. The retrospective analysis of the cells infused to CD patients in the phase I/IIa CATS1 clinical study (Desreumeaux et al., 2012) indicated that expression of lytic molecules, rather than markers of suppression, is related to the CDAI change in individual patients. Analysis of lytic molecule expression revealed that the ova-Tr1 cells administered to the patients expressed a wide array of lytic molecules including the granzymes A, B, H and M as well as granulysin. To our knowledge, this is the first report of the expression of granzymes H, granzyme M and granulysin in Treg cell populations (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004a, 2004b; Loebbermann et al., 2012; Velaga et al., 2015). Importantly, our analysis shows that the cumulative expression of lytic molecules in the administered ova-Tr1 cells correlated with the reduction of the CDAI score measured in the treated patients. This finding justified a further exploration of the biology of ova-Tr1 cells, with a focus on their potential cytotoxic activity.

By employing a combination of flow cytometry, confocal microscopy and live cell imaging, we demonstrated that ova-Tr1 cells are genuine cytotoxic lymphocytes. Indeed, these cells were able to efficiently kill cells of the monocytic lineage in a contact-dependent manner. Ova-Tr1 cells were found to establish prolonged contacts with target cells. Upon contact, they destabilized the plasma membrane of the target cells as observed by the entry of PI. Furthermore, target cells were found to undergo apoptosis as shown by the activation of caspase-3. Similarly to other cytotoxic lymphocytes such as CTL or NK cells, ova-Tr1 cells were loaded with a high content of LAMP-1⁺ granules containing lytic molecules. However, our in-depth characterization of the cytotoxic activity of ova-Tr1 cells revealed that in many aspects they used an alternative lytic pathway as compared with CD8⁺ CTL. Indeed, they appeared to specifically target cells of the monocytic lineage, to kill over prolonged time periods independently from TCR triggering and to rely on granulysin, rather than perforin, for the lytic process.

Our study demonstrates a preferential lytic activity of therapeutic ova-Tr1 cells toward myeloid cells, especially monocytic cells. This is in line with the observation that in the CATS1 clinical study, responder CD patients displayed a reduction of circulating pro-inflammatory monocytes after ova-Tr1 infusion. A comparable specificity for target cells of the myeloid lineage has been previously reported for Tr1 cells (Locafaro et al., 2017; Magnani et al., 2011). Such specificity might be a property of the Tr1 cell subset since classical human Treg cells are able to lyse a

broader spectrum of target cells, such as T cells, B cells, monocytes and DC (Grossman et al., 2004b).

The lytic capacity of Tr1 cells was previously described to occur via a mechanism based on the lytic molecules perforin and granzyme B and a requirement of DNAM-1 and CD2 for activation, independently of TCR engagement (Magnani et al., 2011). Despite a similar TCR independence, DNAM-1 did not seem to be involved in the lytic activity of the ova-Tr1 cells studied here. Interestingly, we show that although the TCR was not the trigger for the lytic activity of ova-Tr1 cells, it could potentiate it. The reactivity of the TCR might be explained by the recurrent *in vitro* stimulation applied to the ova-Tr1 cells during their generation that may lead to a tonic state. Accordingly, a high level of phosphorylated ZAP-70 was measured in the expanded ova-Tr1 cells. This feature applied both to the drug product upon thawing and following *in vitro* culture and restimulation. We therefore favor a model in which such tonic TCR signals might combine with signals originating from co-receptors to trigger the lytic activity of ova-Tr1 cells.

Whereas high granzyme loads are usually accompanied by perforin expression in both CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic T cells (Takeuchi and Saito, 2017), we observed here that ova-Tr1 lytic activity required granzymes independently of perforin. Interestingly, these cells were found to express high level of granulysin, a protein shown to facilitate granzyme diffusion and to exert additional cytotoxic activities (Saini et al., 2011; Walch et al., 2014). Using SiRNA, we provide clear evidence that granulysin is mediating the killing of myeloid cells by the ova-Tr1 cells. To our knowledge, this is the first report on the activity of granulysin in the Treg cell subset. Interestingly, our data suggest that granulysin might operate as a “spare wheel” for perforin to deliver granzymes within target myeloid cells. Indeed, granulysin is able to perturb membranes and was shown in particular to allow granzyme delivery in intracellular pathogens (Chun et al., 2007; Walch et al., 2014). Alternatively, granulysin might activate target cell apoptosis directly, as shown previously for CTL and NK cells (Saini et al., 2011). However, the observation that serine protease inhibition in ova-Tr1 cells led to full inhibition of their lytic activity indicates that granulysin did not promote killing independently from the granzyme molecules.

Ova-Tr1 cells displayed a sustained lytic activity over very prolonged time periods relying on a gradual onset of their cytotoxicity. Indeed, ova-Tr1 cells appeared to kill slowly with an increased delay between contact and lethal hit delivery as compared to CTL. In addition, ova-Tr1 cells did not all engage at once in killing target cells, at least over the 2h observation period. Such features are expected to contribute to the sustainment of the lytic activity measured over

3 days of interaction with target cells. The sustained lytic activity of ova-Tr1 cells might be the reflection of an alternative lytic pathway involving granulysin instead of perforin. It is also possible that the latter activity is intrinsic to CD4⁺ cytotoxic T cells, since those cells have been shown to exhibit a delayed onset of their lytic activity compared to CD8⁺ cytotoxic T cells (Hildemann et al., 2013). The cytotoxic activity of ova-Tr1 cells characterized here might limit exhaustion or activation-induced cell death. This type of activity would be an advantage to sustain activity in the context of a chronic disease.

In summary, we here provide evidence that ova-Tr1 cells, used in refractory Crohn's disease adoptive cell therapy, eliminate pro-inflammatory myeloid cells as a major mechanism of action. Ova-Tr1 cells mediate the killing of myeloid cells via an alternative lytic pathway, which does not require neither TCR stimulation nor perforin. Ova-Tr1 cells are unique cytotoxic lymphocytes in that they use a combination of granulysin and granzymes to mediate a sustained lytic activity. Moreover, in the context of CD, in which inflammatory myeloid cells contribute to the pathogenesis (Griseri et al., 2012; Linton et al., 2012; Siddiqui et al., 2010), a cytotoxic activity toward these cells is relevant for therapy. Finally, our precise characterization of the cytotoxic activity of ova-Tr1 towards myeloid targets unveils their mechanism of action and provides relevant assays to monitor their activity in the context of clinical trials.

Experimental procedures

Cells

Effector cells

The expansion process of autologous ova-Tr1 cells was optimized from the phase I/IIa study for a phase IIb clinical trial to prevent adverse effects from residues of feeder cells (Brun et al., 2009). Ova-Tr1 cells were produced using an *ex vivo* cell culture process, which generates ova-specific T lymphocytes in 8 to 10 weeks. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from individual donors were used as source of ova-Tr1 cells for the manufacture of the Drug Substance. Donor PBMC were enriched in autologous antigen-specific T cells by stimulation with ovalbumin (ova). After limiting dilution plating of the resulting activated cells, T cells demonstrating specificity to ovalbumin and production of ova-Tr1 cytokines were selected for additional expansion and processing. Expansion relied on a stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of IL-2 and IL-4. The final Drug Product (DP) consisted in the expanded ova-Tr1 cells that were formulated in a cryopreservation medium, filled in vials, and frozen.

To generate control cytotoxic T lymphocytes, CD8⁺ T cells were sorted from healthy donor PBMC with a FACS Aria sorter (BD Biosciences) and cloned. CTL clones were cultured in RPMI 1640 glutamax (Gibco) supplemented with 5% human serum (PAA), 100µg/ml penicillin/streptomycin, 10mM Hepes, 0.1mM MEM nonessential amino acids and 1mM sodium pyruvate (Invitrogen) and stimulated every 2 weeks with irradiated PBMC and EBV-transformed JY cells in the presence of 1µg/ml PHA, 100IU/ml rhIL-2 and 5 ng/ml rhIL-15. Control Foxp3⁺ Treg cells were isolated from healthy donor PBMC based on the expression CD4⁺ CD127^{low} CD25⁺ (EasySep Stemcell isolation kit) according to the manufacturer protocol.

Target cells

The U937 (ATCC), THP1 (ATCC), JY (ATCC) and K562 (kindly provided by Nabila Jabrane-Ferrat) cell lines were cultured in RPMI (Gibco) supplemented with 10% FCS (PAA) and the components described above. The P815 (kindly provided by Nabila Jabrane-Ferrat) cell line was cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS (PAA) and the components described above. Primary dendritic cells (DC) were obtained from monocytes following isolation of PBMC from a healthy donor and 1h adherence in a flask. DC differentiation was induced during 6 days of culture in RPMI supplemented with 10% FCS and in the presence of

750IU/ml GM-CSF and 100IU/ml rhIL-4. Where indicated, immature DC were treated with 1µg/ml of LPS to obtain mature DC.

Phenotypic characterization

Ova-Tr1 cells and Treg were stained for extracellular markers with fluorochrome-coupled antibodies recognizing CD4-VioBlue, CD25-APC, CD62L-FITC, CD127-PE, CTLA-4-PE, ICOS-PECy7, GITR-AF488, PD-1-PE and CD39-PE for 30min at 4°C. Intracellular staining was performed after fixation and permeabilization using the Cytofix/Cytoperm kit (BD) with the following antibodies: Foxp3-APC, perforin-APC, granulysin-AF488, granzyme A-FITC, granzyme B-PE, granzyme H-PE, granzyme K-eFluor660 and granzyme M. For granzyme M staining, a secondary FITC-coupled antibody was added. Antibodies were purchased from Miltenyi, BD and Clinisciences. All data were acquired on a Macsquant 10 cytometer and analyzed using MacsQuantify software (Miltenyi).

Phospho-ZAP-70 staining

Control CD4⁺ T cells were stimulated for 30 min with anti-CD3/CD28 beads (1:1 ratio). Ova-Tr1 cells were harvested from the culture upon thawing and every 3 days (in parallel of the cytotoxic assays performed on the same days). After washing, a first step of fixation with 4% PFA was performed at room temperature for 10 min, followed by a permeabilization step with 90% methanol at -20°C overnight. A rabbit polyclonal Ab for phospho-ZAP-70 (Tyr493, Cell Signaling technology) was used at a dilution of 1:25 for 45 min at room temperature, then revealed by a secondary anti-rabbit IgG Ab coupled with AF647 (Invitrogen) at a dilution 1:400 for 30 min at room temperature. Data were acquired on a Macsquant 10 cytometer (Miltenyi) and analyzed using FlowJo software.

Cytotoxic assays

Ova-Tr1 cells were co-incubated with various target cells, at 1:1, 5:1 and 10:1 effector to target cell ratios. Cells were pelleted for 1min at 1500rpm and incubated at 37°C/5% CO₂ from 4 to 72h. Aphidicolin (Sigma) was used at 0.2µg/ml during the duration of the assay to block target cell proliferation for all target cell line, but not primary cells. Where indicated, blocking

antibodies were used at the concentration of 10µg/ml (anti-DNAM-1, -FasL, and -Trail). Residual alive target cell acquisition and quantification were made as described previously (Vasconcelos et al., 2015). All data were acquired on a Macsquant 10 and VYB cytometers (Miltenyi) and analyzed using FlowJo software.

Live-microscopy recording of cytotoxic activity

For the microscopy-based assessment of effector cells cytotoxic activity, 8-well IBIDI chambers were coated with 10µg/ml of fibronectin (Sigma-Aldrich) for 1h at 37°C/5% CO₂. Effector cells were pre-stained with CellTracker green CMFDA dye (Invitrogen) for 30 min at 37°C/5% CO₂ or CellTrace Calcein red/orange dye (Invitrogen) and then transferred to an IBIDI 8-well chamber together with U937 cells. A 2µM concentration of NucView 488 caspase-3 substrate (Biotium) or a 200µM concentration of PI (Sigma) was added in the medium and present during the acquisition on a Leica SP8 confocal microscope equipped with a chamber set at 37°C/5% CO₂. To automatically count caspase-3⁺ cells through time, images were binarized and further processed using erosion, dilatation, and watershed tools from the ImageJ software (National Institutes of Health). Percentage of caspase-3⁺ cells was calculated based on the number of alive target cells enumerated at the beginning of the video. Measurements of interaction time and PI entry delay was done by cropping regions of interest containing isolated conjugates made of 1 T cell and 1 target cell.

Analysis of lytic granules by confocal microscopy

Ova-Tr1 cells were seeded onto poly-L-lysine coated slides. Cells were fixed with 4% PFA for 10min at 37°C, washed with PBS 3% BSA and permeabilized with PBS 3% BSA 0.1% saponin for 15min at RT. F-actin were then stained with phalloidin-AF555 for 1h at RT. Granulysin and granzyme B were revealed with coupled-mAb (anti-granulysin-AF488 and anti-granzymeB-AF647). LAMP-1 was first stained with a primary rabbit Ab, then revealed by an anti-rabbit-AF405 secondary antibody. Slides were mounted with Vectashield mounting medium (Vector laboratories). All images were acquired on a LSM 710 confocal microscope equipped with a x63-1.4 oil immersion Plan-Apochromat objective (Carl Zeiss AG).

SiRNA transfection

Ova-Tr1 cells were harvested and resuspended in OPTI-MEM medium at 1.10^6 cells in 100 μ l and transferred in a 2mm cuvette (Biorad) alone or together with 2 μ g final either of 2 SiRNA control or 3 SiRNA granulysin (Life technologies, ID 17933, 18028 and 135803). The transfection was performed by electroporation using the gene pulser system with the square wave program: 300V and 1 pulse of 2 msec (Biorad). Cells were immediately put back in culture in their culture medium added with cytokines.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad software. Statistical significance was determined by performing two-tailed unpaired t-tests. Graphs show mean values $\pm$ SEM. Resulting P values are indicated as follows: ns $P>0.05$; * $0.01<P<0.05$; ** $0.001<P<0.01$; *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$.

Author contributions

D.G. performed the experiments, analyzed the results and wrote the paper; J.G-D. performed the phenotypic characterization of ova-Tr1, designed the research and supervised the experiments; N.B. participated in the CATS1 study, designed the research and supervised the experiments; L.D. designed the research, supervised the experiment analysis and wrote the paper.

Acknowledgments

We wish to thank the entire Cell Processing Team at TxCell and in particular Nadia Lounnas-Mourey, Fatima Benali and Justine Desnouveaux for providing the ova-Tr1 cells for this study. We also wish to thank Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive, Valérie Duplan-Eche, Anne-Laure Iscache and Paul Menut from the CPTP cytometry platform, as well as Sophie Allart, Raïssa Houmadi, Astrid Canivet and Danièle Daviaud from the CPTP microscopy platform. We are grateful to Hans Yssel, Salvatore Valitutti, Sabina Müller, Pauline Gonnord, Liza Filali, Laurène Pfajfer, Javier Rey-Barroso, Marie-Pierre Puissegur, Arnaud Foussat, Nathalie Clerget, and Hélène Asnagli for support, technical advice and discussion. This work was funded by the Cifre convention n° 2014/0916 between the French National Association of Technological Research (ANRT) and TxCell. The ANRT funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M.K., Bordignon, C., Narula, S., and Roncarolo, M.G. (2002). Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur. J. Immunol.* 32, 2237–2245.
- Brun, V., Bastian, H., Neveu, V., and Foussat, A. (2009). Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int. Immunopharmacol.* 9, 609–613.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity* 27, 635–646.
- Chun, F.Z., Ling, L.M., Jones, G.J., Gill, M.J., Krensky, A.M., Kubes, P., and Mody, C.H. (2007). Cytotoxic CD4⁺ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. *Blood* 109, 2049–2057.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1257–1265.
- Desreumeaux, P., Foussat, A., Allez, M., Beaugerie, L., Hébuterne, X., Bouhnik, Y., Nachury, M., Brun, V., Bastian, H., Belmonte, N., et al. (2012). Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients With Refractory Crohn ' s Disease. *Gastroenterology* 143, 1207–1217.e2.
- Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R.M., Marincola, F.M., Leitman, S.F., Seipp, C.A., et al. (2002). A Phase I Study of Nonmyeloablative Chemotherapy and Adoptive Transfer of Autologous Tumor Antigen-Specific T Lymphocytes in Patients With Metastatic Melanoma. *J. Immunother.* 25, 243–251.
- Foussat, A., Cottrez, F., Brun, V., Fournier, N., Breitmayer, J., and Groux, H. (2003). A Comparative Study between T Regulatory Type 1 and CD4⁺ CD25⁺ T Cells in the Control of Inflammation 1. *J. Immunol.* 171, 5018–5026.
- Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory Cells Involves a Granzyme

B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J. Immunol.* 174, 1783–1786.

Gregori, S., Passerini, L., and Roncarolo, M.G. (2015). Clinical outlook for type-1 and FOXP3+ T regulatory cell-based therapy. *Front. Immunol.* 6, 1–8.

Griseri, T., McKenzie, B.S., Schiering, C., and Powrie, F. (2012). Dysregulated Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Activity Promotes Interleukin-23-Driven Chronic Intestinal Inflammation. *Immunity* 37, 1116–1129.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., Ley, T.J., and Ctls, C.T. (2004a). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Analysis* 104, 2840–2848.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004b). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589–601.

Groux, H., Garra, A.O., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., Vries, J.E. De, and Roncarolo, M.G. (1998). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Transfus. Med. Rev.* 12, 230–231.

Hildemann, S.K., Eberlein, J., Davenport, B., Nguyen, T.T., Victorino, F., and Homann, D. (2013). High Efficiency of Antiviral CD4+ Killer T Cells. *PLoS One* 8, e60420.

June, C.H.C. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.* 117, 1466–1476.

Linton, L., Karlsson, M., Grundström, J., Hjalmarsson, E., Lindberg, A., Lindh, E., Glise, H., Befrits, R., Janczewska, I., Karlén, P., et al. (2012). HLA-DR(hi) and CCR9 Define a Pro-Inflammatory Monocyte Subset in IBD. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 3, e29.

Locafaro, G., Andolfi, G., Russo, F., Cesana, L., Spinelli, A., Camisa, B., Ciceri, F., Lombardo, A., Bondanza, A., Roncarolo, M.G., et al. (2017). IL-10-Engineered Human CD4+Tr1 Cells Eliminate Myeloid Leukemia in an HLA Class I-Dependent Mechanism. *Mol. Ther.* 25, 2254–2269.

Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L., Sparwasser, T., Webster, K.E., Sprent, J., Culley, F.J., Johansson, C., and Openshaw, P.J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B

play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol.* 5, 161–172.

Lopez, J.A., Jenkins, M.R., Rudd-Schmidt, J.A., Brennan, A.J., Danne, J.C., Mannering, S.I., Trapani, J.A., and Voskoboinik, I. (2013). Rapid and Unidirectional Perforin Pore Delivery at the Cytotoxic Immune Synapse. *J. Immunol.* 191, 2328–2334.

Magnani, C.F., Alberigo, G., Bacchetta, R., Serafini, G., Andreani, M., Roncarolo, M.G., and Gregori, S. (2011). Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 1652–1662.

Marek-Trzonkowska, N., Mysliwiec, Ma., Dobyszek, A., Grabowska, M., Techmanska, I., Juscinska, J., Wujtewicz, A. a., Witkowski, P., MIYNARSKI, W., Balcerska, A., et al. (2012). Regulatory T Cells Preserves B -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care* 35, 1817–1820.

Mascanfroni, I.D., Takenaka, M.C., Yeste, A., Patel, B., Wu, Y., Kenison, J.E., Siddiqui, S., Basso, A.S., Otterbein, L.E., Pardoll, D.M., et al. (2015). Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat. Med.* 21, 638–646.

Mul , J., Shu, S., Shwarz, S., and Rosenberg, S. (1984). Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* 225, 1487–1490.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell Contact–Dependent Immunosuppression by CD4(+) CD25(+) Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface–Bound Transforming Growth Factor β . *J. Exp. Med.* 194, 629–644.

Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., and Strober, W. (2004). TGF- 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4+CD25+ Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice. *J. Immunol.* 172, 834–842.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118, 240–249.

Perica, K., Varela, J.C., Oelke, M., and Schneck, J. (2015). Adoptive T Cell Immunotherapy

For Cancer. *Rambam Maimonides Med. J.* 6, e0004.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., et al. (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 17, 4550–4557.

Saini, R. V., Wilson, C., Finn, M.W., Wang, T., Krensky, A.M., and Clayberger, C. (2011). Granulysin Delivered by Cytotoxic Cells Damages Endoplasmic Reticulum and Activates Caspase-7 in Target Cells. *J. Immunol.* 186, 3497–3504.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164.

Scallon, B., McCarthy, S., Radewonuk, J., Cai, A., Naso, M., Raju, T.S., and Capocasale, R. (2007). Quantitative in vivo comparisons of the Fc gamma receptor-dependent agonist activities of different fucosylation variants of an immunoglobulin G antibody. *Int. Immunopharmacol.* 7, 761–772.

Siddiqui, K.R.R., Laffont, S., and Powrie, F. (2010). E-Cadherin Marks a Subset of Inflammatory Dendritic Cells that Promote T Cell-Mediated Colitis. *Immunity* 32, 557–567.

Takeuchi, A., and Saito, T. (2017). CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function. *Front. Immunol.* 8, 1–7.

Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszuk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., and Hellmann, A. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin. Immunol.* 133, 22–26.

Vasconcelos, Z., Müller, S., Guipouy, D., Yu, W., Christophe, C., Gadat, S., Valitutti, S., and Dupré, L. (2015). Individual Human Cytotoxic T Lymphocytes Exhibit Intraclonal Heterogeneity during Sustained Killing. *Cell Rep.* 11, 1474–1485.

Velaga, S., Ukena, S.N., Dringenberg, U., Alter, C., Pardo, J., Kershaw, O., and Franzke, A.

(2015). Granzyme a is required for regulatory T-cell mediated prevention of gastrointestinal graft-versus-host disease. *PLoS One* *10*, 1–9.

Walch, M., Dotiwala, F., Mulik, S., Thiery, J., Kirchhausen, T., Clayberger, C., Krensky, A.M., Martinvalet, D., and Lieberman, J. (2014). Cytotoxic Cells Kill Intracellular Bacteria through Granulysin-Mediated Delivery of Granzymes. *Cell* *157*, 1309–1323.

1 **Granulysin- and granzyme-dependent elimination of**
2 **myeloid cells by therapeutic ova-specific type-1 regulatory**
3 **T cells**

4
5 Delphine Guipouy^{1,2,3,4}, Julie Gertner-Dardenne⁴, Nathalie Belmonte⁴, and Loïc
6 Dupré^{1,2,3,#}

7
8 **Supplemental section**

9
10 Content:

- 11 - Supplemental figure legends (S1 and S2)
12 - Supplemental figures (S1 and S2)

13 **Figure Legends**

14 **Figure S1. Ova-Tr1 cells harbor high pZAP70 levels.** (A) Flow-cytometry samples of
15 phosphoZAP-70 (pZAP70) for primary CD4⁺ T cells and ova-Tr1 cells stimulated or not with
16 anti-CD3/CD28 Ab coated beads. (B) pZAP70 expression assessed by flow cytometry every 3
17 days from the thawing day up to after restimulation.

18

19 **Figure S2. Molecular pathway sustaining Ova-Tr1 lytic activity.** (A) Cytotoxic assay of
20 NK-92 cells against K562 target cells in the presence of a blocking Ab against DNAM-1 or
21 isotype control. Mean $\pm$ SD (triplicates) of one experiment. (B) Cytotoxic assay of primary
22 CD8⁺ T cells against P815 cells pre-coated or not with an anti-CD3 Ab in the presence of
23 concanamycin A or DMSO. (C) Granulysin expression measured after SiRNA electroporation
24 (24, 48 and 72h) by flow cytometry. The percentage of inhibition was calculated taking as a
25 reference the level of granulysin (gMFI) expressed by electroporated cells without any SiRNA.
26 (D) Relationship between granulysin gMFI and 24h lytic activity, comparing data from
27 electroporated ova-Tr1 cells without SiRNA, with control siRNA and granulysin-specific
28 SiRNA. Statistical significances were obtained with unpaired t-tests. ns P >0.05; *
29 0.01<P<0.05; ** 0.001<P<0.01; *** P<0.001; **** P<0.0001.

Figure S1

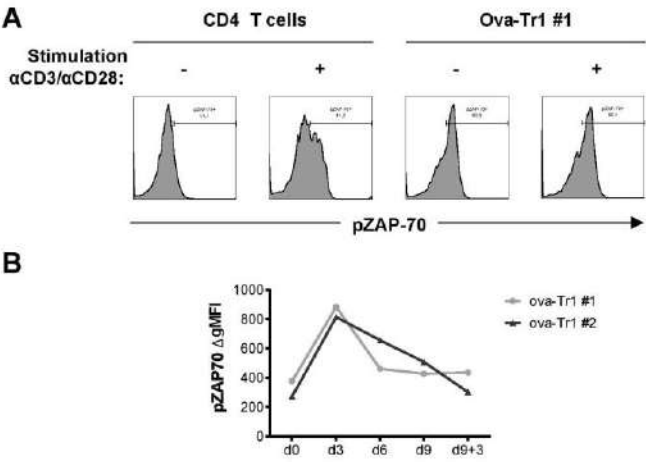
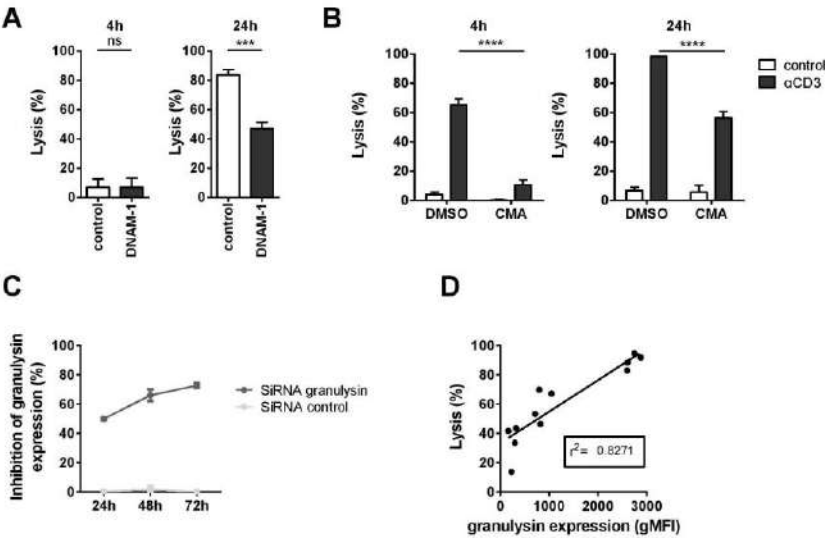


Figure S2



Discussion et perspectives (partie 3)

Nous avons pu démontrer une capacité d'élimination préférentielle de cellules cibles myéloïdes par les ova-Tr1. Cette activité cytotoxique est mise en place progressivement, avec un délai dans la délivrance du coup léthal, et est maintenue sur des temps très prolongés. Par ailleurs, cette lyse est effectuée indépendamment de la reconnaissance de l'antigène ova par le TCR. L'activation de celui-ci permet tout de même de potentialiser leur activité lytique. Les mécanismes moléculaires lytiques mis en jeu dans cette lyse sont la granulysin et les granzymes, avec une indépendance de la perforine.

Ces lymphocytes ova-Tr1 ont alors un **fonctionnement cytotoxique alternatif et unique** à ce que l'on connaît du mécanisme de lyse des lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ ou encore Tr1. En première partie de discussion, j'examinerai et discuterai les **mécanismes moléculaires** de la lyse des cellules ova-Tr1. Ensuite, je discuterai de la proposition d'un **modèle de fonctionnement *in vivo*** dans le cadre de la thérapie.

Mécanismes moléculaires des lymphocytes ova-Tr1

Premier point, sachant que les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ ont une activité de lyse dépendante de leur TCR, dans cette étude les ova-Tr1 démontrent le contraire. Dans la littérature concernant les lymphocytes Tr1, il a été plusieurs fois rapporté qu'une fois activés par leur TCR, pour la sécrétion de cytokines immunomodulatrices par exemple, les Tr1 sont capables d'exercer de manière TCR indépendante : soit une activité suppressive envers des lymphocytes effecteurs spécifiques d'autres antigènes²⁹⁰, soit d'exercer une activité de lyse^{26,246}. En ce point, les ova-Tr1 sont similaires à certaines populations Tr1 décrites précédemment.

En revanche, il est possible de potentialiser la lyse des ova-Tr1 en forçant la stimulation du TCR par un anticorps dirigé contre le CD3. Celui-ci pourrait alors avoir un rôle de co-récepteurs pour augmenter la lyse. N'ayant pas encore identifié l'élément déclencheur de cette lyse des ova-Tr1, je formule l'hypothèse d'une intégration de signaux, à la fois activateurs et inhibiteurs, comme dans le cas des cellules NK. En effet, dans le cas d'une lyse sans reconnaissance spécifique d'un antigène, comme c'est le cas à la fois pour les cellules NK et les ova-Tr1, il me semble important qu'un niveau de contrôle soit exercé sur le déclenchement

de la lyse. C'est pourquoi un contrôle *via* l'intégration de signaux me semble approprié. De plus, comme les CD4 CTL et les cellules NK, les ova-Tr1 expriment NKG2A (data not shown) qui est caractérisé comme un récepteur inhibiteur de la lyse des cellules NK²⁹¹. En outre, GITR, exprimé par les ova-Tr1, a aussi été démontré comme inhibiteur de la lyse des cellules NK²⁹². Ainsi, en plus des potentiels récepteurs activateurs comme NKG2D, NKp30 et NKp46, exprimés par les ova-Tr1 (data not shown), se rajoutent ces récepteurs inhibiteurs. Par ailleurs, ayant observé une présence de ZAP-70 phosphorylé et que celui se fixe sur les motifs ITAM présents sur les récepteurs activateurs nommés précédemment, les ova-Tr1 serait dans un état « pré-activé » pour être cytotoxique. C'est pourquoi un signal inhibiteur devient essentiel pour que cette activité ne soit pas induite par erreur sur les tissus sains par exemple. Par l'utilisation d'un anticorps bloquant GITR et NKG2A, je pourrais mesurer si cela permettrait la levée de l'inhibition par une augmentation de la lyse. Si une intégration de signaux est nécessaire au déclenchement de la lyse, une combinaison d'anticorps activateurs pourrait permettre de déclencher cette lyse. A ma connaissance, cette potentielle intégration de signaux n'a pas encore été étudiée pour les CD4 CTL ni les Tr1.

Concernant le mécanisme de lyse granzymes-dépendante, perforine-indépendante des ova-Tr1, une étude a précédemment démontré un mécanisme cytotoxique identique de lymphocytes T régulateurs induisant l'apoptose de ces lymphocytes T effecteurs²⁹³. En effet, cette activité cytotoxique était affectée seulement dans le cas de souris déficientes pour le granzyme B et non la perforine. Les auteurs n'ont pas révélé la voie d'entrée du granzyme B, cependant la granulysine, une molécule lytique exprimée par les ova-Tr1, pourrait remplacer la perforine pour l'entrée des granzymes¹²⁷. Dans notre étude, nous avons pu démontrer l'implication de la granulysine dans l'activité cytotoxique des ova-Tr1. Cependant, la granulysine peut avoir un deuxième mode d'action : elle est capable de pénétrer la membrane plasmique et d'activer directement la voie du cytochrome c pour induire l'apoptose¹²⁹. Ainsi deux premières hypothèses du fonctionnement moléculaire de lyse des ova-Tr1 sont possibles, (i) une entrée des granzymes *via* la granulysine et/ou (ii) une entrée et une action directe d'activation de l'apoptose par la granulysine. Nos résultats montrent une inhibition totale de la lyse des ova-Tr1 en bloquant l'activité des granzymes, éliminant la deuxième hypothèse. Ainsi, pour la première fois dans un modèle de membrane plasmidique d'une

cellule cible, nos résultats suggèrent l'entrée des granzymes *via* une perforation par la granulysine.

Proposition d'un modèle de fonctionnement des ova-Tr1 in vivo, dans le cadre de la thérapie

De manière plus globale, quel est l'avantage d'éliminer les cellules myéloïdes ? Il a été démontré, en plus de la présence de lymphocytes T effecteurs pathogéniques, que la population de monocytes pro-inflammatoires contribuait majoritairement aux infiltrats cellulaires au niveau de la muqueuse intestinale de patients atteints de la maladie de Crohn²⁹⁴. De plus, afin de réguler l'activation de nouveaux lymphocytes T effecteurs, l'élimination de cellules présentatrices de l'antigène semble judicieuse. Ainsi, une thérapie cellulaire comportant une capacité cytotoxique envers les cellules myéloïdes, en plus d'une activité suppressive sur les populations effectrices lymphoïdes, semble idéale pour la maladie aussi complexe et multifactorielle qu'est la maladie de Crohn. Ainsi les ova-Tr1 permettraient de contrôler l'inflammation sur tous les fronts afin d'obtenir une efficacité optimale.

Notre étude révèle une capacité de lyse graduelle dans le temps, avec sur un temps court, une faible proportion de cellules ayant une activité cytotoxique. Il serait alors judicieux d'identifier la participation de chaque cellule individuelle à la lyse globale. Comme démontré dans la première étude à laquelle j'ai participé, les CTL ont une capacité de lyse hétérogène. Cette hétérogénéité pourrait être expliquée pour un partage de fonctions entre sécrétion de cytokines et lyse. Sachant que des Tr1 sont capables d'une multitude de mécanismes d'action²⁴⁴, ce partage de fonctions serait alors pertinent. Pour cela, une analyse du comportement individuel des ova-Tr1 pourrait être caractérisé en bloquant un à un les mécanismes d'action afin de révéler un potentiel partage fonctionnel.

Sur la base de cette étude, je propose le modèle d'action *in vivo* suivant :

Directement après décongélation, les ova-Tr1 vont migrer vers le site de l'inflammation. En effet, le suivi du sang de patient post-injection ne révélait plus la présence des ova-Tr1 dans celui-ci. De plus, chez la souris, les études pré-cliniques ont démontré une présence au niveau du site d'inflammation. Par la suite, l'activité lytique vers les monocytes pro-inflammatoires et les APC peut se produire sans aucune reconnaissance préalable de l'antigène Ova. L'antigène ova pourrait potentialiser l'activité lytique mais serait particulièrement essentiel pour la survie et la prolifération des cellules ova-Tr1. D'après notre étude *in vitro*, suite à ces

événements, ils seront toujours capables d'avoir une activité lytique. L'apparition progressive et la capacité de maintenir l'activité lytique sur des périodes prolongées est un avantage de cette thérapie pour assurer une réponse ciblée aux cellules myéloïdes pro-inflammatoires en lien avec une pathologie inflammatoire chronique comme la maladie de Crohn.

En résumé, cette étude démontre pour la première fois le rôle prépondérant d'une activité cytotoxique, granulysine- et granzyme-dépendant, de lymphocytes T régulateurs pour une application en thérapie cellulaire. Cependant, l'avenir de cette étude serait l'identification des mécanismes moléculaires sous-jacents, en particulier le mécanisme de reconnaissance de la cellule cible et déclencheur de la lyse.

Conclusion

Ces travaux effectués au cours de ma thèse ont permis une caractérisation de la fonction cytotoxique de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) à plusieurs échelles. Tout d'abord, au niveau de la population avec une lyse soutenue sur des temps prolongés face à un excès de cibles. Cette lyse soutenue repose sur une capacité individuelle hétérogène à effectuer une lyse multiple. L'importance de cette activité de lyse soutenue a été renforcée par l'identification d'un défaut lytique particulièrement prononcé sur le long-terme chez des lymphocytes T CD8⁺ issus de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich. À l'échelle cellulaire et nanoscopique, nous avons pu identifier le rôle de WASP dans la formation du ring de nanoclusters de LFA-1, permettant le confinement des granules lytiques. L'application des connaissances, acquises dans ces deux études, à des lymphocytes T régulateurs de type 1 (ova-Tr1) utilisés en thérapie, ont permis la caractérisation d'un mécanisme de lyse alternatif. Les ova-Tr1 effectuent une lyse soutenue, indépendamment de l'activation du TCR, *via* la granulysine et les granzymes mais de manière perforine-indépendante.

Cependant, ces travaux soulèvent de nombreuses idées d'études transversales. Par exemple, le défaut de lyse soutenue des CTL WAS est-il lié à une diminution de la fréquence de la sous-population de CTL ayant une forte activité de lyse multiple ? Quelle est l'organisation de LFA-1 à la synapse de cette population de CTL, ou des ova-Tr1 ? La lyse soutenue de ova-Tr1 est-elle basée sur une hétérogénéité individuelle ? Le futur du laboratoire, ou de la recherche, pourra y répondre.

En résumé, ces travaux ont apporté de nouvelles connaissances fondamentales sur la fonction cytotoxique, mais aussi l'utilisation de cette fonction en thérapie cellulaire. Ceci renforce l'idée que cette fonctionnalité est nécessaire dans les réponses immunitaires. Néanmoins, il reste de nombreux éléments à découvrir, notamment sur les mécanismes alternatifs de cette fonction lytique.

Bibliographie

1. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11–22 (2004).
2. Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. 'Natural' killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* **5**, 117–121 (1975).
3. Herberman, R. B., Nu, M. E., Holden, H. T. & Lavrin, D. H. Natural cytotoxicity reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* **16**, 230–239 (1975).
4. Watzl, C. & Long, E. O. Signal Transduction During Activation and Inhibition of Natural Killer Cells. *Curr Protoc Immunol* Unit 11.9B (2010).
5. Long, E. O., Sik Kim, H., Liu, D., Peterson, M. E. & Rajagopalan, S. Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **31**, 1–36 (2013).
6. Pudifin, D. J., Harding, B. & MacLennan, I. C. M. The differential effect of γ irradiation on the sensitizing and effector stages of antibody dependent lymphocyte mediated cytotoxicity. *Immunology* **21**, 853–860 (1971).
7. Mandelboim, O. *et al.* Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5640–4 (1999).
8. Deguine, J., Breart, B., Lemaître, F., Di Santo, J. P. & Bousso, P. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8⁺ T cells during tumor regression. *Immunity* **33**, 632–644 (2010).
9. Bengsch, B. *et al.* Deep immune profiling by mass cytometry links human T and NK cell differentiation and cytotoxic molecule expression patterns. *J. Immunol. Methods* 3–10 (2017). doi:10.1016/j.jim.2017.03.009
10. Strid, J. *et al.* Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis. *Nat. Immunol.* **9**, 146–154 (2008).
11. Pereira, P. & Boucontet, L. Rates of recombination and chain pair biases greatly influence the primary gammadelta TCR repertoire in the thymus of adult mice. *J. Immunol.* **173**, 3261–70 (2014).
12. Pitard, V. *et al.* Long-term expansion of effector / memory V δ 2- $\gamma\delta$ T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Infection* **112**, 1–3 (2008).
13. Sell, S. *et al.* Control of Murine Cytomegalovirus Infection by $\gamma\delta$ T Cells. *PLOS Pathog.* **11**, 1–21 (2015).
14. Schild, H. *et al.* The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Cell* **76**, 29–37 (1994).
15. Weintraub, B. C., Jackson, M. R. & Hedrick, S. M. Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J. Immunol.* **153**, 3051–3058 (1994).
16. Tanaka, Y. *et al.* Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human [gamma][delta] T cells. *Nature* **375**, 155–158 (1995).
17. Matsuda, J. L. *et al.* Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid

- antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* **192**, 741–54 (2000).
18. Bendelac, A., Savage, P. B. & Teyton, L. The Biology of NKT Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 297–336 (2007).
 19. Tessmer, M. S., Fatima, A., Paget, C., Trottein, F. & Brossay, L. NKT cell immune responses to viral infection. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 153–62 (2009).
 20. Motohashi, S., Okamoto, Y., Yoshino, I. & Nakayama, T. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin. Immunol.* **140**, 167–176 (2011).
 21. Novak, J. & Lehuen, A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine* **53**, 263–270 (2011).
 22. Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. & Hafler, D. A. CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.* **167**, 1245–1253 (2001).
 23. Fontenot, J. D., Gavin, M. a & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–6 (2003).
 24. Vignali, D., Collison, L. & Workman, C. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**, 523–532 (2008).
 25. Ren, X. *et al.* Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Cell Death Differ.* **14**, 2076–2084 (2007).
 26. Magnani, C. F. *et al.* Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1652–1662 (2011).
 27. Schatorjé, E. J. H. *et al.* Paediatric Reference Values for the Peripheral T cell Compartment. *Scand. J. Immunol.* **75**, 436–444 (2012).
 28. Wagner, C. *et al.* Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* **103**, 1099 (2004).
 29. Elavazhagan, S. *et al.* Granzyme B Expression is Enhanced in Human Monocytes by TLR8 Agonists and Contributes to ADCC. *J. Immunol.* **194**, 2786–2795 (2015).
 30. Jahrsdörfer, B. *et al.* Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood* **115**, 1156–1165 (2010).
 31. Wang, S. *et al.* Natural Killer-like B Cells Prime Innate Lymphocytes against Microbial Infection. *Immunity* **45**, 131–144 (2016).
 32. Yang, Y. & Wilson, J. M. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4⁺ CTLs in vivo. *J Immunol* **155**, 2564–2570 (1995).
 33. Grubor-Bauk, B., Simmons, A., Mayrhofer, G. & Speck, P. G. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J. Immunol.* **170**, 1430–1434 (2003).
 34. Hansen, D. S. & Schofield, L. Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *Int. J. Parasitol.* **34**, 15–25 (2004).
 35. Roy, S. *et al.* NK Cells Lyse T Regulatory Cells That Expand in Response to an Intracellular Pathogen. *J Immunol Ref.* **180**, 1729–1736 (2008).
 36. Cook, K. D., Waggoner, S. N. & Whitmire, J. K. NK cells and their ability to modulate T

- cells during virus infections. *Crit. Rev. Immunol.* **34**, 359–88 (2014).
37. Waggoner, S. N., Cornberg, M., Selin, L. K. & Welsh, R. M. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* **481**, 394–8 (2012).
 38. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**, 1–27 (1970).
 39. Smyth, M. J. *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* **192**, 755–760 (2000).
 40. Clementi, R. *et al.* A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood* **105**, 4424–4428 (2005).
 41. Smyth, M. J. *et al.* Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* **191**, 661–668 (2000).
 42. Bousso, P. *et al.* Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires. *Immunity* **9**, 169–178 (1998).
 43. Arstila, T. P. A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science* **286**, 958–961 (1999).
 44. Blattman, J. N. *et al.* Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-specific CD8 T Cells. *J. Exp. Med.* **195**, 657–664 (2002).
 45. Casrouge, a *et al.* Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J. Immunol.* **164**, 5782–5787 (2000).
 46. Kedzierska, K. *et al.* Quantification of Repertoire Diversity of Influenza-Specific Epitopes with Predominant Public or Private TCR Usage. *J. Immunol.* **177**, 6705–6712 (2006).
 47. Kagi, D., Odermatt, B. & Mak, T. W. Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3262–72 (1999).
 48. De Saint Basile, G. & Fischer, A. The role of cytotoxicity in lymphocyte homeostasis. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 549–554 (2001).
 49. Stepp, S. E. *et al.* Perforin Gene Defects in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Science* **286**, 1957–1959 (1999).
 50. Menasche, G., Feldmann, J., Fischer, A. & De Saint Basile, G. Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol. Rev.* **203**, 165–179 (2005).
 51. Borrow, P., Tishon, A. & Oldstone, M. B. Infection of lymphocytes by a virus that aborts cytotoxic T lymphocyte activity and establishes persistent infection. *J. Exp. Med.* **174**, 203–212 (1991).
 52. Huang, J. *et al.* TCR-Mediated Internalization of Peptide-MHC Complexes Acquired by T Cells. *Science* **286**, 952–954 (1999).
 53. Stinchcombe, J. C. & Griffiths, G. M. The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8 + CTL. *Semin. Immunol.* **15**, 301–305 (2003).
 54. Yang, J., Huck, S. P., McHugh, R. S., Hermans, I. F. & Ronchese, F. Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8+ T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 147–152 (2006).

55. Sepulveda, F. E. *et al.* A novel immunoregulatory role for NK-cell cytotoxicity in protection from HLH-like immunopathology in mice. *Blood* **125**, 1427–1434 (2015).
56. de Saint Basile, G., Sepulveda, F. E., Maschalidi, S. & Fischer, A. Cytotoxic granule secretion by lymphocytes and its link to immune homeostasis. *F1000Res.* **4**, 930–938 (2015).
57. de Saint Basile, G. & Fischer, A. Defective cytotoxic granule-mediated cell death pathway impairs T lymphocyte homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**, 436–45 (2003).
58. Kagi, D., Odermatt, B., Ohashi, P. S., Zinkernagel, K. & Hengartner, H. Development of Insulinitis without Diabetes in Transgenic Mice Lacking Perforin-dependent Cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **183**, 2143–2152 (1996).
59. Kreuwel, H. T. *et al.* Comparing the relative role of perforin/granzyme versus Fas/Fas ligand cytotoxic pathways in CD8+ T cell-mediated insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* **163**, 4335–41. (1999).
60. Lunemann, A., Lunemann, J. D. & Munz, C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol. Med.* **15**, 352–358 (2009).
61. Sinha, S., Itani, F. R. & Karandikar, N. J. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol. Res.* **59**, 254–265 (2014).
62. Sinha, S., Boyden, A. W., Itani, F. R., Crawford, M. P. & Karandikar, N. J. CD8+ T-cells as immune regulators of multiple sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, 1–12 (2015).
63. Cantor, H. & Boyse, E. FUNCTIONAL SUBCLASSES OF T LYMPHOCYTES BEARING DIFFERENT Ly ANTIGENS I . The Generation of Functionally Distinct T-Cell Subclasses is a Differentiative Process Independent of Antigen. *J. Exp. Med.* **141**, 1376–1389 (1975).
64. Shiku, H. *et al.* Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *J. Exp. Med.* **141**, 227–41 (1975).
65. Kisielow, P. *et al.* Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature* **253**, 219–20 (1975).
66. Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E. J. & Ahmed, R. A brief history of CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 103–110 (2007).
67. Zhang, S., Zhang, H. & Zhao, J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 405–408 (2009).
68. Bourgeois, C., Bourgeois, C., Rocha, B. & Tanchot, C. A Role for CD40 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory. **297**, 2060–3 (2002).
69. Sanchez-Ruiz, Y., Valitutti, S. & Dupre, L. Stepwise maturation of lytic granules during differentiation and activation of human CD8 + T lymphocytes. *PLoS One* **6**, 1–11 (2011).
70. Gattinoni, L., Klebanoff, C. A. & Restifo, N. P. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 671–684 (2012).
71. De Rosa, S. C., Herzenberg, L. a, Herzenberg, L. a & Roederer, M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med.* **7**, 245–248 (2001).

72. Oberdoerffer, S. *et al.* Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science* **321**, 686–691 (2008).
73. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
74. Weninger, W., Crowley, M. A., Manjunath, N. & von Andrian, U. H. Migratory Properties of Naive, Effector, and Memory Cd8+ T Cells. *J. Exp. Med.* **194**, 953–966 (2001).
75. Gattinoni, L. *et al.* A human memory T cell subset with stem cell–like properties. *Nat. Med.* **17**, 1290–1297 (2011).
76. Pita-López, M. L., Pera, A. & Solana, R. Adaptive memory of human NK-like CD8+ T-cells to aging, and viral and tumor antigens. *Front. Immunol.* **7**, 1–8 (2016).
77. Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S. & Griffiths, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* **15**, 751–761 (2001).
78. Grakoui, a *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–227 (1999).
79. Billings, P., Burakoff, S., Dorf, M. & Benacerraf, B. Cytotoxic T lymphocytes specific for I region determinants do not require interactions with H-2K or D gene products. *J. Exp. Med* **145**, 1387–1392 (1977).
80. Jacobson, S. *et al.* Measles virus-specific T4+ human cytotoxic T cell clones are restricted by class II HLA antigens. *J. Immunol.* **133**, 754–7 (1984).
81. Muller, D. *et al.* LCMV-Specific , Class II-Restricted Cytotoxic T Cells in [beta]2-Microglobulin-Deficient Mice. *Science* **255**, 1576–8 (1992).
82. Casazza, J. P. *et al.* Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J. Exp. Med.* **203**, 2865–2877 (2006).
83. Sun, Q., Burton, R. L. & Lucas, K. G. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4+cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus–specific T-cell cultures. **99**, 3302–3309 (2002).
84. Appay, V. *et al.* Characterization of CD4+ CTLs Ex Vivo. *J. Immunol.* **168**, 5954–5958 (2002).
85. Klucar, P. *et al.* Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen. *Hum. Immunol.* **69**, 475–483 (2008).
86. Namekawa, T., Wagner, U. G., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* **41**, 2108–2116 (1998).
87. Quezada, S. A. *et al.* Tumor-reactive CD4 + T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **207**, 637–650 (2010).
88. Yasukawa, M. *et al.* Fas-Independent Cytotoxicity Mediated by Human CD4 + CTL Directed Against Herpes Simplex Virus-Infected Cells. *J. Immunol.* **162**, 6100–6 (1999).
89. Brown, D. M., Kamperschroer, C., Dilzer, A. M., Roberts, D. M. & Swain, S. L. IL-2 and

- antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4⁺ T cells. *Cell. Immunol.* **257**, 69–79 (2009).
90. Haigh, T. a *et al.* EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4⁺ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines. *J. Immunol.* **180**, 1643–1654 (2008).
 91. Brien, J. D., Uhrlaub, J. L. & Nikolich-Zugich, J. West Nile virus-specific CD4 T cells exhibit direct antiviral cytokine secretion and cytotoxicity and are sufficient for antiviral protection. *J. Immunol.* **181**, 8568–8575 (2008).
 92. Lancki, D. W., Hsieh, C.-S. & Fitch, F. W. Mechanisms of lysis by cytotoxic T lymphocyte clones: Lytic activity and gene expression in cloned antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* **146**, 3242–3249 (1991).
 93. Brown, D. M. Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell. Immunol.* **262**, 89–95 (2010).
 94. Sujino, T. *et al.* Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4⁺ T cells controls gut inflammation. *Science (80-.).* **352**, 1581–1586 (2016).
 95. Takeuchi, A. *et al.* CRTAM determines the CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J. Exp. Med.* **213**, 123–138 (2016).
 96. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4⁺ T cells, their differentiation and function. *Front. Immunol.* **8**, 1–7 (2017).
 97. Hildemann, S. K. *et al.* High Efficiency of Antiviral CD4⁺ Killer T Cells. *PLoS One* **8**, e60420 (2013).
 98. Monks, C. R. F., Freiberg, B. a, Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–86 (1998).
 99. Huppa, J. B. & Davis, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 973–983 (2003).
 100. Dustin, M. L. The Cellular Context of T Cell Signaling. *Immunity* **30**, 482–492 (2009).
 101. Freiberg, B. A. *et al.* Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat. Immunol.* **3**, 911–917 (2002).
 102. Allenspach, E. J. *et al.* ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* **15**, 739–750 (2001).
 103. Davis, S. J. & van der Merwe, P. A. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* **7**, 803–9 (2006).
 104. Ritter, A. T. *et al.* Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse. *Immunity* **42**, 864–876 (2015).
 105. Rak, G. D., Mace, E. M., Banerjee, P. P., Svitkina, T. & Orange, J. S. Natural Killer Cell Lytic Granule Secretion Occurs through a Pervasive Actin Network at the Immune Synapse. *PLOS Biol.* **9**, 1–15 (2011).
 106. Betts, M. R. *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* **281**, 65–78 (2003).
 107. Muralitharan, S. *et al.* Novel spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in ethnic Omani patients. *Am. J. Hematol.* **82**,

- 1099–102 (2007).
108. Tschopp, J., Masson, D. & Stanley, K. K. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature* **322**, 831–4 (1986).
 109. Henkart, M. P. & Henkart, P. A. Lymphocyte mediated cytotoxicity as a secretory phenomenon. *Adv Exp Med Biol* **146**, 227–47 (1982).
 110. Baran, K. *et al.* The Molecular Basis for Perforin Oligomerization and Transmembrane Pore Assembly. *Immunity* **30**, 684–695 (2009).
 111. Motyka, B. *et al.* Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell-Induced Apoptosis. *Cell* **103**, 491–500 (2000).
 112. Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 15–25 (2009).
 113. Shi, L. *et al.* Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *J. Immunol.* **174**, 5456–5461 (2005).
 114. Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H. & Ley, T. J. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**, 977–987 (1994).
 115. Beresford, P. J. *et al.* Granzyme A Activates an Endoplasmic Reticulum-associated Caspase-independent Nuclease to Induce Single-stranded DNA Nicks. *J. Biol. Chem.* **276**, 43285–43293 (2001).
 116. Lieberman, J. & Fan, Z. Nuclear war: The granzyme A-bomb. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 553–559 (2003).
 117. Cullen, S. P., Adrain, C., Lüthi, A. U., Duriez, P. J. & Martin, S. J. Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. *J. Cell Biol.* **176**, 435–444 (2007).
 118. Sutton, V. R. *et al.* Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1403–14 (2000).
 119. Alimonti, J. B., Shi, L., Baijal, P. K. & Greenberg, a H. Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **276**, 6974–6982 (2001).
 120. Slee, E. A. *et al.* Elizabeth A. Slee, Mary T. Harte, Ruth M. Kluck, Beni B. Wolf, Carlos A. Casiano, Donald D. Newmeyer, Hong-Gang Wang,. *J. Cell Biol.* **144**, 281–292 (1999).
 121. Medema, J. P. *et al.* Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3492–3498 (1997).
 122. Sutton, V. R., Wowk, M. E., Cancilla, M. & Trapani, J. A. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* **18**, 319–329 (2003).
 123. Adrain, C., Murphy, B. M. & Martin, S. J. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* **280**, 4663–4673 (2005).

124. Atkinson, E. A. *et al.* Cytotoxic T Lymphocyte-assisted Suicide. *J. Biol. Chem.* **273**, 21261–21266 (1998).
125. Hoves, S., Trapani, J. A. & Voskoboinik, I. The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 237–243 (2010).
126. Clayberger, C. & Krensky, A. M. Granulysin. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 560–565 (2003).
127. Walch, M. *et al.* Cytotoxic Cells Kill Intracellular Bacteria through Granulysin-Mediated Delivery of Granzymes. *Cell* **157**, 1309–23 (2014).
128. Anderson, D. *et al.* Granulysin Crystal Structure and a Structure-derived Lytic Mechanism. *J. Mol. Biol.* **325**, 355–365 (2003).
129. Saini, R. V. *et al.* Granulysin Delivered by Cytotoxic Cells Damages Endoplasmic Reticulum and Activates Caspase-7 in Target Cells. *J. Immunol.* **186**, 3497–3504 (2011).
130. Dalton, D. K. *et al.* Multiple Defects of Immune Cell Function in Mice with Disrupted Interferon- γ Genes. *Science* **259**, 1739–42 (1993).
131. Wang, B. Z., Reiner, S. L., Zheng, S., Dalton, D. K. & Locksley, R. M. CD4 + Effector Cells Default to the Th2 Pathway in Interferon γ -deficient Mice Infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **179**, 1367–1371 (1994).
132. Cooper, B. A. M. *et al.* Disseminated Tuberculosis in Interferon [gamma] Gene-disrupted Mice. *J. Exp. Med.* **178**, 2243–2247 (1993).
133. Huang, S. *et al.* Immune Response in Mice That Lack the Interferon- γ Receptor. *Science* **259**, 1742–1745 (1993).
134. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- γ . *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–95 (1997).
135. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon- γ : an overview of signals , mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163–189 (2004).
136. Schoenborn, J. R. & Wilson, C. B. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Adv. Immunol.* **96**, 41–101 (2007).
137. Serhan, C. N., Ward, P. A. & Gilroy, D. W. Fundamentals of inflammation. *Cambridge Univ. Press* 64–65 (2010).
138. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487–501 (2001).
139. Liu, A. N. *et al.* Perforin-Independent CD8+ T-Cell-Mediated Cytotoxicity of Alveolar Epithelial Cells Is Preferentially Mediated by Tumor Necrosis Factor- α . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 849–858 (1999).
140. Ostergaard, H. L., Kane, K. P., Mescher, M. F. & Clark, W. R. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* **330**, 71–2 (1987).
141. Rouvier, E., Luciani, M. F. & Golstein, P. Fas involvement in CA 2+ -independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **177**, 195–200 (1993).
142. Powell, W. C., Fingleton, B., Wilson, C. L., Boothby, M. & Matrisian, L. M. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* **9**, 1441–1447 (1999).
143. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1 / Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675–1687

- (1998).
144. Li, M. *et al.* Folic acid reduces adhesion molecules VCAM-1 expression in aortic of rats with hyperhomocysteinemia. *Int. J. Cardiol.* **106**, 285–288 (2006).
 145. Russell, J. H. & Ley, T. J. LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 323–70 (2002).
 146. Ju, S., Cui, H., Panka, D. J., Ettingert, R. & Marshak-rothstein, A. N. N. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD⁺ Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells. **91**, 4185–4189 (1994).
 147. Williams, N. S. & Engelhard, V. H. Identification of a population of CD4⁺ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J. Immunol.* **156**, 153–59 (1996).
 148. Schulz, M. *et al.* Acute rejection of vascular heart allografts by perforin-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **25**, 474–480 (1995).
 149. Graubert, T. A., Dipersio, J. F., Russell, J. H. & Ley, T. J. Perforin / granzyme-dependent and Independent Mechanisms are Both Important for the Development of Graft-versus-host Disease After Murine Bone Marrow Transplantation. *J. Clin. Invest.* **100**, 904–911 (1997).
 150. Clementi, R. *et al.* Inherited Perforin and Fas Mutations in a Patient with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome and Lymphoma. *Blood* **104**, 1379 (2015).
 151. Gholam, C., Grigoriadou, S., Gilmour, K. C. & Gaspar, H. B. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: Advances in the genetic basis, diagnosis and management. *Clin. Exp. Immunol.* **163**, 271–283 (2011).
 152. Picard, C. *et al.* Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* **35**, 696–726 (2015).
 153. Dupré, L. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* **17**, 157–166 (2002).
 154. De Meester, J., Calvez, R., Valitutti, S. & Dupré, L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 1031–1040 (2010).
 155. Wiskott, A. Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii? *Monatsschr Kinderheilkd* **68**, 212–216 (1937).
 156. Aldrich, R. A., Steinberg, A. G. & Campbell, D. C. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics* **13**, 133–9 (1954).
 157. Ochs, H. D. & Thrasher, A. J. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 725–738 (2006).
 158. Ochs, H. D., Filipovich, A. H., Veys, P., Cowan, M. J. & Kapoor, N. Wiskott-Aldrich Syndrome: Diagnosis, Clinical and Laboratory Manifestations, and Treatment. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**, 84–90 (2009).
 159. Derry, J. M., Ochs, H. D. & Francke, U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**, 635–644 (1994).

160. Parolini, O. *et al.* Expression of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) Gene During Hematopoietic Differentiation. *Blood* **90**, 70–75 (1997).
161. Thrasher, A. J. & Burns, S. O. WASP: a key immunological multitasker. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 182–192 (2010).
162. Lorenzi, R., Brickell, P. M., Katz, D. R., Kinnon, C. & Thrasher, a J. Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* **95**, 2943–2946 (2000).
163. Leverrier, Y. *et al.* Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *J. Immunol.* **166**, 4831–4834 (2001).
164. Tsuboi, S. & Meerloo, J. Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *J. Biol. Chem.* **282**, 34194–34203 (2007).
165. Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. & Aepfelbacher, M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9648–9653 (1999).
166. Badolato, R. *et al.* Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Immunol.* **161**, 1026–33 (1998).
167. Binks, M. *et al.* Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3259–67 (1998).
168. Zicha, D. *et al.* Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br. J. Haematol.* **101**, 659–665 (1998).
169. Zhang, H. *et al.* Impaired Integrin-Dependent Function in Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-Deficient Murine and Human Neutrophils. *Immunity* **25**, 285–295 (2006).
170. Stabile, H. *et al.* Impaired NK-cell migration in WAS/XLT patients: Role of Cdc42/WASp pathway in the control of chemokine-induced $\beta 2$ integrin high-affinity state. *Blood* **115**, 2818–2826 (2010).
171. Orange, J. S. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11351–11356 (2002).
172. Gismondi, A. *et al.* Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: Ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood* **104**, 436–443 (2004).
173. Bouma, G. *et al.* Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T cell priming Cytoskeletal remodeling mediated by WASp in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T cell priming. **118**, 2492–2502 (2011).
174. Malinova, D. *et al.* WASp-dependent actin cytoskeleton stability at the dendritic cell immunological synapse is required for extensive, functional T cell contacts. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 699–710 (2016).
175. Westerberg, L. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response.

- Blood* **105**, 1144–1152 (2005).
176. Andreu, N., Aran, J. M. & Fillat, C. Novel membrane cell projection defects in Wiskott-Aldrich syndrome B cells. *Int. J. Mol. Med.* **20**, 445–450 (2007).
 177. Westerberg, L., Greicius, G., Snapper, S. B., Aspenstrom, P. & Severinson, E. Cdc42, Rac1, and the Wiskott-Aldrich syndrome protein are involved in the cytoskeletal regulation of B lymphocytes. *Blood* **98**, 1086–1094 (2001).
 178. Meyer-bahlburg, A. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in B cells results in impaired peripheral homeostasis. **112**, 4158–4170 (2015).
 179. Recher, M. *et al.* B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood* **119**, 2819–2828 (2012).
 180. Badour, K. *et al.* The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity* **18**, 141–154 (2003).
 181. Calvez, R. *et al.* The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* **96**, 1415–1423 (2011).
 182. Molina, I. J., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F. S. & Remold-O'Donnell, E. T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J. Immunol.* **151**, 4383–90 (1993).
 183. Morales-Tirado, V. *et al.* Cutting Edge: Selective Requirement for the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in Cytokine, but Not Chemokine, Secretion by CD4+ T Cells. *J. Immunol.* **173**, 726–730 (2004).
 184. Trifari, S. *et al.* Defective Th1 Cytokine Gene Transcription in CD4+ and CD8+ T Cells from Wiskott-Aldrich Syndrome Patients. *J. Immunol.* **177**, 7451–7461 (2006).
 185. Taylor, M. D. *et al.* Nuclear role of WASp in the pathogenesis of dysregulated TH1 immunity in human Wiskott-Aldrich syndrome. *Sci Transl Med* **2**, 37ra44 (2010).
 186. Maillard, M. H. *et al.* The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 381–391 (2007).
 187. Marangoni, F. *et al.* WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 369–380 (2007).
 188. Cotta-de-Almeida, V., Dupré, L., Guipouy, D. & Vasconcelos, Z. Signal integration during T lymphocyte activation and function: Lessons from the Wiskott-Aldrich syndrome. *Front. Immunol.* **6**, 1–11 (2015).
 189. Imai, K. *et al.* Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Gene* **103**, 456–464 (2004).
 190. Jin, Y. *et al.* Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots , effect on transcription , and translation and phenotype / genotype correlation. *Blood* **104**, 4010–4019 (2004).
 191. Sullivan, K., Mullen, C., Blaese, R. & Winkelstein, J. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Pediatr.* **125**, 876–85 (1994).

192. Buchbinder, D., Nugent, D. J. & Fillipovich, A. H. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl. Clin. Genet.* **7**, 55–66 (2014).
193. Humblet-baron, S. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J. Clin.* **117**, 407–418 (2007).
194. Orange, J. S. *et al.* IL-2 induces a WAVE2-dependent pathway for actin reorganization that enables WASp-independent human NK cell function. *J. Clin. Invest.* **121**, 1535–1548 (2011).
195. Strom, T. S. *et al.* Defects in T-cell – mediated immunity to influenza virus in murine Wiskott-Aldrich syndrome are corrected by oncoretroviral vector – mediated gene transfer into repopulating hematopoietic cells. *Blood* **102**, 3108–3116 (2003).
196. Andreansky, S. *et al.* WASP- mice exhibit defective immune responses to influenza A virus, Streptococcus pneumoniae, and Mycobacterium bovis BCG. *Exp. Hematol.* **33**, 443–451 (2005).
197. Morio, T. *et al.* The increase of non-MHC-restricted cytotoxic cells (gamma/delta-TCR-bearing T cells or NK cells) and the abnormal differentiation of B cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **52**, 279–90 (1989).
198. Morio, T., Nagasawa, M., Nonoyama, S., Okawa, H. & Yata, J. Phenotypic profile and functions of T cell receptor-gamma delta-bearing cells from patients with primary immunodeficiency syndrome. *J Immunol* **144**, 1270–1275 (1990).
199. Lafouresse, F. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4 + T-cell motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* **137**, 183–196 (2012).
200. Schürpf, T. & Springer, T. A. Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *EMBO J.* **30**, 4712–4727 (2011).
201. Simonson, W. T. ., Franco, S. J. & Huttenlocher, A. Talin1 regulates TCR-mediated LFA-1 function. *J. Immunol.* **177**, 7707–14 (2006).
202. Somersalo, K. *et al.* Cytotoxic T lymphocytes form an antigen-independent ring junction. *J. Clin. Invest.* **113**, 49–57 (2004).
203. Sasahara, Y. *et al.* Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol. Cell* **10**, 1269–1281 (2002).
204. Brunet, J.-F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* **328**, 267–270 (1987).
205. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887–95 (1992).
206. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
207. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12293–12297 (2002).
208. Ribas, A. Anti-CTLA4 antibody clinical trials in melanoma. *Update Cancer Ther.* **2**, 133–139 (2007).

209. Mukherji, B. *et al.* Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8078–82 (1995).
210. Hsu, F. J. *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **2**, 52–58 (1996).
211. Palucka, K. & Banchereau, J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity* **39**, 38–48 (2013).
212. Gaur, A., Wiers, B., Liu, A., Rothbard, J. & Fathman, C. G. Amelioration of autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein synthetic peptide-induced anergy. *Science* **258**, 1491–1494 (1992).
213. Thorstenson, K. M. & Khoruts, A. Generation of Anergic and Potentially Immunoregulatory CD25+CD4 T Cells In Vivo After Induction of Peripheral Tolerance with Intravenous or Oral Antigen. *J. Immunol.* **167**, 188–195 (2001).
214. Woods, G. M. *et al.* Prevention of Autoimmunity by Induction of Cutaneous Tolerance. *Cell. Immunol.* **207**, 1–5 (2001).
215. Tian, J. *et al.* Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat. Med.* **2**, 1348–53 (1996).
216. Tisch, R., Wang, B. & Serreze, D. V. Induction of glutamic acid decarboxylase 65-specific Th2 cells and suppression of autoimmune diabetes at late stages of disease is epitope dependent. *J. Immunol.* **163**, 1178–87 (1999).
217. Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M. & Schneck, J. Adoptive T Cell Immunotherapy For Cancer. *Rambam Maimonides Med. J.* **6**, e0004 (2015).
218. Safinia, N., Sagoo, P., Lechler, R. & Lombardi, G. Adoptive regulatory T cell therapy: challenges in clinical transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **15**, 427–34 (2010).
219. June, C. H. C. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.* **117**, 1466–1476 (2007).
220. Mulé, J., Shu, S., Shwarz, S. & Rosenberg, S. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* **225**, 1487–1490 (1984).
221. Bennouna, J. *et al.* Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1599–1609 (2008).
222. Kobayashi, H., Tanaka, Y., Shimmura, H., Minato, N. & Tanabe, K. Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous gammadelta T-cells in a patient with renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* **30**, 575–579 (2010).
223. Nakajima, J. *et al.* A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous $\gamma\delta$ T cells. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **37**, 1191–1197 (2010).
224. Figlin Pierce, WC, Kaboo, R, Tso, CL, Moldawer, N, Gitlitz, B, deKernion, J, Belldegrin, A, R. A. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2

- and cytokine-primed or CD8+ selected tumor-infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J Urol* **158**, 740–745 (1997).
225. Dréno, B. *et al.* Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 539–46 (2002).
 226. Fesnak, A. D., June, C. H. & Levine, B. L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 566–581 (2016).
 227. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>.
 228. <https://www.jnj.com/innovation/next-frontier-in-cancer-care-what-is-car-t-cell-therapy>.
 229. Taams, L. S. *et al.* Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* **118**, 1–9 (2006).
 230. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 490–500 (2010).
 231. Abbas, A. K. *et al.* Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat. Immunol.* **14**, 307–308 (2013).
 232. Schmetterer, K. G., Neunkirchner, a. & Pickl, W. F. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* **26**, 2253–2276 (2012).
 233. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**, 303–310 (2000).
 234. McHugh, R. S. *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311–323 (2002).
 235. Borsellino, G. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3. *Blood* **110**, 1225–1233 (2007).
 236. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *J. Exp. Med.* **190**, 995–1004 (1999).
 237. Nakamura, K. *et al.* TGF- 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4+CD25+ Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice. *J. Immunol.* **172**, 834–842 (2004).
 238. Chaturvedi, V., Collison, L. W., Guy, C. S., Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. Cutting Edge: Human Regulatory T Cells Require IL-35 To Mediate Suppression and Infectious Tolerance. *J. Immunol.* **186**, 6661–6666 (2011).
 239. Grossman, W. J. *et al.* Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* **21**, 589–601 (2004).
 240. Wing, K. *et al.* CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
 241. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).

242. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).
243. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1303–1310 (2007).
244. Gregori, S., Passerini, L. & Roncarolo, M. G. Clinical outlook for type-1 and FOXP3+ T regulatory cell-based therapy. *Front. Immunol.* **6**, 1–8 (2015).
245. Groux, H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Transfus. Med. Rev.* **12**, 230–231 (1998).
246. Gregori, S., Goudy, K. S. & Roncarolo, M. G. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front. Immunol.* **3**, 1–12 (2012).
247. Gagliani, N. *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* **19**, 739–746 (2013).
248. Bacchetta, R. *et al.* Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2237–2245 (2002).
249. Häringer, B., Lozza, L., Steckel, B. & Geginat, J. Identification and characterization of IL-10/IFN-gamma-producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J. Exp. Med.* **206**, 1009–1017 (2009).
250. Mascanfroni, I. D. *et al.* Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat. Med.* **21**, 638–646 (2015).
251. Vieira, P. L. *et al.* IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **172**, 5986–5993 (2004).
252. Levings, M. K. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25 + CD4 + Treg cells. *Blood* **105**, 1162–1169 (2005).
253. Brun, V., Bastian, H., Neveu, V. & Foussat, A. Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 609–613 (2009).
254. Brun, V. *et al.* Isolation of functional autologous collagen-II specific IL-10 producing Tr1 cell clones from rheumatoid arthritis blood. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1074–1078 (2011).
255. Roncarolo, M.-G. & Battaglia, M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 585–598 (2007).
256. Tang, Q., Bluestone, J. a & Kang, S. Review CD 4 + Foxp 3 + regulatory T cell therapy in transplantation. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 11–21 (2012).
257. Bluestone, J. a, Trotta, E. & Xu, D. The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **8222**, 1–13 (2015).
258. Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R. & Edinger, M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4+ CD25high regulatory T cells. *Blood* **104**, 895–904 (2004).

259. Godfrey, W. R. *et al.* In vitro-expanded human CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* **104**, 453–461 (2004).
260. Trzonkowski, P. *et al.* First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁺ T regulatory cells. *Clin. Immunol.* **133**, 22–26 (2009).
261. Brunstein, C. G. *et al.* Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood : safety profile and detection kinetics Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood : safety profile and. *Blood* **117**, 1061–1070 (2013).
262. Di Ianni, M. *et al.* Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* **117**, 3921–3928 (2011).
263. Martelli, M. F. *et al.* HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* **124**, 638–644 (2014).
264. Marek-Trzonkowska, N. *et al.* Regulatory T Cells Preserves B -Cell Function in Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes Care* **35**, 1817–1820 (2012).
265. Bacchetta, R. *et al.* Immunological outcome in haploidentical-HSC transplanted patients treated with IL-10-anergized donor T Cells. *Front. Immunol.* **5**, 1–14 (2014).
266. Bluestone, J. A. *et al.* Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* **7**, 1–14 (2015).
267. Desreumeaux, P. *et al.* Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients With Refractory Crohn ' s Disease. *Gastroenterology* **143**, 1207–1217.e2 (2012).
268. Molodecky, N. A. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46–54 (2012).
269. Kaser, A., Zeissig, S. & Blumberg, R. S. Inflammatory bowel disease. *Annu. Reveiw Immunol.* **28**, 573–621 (2010).
270. Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Crohn's disease. *Lancet* **380**, 1590–1605 (2012).
271. Feuerstein, J. D. & Cheifetz, A. S. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clin. Proc.* **92**, 1088–1103 (2017).
272. Best, W., Bechtel, J., Singleton, J. & Kern, F. J. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* **70**, 439–44 (1976).
273. Winship, D. *et al.* National Cooperative Crohn's Disease Study: study design and conduct of the study. *Gastroenterology* **77**, 829–42 (1979).
274. Morel, A. La maladie de Crohn, epidemiologie, traitements actuels et en développement dont l'anticorps anti-integrine alpha4beta7. (2014).
275. Brunner, K. T., Mauel, J., Cerottini, J. C. & Chapuis, B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**, 181–96 (1968).

276. Song, Y., Zhang, X., Huang, L., Behlke, M. a & Tsourkas, A. Real-time Imaging of Single Engineered RNA Transcripts in Living Cells Using Ratiometric Bimolecular Beacons. *J. Vis. Exp.* **16**, 1–7 (2014).
277. Buchholz, V. *et al.* Disparate individual fates compose robust CD8+ T cell immunity. *Science* **340**, 630–5 (2013).
278. Beuneu, H. *et al.* Visualizing the Functional Diversification of CD8+ T Cell Responses in Lymph Nodes. *Immunity* **33**, 412–423 (2010).
279. Gerlach, C. *et al.* Heterogeneous Differentiation Patterns of Individual CD8+ T Cells. *Science* **340**, 635–639 (2013).
280. Lemaître, F., Moreau, H. D., Vedele, L. & Bousso, P. Phenotypic CD8+ T cell diversification occurs before, during, and after the first T cell division. *J. Immunol.* **191**, 1578–85 (2013).
281. Varadarajan, N. *et al.* A high-throughput single-cell analysis of human CD8 + T cell functions reveals discordance for cytokine secretion and cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **121**, 4322–4331 (2011).
282. Sims, T. N. *et al.* Opposing Effects of PKC θ and WASp on Symmetry Breaking and Relocation of the Immunological Synapse. *Cell* **129**, 773–785 (2007).
283. Krummel, M. F. Immunological Synapses: Breaking Up May Be Good to Do. *Cell* **129**, 653–655 (2007).
284. Cambi, A. *et al.* Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4270–81 (2006).
285. Kaizuka, Y., Douglass, A. D., Varma, R., Dustin, M. L. & Vale, R. D. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20296–20301 (2007).
286. Comrie, W. A., Babich, A. & Burkhardt, J. K. F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *The Journal of Cell Biology* **208**, 475–491 (2015).
287. Stinchcombe, J. C. & Griffiths, G. M. Secretory Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 495–517 (2007).
288. Basu, R. *et al.* Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell* **165**, 100–110 (2016).
289. Basu, R. & Huse, M. Mechanical Communication at the Immunological Synapse. *Trends Cell Biol.* **27**, 241–254 (2017).
290. Yu, H. *et al.* Intestinal type 1 regulatory T cells migrate to periphery to suppress diabetogenic T cells and prevent diabetes development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 10443–8 (2017).
291. Brooks, C. R., Elliott, T., Parham, P. & Khakoo, S. I. The inhibitory receptor NKG2A determines lysis of vaccinia virus-infected autologous targets by NK cells. *J. Immunol.* **176**, 1141–1147 (2006).
292. Placke, T., Salih, H. R. & Kopp, H.-G. GITR Ligand Provided by Thrombopoietic Cells Inhibits NK Cell Antitumor Activity. *J. Immunol.* **189**, 154–160 (2012).

293. Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J. Immunol.* **174**, 1783–1786 (2005).
294. Linton, L. *et al.* HLA-DR(hi) and CCR9 Define a Pro-Inflammatory Monocyte Subset in IBD. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **3**, e29 (2012).

Annexes

Contenu des annexes:

- Cotta-de-Almeida, V., Dupré, L., Guipouy, D. & Vasconcelos, Z. Signal integration during T lymphocyte activation and function: Lessons from the Wiskott-Aldrich syndrome. *Front. Immunol.* **6**, 1-11 (2015).



Signal integration during T lymphocyte activation and function: lessons from the Wiskott–Aldrich syndrome

Vinicius Cotta-de-Almeida¹, Loïc Dupré^{2,3,4*}, Delphine Guipouy^{2,3,4} and Zilton Vasconcelos⁵

¹ Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

² UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM, Toulouse, France

³ Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France

⁴ UMR 5282, CNRS, Toulouse, France

⁵ Fernandes Figueira Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Edited by:

Hans Dieter Ochs, University of Washington, USA

Reviewed by:

Lisa S. Westberg, Karolinska Institutet, Sweden

Emily Mace, Baylor College of Medicine, USA

Fabio Candotti, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Switzerland

*Correspondence:

Loïc Dupré, UMR 1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM, Purpan University Hospital, 1 Place du Dr. Baylac, Toulouse 31300, France
e-mail: loic.dupre@inserm.fr

Over the last decades, research dedicated to the molecular and cellular mechanisms underlying primary immunodeficiencies (PID) has helped to understand the etiology of many of these diseases and to develop novel therapeutic approaches. Beyond these aspects, PID are also studied because they offer invaluable natural genetic tools to dissect the human immune system. In this review, we highlight the research that has focused over the last 20 years on T lymphocytes from Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) patients. WAS T lymphocytes are defective for the WAS protein (WASP), a regulator of actin cytoskeleton remodeling. Therefore, study of WAS T lymphocytes has helped to grasp that many steps of T lymphocyte activation and function depend on the crosstalk between membrane receptors and the actin cytoskeleton. These steps include motility, immunological synapse assembly, and signaling, as well as the implementation of helper, regulatory, or cytotoxic effector functions. The recent concept that WASP also works as a regulator of transcription within the nucleus is an illustration of the complexity of signal integration in T lymphocytes. Finally, this review will discuss how further study of WAS may contribute to solve novel challenges of T lymphocyte biology.

Keywords: Wiskott–Aldrich syndrome, T lymphocytes, actin cytoskeleton, motility, immunological synapse, signaling, transcription

GENERAL PRESENTATION OF THE WISKOTT–ALDRICH SYNDROME

The Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) is an X-linked primary immunodeficiency (PID) characterized by the association of multiple clinical manifestations. Depending on disease severity, WAS patients may display susceptibility to viral, bacterial, and fungal infections, hemorrhages, eczema, multiple forms of autoimmune disorders, and susceptibility to develop hematological malignancies (1). The genetic defect at the origin of WAS has been identified 20 years ago (2), as mutations in the previously unknown gene encoding the WAS protein (WASP). This discovery has paved the way to the elucidation of WASP function. WASP expression is restricted to precursor and mature cells of the hematopoietic lineage (3), in which it promotes Arp2/3-dependent actin polymerization as an effector of the Rho GTPase Cdc42 (4, 5). Most of the defects associated with defective or abnormal WASP expression arise in mature hematopoietic cells rather than in their precursors. The nature of the mutations in the WAS gene and their consequence on the expression of WASP in hematopoietic cells correlate with the severity of the disease. The WASP-related pathologies include classical WAS (usually associated with defective WASP), X-linked thrombocytopenia (XLT, caused by residual point-mutated WASP), and X-linked neutropenia (XLN, caused by activating mutations). Over the last two decades, hundreds of studies have provided insights into how WASP regulates the activation and function of the different subsets of hematopoietic cells

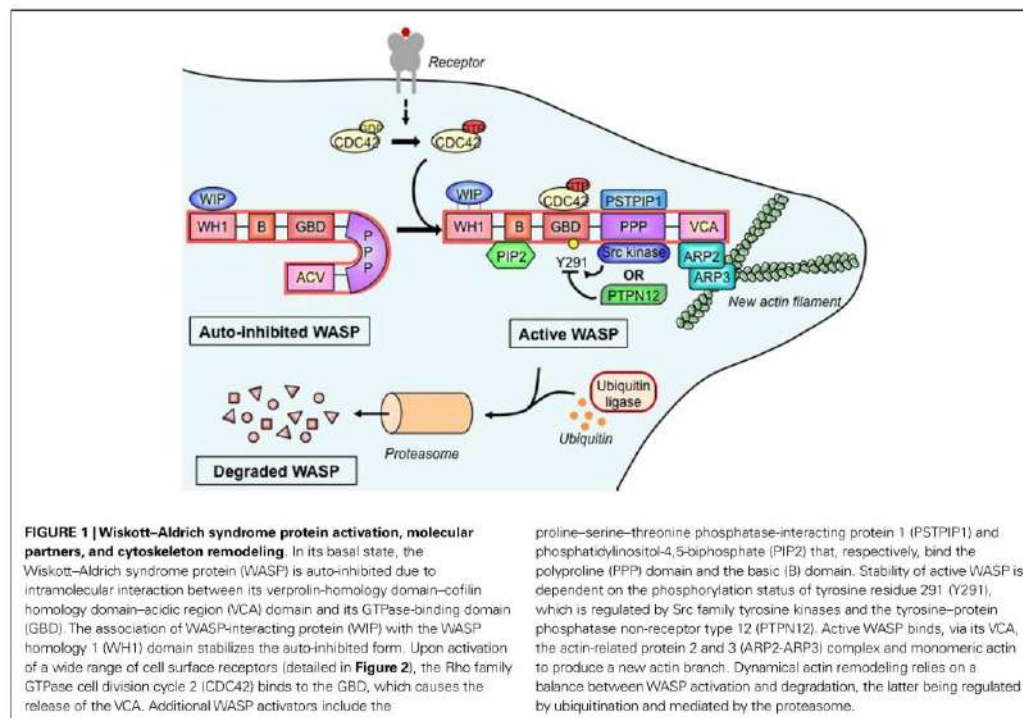
in which it is normally expressed (6). This has led to the notion that WAS results from the combination of a myriad of hematopoietic cell defects. In that respect, WASP deficiency illustrates how a single protein may participate in distinct functions in different cells (7). The ability of WASP to execute multiple tasks is linked to the fact that actin cytoskeleton remodeling is supporting many dynamic aspects of cell biology and that the different hematopoietic cells execute specific functions relying on a dynamic actin cytoskeleton.

The objective of this review is not to draw a comprehensive map of the functions executed by WASP in the numerous hematopoietic subsets. Instead, we will focus on the role played by WASP in T lymphocytes and will highlight how this line of research has contributed to our current understanding of signal integration during T lymphocyte activation and function. By attempting to link-specific WAS-related T lymphocytes defects to the clinical manifestations arising in WAS patients, we will also discuss how the study of WAS is helping us to understand the function of human T lymphocytes *in vivo*.

ROLE OF WASP IN THE MOLECULAR CONTROL OF T CELL ACTIVATION

STRUCTURAL DOMAINS AND MOLECULAR CONTROL OF WASP ACTIVITY

A close analysis of WASP reveals a molecular hub organized as a five-domain structured molecule (Figure 1). The first N-terminal



domain, WASP homology 1 (WH1; also defined as EVH1, for ENA/VASP homology 1) binds to a proline repeat motif present in WASP-interacting protein (WIP) and mediates a molecular interaction regarded as critical for keeping a stable and auto-inhibited WASP conformation. The basic region also participates in the regulation of WASP conformational status, as it binds to the phosphoinositide PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), which acts synergistically with the small GTPase Cdc42 to activate WASP (8). The GTPase binding domain (GBD), in a non-activated state of the WASP molecule, is found in an intramolecular hydrophobic link with the C-terminal VCA (composed by the verprolin-homology, central hydrophobic, and acidic regions) domain. Upon cell activation, GBD is the critical binding site for the active Cdc42-GTP, and such an interaction leads to a conformational change that releases the VCA domain, shifting auto-inhibited WASP to an active molecule. The proline-rich region contains several sites for binding of Src homology 3 (SH3) domain, playing a role as a central core for docking of various SH3 domain-containing proteins. The C-terminal VCA forms the actin-nucleating region of WASP. It binds both actin monomers and the Arp2/3 complex, which is composed of seven proteins that work together to assemble branches of actin that grow out of a pre-existing filament. Altogether, WASP binding regions provide a molecular hub for associations with several proteins that integrate distinct signals brought together during cellular WASP activity (7, 9).

In T cells, WASP is mainly found in a molecular association with WIP (**Figure 1**), a molecule regarded as the major controller of WASP activation (10). As shown by *in vitro* data, upon TCR stimulation, WIP recruits WASP to the immunological synapse and appears to facilitate Cdc42-mediated activation of WASP (11). On the other hand, *in vivo* studies showed that WIP favors WASP stability by working as a molecular chaperone (12). WASP activation is also under control of the phosphorylation at tyrosine residue 291 within GBD (**Figure 1**). Mediated by Src kinases, including Fyn and Lck, this phosphorylation acts synergistically with Cdc42 binding to activate WASP (13) and is likely to regulate various T cell functions (14). Therefore, dephosphorylation also controls WASP activity, possibly carried out by tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12 (PTPN12). As shown from mouse studies, this phosphatase interacts with WASP via proline, serine, threonine phosphatase-interacting protein 1 (PSTPIP1) and appears to mediate inhibition of WASP-induced immunological synapse formation (14). Additionally, the intramolecular GBD-VCA binding is regarded as a critical allosteric control of WASP activity, since mutations in GBD produce a constitutively active molecule that seems to directly affect myeloid and lymphoid cells, including lymphocyte number and proliferation, and increased T cell death and genomic instability, as found in X-linked neutropenia patients and in a mouse model (15–17).

Beyond the schematic representation of **Figure 1**, WASP-promoted actin nucleation appears to be regulated by interactive stoichiometry, as biochemical studies suggest that two WASP proteins provide a VCA dimer that delivers two actin monomers to the Arp2/3 complex (18). This process occurs upon WASP recruitment of Arp2/3 complex to inner cell membranes where they interact with actin filaments and, after an initial conformational activation of Arp2/3 complex, WASP proteins are dissociated and filament branching and growth can be carried out (19, 20).

Finally, WASP activity is also regulated through degradation (**Figure 1**). *In vitro* studies employing human T cells have shown that TCR ligation and tyrosine phosphorylation promote WASP cleavage by calpain and proteasomal degradation following Cbl E3 ligase-mediated ubiquitylation (12, 21, 22). Conversely, interaction with WIP leads to WASP protection (12), and disruption of the WIP–WASP partnership, due to mutations within the WH1 domain, could decrease the WASP cell pool, which forms the molecular basis for the several immune defects seen in WAS (23, 24). The relevance of WIP for WASP stability is supported by the recent demonstration that a patient genetically deficient in WIP showed clinical signs similar to those typical of WAS. In addition, WASP expression was corrected by the transduction of WIP into the T cells from this patient (24).

INPUT SIGNALS LEADING TO WASP ACTIVATION

The multidomain nature of WASP allows a complex molecular partnership that integrates different pathways contributing to the T cell activation *scenario*. Indeed, WASP has been shown to be activated by the triggering of numerous cell leukocyte surface receptors including the TCR, costimulatory receptors, integrins, and chemokine receptors. The pathways linking TCR-driven signaling to WASP activation are closely related to its localization at the immunological synapse. *In vitro* studies employing mouse and human T cell–APC conjugates demonstrated that TCR stimulation induces a proximal phosphorylation cascade driven by Lck, ZAP-70, and Itk kinases (25, 26). Upon ZAP-70-induced phosphorylation of the transmembrane adaptor protein LAT, a complex of scaffold proteins such as Grb-2, SLP-76, and Gads are assembled at the inner face of plasma membrane. WASP can be recruited to this complex through binding of its proline-rich region to SH3 domain of Nck1 (or Nck2), a molecule that contains an SH2 domain that allows direct interaction to tyrosine-phosphorylated SLP-76. These interactions recruit WASP to lipid rafts and to the immunological synapse and also promote its activation by bringing it close to the guanine exchange factor Vav1 and to membrane-bound Cdc42 (11, 25–27). In parallel, *in vitro* biochemical assays revealed that phosphorylation of human WASP at tyrosine 291 by the Src kinase Fyn is regarded as an associated pathway for WASP activation (28).

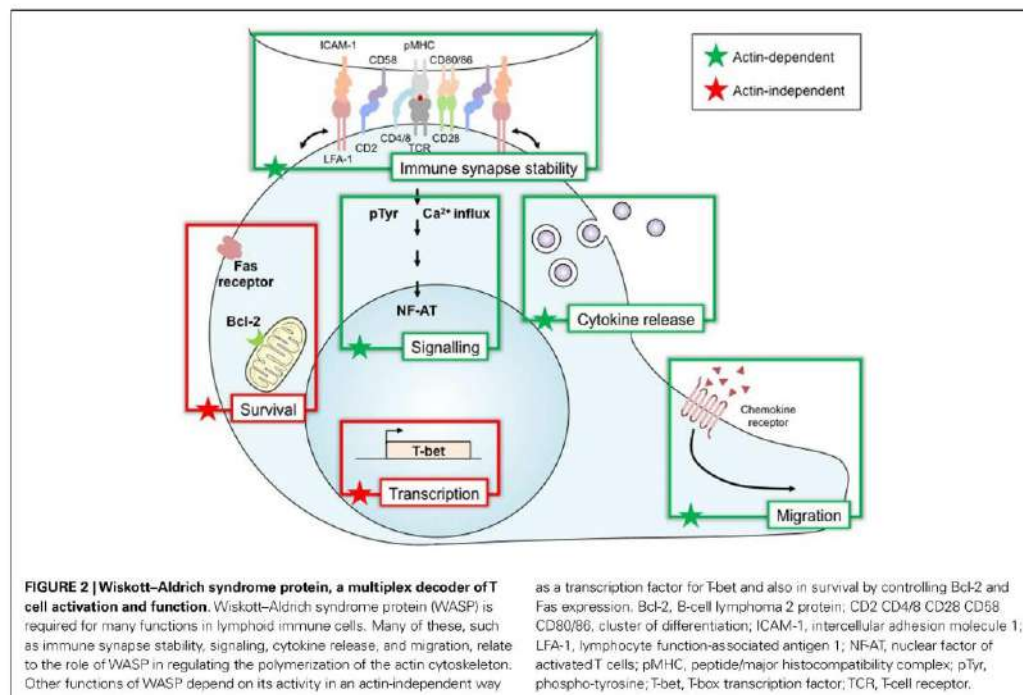
Signals triggered through TCR engagement also induce conformational activation of integrins (inside-out signaling), as seen for the $\beta 2$ integrin LFA-1 in the adhesive interaction with ICAM-1 on the APC surface. This high-affinity conformation of LFA-1 is organized in membrane microclusters that results in further adhesive strength for stable interaction and allows the intracellular $\beta 2$ -chain tail to interact with the actin cytoskeleton via actin-binding proteins, such as talin (29). Costimulatory receptors also

appear to collaborate with TCR-triggered WASP activation and subsequent actin rearrangement at the immunological synapse. CD28 signaling activates Vav1 and NF-AT signaling as well as actin rearrangement in T cells, events known to improve TCR activation (30). CD2 stimulation leads to WASP proline-rich domain binding with PSTPIP1, a SH3-containing adaptor protein, which recruits WASP to the immunological synapse, a molecular event that might explain the impaired actin polymerization *in vitro* following CD2 stimulation of WASP-deficient mouse T cells (31). Chemokine receptors also bring important signal input to WASP activation. They are G protein-coupled receptors that promote *in vitro* chemotaxis of human and mouse T cells by employing a signaling cascade that includes activation of Vav and Cdc42 and, consequently, WASP regulation of T cell migration (32, 33).

A concept of multiple receptors involved in relaying signals, which activate WASP can also be supported, as a recent *in vitro* study revealed that about 120 transmembrane or membrane-associated proteins can trigger actin rearrangement through activation of WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein) molecules (34). Adhesive and chemotactic stimuli seem to act cooperatively in controlling WASP activation, as suggested by the *in vitro* finding that fibronectin and CXCL12 promote additive Vav phosphorylation in human T cells, contributing for maximal migration (32). Costimulation signals also jointly work with other receptor-triggered actin-dependent process, as recently shown that *in vitro* NKG2D receptor costimulation regulates CXCL12-driven chemotaxis in human CD8⁺ T cells by increasing Cdc42 activity (35). Taken together, these findings point to a complex partnership constructing the signaling pathways from a coordinated response initiated by ligation of the TCR and its partner surface receptors toward localized WASP activation and subsequent actin remodeling.

DECODING WASP ACTIVATORY SIGNALS INTO CELLULAR MECHANISMS

Wiskott–Aldrich syndrome protein activation plays a pivotal role in regulating actin dynamics following T cell stimulation. In fact, adhesion, polarization and motility, cellular events that underscore various main T cell functions arise as a consequence of regulated actin rearrangements in response to TCR engagement along with ligation of chemokine receptors and integrins (36). Nevertheless, WASP has been reported to drive T cell activities that can be distinctly divided accordingly to their dependence or independence on actin remodeling (**Figure 2**). In this context, cognate interaction of T cells with APC results in a stable contact that employs T cell-derived actin-rich membrane protrusions extending toward the APC. This T cell activation-induced structure is the cellular basis for immunological synapse formation (37). Molecular imaging studies with human T cells have elegantly showed that actin polymerization is dynamically responsive to TCR triggering, initiating at the TCR signaling site and further remodeled by WASP recruitment and proximal tyrosine phosphorylation events (38). Although we still miss a direct evidence for WASP regulation of actin flow-driven TCR microcluster dynamics (39), WASP activation in both human and mouse T cells has been demonstrated to be critical for the late and more stable interaction that forms the long-lived immunological synapse (40, 41). WASP deficiency



seems to disorganize the immunological synapse *in vitro* as a consequence of impaired lipid raft clustering and scaffold signaling, resulting in abnormal localized actin polymerization (11, 27).

In parallel, as the cell secretion machinery is reoriented to this close contact site as well, this process also drives T cell effector functions associated with cytokine secretion (helper activity) and cytotoxicity (Figure 2). A mechanistic role can also be ascribed for WASP activity on these functions, since cytotoxic T cells from WAS patients show aberrant polarization of cytotoxic granules toward the T cell–target cell contact area (42). In addition, WASP-deficient mouse T cells were shown to present impaired IL-2 production and cytokine secretion (43). Actin remodeling is also reported to regulate appropriate calcium and NF-AT signaling in T cells (44). Moreover, active WASP appears to play a critical role in both sustained calcium signaling (40) and NF-AT translocation (45), as IL-2 transcription and production are impaired in WASP-deficient mouse T cells (45, 46). Cell migration toward chemokine gradients guides important T cell effector activities (47). These chemotactic activities are actin-dependent mechanisms that employ active WASP, as chemokine-induced migration and homing of mouse T cells have been defined as reduced as a consequence of WASP deficiency (33, 48).

Wiskott–Aldrich syndrome protein activation is also reported to regulate Th1 cytokine gene transcription (Figure 2). T cells from WAS patients showed reduced IL-2 and IFN- γ transcripts associated to impaired NF-AT translocation and T-BET transcription

following TCR/CD28 stimulation (49). Interestingly, the finding that WASP is present within human T cell nucleus and plays a pivotal role in regulating histone methylation at the *TBX21* promoter (50) reveals a regulated cytoplasmic-nuclear trafficking of WASP with direct effect on T-BET transcription and Th1 differentiation in an actin-independent manner (51).

Wiskott–Aldrich syndrome protein activation seems also to be involved in cell death receptor signaling (Figure 2), as some *in vitro* findings indicate that death-inducing signaling complex (DISC) assembly and Fas internalization induced by Fas signaling, including in human T lymphocytes, appears to be dependent on actin rearrangements (52). However, an actin-independent function for WASP in Fas signaling was suggested as well. Lymphocytes from WAS patients have increased CD95 expression and caspase-3 activity along with lower Bcl-2 expression (53, 54), which paralleled spontaneous accelerated apoptosis likely triggered via actin-independent mechanisms (54). Interestingly, TCR-stimulated CD4 T cells from WASP-deficient mice, which develop autoantibodies and glomerulonephritis, presented reduced apoptosis and FasL secretion (55). Altogether, these data indicate that WASP distinctly regulates spontaneous or TCR-induced cell death through mechanisms that include Fas/FasL signaling, controlling survival of normal T cells, and apoptosis of auto-reactive T cells. Nevertheless, impairment in both regulatory activities of WASP on T cell death can be related to immunodeficiency and autoimmunity in WAS patients.

These different WASP-driven cellular mechanisms might be regulated through distinct distribution of WASP and actin dynamics within subcellular compartments. Besides the localization in conjugated T cell–APC membranes and within the T cell nucleus, the targeting of WASP along with signaling molecules to the endocytic pathway points to an important subcellular localization of actin rearrangements following receptor engagement. TCR endocytosis triggered by antigen binding in human T cells was shown to be mediated by WASP activation upon binding to intercalin 2 (56). Moreover, *in vitro* studies demonstrated that human and mouse WASP bind to SNX9 (sorting nexin 9), a regulator of clathrin-mediated endocytosis (57). Such a binding seems to mediate both interaction with the PI3K pathway and CD28 endocytosis after TCR/CD28 costimulation. WASP seems to play an essential role in this process, as both CD28 endocytosis and actin rearrangements are impaired in WASP-deficient T cells (57). In spite of the critical signal transduction cascades evoked by input signals and the consequent WASP segregation into specific cell sites, how these subcellular compartments communicate to each other and which mechanisms control WASP trafficking (e.g., cytoplasm–nucleus) and its utilization from a common cellular pool are not yet established.

DEFECTIVE WASP EXPRESSION AND DYSREGULATED T CELL FUNCTION

Cell adhesion, shaping, and migration are critical events for T cell development and function. As T cells develop, they emigrate from the thymus, enter in peripheral lymphoid organs, are activated after contacting cognate APC and, ultimately, work as helper, regulatory, or cytotoxic effectors. These cellular events are under the influence of actin dynamics. Migratory disturbances and aberrant T cell–APC interactions are regarded as the central dysfunctions, which underlies the immune defects reported in WAS patients (7). Several *in vitro* studies revealed that the defective interaction can be ascribed to the inability to stabilize immunological synapses, which is linked to defects in the assembly of focused signaling (11, 27, 40), distribution of high-affinity LFA-1 (58) and T cell–APC contact reformation (41).

Altogether, these data point out how signal inputs that link T cell activation to actin rearrangements are critical for proper T cell functions. Although mechanistic basis for regulation of the actin dynamics during T cell activation are not completely understood, WASP seems to be one of the critical molecules and to play a unique role in such a process, as regarded from the several abnormalities found in the WAS immunodeficiency (59). In fact, as discussed below, WASP deficiency renders major T cell subsets dysfunctional and T cell activation seems to be greatly impacted by impaired actin dynamics.

WASP DEFICIENCY CAUSES SELECTIVE DEFECTS IN T CELL SUBSETS

T CELL ONTOGENY AND DIFFERENTIATION

Initial studies have revealed a status of a thymic hypoplasia at post-mortem examination of patients with WAS (60). This suggests reduced thymic function and possible impairment of T cell development in this pathology. Depending on the cohorts of patients studied, T cell counts in early-aged patients were reported to be either normal or reduced, whereas a marked T cell lymphopenia

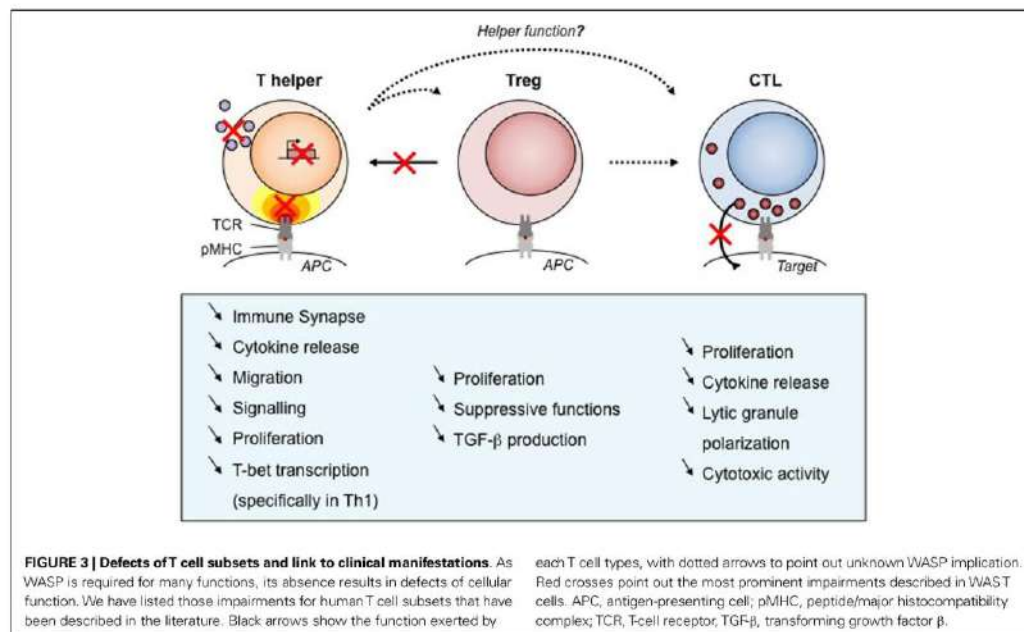
in older patients was more systematically reported (61, 62). Recent studies have clarified the presence of TCR repertoire perturbations independently from the age of the WAS patients considered (63–65). These perturbations consist in reduced TCR diversity due to clonotypic expansions in memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Although selective pressure exerted by recurrent infections cannot be excluded, these data argue for a defect in thymic development and T cell generation in WAS patients. Additionally to central defects, there is evidence that reduced T cell survival could account for reduced lymphocyte numbers in the peripheral blood of WAS patients. Indeed, WAS T lymphocytes appear to be abnormally susceptible to apoptosis, potentially through up-regulation of the FAS-mediated cell death pathway (54). The T lymphocyte compartment of WAS patients was further investigated by studying the diversity of 24 TCRV β subfamilies by CDR3 size distribution analysis (66). The results of this study clearly indicate that, in WAS patients above 15 years of age, the frequency of skewed TCRV β subfamilies is abnormally high. This indicates an oligoclonal pattern of TCRV β subfamilies usage in older patients with WAS, which might result from the progressive accumulation of antigen-specific T cell clones. Possibly, chronic antigenic stimulation consecutive to the inability to properly eradicate infectious agents could favor oligoclonality. Shrinkage of the T cell repertoire may also result from a failure to regenerate a diversified naive T cell pool or from an abnormal susceptibility to apoptosis in the periphery. All in all, there is evidence for an anticipated aging of the T cell compartment in WAS patients that probably results from a combination of differentiation defects and overt stimulation in the periphery. As a result, the restricted T cell repertoire and biased T cell responses will ensure a less protective coverage against pathogens. In addition, this might favor the development of autoimmunity.

The critical role played by WASP in the homeostasis of human T lymphocytes is demonstrated by the *in vivo* selective advantage measured in patients with secondary WAS gene mutations allowing restoration of WASP expression (67). WASP re-expression and somatic mosaicism due to spontaneous *in vivo* reversion occurs in up to 11% of WAS patients (68) that in most of the cases is a phenomenon restricted to T lymphocytes. Reversion events restored T lymphocyte lineage characteristics as CD3-stimulated proliferation, actin rearrangement, WASP localization, cytokine production, and T cell receptor diversity (69–71). As a whole, these data suggests that selective advantage conferred by WASP expression has a major impact on T cell compartment. However, it is not clear whether the presence of somatic mosaicism correlates with clinical improvement (70, 72).

EFFECTOR CD4⁺ T CELLS

Wiskott–Aldrich syndrome protein plays multiple roles in effector CD4⁺ T cells since it regulates motility, immunological synapse stability, signal integration, and cytokine production (Figure 3). T lymphocytes from WAS patients were originally found to display reduced chemotaxis in response to the T-cell chemoattractant stromal cell-derived factor (SDF)-1 (73). On the other hand, WASP-deficient CD4⁺ T cells display increased T cell motility upon encounter with non-cognate dendritic cells or B cells and reduced capacity to stop following antigen recognition (58). As an



integrator of multiple signals arising from chemokine receptors, integrins, and the TCR, WASP may therefore modulate differently the motility of T cells depending on the context. As expected from the *in vitro* findings, WASP-deficient CD4⁺ T cells from the *Was*^{-/-} murine model display abnormal trafficking and scanning abilities. Indeed, the homing of WASP-deficient lymphocytes to Peyer's patches is significantly impaired upon adoptive transfer into recipient mice, when compared to wild-type lymphocytes (48). Although not formally demonstrated, it is highly probable that CD4⁺ T cell motility defects contribute to the immunocompromised status of WAS patients.

Like for its role in T cell motility, WASP appears as a modulator of immunological synapse assembly. Rather than participating in the initial steps of immunological synapse assembly, WASP controls the stability of this complex structure (41). In particular, WASP is required for focused signal integration at the T cell/APC interface and sustained calcium signaling (40). It follows a sub-optimal T cell activation leading to decreased proliferative capacities (74). The selective defect in Th1 cytokine production observed in CD4⁺ T cell from WAS patients (75) was initially described as a consequence of abnormal calcium signaling and reduced nuclear recruitment of NF-AT-1 leading to defective T-BET induction (49). However, following shuttling into the nucleus of activated CD4⁺ T cells, WASP also controls T-BET activation directly as a transcription regulator (50). These two layers of control, at the synaptic and nuclear levels, over the transcriptional activation of Th1 cytokines in CD4⁺ T cells result in a marked Th1/Th2 imbalance (49). Although this has not been precisely

evaluated, the WAS-related Th1/Th2 imbalance is expected to contribute to defective activation of antigen-specific T cell responses as well as to the pathogenesis of eczema. More in general, the lymphocyte defects in WAS patients at least partially account for the high susceptible to develop bacterial, viral, and fungal infections (76). A direct evidence for the contribution of T cell defective cytokine production to the immunodeficiency was provided by the administration to WAS patients of recombinant human IL-2 that appeared to be effective in reducing herpes virus infection (77).

Wiskott–Aldrich syndrome protein plays a key role not only during T cell development, activation, and functional maturation but also during the contraction phase following T cell reactivation. In particular, in absence of WASP, FasL release by CD4⁺ T cells is reduced and this is associated with decreased TCR-mediated apoptosis (55). Possible accumulation on CD4⁺ T cells after T cell reactivation might be associated with the frequent autoimmune complications occurring in WAS patients.

REGULATORY CD4⁺ T CELLS

Studies on T regulatory (Treg) cells from patients and from the *Was*^{-/-} murine model point to functional defects (Figure 3) that most probably contribute to the development of autoimmunity in WAS. WASP-deficient CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells display defective proliferation, cytokine production, and suppressive functions (78–81). This was in particular demonstrated in a model of colitis induced by the transfer of CD45RB⁺ T cells in SCID mice, in which *Was*^{-/-} Treg cells were unable to prevent the development of the inflammatory process (80).

Evaluation of natural Treg cell development clearly showed that WASP has a minor impact on the generation of Treg cells in the thymus (78–81). However, in the periphery, Treg cell suppressive function is impaired and can be partially rescued *in vitro* by treatment with IL-2 (78, 80). These data argue in favor of defective antigen-driven expansion and function. This is corroborated by the observation, in a case of spontaneous revertant mutation, that WASP-expressing Treg cells possess an *in vivo* selective advantage over WASP-defective Treg cells (79).

Autoimmune complications are a frequent manifestation in WAS patients, reaching an incidence of 72% in European and US populations (76, 82). The most common forms are autoimmune hemolytic anemia, cutaneous vasculitis, arthritis, and nephropathy. It is tempting to speculate that the multiple autoimmune manifestations in WAS patients arise as a consequence of a partial loss of self-tolerance due to defective Treg cell function. In parallel, intrinsic B cell dysfunction has been shown to contribute to the emergence of auto-reactive B cells (83, 84). Interestingly, activated Treg cells from *Was*^{-/-} mice display diminished ability to induce apoptosis in B cells when compared to wild-type ones. This impairment is associated with a significant reduction in granzyme B degranulation from those cells and, consequently, direct defective cytotoxicity against auto-reactive B cells (85).

Thus, the onset and development of autoimmunity in the context of WASP deficiency seems to reflect the inability of Treg cells to control the abnormal emergence of auto-reactive B cells. This reveals an important role of WASP in regulating key cellular activities for the control of auto-reactive cells and in the maintenance of self-tolerance.

CYTOTOXIC CD8⁺ T CELLS

As in CD4⁺ T cell subsets, CD8⁺ T cells from WAS patients harbor defects in antigen-driven proliferation and cytokine production (49) (Figure 3). WAS CD8⁺ T cells have a profound impairment in the production of IL-2, IFN- γ , and TNF- α , which is due to defective gene transcription. The block in cytokine production is associated with reduced nuclear levels of NF-AT-1 and NF-AT-2. Defects in antigen-specific CD8⁺ T cell activation and cytokine production are also present in *Was*^{-/-} mice. In this model, the clearance of influenza A virus upon primary infection was normal, but the secondary response was impaired (86, 87).

Wiskott–Aldrich syndrome protein deficiency affects the cytotoxic activity of CD8⁺ T cells (42). In particular, WAS patient CTLs display a reduced cytotoxicity against tumoral B cell lines that can be rescued by restoring WASP expression by means of a lentiviral vector. This defect was associated to the lytic granule organization that appeared not to fully polarize toward the center of the CTL/tumor target cell contact area. Interestingly, cytotoxic function appears to be more profoundly affected in WASP-deficient NK cells than in WASP-deficient CTL (88, 89). A few reasons could account for this apparent difference, including a more pronounced requirement of WASP in NK versus CTL for the scanning and adhesion to target cells, the assembly of the lytic synapse, and/or the polarized delivery of lytic granules. Along those lines, studies on WASP-deficient NK cells have helped to characterize the assembly of a distinct NK cell lytic synapse (90, 91).

It has been proposed that combined defects in the cytotoxic function of CTL and NK cells could lower the level of

immunosurveillance against tumors. Initial studies have reported tumor incidence in WAS patients to range from 13% (92) to 22% (76). This incidence might be underestimated given the increase of WAS patient life expectancy over the last decades. WAS-associated tumors are mainly leukemia, myelodysplasia, and B cell lymphoma (often EBV positive). WAS patients developing tumors belong to the highest risk group. The historical study reported that 2 years after diagnosis only 1 out of 21 patients had survived (92). The selective contribution of CTL defects to the abnormally high occurrence of tumors is difficult to establish in a context in which NK cells have profound defects in cytotoxic activity.

As mentioned, a significant proportion of patients with WAS present chronic viral infections, most commonly involving members of the herpes virus family (76). Surprisingly, little is known about the effects of WASP deficiency on antiviral immunity. Initial animal studies indicated increased susceptibility of *Was*^{-/-} mice to influenza infection, with implications on memory development when secondary viral challenge was evaluated (86, 87). More recently, *Was*^{-/-} mice were shown to be unable to clear an infection with the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and to declare increased immunopathology (93). This was associated with an intrinsic defect in the ability of CD8⁺ T cells to kill target cells presenting viral epitopes combined with a reduced priming due to the inability of DC to produce type I IFN. This is a demonstration that intrinsic defects of cytotoxicity in *Was*^{-/-} CD8⁺ T cells play a significant role in the control of viral infection *in vivo*.

ADDITIONAL T CELL SUBSETS

Wiskott–Aldrich syndrome protein appears to play a particularly important role in iNKT cells. Indeed, a profound reduction of circulating iNKT cells has been observed in WAS patients and seemed to correlate with severity of disease (94). In agreement, WASP is indispensable for the maturation of murine *Was*^{-/-} iNKT cells. In addition, WASP-deficient iNKT cells displayed defective homeostasis, homing, retention within peripheral lymphoid tissues and activation (94, 95). Further studies will be required to determine whether defective iNKT cell function affects pDC function.

Our knowledge about the role of WASP in T lymphocytes is still incomplete. In particular, many T lymphocyte subsets remain to be characterized in the context of WAS. Although $\gamma\delta$ T cells have long been described to be abundant in the peripheral blood of WAS patients (96), their functional properties have not been tested. It will also be of interest to investigate the role of WASP in Th17 cells, since this T cell subset is associated to the development of inflammatory and autoimmune disorders (97). Interestingly, a recent study reported that exacerbated arthritis in *Was*^{-/-} mice was associated with an increase of Th17 cells and a decrease of regulatory T cells and B cells (98). This points to a possible role of WASP in Th17 homeostasis. Whether WASP modulates cytokine production in those cells also remains to be assessed. Unconventional Treg cell populations such as Tr1 cells and CD8⁺ Treg cells might also harbor specific defects in WAS and contribute to some clinical manifestations. Finally, WASP is also probably playing a role in the motility, activation, and function of T follicular helper cells, which play a crucial role in the maturation of antigen-driven B cell responses (99).

CONCLUDING REMARKS

Although the deficiency in WASP is extremely rare in the human population, this protein has been one of the most studied pathology-associated molecules in T lymphocytes. Its role in integrating activation through multiple key receptors and in decoding activation into actin cytoskeleton remodeling has stimulated research interest. As a result, the elucidation of the roles played by WASP in T cells has contributed to our understanding of T cell activation and function.

Many key concepts that still remain to be elucidated are emerging from the study of WASP in T cells. WASP is probably activated concomitantly by several receptors. How is signal integration performed to tune local actin remodeling? WASP plays multiple actin-dependent and actin-independent roles within the cell. How is WASP compartmentalization regulated? Is there a coordination between different compartments such as the immunological synapse and the nucleus? WASP appears to play slightly different roles depending on the T cell subsets. Is this linked to the role of WASP in the fine-tuning of T cell activation or in controlling specific transcriptional programs?

New tools would help to answer these questions. In particular, a better visualization of WASP at work with high resolution would be crucial. A further definition of WASP partners in different subcellular compartments would also be required to elucidate the diversity of WASP function. In light of the role of WASP in tuning motility, in setting the threshold for antigen-driven stimulation and in regulating specific transcriptional programs, it is tempting to speculate that it has an impact on the developmental plasticity of CD4⁺ T lymphocytes.

To unravel the contribution of specific defects to pathology, finer models with one defect only at a time would be required. Then, a further challenge will be to consider that WAS does not just result from isolated T cell-intrinsic defects but from inter-related defects. In addition to the T cell intrinsic defects reviewed here, it is important to underline the extrinsic defects of T cell activation by APC (100, 101).

Beyond the scientific interest in elucidating the multifaceted role of WASP lies the prospect of improving the diagnosis and the treatment of WAS. As part of the development of gene therapy approaches, the understanding of the role played by WASP in setting the threshold for TCR-driven proliferation and IL-2 production has provided a robust read-out to compare the efficacy of WASP-encoding retroviral vectors (102, 103). This has also recently been used to assess restoration of T cell function in the WAS patients enrolled in the first gene therapy trials (63, 104). The follow-up of gene therapy treated patients as well as patients with secondary mutations leading to WASP re-expression in T cells (70) will also allow us to more precisely link WASP-dependent molecular control of T cell function to physiological immune responses.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the CNPq/Brazilian Research Council and FAPERJ/Rio de Janeiro State Research Council (to V.C.-de-A.).

REFERENCES

- Albert MH, Notarangelo LD, Ochs HD. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* (2011) 18:42–8. doi:10.1097/MOH.0b013e318234114bc
- Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott–Aldrich syndrome. *Cell* (1994) 78:635–44. doi:10.1016/0092-8674(94)90528-2
- Parolini O, Berardelli S, Riedl E, Bello-Fernandez C, Strobl H, Majdic O, et al. Expression of Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation. *Blood* (1997) 90:70–5.
- Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick E, et al. Wiskott–Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* (1996) 84:723–34. doi:10.1016/S0092-8674(00)81050-8
- Machesky LM, Insall RH. Scarf1 and the related Wiskott–Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* (1998) 8:1347–56. doi:10.1016/S0960-9822(98)00015-3
- Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS. Wiskott–Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Annu NY Acad Sci* (2013) 1285:26–43. doi:10.1111/nyas.12049
- Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol* (2010) 10:182–92. doi:10.1038/nri2724
- Higgs HN, Pollard TD. Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* (2000) 150:1311–20. doi:10.1083/jcb.150.6.1311
- Padrick SB, Rosen MK. Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annu Rev Biochem* (2010) 79:707–35. doi:10.1146/annurev.biochem.77.060407.135452
- Ramesh N, Geha R. Recent advances in the biology of WASP and WIP. *Immunol Res* (2009) 44:99–111. doi:10.1007/s12026-008-8086-1
- Sasahara Y, Rachid R, Byrne MJ, de la Fuente MA, Abraham RT, Ramesh N, et al. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell* (2002) 10:1269–81. doi:10.1016/S1097-2765(02)00728-1
- de la Fuente MA, Sasahara Y, Calamito M, Anton IM, Elkhail A, Gallego MD, et al. WIP is a chaperone for Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104:926–31. doi:10.1073/pnas.0610275104
- Torres E, Rosen MK. Protein-tyrosine kinase and GTPase signals cooperate to phosphorylate and activate Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)/neuronal WASP. *J Biol Chem* (2006) 281:3513–20. doi:10.1074/jbc.M509416200
- Badour K, Zhang J, Shi F, Leng Y, Collins M, Siminovich KA. Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASP effector function and T cell activation. *J Exp Med* (2004) 199:99–112. doi:10.1084/jem.20030976
- Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, Kempinski H, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott–Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* (2006) 108:2182–9. doi:10.1182/blood-2006-01-010249
- Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, Frants SG, Schwartz M, Van Den Oord JJ, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet* (2001) 27:313–7. doi:10.1038/85886
- Westerberg LS, Meelu P, Baptista M, Eston MA, Adamovich DA, Cotta-de-Almeida V, et al. Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J Exp Med* (2010) 207:1145–52. doi:10.1084/jem.20091245
- Padrick SB, Doolittle LK, Brautigam CA, King DS, Rosen MK. Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108:E472–9. doi:10.1073/pnas.1100236108
- Smith BA, Daugherty-Clarke K, Goode BL, Gelles J. Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex revealed by single-molecule imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:1285–90. doi:10.1073/pnas.1211164110
- Helgeson LA, Nolen BJ. Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP. *Elife* (2013) 2:e00884. doi:10.7554/eLife.00884
- Watanabe Y, Sasahara Y, Ramesh N, Massaad MJ, Yeng Looi C, Kumaki S, et al. T-cell receptor ligation causes Wiskott–Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 132:648–55.e1. doi:10.1016/j.jaci.2013.03.046

22. Reicher B, Joseph N, David A, Pauker MH, Perl O, Barda-Saad M. Ubiquitylation-dependent negative regulation of WASP is essential for actin cytoskeleton dynamics. *Mol Cell Biol* (2012) 32:3153–63. doi:10.1128/MCB.00161-12
23. Jin Y, Mazza C, Christie JR, Giliani S, Fiorini M, Mella P, et al. Mutations of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* (2004) 104:4010–9. doi:10.1182/blood-2003-05-1592
24. Lanzi G, Moratto D, Vairo D, Masneri S, Delmonte O, Paganini T, et al. A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med* (2012) 209:29–34. doi:10.1084/jem.20110896
25. Labno CM, Lewis CM, You D, Leung DW, Takesono A, Kamberos N, et al. Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. *Curr Biol* (2003) 13:1619–24. doi:10.1016/j.cub.2003.08.005
26. Zeng R, Cannon JL, Abraham RT, Way M, Billadeau DD, Bubeck-Wardenberg J, et al. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* (2003) 171:1360–8. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1360
27. Dupré L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* (2002) 17:157–66. doi:10.1016/S1074-7613(02)00360-6
28. Torres E, Rosen MK. Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell* (2003) 11:1215–27. doi:10.1016/S1097-2765(03)00139-4
29. Simonson WT, Franco SJ, Huttenlocher A. Talin1 regulates TCR-mediated LFA-1 function. *J Immunol* (2006) 177:7707–14. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7707
30. Michel F, Mangino G, Attal-Bonnefoy G, Tuosto L, Alcover A, Roumier A, et al. CD28 utilizes Vav-1 to enhance TCR-proximal signaling and NF-AT activation. *J Immunol* (2000) 165:3820–9. doi:10.4049/jimmunol.165.7.3820
31. Badour K, Zhang J, Shi E, McGavin MKH, Rampersad V, Hardy LA, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity* (2003) 18:141–54. doi:10.1016/S1074-7613(02)00516-2
32. Vicente-Manzanares M, Cruz-Adalia A, Martin-Cofreces NB, Cabrero JR, Dosil M, Alvarado-Sanchez B, et al. Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood* (2005) 105:3026–34. doi:10.1182/blood-2004-07-2925
33. Gallego MD, de la Fuente MA, Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 α . *Int Immunol* (2006) 18:221–32. doi:10.1093/intimm/dxh310
34. Chen B, Brinkmann K, Chen Z, Pak CW, Liao Y, Shi S, et al. The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* (2014) 156:195–207. doi:10.1016/j.cell.2013.11.048
35. Serrano-Pertierra E, Cernuda-Morollon E, Lopez-Larrea C. NKG2D- and CD28-mediated costimulation regulate CD8 $^{+}$ T cell chemotaxis through different mechanisms: the role of Cdc42/N-WASP. *J Leukoc Biol* (2014) 95:487–95. doi:10.1189/jlb.0613316
36. Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* (2008) 26:233–59. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090347
37. Dustin ML, Groves JT. Receptor signaling clusters in the immune synapse. *Annu Rev Biophys* (2012) 41:543–56. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155238
38. Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol* (2005) 6:80–9. doi:10.1038/nri143
39. Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* (2006) 25:117–27. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.010
40. Calvez R, Lafouresse E, De Meester J, Galy A, Valitutti S, Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein permits assembly of a focused immunological synapse enabling sustained T-cell receptor signaling. *Haematologica* (2011) 96:1415–23. doi:10.3324/haematol.2011.040204
41. Sims TN, Soos TJ, Xenias HS, Dubin-Thaler B, Hofman JM, Waite JC, et al. Opposing effects of PKC θ and WASP on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* (2007) 129:773–85. doi:10.1016/j.cell.2007.03.037
42. De Meester J, Calvez R, Valitutti S, Dupré L. The Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates CTL cytotoxicity and is required for efficient killing of B cell lymphoma targets. *J Leukoc Biol* (2010) 88:1031–40. doi:10.1189/jlb.0410197
43. Morales-Tirado V, Johansson S, Hanson E, Howell A, Zhang J, Siminovich KA, et al. Cutting edge: selective requirement for the Wiskott-Aldrich syndrome protein in cytokine, but not chemokine, secretion by CD4 $^{+}$ T cells. *J Immunol* (2004) 173:726–30. doi:10.4049/jimmunol.173.2.726
44. Rivas FV, O'Keefe JP, Alegre ML, Gajewski TF. Actin cytoskeleton regulates calcium dynamics and NFAT nuclear duration. *Mol Cell Biol* (2004) 24:1628–39. doi:10.1128/MCB.24.4.1628-1639.2004
45. Badour K, Zhang J, Siminovich KA. Involvement of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation. *Semin Immunol* (2004) 16:395–407. doi:10.1016/j.smim.2004.08.019
46. Cannon JL, Burkhardt JK. Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol* (2004) 173:1658–62. doi:10.4049/jimmunol.173.3.1658
47. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8 $^{+}$ T cells to sites of CD4 $^{+}$ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* (2006) 440:890–5. doi:10.1038/nature04651
48. Snapper SB, Meelu P, Nguyen D, Stockton BM, Bozza P, Alt FW, et al. WASP deficiency leads to global defects of directed leukocyte migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* (2005) 77:993–8. doi:10.1189/jlb.0804444
49. Trifari S, Sitia G, Aiuti A, Scaramuzza S, Marangoni F, Guidotti LG, et al. Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol* (2006) 177:7451–61. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7451
50. Taylor MD, Sadhukhan S, Kottangada P, Ramgopal A, Sarkar K, D'Silva S, et al. Nuclear role of WASP in the pathogenesis of dysregulated Th1 immunity in human Wiskott-Aldrich syndrome. *Sci Transl Med* (2010) 2:37ra44. doi:10.1126/scitranslmed.3000813
51. Sadhukhan S, Sarkar K, Taylor M, Candotti F, Vyas YM. Nuclear role of WASP in gene transcription is uncoupled from its ARP2/3-dependent cytoplasmic role in actin polymerization. *J Immunol* (2014) 193:150–60. doi:10.4049/jimmunol.1302923
52. Algeciras-Schminich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* (2002) 22:207–20. doi:10.1128/MCB.22.1.207-220.2002
53. Rawlings SL, Crooks GM, Bockstoe D, Barsky LW, Parkman R, Weinberg KI. Spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome: correlation of accelerated cell death and attenuated bcl-2 expression. *Blood* (1999) 94:3872–82.
54. Rengan R, Ochs HD, Sweet LI, Keil ML, Gunning WT, Lachant NA, et al. Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood* (2000) 95:1283–92.
55. Nikolov NP, Shimizu M, Cleland S, Bailey D, Aoki J, Strom T, et al. Systemic autoimmunity and defective Fas ligand secretion in the absence of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Blood* (2010) 116:740–7. doi:10.1182/blood-2009-08-237560
56. McGavin MK, Badour K, Hardy LA, Kubieski TJ, Zhang J, Siminovich KA. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J Exp Med* (2001) 194:1777–87. doi:10.1084/jem.194.12.1777
57. Badour K, McGavin MK, Zhang J, Freeman S, Vieira C, Filipp D, et al. Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and costimulatory signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104:1593–8. doi:10.1073/pnas.0610543104
58. Lafouresse F, Cotta-de-Almeida V, Malet-Engra G, Galy A, Valitutti S, Dupré L. Wiskott-Aldrich syndrome protein controls antigen-presenting cell-driven CD4 $^{+}$ T-cell motility by regulating adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Immunology* (2012) 137:183–96. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03620.x
59. Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* (2006) 117:725–38. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.005

60. Wolff JA. Wiskott-Aldrich syndrome: clinical, immunologic, and pathologic observations. *J Pediatr* (1967) **70**:221–32. doi:10.1016/S0022-3476(67)80417-7
61. Park JY, Kob M, Prodeus AP, Rosen FS, Shcherbina A, Remold-O'Donnell E. Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: possible role of WASP in human lymphocyte maturation. *Clin Exp Immunol* (2004) **136**:104–10. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02409.x
62. Ochs HD, Slichter SJ, Harker LA, Von Behrens WE, Clark RA, Wedgwood RJ. The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* (1980) **55**:243–52.
63. Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A, Witzel M, Schwarzer A, Rothe M, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome – long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med* (2014) **6**:227ra33. doi:10.1126/scitranslmed.3007280
64. O'Connell AE, Volpi S, Dobbs K, Fiorini C, Tsitsikov E, de Boer H, et al. Next generation sequencing reveals skewing of the T and B cell receptor repertoires in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Front Immunol* (2014) **5**:340. doi:10.3389/fimmu.2014.00340
65. Wu J, Liu D, Tu W, Song W, Zhao X. T-cell receptor diversity is selectively skewed in T-cell populations of patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* (2015) **135**(1): 209–16.e8. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.025
66. Wada T, Schurman SH, Garabedian EK, Yachie A, Candotti F. Analysis of T-cell repertoire diversity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* (2005) **106**:3895–7. doi:10.1182/blood-2005-06-2336
67. Wada T, Konno A, Schurman SH, Garabedian EK, Anderson SM, Kirby M, et al. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest* (2003) **111**:1389–97. doi:10.1172/JCI200315485
68. Stewart DM, Candotti F, Nelson DL. The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics Working Party at the XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4–7, 2006. *J Clin Immunol* (2007) **27**:634–9. doi:10.1007/s10875-007-9121-z
69. Ariga T, Kondoh T, Yamaguchi K, Yamada M, Sasaki S, Nelson DL, et al. Spontaneous in vivo reversion of an inherited mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol* **166**(2001):5245–9. doi:10.4049/jimmunol.166.8.5245
70. Trifari S, Scaramuzza S, Catucci M, Ponzoni M, Mollica L, Chiesa R, et al. Revertant T lymphocytes in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome: analysis of function and distribution in lymphoid organs. *J Allergy Clin Immunol* (2010) **125**:439–48.e8. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.034
71. Wada T, Schurman SH, Otsu M, Garabedian EK, Ochs HD, Nelson DL, et al. Somatic mosaicism in Wiskott-Aldrich syndrome suggests in vivo reversion by a DNA slippage mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**:697–702. doi:10.1073/pnas.151260498
72. Davis BR, Candotti F. Revertant somatic mosaicism in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunol Res* (2009) **44**:127–31. doi:10.1007/s12026-008-8091-4
73. Haddad E, Zugaza JL, Louache F, Debili N, Crouin C, Schwarz K, et al. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood* (2001) **97**:33–8. doi:10.1182/blood.V97.1.33
74. Molina JJ, Sancho J, Terhorst C, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J Immunol* (1993) **151**:4383–90.
75. Cianfroni A, Massaad M, Feske S, de la Fuente MA, Gallego L, Ramess N, et al. Defective nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells and extracellular signal-regulated kinase underlies deficient IL-2 gene expression in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* (2005) **116**:1364–71. doi:10.1016/j.jaci.2005.09.006
76. Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* (2004) **103**:456–64. doi:10.1182/blood-2003-05-1480
77. Azuma H, Oshima M, Ito K, Okuno A, Kawabata I, Banba K, et al. Impaired interleukin-2 production in T-cells from a patient with Wiskott-Aldrich syndrome: basis of clinical effect of interleukin-2 replacement therapy. *Eur J Pediatr* (2000) **159**:633–4. doi:10.1007/PL00008395
78. Adriani M, Aoki J, Horai R, Thornton AM, Konno A, Kirby M, et al. Impaired in vitro regulatory T cell function associated with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol* (2007) **124**:41–8. doi:10.1016/j.clim.2007.02.001
79. Humblet-Baron S, Sather B, Anover S, Becker-Herman S, Kasprkiewicz DJ, Khim S, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest* (2007) **117**:407–18. doi:10.1172/JCI29539
80. Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med* (2007) **204**:381–91. doi:10.1084/jem.20061338
81. Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med* (2007) **204**:369–80. doi:10.1084/jem.20061334
82. Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, Quartier P, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, et al. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics* (2003) **111**:e622–7. doi:10.1542/peds.111.5.e622
83. Westerberg LS, de la Fuente MA, Wermeling F, Ochs HD, Karlsson MC, Snapper SB, et al. WASP confers selective advantage for specific hematopoietic cell populations and serves a unique role in marginal zone B-cell homeostasis and function. *Blood* (2008) **112**:4139–47. doi:10.1182/blood-2008-02-140715
84. Meyer-Bahlburg A, Becker-Herman S, Humblet-Baron S, Khim S, Weber M, Bouma G, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in B cells results in impaired peripheral homeostasis. *Blood* (2008) **112**:4158–69. doi:10.1182/blood-2008-02-140814
85. Adriani M, Jones KA, Uchiyama T, Kirby MR, Silvén C, Anderson SM, et al. Defective inhibition of B-cell proliferation by Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient regulatory T cells. *Blood* (2011) **117**:6608–11. doi:10.1182/blood-2010-12-322834
86. Strom TS, Turner SJ, Andreansky S, Liu H, Doherty PC, Srivastava DK, et al. Defects in T-cell-mediated immunity to influenza A virus, *Streptococcus pneumoniae*, and *Mycobacterium bovis* BCG. *Exp Hematol* (2005) **33**:443–51. doi:10.1016/j.exphem.2004.12.006
87. Orange JS, Roy-Ghanta S, Mace EM, Maru S, Rak GD, Sanborn KB, et al. IL-2 induces a WAVE2-dependent pathway for actin reorganization that enables WASP-independent human NK cell function. *J Clin Invest* (2011) **121**:1535–48. doi:10.1172/JCI44862
88. Gismondi A, Gialdi L, Mazza C, Giliani S, Parolini S, Morrone S, et al. Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood* (2004) **104**:436–43. doi:10.1182/blood-2003-07-2621
89. Orange JS, Harris KE, Andzel MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:14151–6. doi:10.1073/pnas.1835830100
90. Krzewski K, Chen X, Orange JS, Strominger JL. Formation of a WIP-, WASP-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *J Cell Biol* (2006) **173**:121–32. doi:10.1083/jcb.200509076
91. Sullivan KE, Mullen CA, Blasec RM, Winkelstein JA. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* (1994) **125**:876–85. doi:10.1016/S0022-3476(05)82002-5
92. Lang PA, Shaabani N, Borkens S, Honke N, Scheu S, Booth S, et al. Reduced type I interferon production by dendritic cells and weakened antiviral immunity in patients with Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2013) **131**:815–24. doi:10.1016/j.jaci.2012.08.050
93. Locci M, Draghici E, Marangoni F, Bosticardo M, Catucci M, Aiuti A, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for iNKT cell maturation and function. *J Exp Med* (2009) **206**:735–42. doi:10.1084/jem.20081773
94. Astrakhan A, Ochs HD, Rawlings DJ. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for homeostasis and function of invariant NKT cells. *J Immunol* (2009) **182**:7370–80. doi:10.4049/jimmunol.0804256
95. Morio T, Takase K, Okawa H, Oguchi M, Kanbara M, Hiruma F, et al. The increase of non-MHC-restricted cytotoxic cells (gamma/delta-TCR-bearing T cells or NK cells) and the abnormal differentiation of B cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* (1989) **52**:279–90. doi:10.1016/0090-1229(89)90179-7

97. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* (2006) **441**:235–8. doi:10.1038/nature04753
98. Bouma G, Carter NA, Recher M, Malinova D, Adriani M, Notarangelo LD, et al. Exacerbated experimental arthritis in Wiskott–Aldrich syndrome protein deficiency: modulatory role of regulatory B cells. *Eur J Immunol* (2014) **44**:2692–702. doi:10.1002/eji.201344245
99. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* (2008) **26**:741–66. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090344
100. Bouma G, Burns S, Thrasher AJ. Impaired T-cell priming in vivo resulting from dysfunction of WASP-deficient dendritic cells. *Blood* (2007) **110**:4278–84. doi:10.1182/blood-2007-06-096875
101. Bouma G, Mendoza-Naranjo A, Blundell MP, de Falco E, Parsley KL, Burns SC, et al. Cytoskeletal remodeling mediated by WASP in dendritic cells is necessary for normal immune synapse formation and T-cell priming. *Blood* (2011) **118**:2492–501. doi:10.1182/blood-2011-03-340265
102. Dupré L, Marangoni F, Scaramuzza S, Trifari S, Hernandez RJ, Aiuti A, et al. Efficacy of gene therapy for Wiskott–Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* (2006) **17**:303–13. doi:10.1089/hum.2006.17.303
103. Dupré L, Trifari S, Follenzi A, Marangoni F, Lain de Lera T, Bernad A, et al. Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott–Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther* (2004) **10**:903–15. doi:10.1016/j.ymthe.2004.08.008
104. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott–Aldrich syndrome. *Science* (2013) **341**:1233151. doi:10.1126/science.1233151

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 04 December 2014; paper pending published: 21 December 2014; accepted: 26 January 2015; published online: 09 February 2015.

Citation: Cotta-de-Almeida V, Dupré L, Guipouy D and Vasconcelos Z (2015) Signal integration during T lymphocyte activation and function: lessons from the Wiskott–Aldrich syndrome. *Front. Immunol.* **6**:47. doi: 10.3389/fimmu.2015.00047
This article was submitted to Primary Immunodeficiencies, a section of the journal Frontiers in Immunology.

Copyright © 2015 Cotta-de-Almeida, Dupré, Guipouy and Vasconcelos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé

Exploration fonctionnelle de l'activité cytotoxique de lymphocytes T humains en contexte de pathologie et de thérapie

Plusieurs populations de cellules immunitaires possèdent une activité cytotoxique permettant l'élimination de cellules altérées. Cette fonction cellulaire est ainsi déterminante dans le contrôle des infections, des processus tumoraux, ou encore des maladies inflammatoires chroniques.

Mon projet de thèse se concentre sur des aspects fondamentaux de l'activité lytique de deux populations de lymphocytes T cytotoxiques : les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs de type 1. Pour cela, l'exploration des mécanismes de cette activité a été conduite au travers de deux modèles, pathologique et thérapeutique, à différentes échelles biologiques : au niveau de la population ou de la cellule individuelle, mais aussi différentes échelles d'organisations moléculaires : cellulaire et nanoscopique.

Nous avons pu démontrer que l'activité de lyse de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques face à un excès de cellules cibles est efficace sur des temps prolongés, reposant sur une capacité individuelle fortement hétérogène à effectuer une lyse multiple. L'importance de cette activité de lyse soutenue a été renforcée par l'identification d'un défaut lytique particulièrement prononcé sur le long-terme chez des lymphocytes T CD8⁺ issus de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich. Ce défaut est lié à une activation réduite de l'intégrine LFA-1 et un délai dans la délivrance du coup léthal. De plus, la protéine WASP permet de restreindre LFA-1 de haute-affinité en nanoclusters denses ainsi que de permettre l'organisation en un ring de LFA-1 et la localisation des granules lytiques à l'intérieur de celui-ci.

Par ailleurs, les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs de type 1 développés dans le cadre d'une thérapie cellulaire (Ovasave®) démontrent une capacité de lyse envers les cellules myéloïdes, en complément d'une activité immunosuppressive sur les lymphocytes T conventionnels. Cette activité est mise en place sur du long-terme, jusqu'à atteindre une efficacité optimale, lié à un délai dans la délivrance du coup léthal. De manière surprenante, malgré une spécificité pour l'ovalbumine, l'activité cytotoxique semble être indépendante de l'activation du TCR. En outre, la lyse est granzyme-dépendante mais perforine-indépendante. Ainsi ces lymphocytes T thérapeutiques manifestent une activité cytotoxique alternative.

Pour conclure, mon projet de thèse a permis de caractériser une activité de lyse soutenue basée sur une capacité individuelle hétérogène. Cette habilité à soutenir une lyse sur du long-terme implique une stabilité de la synapse, où WASP joue notamment un rôle clé pour l'activation et l'organisation de LFA-1. Les lymphocytes T régulateurs thérapeutiques démontrent aussi une activité de lyse soutenue, cependant les acteurs moléculaires sont non conventionnels. De manière générale, une activité de lyse soutenue permettrait de calibrer une réponse cytotoxique prolongée en rapport à la taille de la population cible, ainsi que le partage avec d'autres fonctions cellulaires comme la sécrétion de cytokines.

Mots-clés : Activité cytotoxique, lymphocytes T CD8⁺, lymphocytes T régulateurs, syndrome de Wiskott-Aldrich, Thérapie cellulaire.

Abstract

Functional exploration of the cytotoxic activity of human T lymphocytes in the context of pathology and therapy

During different pathological conditions such as infections, tumoral processes or chronic inflammation diseases, altered cells are eliminated through a cytotoxic activity mediated by several immune cell populations. This cellular function is therefore crucial for carrying out the action of the immune system.

My thesis project focuses on fundamental aspects of the lytic activity of two cytotoxic lymphocyte populations: CD8⁺ T cells and type-1 CD4⁺ regulatory T cells. To explore the mechanisms of this activity, this study has been driven on two cases, pathological and therapeutic models, at the population and single-cell levels and also at the cellular and nanoscopic scales of the molecular organisation.

We have been able to demonstrate that the CD8⁺ T cell lysis activity against an excess of target cells is effective over prolonged periods, relying on a highly heterogeneous individual capacity to perform multiple lysis. The importance of this sustained cytotoxic activity was reinforced by the identification of a lytic defect, particularly pronounced on a long time period, of CD8⁺ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. This defect is related to a reduced activation of the LFA-1 integrin and delay in the lethal hit delivery. In addition, the WASP protein allows to restrict high affinity LFA-1 to dense nanoclusters as well as the assembly of LFA-1 ring and the localization of the lytic granules inside this ring. Moreover, type-1 CD4⁺ regulatory T cells from a cellular therapy (Ovasave®) demonstrated a cytotoxic activity toward myeloid cells, additionally to an immunosuppressive activity on conventional T cells. This activity is implemented over long time periods, until reaching optimal efficiency, and is related to a delay in the lethal hit delivery. Surprisingly, despite a specificity for ovalbumin, the cytotoxic activity measured in absence of the antigen suggests a TCR independence. In addition, lysis is not mediated by perforin but is exclusively granzyme-dependent. Thus, these therapeutic T cells exhibit an alternative cytotoxic activity.

To conclude, my thesis project permits to characterize a sustained lysis activity relying on a heterogeneous individual capacity. This ability to sustain a lytic activity involves stability of the synapse, where WASP plays a key role towards the activation and organization of LFA-1. The therapeutic regulatory T lymphocytes also demonstrated a sustained cytotoxic activity, however the molecular actors are unconventional. On the whole, sustained lytic activity would be key to the calibration of cytotoxic responses in relation to the size of the target population, as well as sharing with other cellular functions such as cytokine secretion.

Key words: Cytotoxic activity, CD8⁺ T cells, Regulatory T cells, Wiskott-Aldrich syndrome, Cellular therapy.