



HAL
open science

Activation des lymphocytes T gamma delta dans les cancers

Chloé Laplagne

► **To cite this version:**

Chloé Laplagne. Activation des lymphocytes T gamma delta dans les cancers. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30109 . tel-03124407

HAL Id: tel-03124407

<https://theses.hal.science/tel-03124407v1>

Submitted on 28 Jan 2021

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 l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Chloé LAPLAGNE

Le 22 octobre 2020

**ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA DANS LES
CANCERS**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Mary POUPOT

Jury

M. Massimo MASSAIA, Rapporteur
M. Daniel OLIVE, Rapporteur
Mme Virginie LAFONT, Examinatrice
M. Bruno SEGUI, Examineur
Mme Mary POUPOT, Directrice de thèse

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

REMERCIEMENTS

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

Je remercie également le **Professeur Massimo Massaia** et le **Professeur Daniel Olive**, qui ont accepté d'être rapporteurs et de juger ces travaux de thèse.

Je remercie également le **Docteur Virginie Lafont** et le **Docteur Stéphanie Cabantous**, qui ont accepté d'examiner et de juger ces travaux de thèse.

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

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

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

Je souhaite également remercier le **Dr Nathalie BONNEFOY** et le **Dr Nabila JABRANE-FERRAT**, pour m'avoir encadré et conseillé lors des comités de thèse.

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

Anne, pour tes précieux conseils scientifiques, mais aussi de lecture ! Merci pour ton coaching des dernières semaines !

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

Remerciements

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

Sarah C, merci pour ta franchise et ton écoute.

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

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

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

Sophie, merci pour ton écoute, je te souhaite le meilleur pour la suite !

Julie (alias Dora l'exploratrice), merci pour tous ces voyages qui m'auront permis de m'évader par procuration, pour ton sens de l'organisation hors pair et ton soutien. Garde cette motivation!

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

Pauline, merci pour ton écoute et ton aide.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Remerciements

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

A la **team Presbytère** : **Alix, Félicien, Justine, Rémy, Eléonore, Guillaume, Sophie** et **Florent**.

Aux « **anciens internes** », **Caro M, Chloé, Laura, Isabelle**, et **Pierre**.

A toutes les autres belles rencontres de l'internat : **Marie B** (Joyeux anniversaire !!!), **Pauline C, Mathilde S, Aude T, Nolwenn, Julien V, Panthéa, Jean M, Vincent, Marie C, Camille G, Charlotte RL, Pauline G, Charlotte R, Laure T, Iris, Emeline S, Jojo, Loïc, Thomas S**.

Aux autres internes IPR !

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

Je souhaiterais également remercier mes **amies de la promo du M2 Immunologie et Maladies Infectieuses** : **Emeline, Ar(rrr)antxa** et **Marion**.

Je souhaiterais aussi remercier **mes copines de la faculté de pharmacie de Lyon**, **Christelle, Marie, Caro S, Camille L, Pauline, Violaine** et **Eléna**.

Je souhaiterais remercier **mes copines de lycée, Camille T, Hélène** et **Margaux**, pour votre soutien et votre amitié.

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

Papa, je te remercie pour ton écoute et tes conseils. Depuis toute petite tu es pour moi un modèle de force, de justesse et de modestie indéfectible. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi avec **Maman**. Vois en ce travail toute ma reconnaissance et mon amour. **Mathilde & Pierre**, merci pour votre soutien et ces weekends d'évasion à Paris et ailleurs. Une très forte pensée à la petite **Maud** qui vient agrandir cette belle famille. Mais aussi à mes **grands-mères**, à mes tantes **Brigitte, Sylvie**, et **Joelle** ; à mes oncles **Michel, Philippe** et **Hervé**, à **M-H** pour votre soutien ! Aux cousin(e)s **Camille, Thomas, Lou, Solène** et **Auriane**, merci pour tout !

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

Tu as sû partager mes doutes et ma déception après les mauvaises journées, en trouvant toujours les mots justes pour me remotiver. Merci pour tout ce bonheur que tu m'apportes au quotidien, pour ton amour. Pour tout ce qu'on a déjà construit et pour notre futur, je t'aime.

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T (LT) $\gamma\delta$ présentent une hétérogénéité structurale et fonctionnelle et forment un pont entre l'immunité innée et adaptative. Ils comprennent notamment les LT V γ 9V δ 2, qui représentent 1 à 5% des LT circulants, proportion qui peut rapidement croître en réponse à un stress (inflammation, infection ou cancer). Les LT V γ 9V δ 2 sont très cytotoxiques et produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Ces fonctions sont permises suite à la reconnaissance d'antigènes non peptidiques par leur TCR, appelés phosphoantigènes (PAgs), de façon indépendante des molécules du CMH. Différentes études ont montré que les LT V γ 9V δ 2 sont capables de tuer un large panel de cellules tumorales provenant de cancers solides et hématologiques, mais cet effet est limité par l'apparition d'anergie.

Leur activation est médiée par différentes protéines, notamment les butyrophilines (BTN) BTN2A1 et BTN3A1, formant un complexe autour du TCR V γ 9V δ 2 et permettant la reconnaissance du PAg. D'autres acteurs interviennent également pour réguler ce mécanisme comme le transporteur ABCA-1 ou encore la protéine RhoB.

Dès lors que le rôle de RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par des cancers solides n'est pas clairement défini, le premier objectif de mes travaux de thèse visait à préciser davantage ce mécanisme, grâce à un modèle in vitro de cancer du poumon. Par ailleurs, les LT V γ 9V δ 2 présentent la faculté originale mais peu étudiée de pouvoir s'activer en l'absence de cellule cible. Ainsi, l'objectif de la seconde partie de mes travaux de thèse était de caractériser cette « self-activation ».

L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de la compréhension du mécanisme complexe d'activation des LT V γ 9V δ 2 pour améliorer leur efficacité en clinique.

ABSTRACT

$\gamma\delta$ T lymphocytes (TL) exhibit structural and functional heterogeneity and form a bridge between innate and adaptive immunity. They include in particular V γ 9V δ 2 TL, which represent 1 to 5% of circulating TL, a proportion which can quickly increase in response to stress (inflammation, infection or cancer). V γ 9V δ 2 TL are very cytotoxic and produce many proinflammatory cytokines. These functions are enabled following the recognition of non peptide antigens by their TCR, called phosphoantigens (PAgs), independently of the MHC molecules. Various studies have shown that V γ 9V δ 2 TL are capable of killing a large panel of tumor cells from solid and hematological cancers, but this effect is limited by the appearance of anergy.

Their activation is mediated by various proteins, in particular the butyrophilins (BTN) BTN2A1 and BTN3A1, forming a complex around the TCR V γ 9V δ 2 and allowing recognition of PAg. Other actors also intervene to regulate this mechanism; like the ABCA-1 transporter or RhoB protein.

Since the role of RhoB during the activation of V γ 9V δ 2 TL by solid cancers is not clearly defined, the first objective of my thesis was to further clarify this mechanism, using an in vitro model of lung cancer. In addition, the V γ 9V δ 2 TL have the original but little studied ability to be activated in the absence of target cell. Thus, the objective of the second part of my thesis was to characterize this "self-activation". All of these results underline the importance of understanding the complex mechanism of activation of LT V γ 9V δ 2 to improve their efficacy in the clinic.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
RÉSUMÉ	7
ABSTRACT	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	15
INTRODUCTION.....	21
PARTIE I. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale et mécanismes de la réponse immunitaire	23
I.I. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale innée.....	23
I.I.A. Les cellules dendritiques	24
I.I.B. Les cellules NK	26
I.I.B.1. Les récepteurs de cellules NK.....	27
I.I.B.2. Les fonctions cytolytiques et anti-tumorales des cellules NK.....	30
I.II. Principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale adaptative.....	32
I.II.A. Principaux mécanismes d'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$	33
I.II.B. Les lymphocytes T CD4	34
I.II.C. Les lymphocytes T CD8	36
PARTIE II. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2	38
II.I. Développement et répertoire des LT V γ 9V δ 2	38
II.I.A. Développement.....	38
II.I.B. Répertoire	40
II.II. Fonctionnalités des LT V γ 9V δ 2	42
II.II.A. Pléiotropie fonctionnelle et plasticité cellulaire.....	42
II.II.B. Implication des LT $\gamma\delta$ dans l'immunité tumorale.....	42
II.III. Sous-populations de LT V γ 9V δ 2	50
II.IV. Réactivité des LT V γ 9V δ 2	51
II.IV.A. Antigènes reconnus par les LT V γ 9V δ 2	51
II.IV.A.1. Phosphoantigènes	52
II.IV.A.2. Les alkylamines et aminobiphosphonates.....	54
II.IV.B. Reconnaissance des phosphoantigènes par le TCR V γ 9V δ 2	56
II.IV.C. Partenaires impliqués au cours de la reconnaissance des PAg par les LT V γ 9V δ 2	56
II.IV.C.1. Les butyrophilines	57
II.IV.C.2. F1-ATP synthase, Apo A1 et ABCA1	62
II.IV.C.3. RhoB	63
II.IV.C.4. La Périplakine	65
II.IV.D. Récepteurs complémentaires à la réactivité des LT V γ 9V δ 2	66
II.IV.D.1. Les NKRs	66
II.IV.D.2. Les Toll-like receptors.....	67

Table des matières

II.IV.D.3. Les récepteurs aux cytokines	67
II.IV.D.4. Les molécules d'adhésion	68
II.V. Applications cliniques des LT V γ 9V δ 2	69
II.V.A. Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle	70
II.V.B. Nouvelles stratégies d'immunothérapies à base de LT $\gamma\delta$	74
DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	80
RÉSULTATS	84
Résultats – Partie I	86
L'activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes peut être altérée par un réacheminement de RhoB dans les cancers du poumon.	86
I.I. Contexte et objectifs du projet	88
I.II. Introduction sur la protéine RhoB	89
I.II.A. Structure de RhoB	89
I.II.B. Régulation de RhoB.....	90
I.II.C. Techniques d'étude de RhoB dans les cellules	92
I.II.D. Fonctionnalités de RhoB dans les cancers.....	94
I.II.E. Fonctionnalités de RhoB dans l'immunité	97
I.III. Publication scientifique.....	100
I.IV. Résultats complémentaires	102
I.V. Conclusion	108
Résultats – Partie II	110
L'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes solubles indépendante des cellules cibles ne requiert pas de contact cellulaire et dépend des butyrophilines et du TCR.	110
II.I. Contexte et objectifs du projet	112
II.II. Résultats.....	114
II.III. Conclusion.....	136
DISCUSSION	138
BIBLIOGRAPHIE.....	148
ANNEXE	166

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Devenir des DC dans les nœuds lymphatiques drainants.....	24
Figure 2 : Principales DC humaines reconnaissant différents TLRs.....	25
Figure 3 : Principales caractéristiques du processing de l'élément dangereux par les DC. ..	26
Figure 4 : Les récepteurs exprimés par les cellules NK.....	27
Figure 5 : Présentation des différents sous-types de LT CD4 ⁺	35
Figure 6 : Stades de développement des LT $\gamma\delta$ et LT $\alpha\beta$	39
Figure 7 : Vagues de développement des LT $\gamma\delta$ chez l'homme.	39
Figure 8 : Organisation des loci des gènes du TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ humain.	40
Figure 9 : Classification des LT $\gamma\delta$ suivant leurs fonctions tumorales	42
Figure 10 : Potentiel cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cellules cancéreuses.....	46
Figure 11 : Structures chimiques des principaux PAgS naturels et synthétiques.	53
Figure 12 : Voies de biosynthèse du Mévalonate et du DOXP.....	54
Figure 13 : Structures chimiques des principaux ABP.	55
Figure 14 : Structures schématiques des 3 isoformes des BTN3A.	58
Figure 15: Modèles théoriques de l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains	59
Figure 16 : Modèle d'interaction proposé de la BTN2A1 dans l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains.	60
Figure 17 : Modèle d'interaction séquentielle de la reconnaissance antigénique des LT V γ 9V δ 2.....	61
Figure 18 : Mécanismes impliqués dans le relargage de l'IPP par les DC traitées au zolédronate.....	63
Figure 19 : Modèle d'interaction proposé de RhoB dans l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains.	64
Figure 20: Les nouveaux concepts de thérapies sélectives applicables aux LT $\gamma\delta$	75
Figure 21 : Structure schématique de la protéine RhoB	89
Figure 22 : Adaptation du système Split-GFP pour le monitoring des petites RhoGTPases. 93	
Figure 23 : L'expression de la BTN2A1 sur les A549 et PC9 WT n'est pas modulée suite au traitement par les phosphoantigènes.....	104
Figure 24 : Le blocage de l'ABCA-1 dans les A549 et PC9 n'impacte pas l'activation des LT V γ 9V δ 2.....	107
Figure 25 : La lyse autologue des LT V γ 9V δ 2 purifiés nécessite l'activation des lymphocytes par les PAgS.	115
Figure 26: Modulation pharmacologique de la trogocytose des LT V γ 9V δ 2 en PCL.	117
Figure 27 : Les LT V γ 9V δ 2 s'activent par les PAgS solubles en l'absence de cellule cible..	119

Liste des figures

Figure 28 : Induction de lignée primaire de LT V γ 9V δ 2 par le zolédronate et comparaison avec le BrHPP.....	120
Figure 29 : L'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS solubles ne requiert pas de contact cellulaire.	122
Figure 30: L'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP dépend du TCR $\gamma\delta$ et des BTNs..	124
Figure 31: L'activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP dépend de la BTN3A1 et du TCR $\gamma\delta$ en l'absence de cellule cible..	126
Figure 32 : Le traitement par le Probucol n'est pas toxique sur les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés.	127
Figure 33 : L'inhibition du transporteur ABCA-1 par le Probucol perturbe l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP.	128
Figure 34 : Le Probucol inhibe l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP.....	129
Figure 35 : Les LT V γ 9V δ 2 ne sont pas activés après co-culture avec les A549 traitées au BrHPP séparé par un transwell ou par le milieu conditionné de cette lignée..	130
Figure 36 : Augmentation progressive de l'expression de la BTN3A1 à la surface du LT V γ 9V δ 2 auto-activé au BrHPP.....	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des réponses immunitaires innées et adaptatives.	23
Tableau 2 : Structures des antigènes TUBag.....	52
Tableau 3 : Essais cliniques utilisant les LT V γ 9V δ 2 terminés.....	70
Tableau 4: Résumé du rôle bivalent de la protéine RhoB dans différents cancers.....	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

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

Liste des abréviations

HMB-PP	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-CoA
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
ICOS	Inducible T cell costimulator
IDO	Indoléamine 2,3 dioxygénase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine
ILT2	Immunoglobulin-like transcript 2
ILC	Cellules lymphoïdes innées
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KIR	Récepteur apparenté aux Ig des cellules tueuses
Knock-down (KO)	Diminution forcée de l'expression d'un gène
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LB	Lymphocyte B
LFA-1/3	Lymphocyte function associated antigen 1/3
LT	Lymphocyte T
LPS	Lipopolysaccharide
MICA/B	MHC class I polypeptide-related sequence A/B
MVA	Mévalonate
NK	Natural Killer
NKG2	Natural Killer cell lectin-like receptor 2
NKR	Récepteurs caractéristiques des cellules NK
PAg	Phosphoantigène
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	Phosphate buffer saline
PCL	Primary cell line
PD-1	Récepteur de mort programmée-1
PD-L1	Ligand du récepteur de mort programmée-1
PFA	Para-formaldéhyde
PRR	Récepteurs reconnaissant les motifs (de danger)
RAG	Gène activateur de la recombinaison
RTX	Rituximab
SI	Synapse immunologique
siRNA	Petits acides ribonucléiques interférents

Liste des abréviations

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

PRÉAMBULE

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

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

Ce manuscrit de thèse doctorale, clôturant également mes études de pharmacie, est composé d'une introduction comportant deux grandes parties. La première partie de l'introduction décrit les principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale et les mécanismes de la réponse immunitaire. La seconde partie présente les caractéristiques des lymphocytes T V γ 9V δ 2 et leur place dans l'immunité anti-tumorale. La suite du manuscrit comporte les résultats obtenus au cours de ma thèse doctorale, composée de deux parties. La première partie des résultats présente le rôle de RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes, sous forme d'un article scientifique publié. La seconde partie des résultats étudie la capacité originale des LT V γ 9V δ 2 à s'activer sans l'aide des cellules cibles. Enfin, une partie discussion conclue le manuscrit afin de commenter les résultats obtenus lors de ces travaux.

INTRODUCTION

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

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

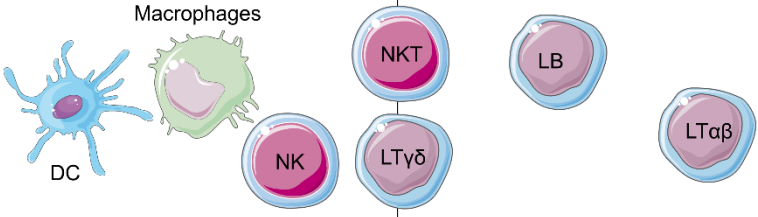
		Immunité innée	Immunité adaptative
Chronologie	Primo-infection	Réponse rapide Première barrière contre les pathogènes	Seconde ligne de défense (temps de latence \pm 7 jours)
	Infections répétées	Identique à la réponse primaire	Mémoire immunitaire -> temps de latence quasi nul
Spécificité		Réponse non spécifique	Réponse spécifique (Ig et TCR)
Motifs moléculaires reconnus		Invariables et communs à de nombreux pathogènes	Propres à l'agent infectieux
Effecteurs cellulaires et moléculaires		<div style="text-align: center;">  <p>Macrophages</p> <p>DC</p> <p>NK</p> <p>LT$\gamma\delta$</p> <p>NKT</p> <p>LB</p> <p>LT$\alpha\beta$</p> </div>	

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

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

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

L'immunité innée se caractérise par une mobilisation rapide de divers acteurs cellulaires et constitue une première ligne de défense pour le système immunitaire (Tableau 1). Ses modes d'action sont invariables et non adaptables. Les cellules de l'immunité innée

interviennent rapidement dans la réponse immunitaire et de façon non spécifique contre les cellules tumorales, reconnues comme anormales pour l'organisme, sans engendrer de mémoire immunologique. Il existe trois principaux types de cellules immunitaires sentinelles de l'immunité innée : les macrophages résidents, les mastocytes et les cellules dendritiques (DC) immatures, qui sont toutes qualifiées de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) grâce à leur capacité de présentation antigénique. D'autres cellules immunitaires impliquées dans l'immunité innée anti-tumorale sont dites circulantes : les *Natural Killers* (cellules NK), les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les *innate lymphoid cells*. Dans cette sous-partie du manuscrit, nous décrivons un type de CPA, les DC, afin de présenter la notion de signaux de danger impliqués dans la réponse immunitaire anti-tumorale et le processing de l'antigène tumoral. Puis nous décrivons un type de cellules circulantes, les cellules NK, qui participent à l'immunité innée et partagent de nombreuses caractéristiques communes avec les LT $\gamma\delta$.

I.1.A. Les cellules dendritiques

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

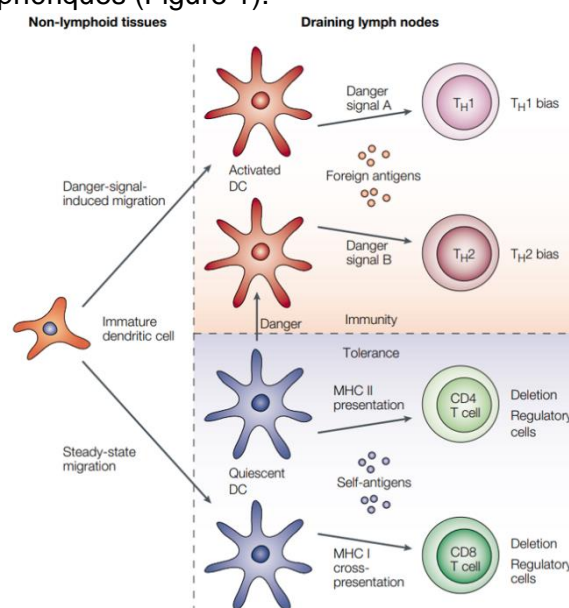
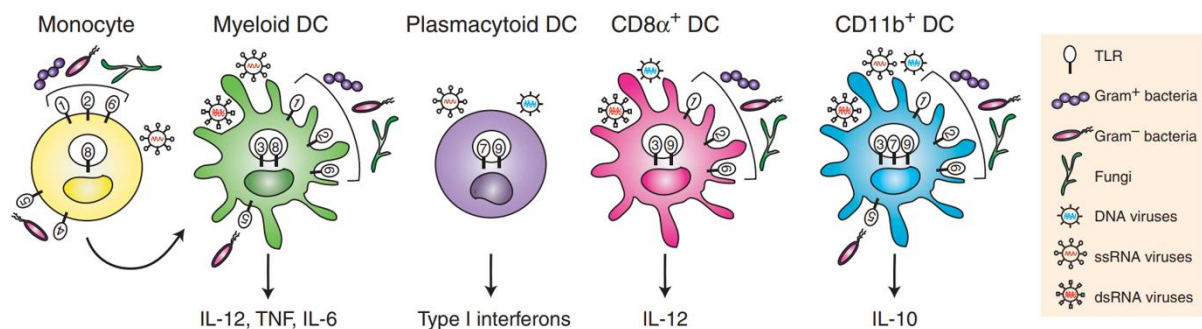


Figure 1 : Devenir des DC dans les nœuds lymphatiques drainants. ²

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

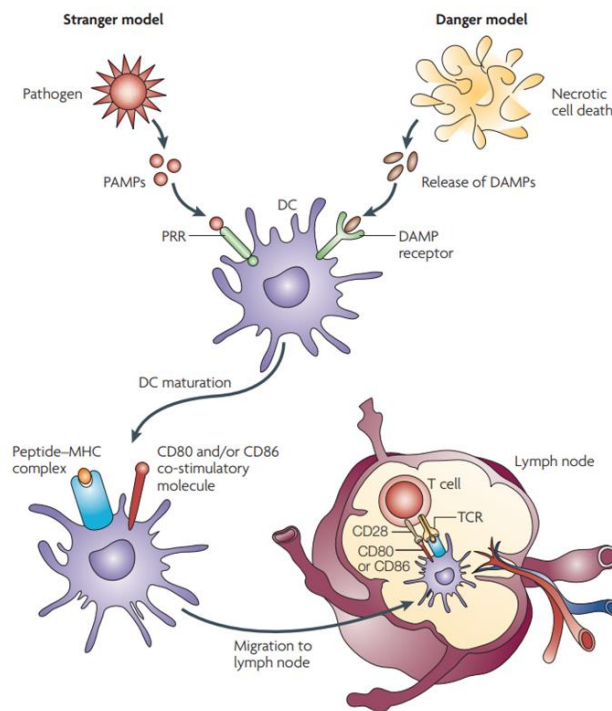


existe différents sous-types (Figure 2).

Figure 2 : Principales DC humaines reconnaissant différents TLRs. ³

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

augmentent également leur expression de molécules comme CD80/CD86 (ligands de la molécule co-activatrice CD28) ou CD40 (récepteur du CD40L), permettant de fournir les signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation efficace des lymphocytes T. Ce



mécanisme est résumé dans la Figure 3 ci-dessous.

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

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

I.I.B. Les cellules NK

Les cellules NK font parties du groupe cellulaire hétérogène des *innate lymphoid cells* (ILC), qui dérivent des progéniteurs lymphoïdes communs dans la moelle osseuse. Il existe cinq groupes majeurs d'ILCs, définis suivant le type de cytokines produites et les facteurs de transcription requis pour leur développement : les cellules NK, les ILCs du groupe 1 à 3 (ILC1s, ILC2s et ILC3s) et les cellules lymphoïdes induites par les tissus (LTi). Les cellules NK et les ILC1s sécrètent l'IFN- γ et expriment T-bet, en plus d'EOMES pour les cellules NK uniquement. Les ILC2s expriment GATA3 et sécrètent l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Les ILC3s expriment ROR γ t et sécrètent l'IL-22 et/ou l'IL-17A ⁶. On peut considérer que les ILC1s, ILC2s et ILC3s sont les parallèles des sous-types de lymphocytes T *Helper* (T_H1, T_H2 et

T_H17) (que nous décrivons dans la partie I.II du manuscrit) et produisent des cytokines qui façonnent les réponses de l'immunité innée et adaptative. Les cellules NK, caractérisées par le phénotype CD3⁻ CD56⁺, ont été découvertes dans les années 1970 et ont fait l'objet de nombreuses études démontrant leur effet cytotoxique sur les cellules tumorales. De plus, les cellules NK partagent de multiples caractéristiques communes aux lymphocytes T $\gamma\delta$, population cellulaire figurant au cœur de mes travaux de thèse. Ainsi, nous allons détailler ci-dessous les différents récepteurs de cellules NK, communs aux lymphocytes T $\gamma\delta$.

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

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

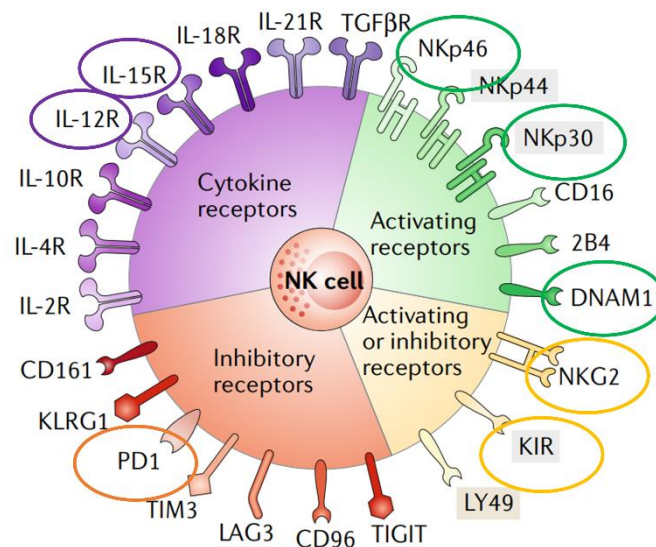


Figure 4 : Les récepteurs exprimés par les cellules NK (Adapté de ⁷).

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

Récepteurs NK bivalents (activateurs ou inhibiteurs)

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

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

NKG2D (ou CD314) est un récepteur activateur des cellules NK qui présente différents ligands. Chez l'homme, huit ligands de NKG2D ont été identifiés : MIC-A et MIC-B (*Major histocompatibility complex class I chain-related protein A* et B) et six protéines de liaisons UL16⁸⁻¹⁰. Ce récepteur va reconnaître des ligands permettant la survie, la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines¹¹. En effet, la downrégulation de NKG2D entraîne une diminution des fonctions anti-tumorales des cellules NK, associée à un risque élevé d'apparition de syndrômes myélodysplasiques¹². Les stratégies thérapeutiques utilisant NKG2D sont efficaces dans les stades précoces de la croissance tumorale. Cependant, différents cancers vont développer des mécanismes échappant au contrôle de NKG2D via le relargage de ligands solubles (sNKG2D-L) à la surface de la tumeur, induisant l'internalisation de NKG2D et affectant les fonctions effectrices des cellules NK. En effet, un taux élevé de ligands solubles de NKG2D dans le sérum d'une souris atteinte d'un cancer est corrélé à une croissance plus importante de la masse tumorale¹³.

NKG2A est un récepteur inhibiteur fortement impliqué dans la réactivité des cellules NK avec les autres cellules immunitaires de l'environnement tumoral. Ce récepteur appartient à la famille des lectines C, comme CD94 et NKG2C. Ces protéines sont groupées sous forme d'hétérodimères formant des récepteurs activateurs (CD94/NKG2C) ou inhibiteurs (CD94/NKG2A) qui ont pour ligand la molécule de CMH I non classique HLA-E, pouvant être exprimée à la surface de diverses cellules infectées ou cancéreuses. NKG2A participe au dialogue entre les cellules NK et les lymphocytes T infiltrant des tumeurs solides comme par exemple les cancers du sein¹⁴. Dans cette étude, l'anticorps bloquant Monalizumab dirigé contre NKG2A en combinaison avec un anti-PD1 va promouvoir les réponses des LT effecteurs et favoriser les réponses effectrices des cellules NK et notamment la conduction de l'ADCC. De plus, la fréquence des cellules NKG2A^{pos} au sein de la masse tumorale est associée à la sécrétion d'IL-15¹⁵ et de TGF- β ¹⁶ dans les cancers.

Les cellules NK expriment à leur surface des KIR qui vont réguler leur activation, en diminuant l'activité anti-tumorale des cellules NK, favorisant ainsi la tolérance immunitaire. L'impact clinique des KIRs sur les réponses anti-tumorales médiées par les cellules NK a été initialement démontré chez des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) traités par transplantation de cellules souches hématopoïétiques¹⁷. Il existe des anticorps monoclonaux dirigés contre les KIRs. Ces derniers ont démontré un effet dans les LAM et les

myélomes multiples (MM) sans pour autant présenter d'effets indésirables auto-immuns ou de toxicités sévères ^{18,19}.

Récepteurs NK activateurs

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

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

Par ailleurs, NKp46 est impliqué dans la reconnaissance et la mort de différentes tumeurs et cellules infectées par les cellules NK ²⁴. De plus, il participe au cross-talk entre les cellules NK et d'autres effecteurs de l'immunité innée, comme les neutrophiles et les éosinophiles ^{25,26}.

DNAM-1 (ou CD226) est une glycoprotéine de surface liant CD112 (connue sous le nom de Nectin-2) et CD115 (connue sous le nom de Necl5). DNAM-1 est une molécule d'adhésion impliquée dans les mécanismes de cytotoxicité des cellules NK et des lymphocytes T ^{27,28}. Ainsi, cette molécule a émergée comme un pivot régulant les fonctions anti-tumorales des cellules NK, grâce à une action conjointe de CD226 avec TIGIT et CD96 ²⁹. Néanmoins, tel que pour NKG2D, les cellules tumorales développent des mécanismes de résistance à DNAM-1.

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

Récepteurs NK inhibiteurs

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

Le récepteur PD-1 est exprimé à la surface des cellules T mais également des cellules NK et son engagement avec ses ligands respectifs PDL-1 et PDL-2 va induire une forte inhibition des fonctions anti-tumorales de la cellule, permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'immunosurveillance médiée par les cellules T ³⁰. Il a été récemment montré que PD-1 est présent à la surface des cellules NK du sang périphérique chez des patients HCMV⁺ ³¹. *In vitro*, les cellules NK PD-1⁺ de ces patients étaient associées à une forte baisse de l'activité anti-tumorale contre les cellules tumorales PDL-1⁺ (en matière de cytotoxicité, de prolifération et de production cytokinique). Ce phénomène était en partie réversible suite à l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant cet axe PD-1/PDL-1 afin de bloquer cette interaction.

Récepteurs NK de cytokines

Les cellules NK expriment à leur surface des récepteurs de cytokines qui sont importantes pour leur fonction, comme par exemple le récepteur à l'IL-12 ou à l'IL-15. En effet, les CPA activées sécrètent de l'IL-12, qui va notamment stimuler la croissance et l'activation des cellules NK, leur permettant d'exercer leur action cytotoxique sur les cellules tumorales ³². De plus, l'IL-15 est importante dans la survie, la prolifération et le maintien des capacités cytotoxiques des cellules NK ³³.

A côté de l'expression de ces récepteurs décrits ci-dessus, les cellules NK peuvent également produire un champ de cytokines et chimiokines pouvant réguler les réponses immunitaires. Par exemple, les NK relargent le *CC-chemokine ligand 5* (CCL5), le *XC-chemokine ligand 1* (XCL1) et XCL2 ; ce qui va entraîner le recrutement des DC dans les tumeurs solides qui sera corrélé à une augmentation de la survie globale des patients ³⁴.

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

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

Contrairement aux autres cellules immunitaires qui vont acquérir progressivement leur activité cytolytique, les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent l'intérêt majeur

d'être déjà « prêtes à tuer ». Les cellules NK matures peuvent être définies comme des lymphocytes très granuleux. Ces granules contiennent à la fois des perforines (protéines perturbant l'intégrité membranaire) et des granzymes (famille d'enzymes protéolytiques), responsables de la cytotoxicité des cellules NK ³⁵. Lorsque les cellules NK interagissent avec leurs cellules cibles, une synapse immunologique va se former, permettant l'exocytose de ces granules pour conduire à la lyse spécifique de la cellule cible ³⁶. De plus, les cellules NK sont capables de tuer les cellules tumorales en utilisant des molécules de la famille des *tumor necrosis factor* (TNF). Les cellules NK expriment à la fois du TNF soluble et membranaire, et l'activation des cellules NK va induire l'expression de ligands de mort, comme le ligand FAS (FASLG ou TNFSF6) et le *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) à la surface des cellules NK ³⁷. Après liaison de ces ligands, les récepteurs de mort exprimés à la surface des cellules cibles (comme par exemple FAS) peuvent activer la cascade enzymatique des caspases permettant leur apoptose ³⁸. Ainsi, les cellules NK présentent des fonctions cytolytiques leur permettant d'exercer une fonction anti-tumorale directe.

De plus, les cellules NK peuvent exercer des fonctions anti-tumorales indirectes car elles régulent les cellules T via la modulation des CPA décrites dans la partie précédente de ce chapitre (partie I.I.A. de cette introduction). Par exemple, un cross talk entre les cellules NK et les DC peut mener à l'engagement du récepteur activateur NKp30 (ou NCR3), permettant la production d'IFN- γ par les cellules NK entraînant l'activation des DC. De plus, la manipulation des cellules NK dans les cancers permet d'initier des réponses immunitaires protectrices et durables à différents niveaux, impliquant plusieurs types cellulaires et notamment les lymphocytes T. Par exemple, il a été montré que le blocage du *checkpoint receptor T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) prévient l'exhaustion des cellules NK et permet l'obtention d'une réponse immunitaire T spécifique de la tumeur dépendante des cellules NK ³⁹.

L'implication des cellules NK dans l'immunité anti-tumorale a été démontrée dans des modèles de cancers solides mais aussi hématologiques. En effet, différentes études réalisées sur un grand nombre de patients ont montrées la valeur pronostique d'une cytotoxicité périphérique médiée par les cellules NK chez des patients atteints de cancers solides ⁴⁰. Cependant, la cytotoxicité médiée par les cellules NK n'est pas toujours corrélée à une forte expression de récepteurs activateurs sur ces cellules. En effet, une équipe a montré que les cellules NK infiltrées dans les tumeurs de patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) exprimant différents marqueurs d'activation (NKp44, CD69 ou encore HLA-DR) présentaient un potentiel cytotoxique altéré ⁴¹. Cette faible

cytotoxicité peut en partie s'expliquer par la présence des cellules NK dans le stroma et non en contact direct avec les cellules tumorales observée dans des biopsies des patients atteints de NSCLC de cette étude.

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

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

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

Les molécules du CMH qui présentent les antigènes peuvent être de deux classes : CMH I ou CMH II. Les peptides qui se lient aux molécules CMH des deux classes sont générés par des systèmes enzymatiques distincts et opérants dans des compartiments cellulaires différents. Les cavités de liaison des peptides des deux classes de molécules ont des propriétés distinctes, spécifiquement adaptées à la capture de peptides d'origines

variées et dans des environnements très différents. En effet, les peptides qui se lient aux molécules CMH de classe I sont produits par des protéases du cytosol et du réticulum endoplasmique (RE) qui génèrent des produits de dégradation de taille uniforme. En revanche, les peptides qui lient les molécules CMH de classe II sont les produits d'une série de protéases du compartiment endo-lysosomal, dans lequel les produits ultimes de la dégradation des protéines sont les acides aminés qui les constituent, et la cavité ouverte des molécules CMH de classe II est adaptée à la capture de produits intermédiaires de cette dégradation. De plus, ces différences se reflètent sur la façon dont les peptides sont attachés dans les cavités.

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

I.II.A. Principaux mécanismes d'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$

L'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ naïfs ($CD4^+$ ou $CD8^+$) requiert la présence de trois signaux complémentaires ⁴²:

Le *signal 1* correspond à la reconnaissance de l'antigène tumoral présenté par la DC via les molécules de CMH dont la classe diffère suivant s'il s'agit d'un LT CD4 ou LT CD8 ⁴³. Les lymphocytes T CD4 et CD8 naïfs circulent dans le sang et la lymphe jusqu'à ce qu'ils rencontrent un antigène, accompagné de molécules co-stimulatrices B7, qu'ils reconnaissent à la surface d'une DC dans un tissu lymphoïde secondaire.

Lors de cette étape, un des événements clé est la phosphorylation d'*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) au niveau de quatre composés du complexe TCR/CD3 : CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ et TCR- ζ . Cette phosphorylation est effectuée par différentes tyrosines kinases de la famille Src (notamment Lck) et entraîne par la suite le recrutement puis la phosphorylation de ZAP70. L'activation de ZAP70 aboutit entre autre à la phosphorylation des molécules LAT. Tous ces événements vont activer différentes voies de signalisation comme la cascade Ras/ERK MAPK, la voie Ca/Calcineurin/NF-AT ou encore la voie PKC/NF- κ B.

Le *signal 2* correspond au stimulus secondaire de co-stimulation. Ce signal 2 est nécessaire pour l'activation des cellules T puisqu'en présence du signal 1 mais en l'absence

du signal 2 ces dernières deviennent anergiques. Le récepteur de co-stimulation le plus important est CD28, constitutivement exprimé à la surface de 95% des LT CD4⁺ et 50% des CD8⁺ naïfs humains. Le récepteur CD28, reconnaissant les ligands CD80 et CD86, fournit en effet un signal de co-stimulation essentiel à la croissance et à la survie des cellules T. Il existe également d'autres récepteurs de co-stimulation, comme par exemple le récepteur *inducible T cell costimulator* (ICOS), dont l'expression est induite après activation des LT et va moduler la co-stimulation des cellules T. Ainsi, ces récepteurs de co-stimulation ont un rôle pivot dans la biologie des cellules T puisqu'ils déterminent le devenir du signaling du TCR.

Ces deux signaux simultanés (signal 1 et signal 2) participent à la formation d'une synapse immunologique (SI). Brièvement, une SI est composée de trois complexes d'activation : central, périphérique et distal (appelés respectivement cSMAC, pSMAC et dSMAC), contenant des molécules spécifiques qui sont cruciales pour la formation et la fonction de la SI. Au niveau de la cSMAC, on retrouve notamment le TCR, le CD3, LAT ou encore CD28.

Enfin, le *signal 3* correspond à l'expression de différentes cytokines exprimées par les LT CD4⁺ (notamment l'IL-1) et les LT CD8⁺ (comme l'IL-12, l'IFN- α/β), qui vont permettre l'expansion et les fonctions effectrices de ces lymphocytes⁴².

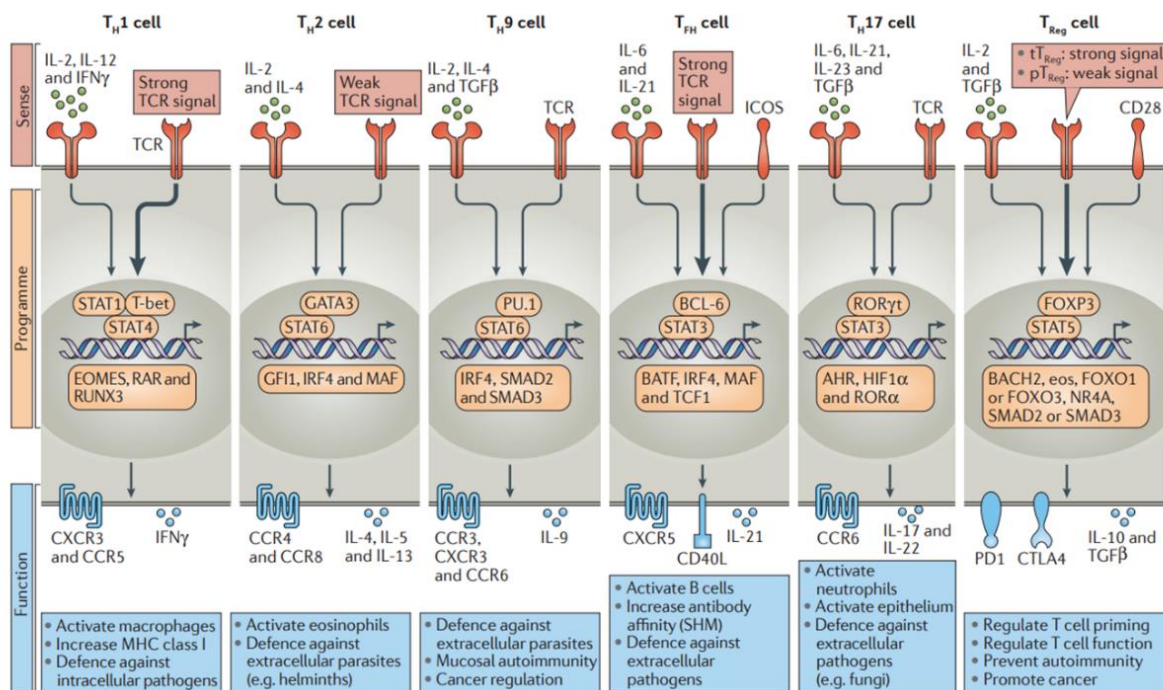
Ces différents signaux stimulent la prolifération et l'acquisition de fonctions effectrices par les cellules naïves. Les cellules T CD8 migrent dans les tissus pour y exercer leur action cytotoxique ; les cellules T CD4 peuvent migrer dans les follicules lymphatiques pour activer les cellules B ou se disperser dans les tissus périphériques pour coordonner ensuite l'action d'autres cellules. Ainsi, tous ces événements aboutissent à l'activation des lymphocytes, leur permettant d'exercer leurs fonctions effectrices, notamment anti-tumorales.

I.II.B. Les lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4, aussi appelés *lymphocytes T Helper*, reconnaissent des antigènes présentés par les molécules de CMH de classe II. Le LT CD4 va également interagir avec la molécule de CMH de classe II afin de stabiliser la SI permettant d'augmenter le temps de l'interaction entre le LT CD4 et la CPA, ce qui va ainsi potentialiser son activation. De plus, le LT CD4 activé va upréguler l'expression du CD40L à sa surface, qui va interagir avec le CD40 présent à la surface des CPA, ce qui provoque une augmentation de l'expression de CD80/CD86 sur ces dernières⁴⁴ (voir partie I.I. de

l'introduction). A la suite de cette activation, les LT CD4 vont subir une phase d'expansion clonale et de maturation au cours de laquelle ils acquièrent leurs fonctions effectrices. Comme nous l'avons vu précédemment (voir partie I.I.A.), les DC vont également participer à la régulation de la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II.

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



différents sous-types présentés dans la Figure 5 ci-dessous.

Figure 5 : Présentation des différents sous-types de LT CD4⁺.⁴³

Parmi ces sous-populations, les lymphocytes T CD4 Th1 et T régulateurs (Treg) sont très impliqués dans les réponses anti-tumorales. Par exemple, les lymphocytes T CD4 naïfs se polarisent en Th1 sous l'influence de l'IL-12 et de l'IFN- γ et expriment le facteur de transcription Tbet. Ces LT sécrètent principalement de l'IFN- γ et du TNF- α et participent à l'activation des lymphocytes T CD8 et des macrophages, pour exercer une réponse anti-tumorale dite de type Th1. Par ailleurs, les lymphocytes Treg expriment le facteur de transcription Foxp3. Ces LT auront une action pro-tumorale via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , et l'expression de récepteurs inhibiteurs à leur

surface.

I.II.C. Les lymphocytes T CD8

Dans l'immunité anti-tumorale, les lymphocytes T CD8 sont essentiels au cours de la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses. Pour cela, les lymphocytes T CD8 naïfs doivent rencontrer leur antigène spécifique présenté par les molécules du CMH de classe I, soit par les cellules cancéreuses, soit par les CPA du système immunitaire qui leur fournissent également des signaux de co-stimulation ¹. Cette activation leur permet d'acquies leurs fonctions de lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Bien qu'elle ne soit pas absolument nécessaire à leur activation, l'interaction avec les LT CD4 renforce grandement leurs fonctionnalités ⁴⁵. De plus, cette interaction avec les lymphocytes T CD4 est nécessaire à l'établissement de la mémoire des CTLs ^{46,47}. L'interaction CD40-CD40L permet également d'augmenter l'expression des molécules du CMH I et II sur les DC, ce qui permet une meilleure activation des CTLs ⁴⁸. Enfin, l'IL-2 et l'IFN- γ sont des signaux de co-stimulation impliqués dans la différenciation et l'activation des cellules NK et CTLs.

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

Comme les cellules NK vues dans la partie I.I.B. de cette introduction, les lymphocytes T CD8⁺ sont des cellules cytotoxiques grâce à deux principaux mécanismes d'induction de mort : l'exocytose de granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes A et B, et l'activation des voies des réceptrices de mort via FasL et TRAIL, leur conférant une action cytolytique anti-tumorale ⁴⁴. Nous reverrons plus en détail ces mécanismes cytotoxiques dans la partie II de l'introduction du manuscrit consacrée aux LT $\gamma\delta$ car ces propriétés sont également partagées par ces lymphocytes.

Outre les LT CD4⁺ et CD8⁺, d'autres lymphocytes comme par exemple les LT $\gamma\delta$ présentent une activité anti-tumorale très intéressante. Puisque les LT $\gamma\delta$ correspondent à

l'objet de mes travaux de thèse, ils seront détaillés dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

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

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T dits non conventionnels, par opposition à leurs homologues conventionnels appelés lymphocytes T $\alpha\beta$ (voir partie I.II. de l'introduction). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent un TCR particulier composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ ^{49,50}. Ces derniers forment un pont entre l'immunité innée et adaptative puisqu'ils partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes aux cellules NK et aux lymphocytes T $\alpha\beta$ (voir partie I de l'introduction du manuscrit et Tableau 1). En effet, les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent à leur surface de nombreux récepteurs communs avec les cellules NK leur conférant une activité cytotoxique comparable à celle que possèdent ces cellules de l'immunité innée. De plus, comme les lymphocytes T $\alpha\beta$, les lymphocytes T $\gamma\delta$ expriment un TCR leur permettant la reconnaissance d'un antigène grâce à un mécanisme de signalisation. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont moins abondants que les lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le sang périphérique, mais ils sont prédominants dans les tissus comme la peau, l'intestin et l'appareil reproducteur. De plus, ils ont montré un rôle critique, notamment dans l'induction de réponses immunitaires lors d'infection, de dommages tissulaires et de cancers, indiquant leur potentiel dans diverses applications ⁵¹. Leur vaste capacité de reconnaissance antigénique et leur très grande diversité fonctionnelle en font des acteurs essentiels dans les réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-tumorales. Dans cette seconde partie de l'introduction de ce manuscrit, nous allons tout d'abord détailler le développement, le répertoire, les fonctionnalités et les propriétés anti-tumorales des LT $\gamma\delta$. Nous verrons par la suite les différents sous-types de LT V γ 9V δ 2, leur réactivité ainsi que les applications cliniques des LT V γ 9V δ 2.

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

II.I.A. Développement

Le développement des cellules T $\gamma\delta$ débute par vagues programmées successives de cellules exprimant des segments géniques V spécifiques ^{52,53}. Les premiers stades de développement des lymphocytes T $\gamma\delta$ sont communs avec les lymphocytes T $\alpha\beta$. En effet, ces deux types cellulaires ont un précurseur bipotent dans la moelle osseuse qui n'exprime ni TCR, ni CD4, ni CD8 ; on parle de stade double négatif (DN) immature. Le précurseur DN2 va ensuite évoluer et passer par différents stades intermédiaires suivant les modifications d'expression de ses molécules de surface telles que le CD117, CD44, CD25 et le CD24. Des expériences menées chez la souris ont permis de déterminer que la

divergence des lignages entre les LT $\alpha\beta$ et les LT $\gamma\delta$ se produit au stade DN3a (double négatif 3a) (Figure 6).

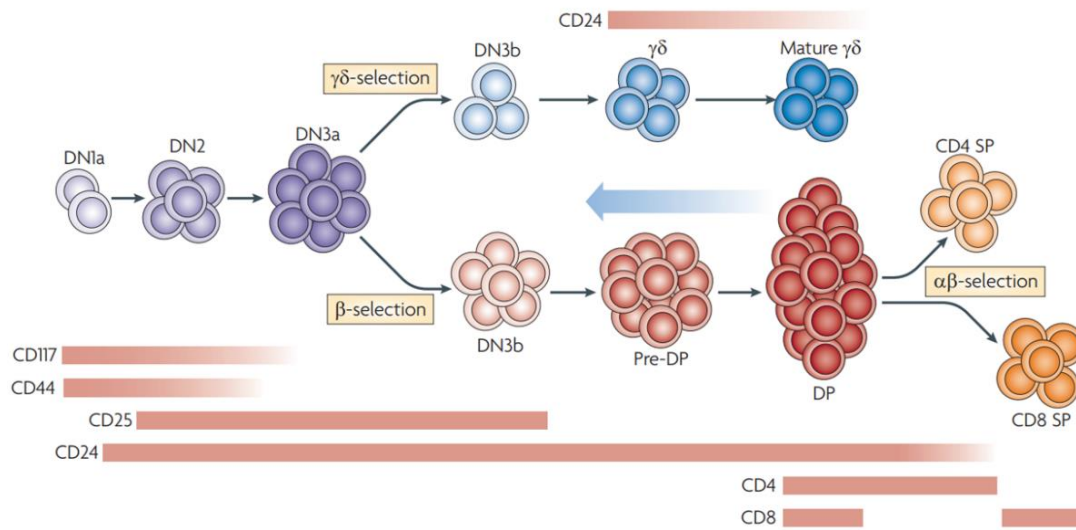


Figure 6 : Stades de développement des LT $\gamma\delta$ et LT $\alpha\beta$.⁵⁴

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

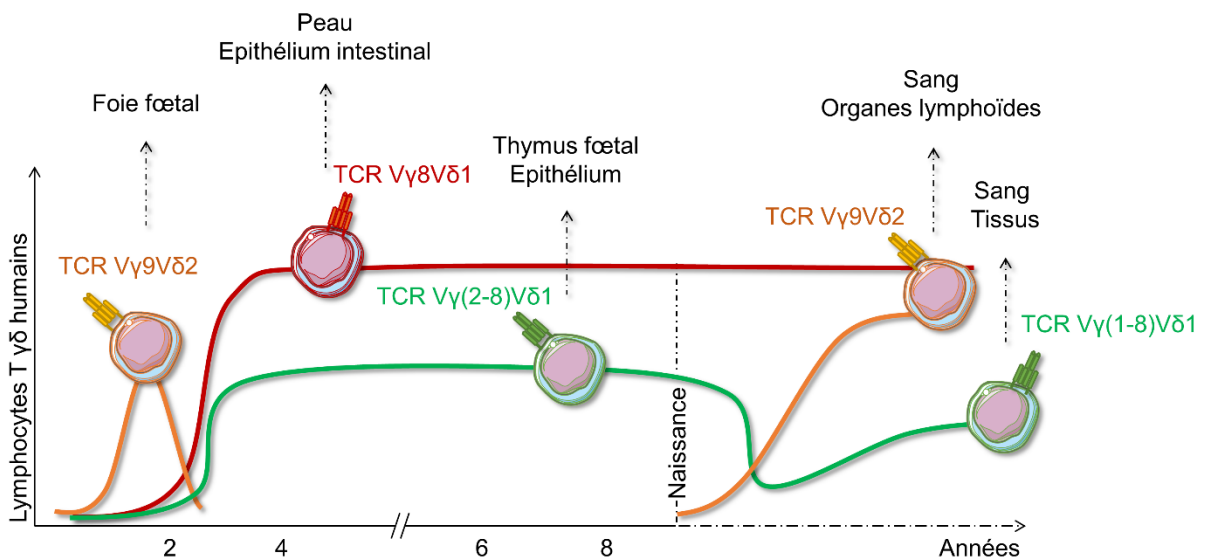


Figure 7 : Vagues de développement des LT $\gamma\delta$ chez l'homme (adapté de⁵³).

Les LT $\gamma\delta$ colonisent ensuite un organe particulier où ils restent tout au long de la vie

⁵⁵. Cette sous population de lymphocytes T représente entre 0,5 et 20% des cellules CD3⁺ humains du sang périphérique et des tissus lymphoïdes ⁵⁶⁻⁵⁸. Cependant, la génération des lymphocytes T V δ 1⁺ augmente tardivement pendant la gestation, et ces derniers représentent la majorité du répertoire $\gamma\delta$ dans le sang de cordon et dans le thymus pédiatrique. Après la naissance, l'expansion du nombre de LT V γ 9V δ 2 se poursuit au cours de l'exposition de l'individu aux micro-organismes pour devenir majoritaire au sein du répertoire $\gamma\delta$ du sang périphérique ⁵⁹. En effet, l'expansion numérique des LT V γ 9V δ 2 est concomitante avec leur phénotype mature. De plus, différentes infections vont stimuler leur expansion et des jumeaux auront différents profils de LT V γ 9V δ 2.

II.I.B Répertoire

Tout comme pour le TCR $\alpha\beta$, les gènes codant pour les chaînes γ et δ vont subir des mécanismes de recombinaisons somatiques aléatoires de différents segments aboutissant à la diversité du TCR $\gamma\delta$ via la production de milliards de récepteurs spécifiques d'antigènes. Cette recombinaison est réalisée par des enzymes appelées recombinases VDJ codées par les gènes RAG (*recombination activating gene*) 1 et RAG2. Ces enzymes s'associent entre elles pour reconnaître les séquences RSS (*recombination signal sequences*) et induire le clivage de l'ADN aux sites RSS. Cette coupure ne concerne qu'un seul brin d'ADN et permet la génération de gènes fonctionnels à partir de segments V (Variable), D (Diversité), J (Jonctionnel) et C (Constant). Le gène codant pour la chaîne γ est constitué d'un segment V et d'un segment J tandis que celui codant pour la chaîne δ se compose des segments V, D et J (Figure 8). Le segment C sera ensuite ajouté à ces deux gènes au moment de l'épissage post-transcriptionnel ⁵⁵.

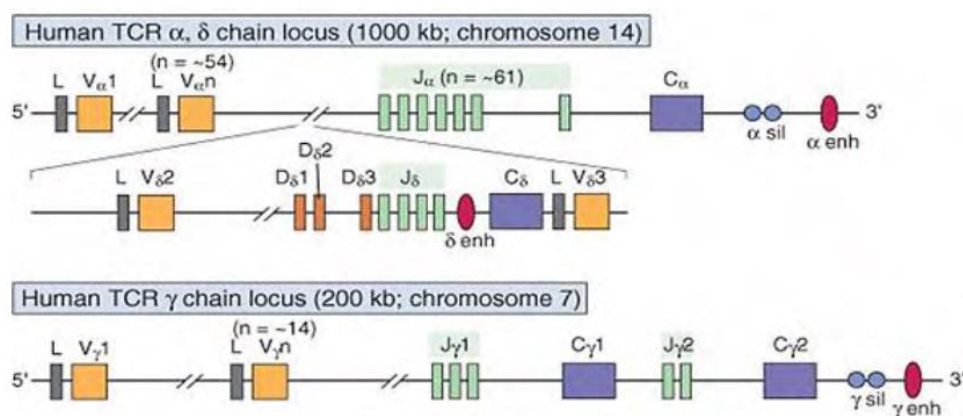


Figure 8 : Organisation des loci des gènes du TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ humain. ⁶⁰

Dans les cellules T $\alpha\beta$, les chaînes TCR β s'associent tout d'abord à la chaîne pré-

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

Les LT $\gamma\delta$ possèdent moins de gènes V que les LT $\alpha\beta$ et les possibilités de combinaisons des gènes V sont encore réduites du fait des conditions d'appariement entre les chaînes γ et δ ⁶¹. Ainsi la diversité du répertoire $\gamma\delta$ serait donc en théorie plus faible, mais elle est en partie compensée par une diversité fonctionnelle élevée liée à une grande variabilité de la boucle CD3R (*complementarity determining region 3*) de la chaîne δ conduisant à un nombre théorique de TCR 100 fois plus élevé que pour les LT $\alpha\beta$ ⁶²⁻⁶⁴. Il y a une corrélation entre le potentiel de formation de cellules T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$ et le nombre de segments géniques disponibles. La souris et l'homme ont relativement peu de segments $V\gamma$ et $V\delta$ (7 $V\gamma$ couramment exprimés chez la souris, dont 4 forment une famille ; 6 $V\gamma$ chez l'homme, dont 5 forment une famille ; 16 $V\delta$ environ chez la souris, 8 à 10 chez l'homme), tandis que le mouton, la vache et le poulet ont beaucoup plus de gènes TCR $\gamma\delta$ que les gènes $\alpha\beta$ et ont un plus grand nombre de cellules T $\gamma\delta$. Le développement des cellules T $\gamma\delta$ dépend de signaux de l'IL-7 et de la chaîne IL-7R α .

Ainsi, chaque réarrangement préférentiel au niveau des gènes codant les chaînes du TCR constitue une sous-population aux caractéristiques fonctionnelles particulières, puisque chacune va peupler spécifiquement un ou des organes, et vont servir de base à la classification des différentes sous-populations des LT $\gamma\delta$. Chez l'homme, on peut distinguer 4 sous-populations principales déterminées suivant l'expression de leur chaîne δ : les $V\delta 1$, $V\delta 2$, $V\delta 3$ et $V\delta 5$ ⁶⁵. En fonction de la chaîne γ associée, les LT $\gamma\delta$ n'auront pas la même localisation : par exemple au sein du groupe des LT $V\delta 1$, les LT $V\delta 1V\gamma 5$ seront majoritairement retrouvés dans la peau alors que les LT $V\delta 1V\gamma 6$ non.

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

II.II.A. Pléiotropie fonctionnelle et plasticité cellulaire

Les différents réarrangements préférentiels au niveau des gènes codants pour les chaînes du TCR vont catégoriser les lymphocytes en différentes sous-populations présentant des caractéristiques fonctionnelles propres, notamment en fonction de leur localisation ⁵⁵. Au-delà de la composante géographique, la fonctionnalité des LT $\gamma\delta$ est également déterminée par la réactivité antigénique et l'environnement. Les lymphocytes, et donc les LT $\gamma\delta$, sont des cellules dites « plastiques » c'est-à-dire adaptables en fonction d'un contexte donné, par exemple un signal de danger, afin de produire une réponse immunitaire adéquate. Il a été rapporté que les LT V γ 9V δ 2 peuvent être polarisés en cellules $\gamma\delta$ T17 (produisant uniquement de l'IL-17), en cellules $\gamma\delta$ T1/T17 (produisant à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- γ), en cellules $\gamma\delta$ T1 (produisant à la fois de l'IFN- γ et du *Tumor Necrosis Factor* TNF- α) et en cellules $\gamma\delta$ T2 (produisant de l'IL-4) via différentes cytokines requises pour l'initiation et la maintenance de la polarisation ⁶⁶. Ainsi, les LT $\gamma\delta$ vont pouvoir exercer leurs fonctionnalités dans deux cas de figure, infectieux ou tumoral, suivant l'environnement. Puisque notre équipe est spécialisée dans le domaine de l'immuno-oncologie, nous nous intéresserons particulièrement aux fonctionnalités des LT $\gamma\delta$ appliquées aux tumeurs.

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

Il est possible de classer les différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$ en fonction de leur activité pro- ou anti-tumorale (Figure 9).

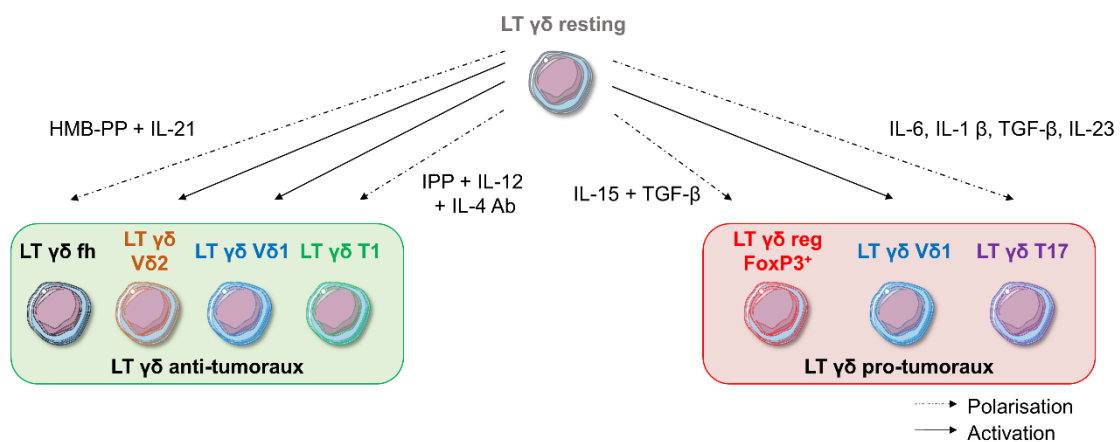


Figure 9 : Classification des LT $\gamma\delta$ suivant leurs fonctions tumorales (adapté de ⁶⁵).

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

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

Les LT $\gamma\delta$ V δ 1 correspondent à un sous-groupe de LT $\gamma\delta$ exerçant une activité tumorale bivalente, à la fois pro- et anti-tumorale. Ainsi, ils ont été récemment identifiés comme ayant une activité pro-tumorale puisqu'ils vont moduler le système immunitaire et le micro-environnement tumoral (MET), mais aussi promouvoir l'invasion tumorale et l'apparition de métastases. En effet, les LT $\gamma\delta$ V δ 1 sont impliqués dans l'inflammation induite par la progression tumorale, qui dépend de la production de l'IL-17A⁶⁷. Une autre étude a montré que les LT $\gamma\delta$ V δ 1 pouvaient sécréter de façon importante le TGF- β , induisant une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) permettant au cancer d'échapper à l'immuno-détection favorisant l'installation de métastases et l'invasion tumorale⁶⁸. Un déséquilibre entre les proportions de LT $\gamma\delta$ V δ 1 et V δ 2 (avec une augmentation du ratio V δ 1/V δ 2) va contribuer au développement tumoral⁶⁹⁻⁷¹ et est médié par l'IL-4. En effet, cette cytokine va inhiber l'activation des LT $\gamma\delta$ V δ 1 naïfs de façon TCR-STAT6 dépendante, ce qui va promouvoir la croissance des LT $\gamma\delta$ V δ 1 activés et donc upréguler le nombre des LT $\gamma\delta$ V δ 1. Ces LT $\gamma\delta$ V δ 1 vont sécréter de l'IL-10 entraînant une inhibition des LT $\gamma\delta$ V δ 2⁷². En présence d'IL-4, les LT $\gamma\delta$ V δ 1 sécrètent significativement moins d'IFN- γ , plus d'IL-10 et expriment moins de NKG2D en comparaison avec les LT $\gamma\delta$ V δ 2. Chez l'homme, il a été également montré que les LT $\gamma\delta$ V δ 1 infiltrant des tumeurs du sein peuvent inhiber la maturation des DC et leur fonctions présentatrices d'antigènes ainsi que freiner l'activation des LT $\alpha\beta$ naïfs et leur différenciation en cellules T effectrices (CD4⁺ et CD8⁺) via la voie de signalisation du TLR 8⁷³.

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

Comme pour les LT $\alpha\beta$ conventionnels, il existe des LT $\gamma\delta$ dits régulateurs qui possèdent une fonction immunosuppressive, et sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD25⁺ et FOXP3⁺ (*Forkhead box P3*), suite à la stimulation *in vitro* par l'IL-15 et le TGF- β (*Tumor Growth Factor*)⁷⁴. Ces LT $\gamma\delta$ régulateurs ont une fonction similaire aux LT $\alpha\beta$ régulateurs, en supprimant la prolifération des PBMCs stimulés par des billes anti-CD3/CD28. De plus, les LT $\gamma\delta$ régulateurs sont également impliqués dans l'action immunosuppressive du MET. En effet, dans les cancers du sein, les LT $\gamma\delta$ régulateurs (exprimant la chaîne V δ 1) sont attirés par les cellules tumorales et vont sécréter la chimiokine IP-10⁷⁵. Dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique ductal, il a été montré que les LT $\gamma\delta$ expriment fortement le PDL-1 et favorisent l'angiogenèse pancréatique en restreignant l'activation des LT $\alpha\beta$ ⁷⁶. De plus, les LT $\gamma\delta$ régulateurs peuvent engendrer l'arrêt du cycle cellulaire des cellules T effectrices en induisant la senescence des cellules T. Enfin, les LT $\gamma\delta$ régulateurs vont aussi induire la senescence des DC, entraînent une modification de leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles⁷⁷.

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

Il existe des cytokines pro-inflammatoires appartenant à la famille de l'IL-17 (IL-17A à IL-17F), retrouvées dans l'organisme au cours de différents contextes. Parmi ces cytokines, l'IL-17A est la plus étudiée et peut être produite par une classe de LT CD4⁺ dits LT Th17 IL-17⁺⁷⁸. D'autres cellules immunitaires, dont les LT $\gamma\delta$, peuvent produire de l'IL-17A, on parle alors de LT $\gamma\delta$ 17 (ou T17). Les LT $\gamma\delta$ 17 jouent un rôle dans la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse dans les cancers de la vésicule biliaire et ovarien par exemple^{79,80}. Les LT $\gamma\delta$ 17 représentent la source principale d'IL-17, cytokine jouant un rôle délétère dans les cancers. Dans les cancers de la vésicule biliaire, les LT $\gamma\delta$ 17 migrent au niveau du site tumoral en utilisant l'axe CXCL9-CXCR3. L'IL-17, sécrétée par les LT $\gamma\delta$ 17, induit la production de différents facteurs favorisant l'angiogenèse, dont le *vascular endothelial growth factor* (VEGF). La présence des LT $\gamma\delta$ 17 a été associée à une faible survie des patients atteints de ces cancers⁷⁹. Après exposition à l'IL-6 et le TGF- β , les LT $\gamma\delta$ CCR6^{neg} infiltrant la tumeur vont se polariser en LT $\gamma\delta$ 17. De plus, les souris déficientes en IL-17 ont montré une diminution de l'angiogenèse entraînant une plus faible progression tumorale, laissant suggérer le rôle majeur des LT $\gamma\delta$ 17 dans la croissance tumorale. Les LT $\gamma\delta$ 17 est une des populations cellulaires recrutant le plus de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs), connues pour faciliter la progression tumorale, notamment des cancers du sein et

colorectal⁸¹⁻⁸³. Les LT $\gamma\delta$ peuvent réguler la tolérance immunitaire en favorisant l'infiltration des MDSCs dans la tumeur, entraînant une exhaustion des LT CD8⁺ médiée par les MDSCs⁸⁴. Les LT $\gamma\delta$ 17 de la peau jouent également un rôle critique dans l'inflammation. Ainsi leur coopération avec les MDSCs va mettre à défaut la surveillance immunitaire au profit de la progression tumorale et permettre la croissance et l'avancée des cellules malignes^{85,86}. Dans un modèle de cancer ovarien murin, les LT $\gamma\delta$ V γ 6⁺ CD27⁻ sécrétant de l'IL-17 vont permettre aux macrophages péritonéaux de rester sur le site tumoral pour exercer leur action d'uprégulation de différents médiateurs pro-tumoraux et pro-angiogéniques⁸⁷. De plus, les LT $\gamma\delta$ peuvent impacter les fonctions des neutrophiles dans les cancers du sein. En effet, une étude montre que l'IL-1 β et l'IL-17 sécrétés par les LT $\gamma\delta$ 17 vont stimuler l'expansion et la polarisation des neutrophiles. Ces neutrophiles induits par la tumeur acquièrent la capacité de supprimer les LT cytotoxiques ce qui facilite l'installation des métastases⁸⁸. De plus ces neutrophiles sont aussi capables de supprimer les LT V γ 9V δ 2 périphériques^{89,90}. Les neutrophiles vont donc empêcher l'action des LT V γ 9V δ 2, en synergie avec l'action des LT $\gamma\delta$ 17, pour favoriser un MET immunosuppresseur.

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

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

L'émergence de l'importance des LT $\gamma\delta$ dans le développement tumoral a été établie grâce à une étude majeure mettant en évidence une forte susceptibilité de développement de carcinomes cutanés squameux après exposition à des agents mutagènes dans des souris déficientes en LT $\gamma\delta$ ⁹¹. Depuis, de nombreuses études *in vivo* ont confirmé l'effet protecteur des LT $\gamma\delta$, notamment dans des modèles de transplantation et de cancers spontanés⁹². De plus, des études ont rapporté l'importance de la production de l'IL-17 par les LT $\gamma\delta$ qui pourrait agir en synergie avec les molécules de chimiothérapies inductrices de mort cellulaire⁹³. L'expansion de TILs (et notamment les LT $\gamma\delta$) a été observée dans des lésions tumorales précoces de modèles murins de cancers du sein (MMTV-PyMT) et de la prostate (Tramp)⁹⁴. Bien que la corrélation entre le niveau de TILs $\gamma\delta$ V δ 1 et le résultat clinique varie suivant le type tumoral, le rôle des LT $\gamma\delta$ dans l'immuno-surveillance tumorale est important. Par exemple, les TILs $\gamma\delta$ V δ 1 sont associés à un bon pronostic chez des patients atteints de mélanomes⁹⁵. A l'aide d'un modèle murin métastatique de colon, une étude a montré que

l'injection systémique de LT $\gamma\delta$ V δ 1 activés au préalable inhibait la croissance des cellules tumorales mais aussi l'émergence de foyers tumoraux secondaires au niveau du poumon et du foie ⁹⁶. L'identification des sous-types cellulaires par utilisation de l'algorithme CIBERSORT (estimation des différents sous-types à partir des transcrits connus) a permis la publication d'une analyse majeure des signatures transcriptomiques des différents sous-types immunitaires réalisée sur 18 000 tumeurs. Cette cartographie du paysage immunologique des différents TILs a montré que les LT $\gamma\delta$ sont les cellules immunitaires qui sont associées au meilleur pronostic clinique, en comparaison avec les autres sous-types immunitaires, ce qui a participé à l'engouement pour les LT $\gamma\delta$ ⁹⁷. Une étude plus récente a réanalysé la signature génique des LT V γ 9V δ 2 afin d'améliorer la distinction entre ce sous-type cellulaire et d'autres cellules comme les LT $\alpha\beta$ ou les cellules NK ⁹⁸. Cette étude a mis en évidence que l'abondance des TILs LT V γ 9V δ 2 n'est pas corrélée avec celle des LT $\alpha\beta$ ni à la charge mutationnelle des tumeurs. Ces résultats montrent la singularité des LT $\gamma\delta$ qui ne sont pas redondants avec les LT $\alpha\beta$, et leur intérêt d'utilisation dans des tumeurs présentant une faible charge mutationnelle. Des études récentes utilisant des nouvelles technologies sur cellules uniques vont permettre d'apporter des nouvelles connaissances dans la biologie des TILs ⁹⁹. Des niveaux élevés de LT $\gamma\delta$ circulants sont également associés à un risque réduit de cancer, à une amélioration de la survie sans progression à 5 ans et de la survie globale après transplantation de moelle osseuse chez des patients atteints de leucémies aigües ¹⁰⁰.

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

Les LT $\gamma\delta$, et notamment les LT V γ 9V δ 2, peuvent exercer leurs fonctions anti-tumorales de façon directe suivant les caractéristiques présentées dans la Figure 10.

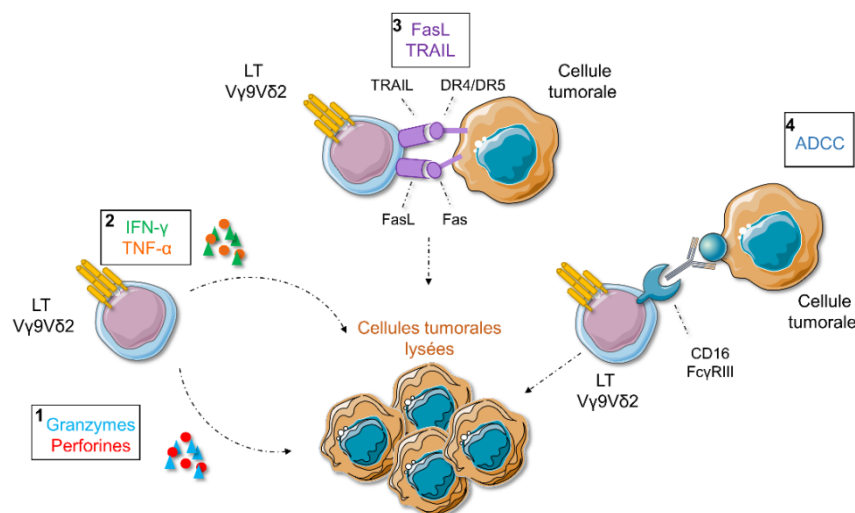


Figure 10 : Potentiel cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cellules cancéreuses (adapté de ⁶⁵).

D'après la Figure 10, les LT V γ 9V δ 2 présentent un potentiel cytolytique suivant quatre aspects :

La voie des perforines et granzymes

Comme les cellules NK, les LT V γ 9V δ 2 sécrètent des granules lytiques contenant des granzymes A, B ou M ; de la perforine et de la granulysine afin de lyser les cellules tumorales après migration au niveau du site tumoral^{66,101,102}. Alors que l'expression de ces molécules est nulle aux stades T_N et T_{CM}, elle est maximale dans les LT V γ 9V δ 2 matures (stade T_{EMRA})^{103,104}. Comme détaillé dans la partie I.I. de l'introduction, la perforine forme des pores dans la membrane de la cellule cible, elle pourrait donc induire seule la lyse de la cellule tumorale. Cependant, l'action lytique est potentialisée par les actions combinées de la perforine avec les granzymes, qui peuvent s'introduire par les pores membranaires formés par la perforine et induire la mort de la cellule cible en activant les caspases ou d'autres voies caspase-dépendantes³⁵. En effet, l'inhibition de cette voie dans les LT $\gamma\delta$ entraîne une diminution de la capacité de lyse des cellules tumorales du sein *in vitro*¹⁰⁵. Dans les cancers du rein, les LT $\gamma\delta$ présentent un potentiel de lyse sélective des cellules cancéreuses primaires autologues, qui ne sera pas dirigé contre les cellules rénales saines de l'hôte. Afin de suivre la dégranulation de la perforine et des granzymes, les études utilisent couramment le marqueur *lysosome-associated membrane protein* (LAMP) 1/CD107a qui permet la libération de ces granules³⁶.

La production importante de cytokines pro-inflammatoires

Les LT $\gamma\delta$ peuvent produire de grandes quantités d'IFN- γ et de TNF- α ^{106,107}. Ces deux cytokines inhibent la croissance tumorale via différents mécanismes, notamment l'induction d'une immunité anti-tumorale et l'inhibition de l'angiogénèse cancéreuse¹⁰⁸. La sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les LT $\gamma\delta$ est favorisée par différents stimuli, notamment les agonistes du TCR, les ligands de NKG2D et certaines cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-18¹⁰⁹.

Les ligands TRAIL et FasL

Les ligands des récepteurs de mort comme FasL (CD95L) et TRAIL sont retrouvés à la surface des LT V γ 9V δ 2 et se lient respectivement aux récepteurs Fas (CD95) et DR4/DR5 (*Death Receptor 4/5*) exprimés sur les cellules cancéreuses. Cette interaction va induire

l'AICD (*Activated-Induced Cell Death*) de la cellule cible, c'est-à-dire sa mort par activation de la voie des caspases ou de la voie de la mort cellulaire mitochondriale⁶⁶. Le blocage de TRAIL entraîne une diminution de l'activité cytotoxique induite par les LT $\gamma\delta$ ¹¹⁰. A l'inverse, l'uprégulation de Fas dans des cellules d'ostéosarcomes entraîne une susceptibilité de ces cellules à la lyse par les LT $\gamma\delta$ ¹¹¹.

Les mécanismes d'ADCC

Les LT $\gamma\delta$, et notamment les LT V γ 9V δ 2, expriment le récepteur CD16 (ou Fc γ R III) leur permettant de réaliser de l'ADCC (*Antibody-Dependant Cell-Mediated Cytotoxicity*). En se liant à la région Fc des IgG, le CD16 constitue alors un autre moyen de reconnaissance des cellules cibles par les LT $\gamma\delta$. De plus, CD16 peut être uprégulé à la surface des LT $\gamma\delta$ suivant le contexte biologique et sa liaison à sa cible peut entraîner une cytotoxicité ou une autre fonction effectrice (comme par exemple la sécrétion de l'IFN- γ)^{112,113}. Enfin, lors de l'activation du LT V γ 9V δ 2 via le TCR, le CD16 joue un rôle de co-stimulateur qui conduit à une augmentation de la production de TNF- α et de la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2¹¹⁴. Ce mécanisme est mis à profit par différents anticorps thérapeutiques, comme par exemple le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la molécule de surface CD20. En effet, cet anticorps utilisé dans le traitement de certains lymphomes, reconnaît le CD20 exprimé à la surface des cellules B anormales du lymphome. Comme les autres IgG, cet anticorps possède un fragment Fc qui sera alors reconnu par le CD16 exprimé sur les LT $\gamma\delta$, leur permettant de réaliser l'ADCC sur les cellules du lymphome.

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

A côté des effets anti-tumoraux directs des LT $\gamma\delta$, ces cellules peuvent également exercer des effets anti-tumoraux indirects, suite à l'interaction avec des cellules B, des DC, des LT $\alpha\beta$ et des cellules NK. Par exemple, dans des souris non immunisées, la sécrétion d'anticorps par les LB est impactée par les LT $\gamma\delta$. En effet, une étude a démontré que l'ablation sélective des sous-groupes de LT $\gamma\delta$ V γ 4 et V γ 6 affectait fortement le niveau sérologique en anticorps dans des souris non immunisées¹¹⁵. Cela démontre que les LT $\gamma\delta$ sont capables de moduler les LB et leur production en anticorps. Une autre étude a observé une polarisation des LT $\gamma\delta$ en un sous-groupe présentant des caractéristiques typiques des *follicular B-helper T cells* (Tfh) après co-culture avec de l'IL-21 et de l'HMB-PP, indiquant qu'ils sont capables d'aider les LB dans la production d'anticorps, tout comme les Tfh¹¹⁶. En effet, l'HMB-PP va upréguler le récepteur à l'IL-21, qui en retour va jouer un rôle de co-

stimulateur via l'expression de la chimiokine CXCL13 pour attirer les lymphocytes B et apporter un support aux LT V γ 9V δ 2.

Les LT $\gamma\delta$ peuvent aussi agir comme des CPA pour le priming des LT $\alpha\beta$. Cette caractéristique de CPA a été pour la première fois reportée en 2005 ¹¹⁷. Après stimulation, le niveau d'expression des molécules présentatrices d'antigènes est augmenté sur les LT $\gamma\delta$, notamment ceux du récepteur activateur leucocytaire (CD69), de la molécule présentatrice d'antigène (HLA-DR) et de molécules de co-stimulation et d'adhésion (CD80, CD86, CD54 et CD40). A la différence des LT $\alpha\beta$, puisque les LT $\gamma\delta$ sont aussi des CPA, ils vont pouvoir upréguler le CD36, un récepteur scavenger impliqué dans la capture des cellules apoptotiques par les DC immatures et les macrophages. Suite à un fort niveau d'expression de CD36, les LT $\gamma\delta$ vont capturer les débris des cellules cancéreuses du foie tuées par ces effecteurs puis vont induire une réponse immunitaire CD8⁺ spécifique de l'antigène tumoral grâce à leur action de CPA ¹¹⁸. Enfin, une étude a montré la capacité des LT V γ 9V δ 2 activés à induire la prolifération de cellules T $\alpha\beta$ CD4⁺ naïves et promouvoir leur différenciation en CTL ¹¹⁹.

Les LT $\gamma\delta$ peuvent également cibler la maturation des DC. En retour, les DC peuvent également induire l'activation et la prolifération des LT $\gamma\delta$, permettant ensuite à ces cellules d'exercer leurs fonctions cytotoxiques et immunomodulatrices ¹²⁰, ce qui démontre que chacun de ces deux types cellulaires peut agir individuellement pour éliminer les cellules cancéreuses mais que leur action concomitante est synergique ¹²¹. Une étude a démontré que les LT V γ 9V δ 2 pouvaient accélérer la maturation des DC. Ce processus s'appuie sur l'expression de TNF- α ainsi que de signaux favorisant le contact cellulaire ¹²². Dans une autre étude, Conti et ses collaborateurs a également montré que l'activation des DC par les LT $\gamma\delta$ était presque entièrement médié par l'IFN- γ et le TNF- α , et nécessitait également le CD86 et le contact cellulaire entre la DC et les LT $\gamma\delta$ ¹²³. En contrepartie, les DC immatures, et dans une moindre mesure les DC matures (DCm), vont permettre de potentialiser la sécrétion de TNF- α par les LT V γ 9V δ 2 ¹²⁴.

Enfin, les LT $\gamma\delta$ vont favoriser la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules tumorales via l'engagement du récepteur CD137 ¹²⁵. Ainsi, cette étude a montré que l'expansion *in vitro* des LT $\gamma\delta$ améliore les capacités cytotoxiques des cellules NK sur des cellules tumorales de cancers NK-résistants. En effet, la cytolysse des cellules tumorales par les cellules NK était ici facilitée par la co-stimulation entre le CD137 exprimé à la surface des cellules NK et son ligand (le CD137L) exprimé sur les LT $\gamma\delta$.

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

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

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

Les cellules naïves (T_N) ont un phénotype CD27⁺, CD45RA⁺ et expriment fortement les récepteurs CCR7 et CD62L¹⁰³. Ces lymphocytes sont localisés essentiellement au niveau des ganglions lymphatiques. Les T_N sont hautement prolifératives mais ne possèdent pas de fonction effectrice.

Les cellules centrales mémoires (T_{CM}) ont un phénotype CD27⁺, CD45RA⁻ et sont issues de la maturation des cellules T_N après stimulation antigénique^{103,126}. Comme les cellules T_N, on les retrouve dans les ganglions lymphatiques, mais également dans le sang de façon importante. Ces cellules expriment faiblement CCR7 et fortement CD62L. Elles vont aussi exprimer de nouveaux récepteurs aux chimiokines, CCR5 et CXCR3, leur permettant de migrer au niveau du site inflammatoire. De plus, elles acquièrent le marqueur de phénotype mémoire CD45RO¹⁰³. Comme les cellules T_N, elles sont prolifératives en réponse à une stimulation. De plus, on peut les différencier en deux sous-populations, suivant l'expression du marqueur CXCR5. Les cellules CXCR5⁺ vont exprimer des molécules co-stimulatrices, comme le CD40L et ICOS (*Inductible T-cell COStimulator*) ; produire de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-10 et aider à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Les T_{CM} CXCR5⁻ seront CD40L⁻, ICOS⁻, ne sécrètent pas de cytokines et n'interagissent pas avec les lymphocytes B¹²⁷.

Les cellules de type effecteur mémoire (T_{EM}) sont CD27⁻ et CD45RA⁻ et expriment fortement les récepteurs aux chimiokines pro-inflammatoires CXCR3, CCR2, CCR5 et également CD45RO. De plus, les T_{EM} expriment faiblement le récepteur aux immunoglobulines G (IgG) Fc γ RIIIA (CD16A) et les NKRs¹⁰⁴. On peut les retrouver dans le sang périphérique mais principalement au niveau des sites inflammatoires. Contrairement

aux T_{CM} , les T_{EM} sont beaucoup moins prolifératives. De plus, elles seront fortement cytotoxiques (grâce à une importante production des cytokines IFN- γ et TNF- α ¹⁰³) mais seront faiblement cytolytiques (à cause d'une faible production de perforine).

Les LT V γ 9V δ 2 effecteurs mémoires terminaux (T_{EMRA}) sont CD27⁻ et CD45RA⁺. Ces cellules se situent essentiellement au niveau des sites inflammatoires ¹⁰³. Les cellules T_{EMRA} expriment le récepteur CD45RO mais contrairement aux T_{CM} , elles expriment peu de récepteurs aux chimiokines et beaucoup de CD16 ainsi que de NKRs. Expriment de fortes quantités de perforine, les T_{EMRA} présentent une activité cytotoxique importante envers certaines bactéries et cellules tumorales. De plus, elles produisent des cytokines pro-inflammatoires mais en quantités plus faibles que les T_{EM} ¹⁰⁴.

Les LT V γ 9V δ 2 pourraient passer successivement entre les quatre sous-populations suivant cette séquence, basée sur l'enchaînement de l'état de leur maturation ¹⁰³ :

$T_N \rightarrow T_{CM} \rightarrow T_{EM} \rightarrow T_{EMRA}$.

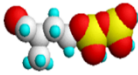
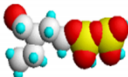
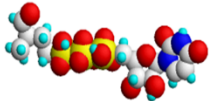
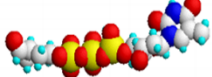
II.IV. Réactivité des LT V γ 9V δ 2

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

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

Dans les années 1990, les premiers antigènes spécifiques des LT V γ 9V δ 2 ont été mis en évidence suite à l'étude d'extraits de *Mycobacterium tuberculosis* qui s'avéraient capables d'activer des LT V γ 9V δ 2 *in vitro*. Cela a conduit à l'identification de petites molécules non peptidiques phosphorylées indispensables à leur fonction activatrice ^{128,129}. Ces carbohydrates de faibles poids moléculaires (<3KDa) contenant un groupement pyrophosphate ont alors été nommées phosphoantigènes (PAGs) ¹³⁰.

II.IV.A.1. Phosphoantigènes

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

Nature des phosphoantigènes

Les premières études réalisées sur les extraits de *Mycobacterium tuberculosis* ont permis d'isoler par des analyses structurales quatre antigènes non peptidiques phosphorylés dénommés tuberculosis antigens TUBag 1-4¹²⁸ et décrits dans la Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Structures des antigènes TUBag (adapté de¹³¹, P en jaune, O en rouge, C en blanc, N en bleu foncé, H en cyan).

Parallèlement, une autre équipe a identifié d'autres PAG naturels (isopentényl-pyrophosphate, diméthylallyl-pyrophosphate) ou synthétiques (alkyl phosphates) et a confirmé la nécessité du groupement phosphate, commun dans la structure¹³² (Figure 11).

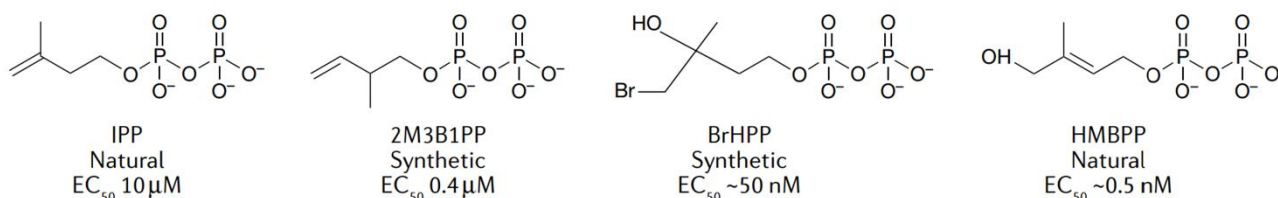


Figure 11 : Structures chimiques des principaux PAg naturels et synthétiques. ¹³³

Le PAg naturel qui a la plus forte réactivité décrite correspond au (E)-Hydroxydiméthylallyl pyrophosphate (HDMAPP), puisque sa capacité d'activation des LT Vγ9Vδ2 est 1000 fois supérieure à celle de l'IPP ¹³⁴. Grâce à la connaissance de la structure chimique des PAg naturels, des PAg synthétiques ont été produits, présentant des bioactivités très variables ¹³⁵. Par exemple, la forme synthétique de l'HDMAPP correspond au c-HDMAPP (ou Picostim), qui présente la même bioactivité que le PAg naturel mais une structure légèrement différente (un atome d'oxygène est remplacé par un atome de carbone au niveau de la chaîne de liaison carbonique) ¹³⁶. De plus, le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP) (ou Phosphotim) est connu comme étant un très bon activateur synthétique des LT Vγ9Vδ2. Il est utilisé en expérimentation et dans les essais thérapeutiques d'immunothérapies basés sur les LT Vγ9Vδ2 ^{134,137}.

Biosynthèse des phosphoantigènes

Les PAg naturels qui présentent la plus forte bioactivité sont des intermédiaires de synthèse de la voie métabolique des isoprénoïdes (Figure 12).

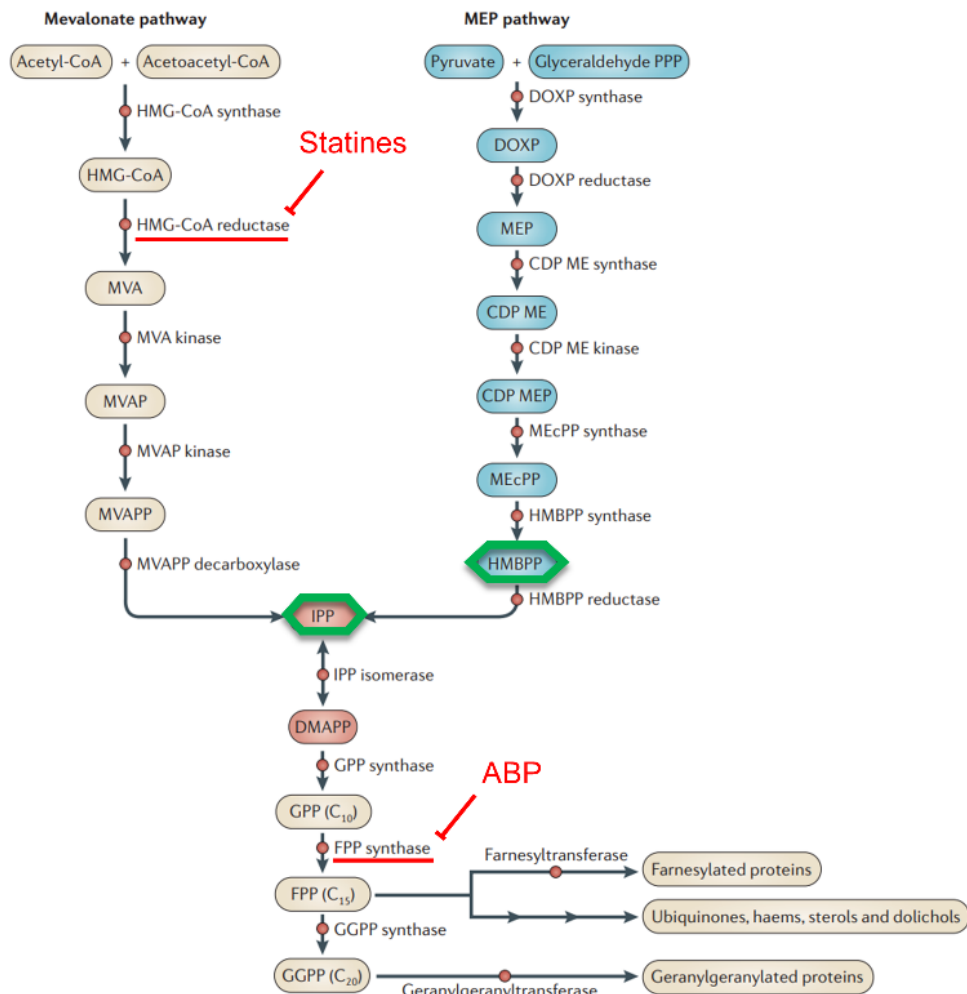


Figure 12 : Voies de biosynthèse du Mévalonate et du DOXP (adapté de ¹³⁸).

Il existe deux voies de synthèse de ces molécules : la voie de Rohmer (appelée également voie du DOXP (deoxyxylulose-5-phosphate)) et la voie du mévalonate, qui est ubiquitaire chez les eucaryotes ¹³⁹. Ces deux voies métaboliques différentes permettraient aux LT Vγ9Vδ2 de repérer les cellules infectées parmi les cellules saines grâce à leur production importante des PAgS IPP et HDMAPP, deux métabolites finaux communs à ces voies métaboliques (losanges verts sur la Figure 12) ¹⁴⁰. De nombreuses espèces du vivant utilisent ces voies métaboliques pour réaliser des processus biologiques nécessitant de l'énergie, notamment du cholestérol. Cette large utilisation pourrait expliquer l'implication des LT Vγ9Vδ2 dans la réponse immunitaire contre des pathologies infectieuses variées. Par ailleurs, la voie du mévalonate est ubiquitaire et peut être surexprimée dans certains types de cellules cancéreuses, pouvant expliquer en partie l'activation possible des LT Vγ9Vδ2 en présence de cellules cancéreuses ¹⁴¹.

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

Outre les PAgS, des molécules de la famille des alkylamines, comme par exemple l'iso-butylamine qui est naturellement sécrété par des bactéries commensales et donc présent notamment dans le sang périphérique, peuvent induire la production d'IL-2 et la prolifération des LT Vγ9Vδ2 entraînant leur activation spécifique ^{142,143}.

Une famille de molécules correspondant aux aminobiphosphonates (ABP), composés d'origine naturelle ou synthétique, sont connus depuis longtemps comme des inhibiteurs de la résorption osseuse et sont indiqués chez des patients atteints d'ostéoporose ou de métastases osseuses ¹⁴⁴. D'après la Figure 12, ces composés sont capables d'inhiber une enzyme intervenant dans la voie métabolique de biosynthèse du cholestérol entraînant par la suite une modification de la concentration intracellulaire en IPP pouvant moduler l'activation des LT Vγ9Vδ2 ¹⁴⁵. L'enzyme inhibée par les ABP correspond à la farnesyl diphosphate synthase (FPPS), responsable de la transformation de l'IPP en farnesyl diphosphate (FPP) (traits rouges sur la Figure 12) ^{138,146}. Cette inhibition va bloquer la synthèse de FPP ce qui entraîne une accumulation de l'IPP endogène pouvant induire de manière indirecte l'activation des LT Vγ9Vδ2. Au-delà de cette propriété, les ABP partagent une similitude structurale avec les PAgS (Figure 13).

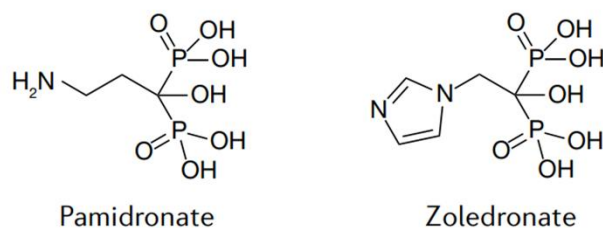


Figure 13 : Structures chimiques des principaux ABP. ¹³³

D'après une étude, les ABP (zoledronate, alendronate et pamidronate) sont capables d'induire une prolifération significative des LT V γ 9V δ 2 au sein des PBMCs de donneurs sains, strictement dépendante de l'IL-2 ¹⁴⁷. Les ABP conduisent à une activation efficace des LT V γ 9V δ 2 puisqu'ils entraînent une augmentation de l'expression du CD69 (marqueur d'activation apparaissant précocement à la surface des lymphocytes) et du CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2). Parmi les ABP, les plus utilisés en recherche et en clinique sont le zoledronate et le pamidronate et leur capacité d'activation pharmacologique des LT V γ 9V δ 2 se produit à une concentration inférieure à celle des alkylamines.

De plus, il existe une famille de composés pharmacologiques correspondant aux statines, dont le chef de file est la Mévastatine, qui vont inhiber la HMG-CoA réductase et donc bloquer la voie du mévalonate plus en amont que les ABP (traits rouges sur la Figure 12). Certaines molécules de la famille des statines correspondent au traitement de référence pour certaines pathologies métaboliques. Ainsi, une étude a montré que le traitement par la Mévastatine empêchait l'activation des LT V γ 9V δ 2 induite par le zoledronate ¹⁴¹. En effet, les statines bloquent l'accumulation d'IPP endogène, inhibant l'activation des LT V γ 9V δ 2 induite par un ABP ou une alkylamine ¹⁴⁶.

Les LT V γ 9V δ 2 seraient aussi capables de répondre à des superantigènes comme la SEA (Staphylococcal Enterotoxin A) ^{148,149} ou la TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1*) ¹⁵⁰. Dans cette étude réalisée sur des PBMCs humains, la TSST-1 peut induire une augmentation significative de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2, associée à une diminution de l'IL-10, après priming des LT $\gamma\delta$ par l'IPP, en comparaison au groupe contrôle sans priming. De plus, la déplétion des LT $\gamma\delta$ dans les PBMCs humains supprime cet effet, montrant l'importance des LT $\gamma\delta$ dans la réponse à la TSST-1. Cependant, il n'y a pas eu de nouvelle étude publiée à ce jour concernant la réponse des LT V γ 9V δ 2 aux superantigènes.

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

Il est clairement établi que l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg est dépendante de leur TCR. En effet, le blocage du TCR ou du CD3 permet d'inhiber la réactivité des LT V γ 9V δ 2^{128,141,132} tandis que la transfection d'un TCR V γ 9V δ 2 dans la lignée Jurkat (LT $\alpha\beta$ leucémique n'exprimant pas de TCR) la rend capable de reconnaître aussi bien des PAg que des cellules sensibilisées par des ABP¹⁵¹.

Cependant et malgré de nombreuses études réalisées dans ce domaine, les mécanismes d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg ne sont pas complètement élucidés. L'hypothèse d'une interaction directe entre le TCR V γ 9V δ 2 et le PAg, sans intervention d'un partenaire moléculaire, a été rapidement réfutée par la nécessité de contacts cellulaires pour activer les LT V γ 9V δ 2^{130,152}.

En comparaison de l'activation des LT $\alpha\beta$ conventionnels (voir partie I.II. de l'introduction de ce manuscrit), de nombreuses molécules du CMH classiques et non classiques ont été testées comme molécules de présentation des PAg. Ces études ont montré que l'activation des LT V γ 9V δ 2 ne requiert pas l'intervention des molécules du CMH de classe I et II, ni du transporteur TAP^{130,152,153}. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les LT V γ 9V δ 2 seraient capables de reconnaître des PAg sans présentation ni restriction par les molécules du CMH a émergé. Elle est soutenue par certaines observations expérimentales puisque des LT V γ 9V δ 2 exposés à des PAg en l'absence de cellule cible peuvent s'activer, sécréter du TNF- α et avoir une activité cytotoxique^{152,154}. Ainsi, un LT V γ 9V δ 2 pourrait jouer un rôle de CPA pour un autre lymphocyte.

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

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

Ces différents partenaires identifiés sont présents sur la cible, notamment tumorale

ou CPA, avec laquelle interagit le LT V γ 9V δ 2.

II.IV.C.1. Les butyrophilines

Afin d'identifier un premier partenaire de la présentation des PAgS aux LT V γ 9V δ 2 permettant leur activation, plusieurs études se sont concentrées sur la famille de protéines correspondant aux butyrophilines (BTN). Ces glycoprotéines de type I font partie de la superfamille des immunoglobulines, sont ubiquitaires et présentent de grandes similarités de structure avec la famille des protéines B7, des molécules ayant une action co-stimulatrice. En effet, les domaines extracellulaires IgV et IgC (domaine de type immunoglobuline variable et constant) sont très similaires entre les familles des BTN et des B7, laissant suggérer une fonction immunomodulatrice de cette famille de protéines B7-like¹⁵⁵. Ainsi, cette famille présente des candidats particulièrement intéressants pour identifier de nouveaux partenaires à l'activation des LT V γ 9V δ 2.

Une étude sur la caractérisation des BTN a permis la génération de différents anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules de la sous-famille BTN3A/CD277¹⁵⁶. En testant la réactivité de ces anticorps, une équipe a mis en évidence que l'anticorps monoclonal 20.1 activait les LT V γ 9V δ 2 via leur TCR en induisant leur sécrétion de cytokines et leurs fonctions cytotoxiques, reproduisant ainsi l'action des PAgS. De plus, l'anticorps dirigé contre le clone 20.1 peut aussi augmenter la lyse tumorale de lignées cancéreuses pourtant résistantes à l'activité cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 et traitées au préalable par cet anticorps. Le ciblage du clone 103.2 va quant à lui inhiber cette activation^{157,158}.

La sous-famille BTN3A (ou CD277) présente trois isoformes : BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3⁶⁴ décrits dans la Figure 14 ci-dessous.

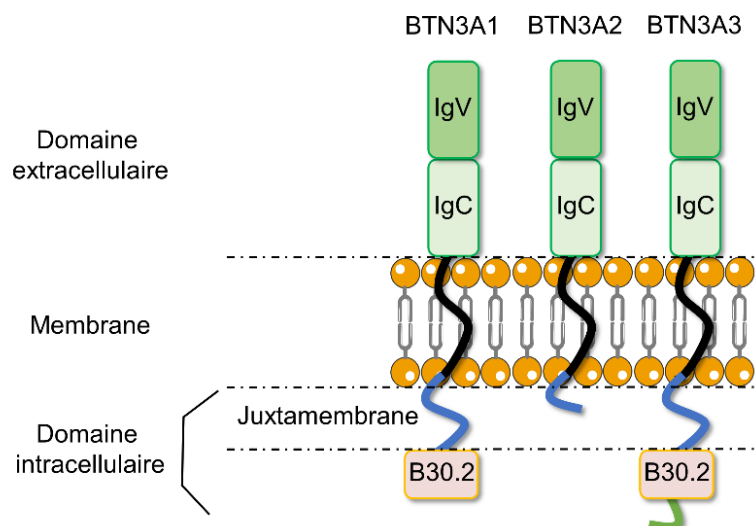


Figure 14 : Structures schématiques des 3 isoformes des BTN3A.

D'après la Figure 14, elles sont toutes composées de deux domaines extracellulaires de type IgV et IgC qui présentent une très forte homologie de structure (>95%). Cependant, leur domaine transmembranaire et intracellulaire présente une grande diversité ¹⁵⁹. En effet, seules les isoformes A1 et A3 possèdent un domaine intracellulaire de type B30.2, celui de l'isoforme A2 étant tronqué, il ne comporte pas de domaine intracellulaire. Or, le domaine intracellulaire de type B30.2 est très important pour la transduction du signal ¹⁵⁵. L'anticorps dirigé contre le clone 20.1 peut reconnaître ces trois isoformes, mais l'activation des LT V γ 9V δ 2 grâce au domaine intracellulaire B30.2 ne peut se faire qu'avec l'isoforme BTN3A1. En effet, le domaine intracellulaire de type B30.2 présent au niveau de l'isoforme BTN3A3 diffère légèrement de celui de la BTN3A1, ce qui ne lui confère pas les propriétés activatrices de LT V γ 9V δ 2.

Au cours de ces dernières années, l'implication de la BTN3A1 dans la réactivité des LT V γ 9V δ 2 a été clairement démontrée ^{158,160,161} mais les mécanismes moléculaires permettant l'activation des LT V γ 9V δ 2 via l'interaction entre la BTN3A1 et les PAg restent encore en partie inexpliqués. Ainsi deux modèles principaux d'interaction pourraient être proposés, repris dans la Figure 15 ⁶⁴.

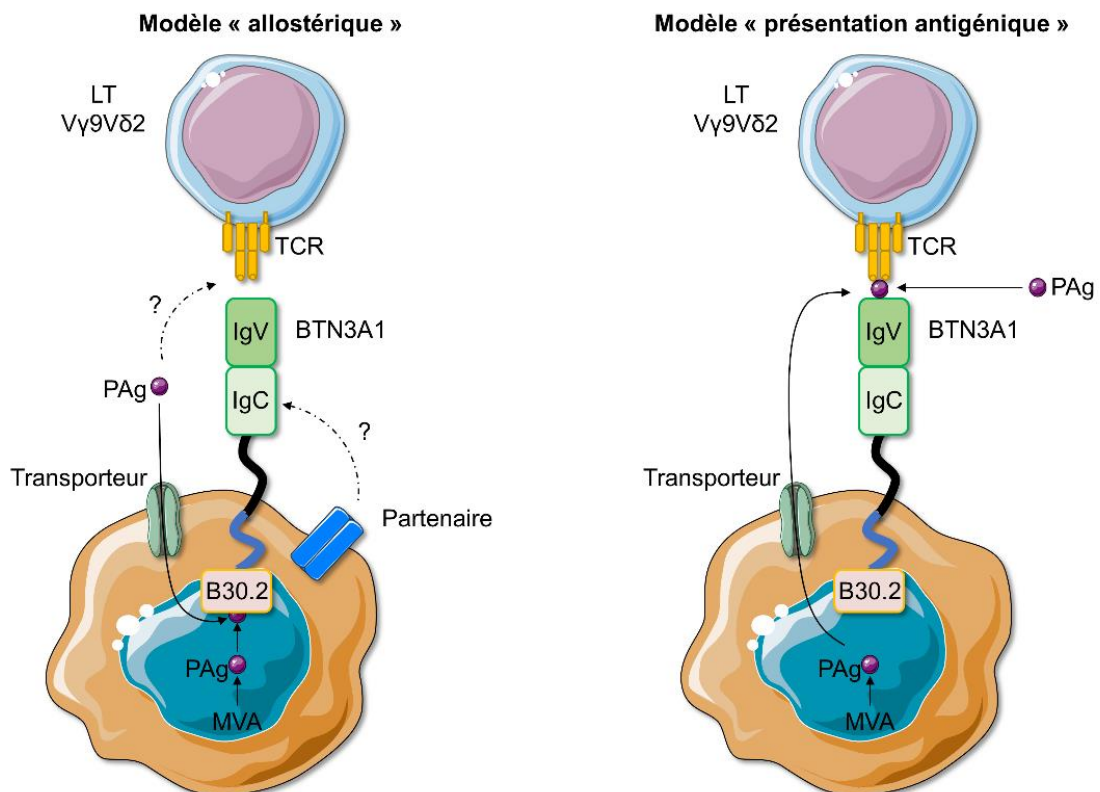


Figure 15: Modèles théoriques de l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains (adapté de ⁶⁴).

Le premier est un modèle « allostérique » basé sur l'interaction des PAg (endogènes ou internalisés) avec le domaine intracellulaire B30.2 de la BTN3A1, qui induirait des modifications alors perçues par les LT V γ 9V δ 2 et permettrait leur activation (partie gauche de la Figure 15). Ces modifications allostériques peuvent être des changements de conformation, des variations de la topographie membranaire et/ou le recrutement/exclusion de partenaires moléculaires ¹⁵⁸.

Le second est un modèle de « présentation antigénique » basé sur l'interaction des PAg (extrudés ou exogènes) avec le domaine extracellulaire IgV de la BTN3A1 formant ainsi un complexe antigénique reconnu par les LT V γ 9V δ 2 et menant à leur activation ¹⁶⁰ (partie droite de la Figure 15). Dans le cas des PAg endogènes, ce modèle nécessite l'implication d'un transporteur membranaire. Cependant ce modèle est controversé puisqu'il n'y a pas de preuve d'une interaction directe entre le TCR V γ 9V δ 2 et la BTN3A1 ^{133,160,162}.

Une étude a montré que la transfection de la BTN3A1 dans des cellules murines ne permet pas l'activation des LT V γ 9V δ 2 en présence de PAg ¹⁶³. Ainsi, la protéine BTN3A1 est nécessaire mais insuffisante à l'activation des LT V γ 9V δ 2 et d'autres partenaires protéiques potentiellement impliqués dans ce mécanisme continuent d'être investigués. Des équipes ont cherché à approfondir les connaissances dans la séquence d'activation des LT V γ 9V δ 2 ¹⁶². Grâce à la technique de spectrométrie RMN, cette étude a montré que le domaine intracellulaire B30.2 de la BTN3A1 subit un changement conformationnel lors de sa liaison avec le PAg, puisque la fixation du PAg dans sa poche de liaison va modifier la conformation préexistante du domaine intracellulaire B30.2. De plus, les domaines extracellulaires de la BTN3A1 adoptent au repos une conformation en V et si cette conformation est bloquée artificiellement, l'activation des LT V γ 9V δ 2 suite à l'arrivée des PAg sera diminuée. Ces résultats sont en faveur d'un changement de conformation de la BTN3A1 qui serait un évènement clé dans la détection des PAg précédant l'activation des LT V γ 9V δ 2.

Grâce à une cartographie du génome, une étude particulièrement récente (publiée en février 2020) a identifié la BTN2A1 comme nouvel acteur dans la détection du PAg par les LT V γ 9V δ 2 ¹⁶⁴. Après identification, les chercheurs ont regardé si cette molécule liait directement le TCR V γ 9V δ 2 et si son action pouvait être conjointe avec celle connue de la BTN3A1. Ces travaux montrent que les LT V γ 9V δ 2 ne peuvent pas s'activer par des PAg bactériens ou de mammifères en l'absence de la BTN2A1 et que l'expression de la BTN2A1

est requise pour la lyse tumorale médiée par les LT V γ 9V δ 2. De plus, la perte de la BTN2A1 ne peut pas être compensée par la BTN3A1 ou d'autres butyrophilines. La BTN2A1 peut se lier directement au TCR V γ 9V δ 2 et s'associer avec la BTN3A1 à la surface des cellules cibles. Le domaine transmembranaire et/ou intracellulaire de la BTN2A1 joue également un rôle important. De plus, l'activation des LT V γ 9V δ 2 médiée par les PAg nécessite la co-expression à la fois de la BTN3A1 mais également de la BTN2A1, permettant ensemble la reconnaissance du PAg et l'activation des LT V γ 9V δ 2. La liaison de la BTN2A1 se situe au niveau du domaine V γ 9 du TCR du lymphocyte. Il existe un second domaine de liaison critique sur le TCR qui incorpore V δ 2. La perturbation de ces sites de liaison supprime la capacité des LT V γ 9V δ 2 à répondre aux PAg. Ces résultats ont conduit à la proposition du modèle d'interaction présenté dans la Figure 16.

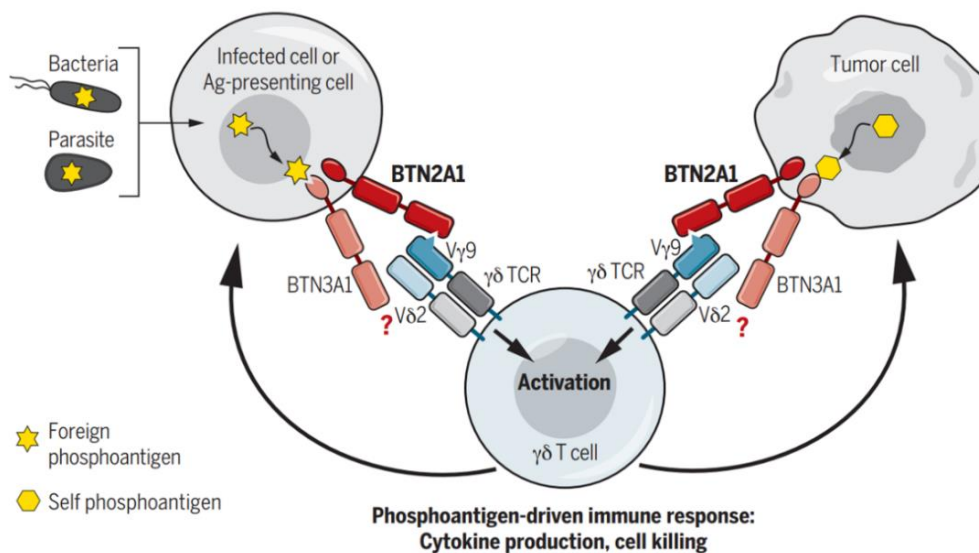


Figure 16 : Modèle d'interaction proposé de la BTN2A1 dans l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains. ¹⁶⁴

Ces travaux ont été confortés par une nouvelle étude sortie un mois après, ayant identifié, par une technique d'hydrides de radiations, la BTN2A1 comme co-facteur critique de la BTN3A1 pour la reconnaissance du TCR V γ 9V δ 2 en présence de PAg ¹⁶⁵. Cette étude démontre que la reconnaissance antigénique des LT V γ 9V δ 2 est complètement différente de celle retrouvée pour les autres cellules immunitaires. Ils ont proposé un modèle dans lequel la BTN3A1 et la BTN2A1 se lient toutes deux au TCR V γ 9V δ 2 en réponse au PAg. La liaison du PAg pourrait entraîner un remodelage et/ou un changement de conformation de la molécule BTN pour former un complexe BTN2A1/BTN3A1 stimulant. La détection du PAg aurait lieu grâce à un modèle de ligands composites dans lequel le TCR V γ 9V δ 2 interagit directement avec la BTN2A1 et un ligand supplémentaire reconnu d'une façon dépendante du CD3R.

Ainsi la BTN3A1 et la BTN2A1 vont interagir avec le TCR afin de permettre l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg, mais la séquence temporelle qui régit ces trois acteurs reste inconnue. Une étude publiée en juin 2020 a permis d'établir plus finement l'intervention de ces trois paramètres et a proposé ainsi un nouveau modèle séquentiel de reconnaissance antigénique des LT V γ 9V δ 2 ¹⁶⁶. Ce modèle est résumé dans la Figure 17 ci-contre.

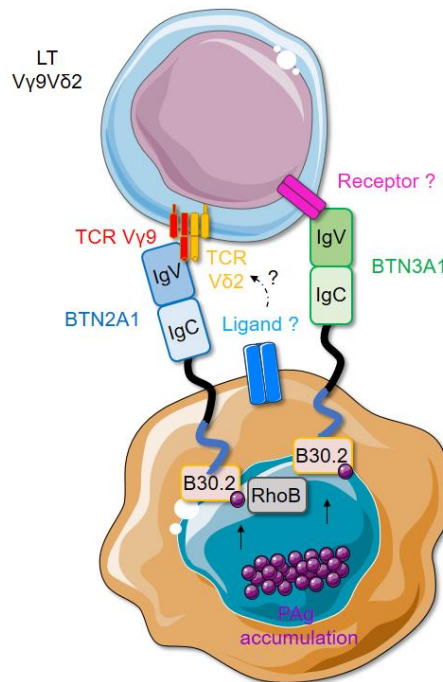


Figure 17 : Modèle d'interaction séquentielle de la reconnaissance antigénique des LT V γ 9V δ 2.

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

du PAg mais pas de la présence du TCR V γ 9V δ 2.

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

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

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

Parmi les candidats étudiés, la F1-ATP synthase, exprimée à la surface des cellules tumorales lysées par les LT V γ 9V δ 2, pourrait s'associer à l'apolipoprotéine A1 pour former un complexe de présentation des PAg à la surface des cellules cibles¹⁶⁷. De plus, l'Apppl, un dérivé adénylé de l'IPP, pourrait se lier de manière stable à la F1-ATPase et promouvoir l'agrégation du TCR, la sécrétion d'IFN- γ et la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2¹⁶⁸. Pris ensemble, ces résultats tendent à montrer que la F1-ATPase, associée à l'Apo A1, pourrait jouer un rôle de présentation antigénique des PAg. Cependant, aucune expérience de co-immunoprécipitation entre la F1-ATPase et le TCR V γ 9V δ 2 n'a pu être réalisée à ce jour et le rôle de la F1-ATPase en tant que molécule présentatrice des PAg n'est pas formellement démontré.

Plus récemment, une équipe a mis en évidence un nouveau partenaire participant à la reconnaissance des PAg endogènes avec le domaine extracellulaire IgV de la BTN3A1, formant un complexe antigénique reconnu par les LT V γ 9V δ 2¹⁶⁹. Cette étude montre que l'accumulation de l'IPP entraîne la translocation nucléaire de LXR α , permettant ensuite la transcription des gènes *Abca1* et *apoA-1* puis l'augmentation de l'expression d'ABCA1 et d'apoA-I à la surface de la DC. Ce partenaire nouvellement identifié correspond à un transporteur membranaire permettant la sortie des PAg endogènes vers le milieu extracellulaire, appelé ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). Ce dernier agit en collaboration avec l'apolipoprotéine A1 et la BTN3A1 pour permettre l'activation des LT

V γ 9V δ 2 comme indiqué dans le modèle d'action proposé dans cette étude (Figure 18).

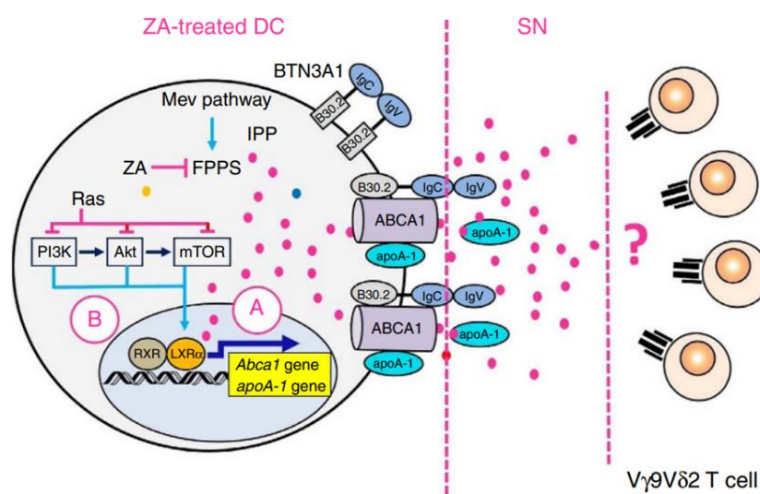


Figure 18 : Mécanismes impliqués dans le relargage de l'IPP par les DC traitées au zolédronate.¹⁶⁹

Une étude plus récente a également identifié des membres de la famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC) (ABCG2 et ABCG1), comme étant impliqués dans la sécrétion de cytokines par les LT V γ 9V δ 2 suite au traitement par HMB-PP¹⁷⁰. Ils ont également confirmé l'implication du transporteur ABCA-1.

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

II.IV.C.3. RhoB

Le mode opératoire des PAg endogènes et exogènes n'étant pas encore parfaitement décrit, des études ont ciblé leurs recherches dans l'identification de partenaires intracellulaires régulant l'activation des LT V γ 9V δ 2. Ainsi, une étude a mis en évidence l'implication de RhoB, petite protéine G impliquée notamment dans l'organisation des filaments d'actine et le transport vésiculaire, dans les mécanismes d'activation des LT V γ 9V δ 2¹⁷¹. Cette équipe a proposé le modèle d'interaction décrit dans la Figure 19.

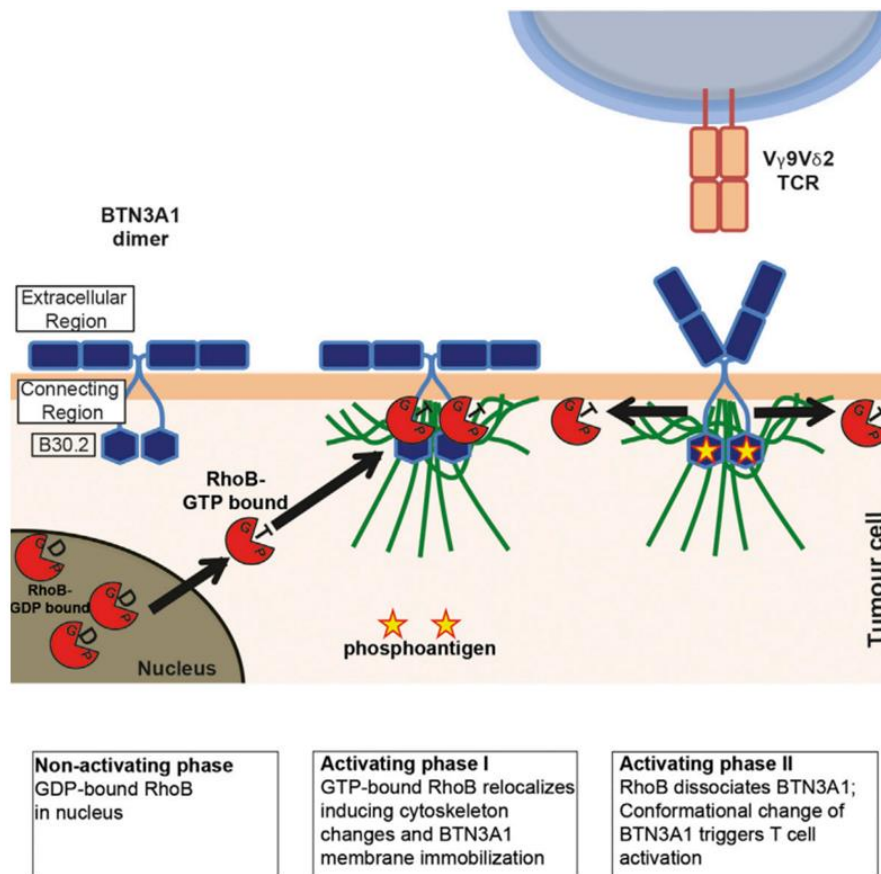


Figure 19 : Modèle d'interaction proposé de RhoB dans l'activation antigénique des LT V γ 9V δ 2 humains. ¹⁷¹

Au repos, il n'y a pas d'accumulation de PAg et dans ce cas RhoB est sous forme inactive dans le noyau de la cellule tumorale, c'est-à-dire lié à une molécule GDP. Suite à l'accumulation de PAg, RhoB va s'activer, sera lié à une molécule GTP et va changer de localisation. En effet, il sera dans le cytoplasme et pourra se fixer au niveau du domaine intracellulaire B30.2 de la BTN3A1. Grâce à son action sur le cytosquelette, RhoB va entraîner une redistribution spatiale de la BTN3A1 et ainsi permettre la fixation du PAg au niveau du domaine intracellulaire B30.2. Puis RhoB actif lié au GTP va se dissocier permettant un changement de conformation de la partie extracellulaire de la BTN3A1 conduisant à l'activation des LT V γ 9V δ 2. Les expériences ont été réalisés sur des modèles de cancers hématologiques et ont testés l'implication de RhoB en réponse aux PAg endogènes (suite au traitement par ABP) et exogènes (IPP).

L'étude récente de Vyborova et al. confirme l'importance de RhoB dans la coordination du signal de co-stimulation délivré par la BTN3A1 ¹⁶⁶. En effet, la capacité de la cellule cible à utiliser les stocks de réserve intracellulaire de la BTN3A1 dépend probablement de sa capacité à activer RhoB. Lorsque la protéine RhoB est activée, elle

pourra alors exercer son rôle sur la mobilité membranaire pour permettre la modification de la conformation de la BTN3A1.

A ce jour il existe peu d'articles scientifiques dans la littérature relatant de l'implication de RhoB dans le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2 et rien n'est connu concernant les cancers solides. C'est pourquoi, l'implication de la protéine RhoB dans ce mécanisme correspondait à un des objectifs de mes travaux de thèse doctorale. Par conséquent, nous présenterons dans la partie I des résultats de ce manuscrit les principales caractéristiques de la protéine RhoB et son implication dans les cancers ainsi que dans l'immunité. Les résultats sur la protéine RhoB obtenus dans le cadre de mon projet de thèse seront présentés dans la partie I des résultats de ce manuscrit.

Comme la protéine RhoB est nécessaire mais insuffisante pour permettre l'activation des LT V γ 9V δ 2, des études ont cherché à identifier d'autres partenaires impliqués dans le remodelage du cytosquelette.

II.IV.C.4. La Périplakine

Une étude a identifié la Périplakine, un membre de la famille des protéines adaptatrices du cytosquelette, comme étant impliqué dans le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2¹⁷². La Périplakine interagirait avec un motif di-leucine localisé près de la queue cytoplasmique du domaine B30.2 de la BTN3A1, sans interagir avec la BTN3A2 ni BTN3A3 car ils ne contiennent pas ce motif. Ces travaux ont montré une activation possible des LT V γ 9V δ 2 après restauration de la BTN3A1 dans des lignées cellulaires *knock out* (KO) pour la BTN3A1, mais qui restait impossible dans le variant déficient en motif dileucine permettant la fixation de la Périplakine (le variant BTN3A1 Δ exon5). Ces travaux ont testé la réactivité des LT V γ 9V δ 2 au PAg endogènes (via l'utilisation du zolédronate) et exogènes via le HMB-PP. A ce jour, il n'y a pas d'autres travaux montrant l'implication de la Périplakine dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg.

Ainsi la réactivité des LT V γ 9V δ 2 est régulée par différents partenaires permettant la présentation des PAg au TCR V γ 9V δ 2. Ces différents partenaires sont présents au niveau de la cible tumorale. Cependant, l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg est également contrôlée par d'autres récepteurs complémentaires, présents directement sur les lymphocytes.

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

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

II.IV.D.1. Les NKR

Comme les cellules NK, les LT V γ 9V δ 2 expriment de nombreux récepteurs de cellules NK (NKR) activateurs ou inhibiteurs ¹⁷³. Ces récepteurs ont été détaillés dans la partie I.I.B.1. de l'introduction de ce manuscrit.

Les LT V γ 9V δ 2 peuvent notamment exprimer le récepteur activateur NKG2D, apportant un signal important de co-stimulation puisque son activation entraîne une amplification de la production cytokinique, la prolifération et la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 ^{174,175}. Une étude a montré que le récepteurs NKG2D et ses ligands étaient impliqués dans les effets anti-tumoraux des LT V γ 9V δ 2 contre le mélanome et d'autres cancers épithéliaux ¹⁷⁶. L'expression des ligands de NKG2D à la surface tumorale pourrait être corrélée à la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 contre des blastes de LAM traités par ABP ¹⁷⁷. D'autres expériences ont montré que le blocage de ce récepteur via un anticorps bloquant va fournir un signal de co-stimulation important dans la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 dirigée contre des cellules cibles cancéreuses exprimant MICA/B et ULPBs ^{137,178}.

Parmi les NKR inhibiteurs exprimés par les LT V γ 9V δ 2, on peut citer des molécules de la famille des lectines C (NKG2A, NKG2C et CD94) ¹⁷⁹. Leur expression est corrélée à une diminution de l'expression du TCR V γ 9V δ 2 ¹⁸⁰. Lors d'une activation des LT V γ 9V δ 2 par un PAg, tous les récepteurs CD94/NKG2A intracytoplasmiques vont être externalisés à la surface ¹⁸¹. Le complexe CD94/NKG2A va alors s'activer et conduire à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α), ainsi qu'à l'inhibition de la prolifération et de la cytotoxicité dirigée contre des cellules cibles accumulant des PAg ¹⁷⁹. Un autre récepteur inhibiteur des cellules NK exprimé par les LT V γ 9V δ 2 est l'ILT2 (immunoglobulin-like transcript 2). Ce récepteur interagit avec la molécule du CMH I non classique HLA-G, exprimée à la surface de cellules tumorales de mélanomes, de carcinomes rénaux, de tumeurs hématopoïétiques et de cancers ovariens. L'interaction HLA-G/ILT2 produit un signal inhibiteur pour la prolifération et la production d'IFN- γ des LT V γ 9V δ 2 activés par un PAg ¹⁸². Ces ligands de ces NKR inhibiteurs sont des molécules du CMH I,

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

Afin de respecter une balance immunitaire raisonnable, la réponse des LT V γ 9V δ 2 est extrêmement bien régulée grâce à la compétition des signaux inhibiteurs délivrés par les récepteurs inhibiteurs avec ceux activateurs ¹⁸³.

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

Comme pour les LT $\alpha\beta$ conventionnels, les TLRs exprimés à la surface des LT V γ 9V δ 2 vont également influencer leur activation (voir partie I.II. de l'introduction). Par exemple, lorsque les LT V γ 9V δ 2 expriment le TLR 3, la production d'IFN- γ sera augmentée ¹⁸⁴. De plus, la stimulation du TLR 2 exprimé sur les LT V γ 9V δ 2 entraîne leur activation via la sécrétion d'IFN- γ et l'expression de CD107a ¹⁸⁵. Une étude récente a montré que les monocytes activés par des ligands de TLR 8 activent les LT V γ 9V δ 2 et ces derniers produisent de l'IFN- γ ¹⁸⁶. Cependant, cela ne stimule pas la prolifération des LT V γ 9V δ 2 en présence de PAg ou de zolédronate. Dans cette étude les agonistes du TLR 7 ont également été testés mais ils n'entraînent pas cet effet. Contrairement aux NKRs, les TLRs sont uniquement des co-stimulateurs puisqu'ils n'activent pas indépendamment du TCR $\gamma\delta$ les LT V γ 9V δ 2 ¹⁸⁷.

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

Les cytokines de l'environnement vont également participer à la régulation de l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg par une immunomodulation du microenvironnement tumoral. Les cytokines de la famille γ_c , regroupant 6 cytokines différentes dont l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21, ont été bien étudiées. Ces cytokines vont toutes influencer les réponses des LT V γ 9V δ 2 aux PAg mais n'auront pas le même effet. Parmi celles-ci, l'IL-2 est la plus étudiée. Elle agit comme un facteur de croissance des LT, augmente la cytotoxicité des cellules NK et favorise la production des Ig par les LB. De plus, l'IL-2 induit la prolifération et la survie des cellules T activées ¹⁸⁸. En présence d'IL-2, les LT V γ 9V δ 2 activés suite au traitement de PBMCs par un PAg ou un ABP vont proliférer et devenir matures ¹⁸⁹. L'IL-7 et l'IL-15 peuvent également contrôler l'homéostasie des LT V γ 9V δ 2 ¹⁹⁰. Enfin, l'IL-21 va pouvoir agir en synergie avec les autres cytokines γ_c pour permettre la prolifération des LT lors de la réponse anti-tumorale ¹⁹¹. Cependant, l'IL-21 peut aussi conduire à l'émergence des LT V γ 9V δ 2 régulateurs dans le cas d'une surexpression du récepteur CD73 ¹⁹².

D'autres cytokines, comme l'IL-33, ne font pas partie de la famille γ_c . Cette cytokine est capable d'induire *in vitro* la prolifération des LT V γ 9V δ 2 activés par un PAg, leur production en cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α) et leur cytotoxicité anti-tumorale¹⁹³. Une étude complémentaire a permis de confirmer l'effet prolifératif de l'IL-33 *in vivo* en combinaison avec un PAg et montrer que l'expansion des LT V γ 9V δ 2 peut prévenir la croissance tumorale dans un modèle murin de lymphome¹⁹⁴.

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

II.IV.D.4. Les molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion sont importantes dans l'installation et la stabilisation d'une synapse immunologique entre une cellule immunitaire effectrice et sa cible¹⁹⁵. Ainsi les molécules d'adhésion sont présentes au sein de la synapse, colocalisant avec le complexe TCR/CD3. Le contact entre le LT V γ 9V δ 2 et sa cible est nécessaire pour permettre leur activation par les PAg. Ainsi, les LT V γ 9V δ 2 vont exprimer différentes molécules d'adhésion dont le binôme pourra être exprimé sur les cellules tumorales, on parle de couple (ou complexe) récepteur/ligand, comme par exemple LFA-1/ICAM-1, CD2/LFA-3 et CD6/CD166.

Le récepteur LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen 1*) est fortement exprimé à la surface des LT V γ 9V δ 2. Dans une étude *in vitro* sur le myélome multiple, la capacité de reconnaissance et de cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 contre les lignées tumorales RPMI8226 et U266 prétraitées par un PAg (ici le zoledronate ou la Mévastatine) est dépendante de l'expression d'ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*)¹⁹⁶. En effet, le blocage d'ICAM-1 à la surface des lignées tumorales par un anticorps va diminuer la cytolysse de ces cibles. De plus, l'expression induite d'ICAM-1 par transfection dans la lignée AMO-1, augmente significativement la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 alors que la lignée parentale ne répondait pas à ces effecteurs. Une autre étude a montré que le blocage de LFA-1 par un anticorps bloquant à la surface des LT V γ 9V δ 2 va inhiber la cytotoxicité des effecteurs envers la cible tumorale Daudi, sans modifier la prolifération ni le relargage des cytokines¹⁹⁷.

Le récepteur CD2, appartenant à la superfamille des Ig, est notamment exprimé à la surface des cellules NK et des LT V γ 9V δ 2. L'utilisation d'anticorps bloquant CD2 et LFA-3 n'a pas d'effet sur l'activité lytique des LT V γ 9V δ 2 mais inhibe fortement le relargage du TNF- α et la prolifération¹⁹⁷. Cependant l'intervention du complexe CD2/LFA-3 n'est pas

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

L'activation des LT V γ 9V δ 2 est également favorisée par l'expression de la molécule d'adhésion CD166 (ou ALCAM), une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des Ig, dont le récepteur exprimé à la surface des LT V γ 9V δ 2 correspond au CD6. Une étude a montré que l'expression induite du CD166 suite à la transfection d'une lignée CD166⁻ augmente fortement la capacité d'activation des LT V γ 9V δ 2 par la lignée traitée par le pamidronate, en augmentant la sécrétion de l'IFN- γ et leur prolifération¹⁹⁸. A l'inverse, la downrégulation de l'expression du CD166 sur une lignée tumorale CD166⁺ va diminuer significativement l'activation des LT V γ 9V δ 2 par la lignée traitée par le PAg. Ainsi le complexe CD6/CD166 est recruté au centre de la synapse immunologique établie entre un LT V γ 9V δ 2 et sa cible tumorale.

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

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

Les cancers peuvent être traités par différentes thérapies conventionnelles, comme la chirurgie, la chimiothérapie ou encore la radiothérapie, utilisées seules ou en combinaison. Ces thérapies conventionnelles présentent des limites dans certains cas de figure : tumeurs inopérables, efficacité limitée ou encore effets indésirables importants. Ainsi, ces freins ont poussé au développement de nouvelles thérapies dont certaines visent à utiliser le système immunitaire pour booster l'activité anti-tumorale, on parle alors de l'immunothérapie anti-cancéreuse. Cette thérapie sera particulièrement intéressante dans les tumeurs où les thérapies conventionnelles ont échoué : tumeurs chimiorésistantes, maladie résiduelle après le traitement ou sites métastatiques difficiles d'accès. L'immunothérapie anticancéreuse a progressivement été développée et testée dans différentes applications. A ce jour, elle est couramment retrouvée dans les lignes de traitement de certains cancers et est par exemple devenue le traitement de référence des mélanomes métastatiques, permettant l'obtention de résultats très encourageant dans cette pathologie au pronostic très sombre¹⁹⁹.

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

capables d'infiltrer la tumeur), présentent une reconnaissance antigénique qui est indépendante des molécules du CMH et ont une forte capacité d'expansion grâce aux PAgS et aux cytokines prolifératives^{140,178,200,201}. Les premières thérapies utilisant les LT V γ 9V δ 2 ont été réalisées dans les années 2000 et correspondent à l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle.

II.V.A. Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle

L'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle utilisant les LT V γ 9V δ 2 peut être divisée en deux catégories : l'immunothérapie active et l'immunothérapie passive, reposant toutes deux sur le recrutement des LT V γ 9V δ 2 par un PAg ou après traitement par un ABP. Ces deux catégories de l'immunothérapie anti-cancéreuse utilisant les LT V γ 9V δ 2 ont été

Etudes	Maladies	Activateurs	Nombre de sujets inclus	Réponse objective	Réponse complète
Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle active					
Wilhem 2003 ⁽²⁰⁶⁾	LNH MM	Pamidronate + IL-2	19	3/19	0/19
Dieli F 2003 ⁽¹⁰³⁾	Prostate	Zolédronate +/- IL-2	18	3/18	0/18
Bennouna 2010 ⁽²⁰⁷⁾	Cancers du rein, colon et sein	BrHPP	28	0/28	0/28
Bregeon D 2012 ⁽²⁰⁸⁾	LF	BrHPP + Rituximab	45	19/45	11/45
Immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle passive autologue					
Kobayashi 2007 ⁽²⁰⁹⁾	Cancer du rein	2M3B1PP + IL-2	7	3/7	0/7
Cui 2014 ⁽²¹⁰⁾	Cancer hépatique	ARF + cytokines +/- Zolédronate	32	Non reporté	Non reporté

appliquées à différents types de cancers hématologiques et solides, dont majoritairement le carcinome rénal^{202,203}. Le Tableau 3 ci-dessous présente quelques études cliniques terminées utilisant les LT V γ 9V δ 2 et leurs résultats cliniques. Ces études seront détaillées par la suite.

Tableau 3 : Essais cliniques utilisant les LT V γ 9V δ 2 terminés (adapté de¹³³, (LNH : lymphome non Hodgkinien, MM : myélome multiple, LF : lymphome folliculaire, 2M3B1PP : 2-methyl-3-butenyl-1-pyrophosphate, ARF : ablation par radiofréquence).

Immunothérapie anti-cancéreuse active

L'immunothérapie anti-cancéreuse est dite active lorsqu'elle repose sur l'activation *in vivo* des LT V γ 9V δ 2 via l'administration systémique d'activateurs spécifiques, les phosphoantigènes ou des ABP au patient ^{204,205} (partie verte du Tableau 3). La première étude démontrant l'intérêt thérapeutique des LT V γ 9V δ 2 a été menée chez des patients atteints de lymphome non-Hodgkinien ou de myélome multiple ²⁰⁶. Dans cette étude, les patients ont reçu une injection de pamidronate par voie intraveineuse suivie de doses croissantes d'IL-2. L'association du pamidronate avec l'IL-2 à faible dose a été bien tolérée par les patients et a conduit à une prolifération des LT V γ 9V δ 2 *in vivo*, voire à une rémission partielle du cancer chez certains patients. La seconde étude a permis de confirmer que l'activation des LT V γ 9V δ 2 *in vivo* était associée à une production de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ , entraînant le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale chez des patients atteints de cancers de la prostate traités par injection intraveineuse de zolédronate associée ou non à des injections de faibles doses d'IL-2 ²⁰². D'autres études cliniques ont suivi, appliquées à des cancers solides (rein, colon et sein) ou hématologiques (lymphomes folliculaires) ^{207,208}. Dans ces études, les patients étaient traités par un PAg de synthèse, le BrHPP (Phosphotim, Innate Pharma), en administration intraveineuse à doses croissantes de BrHPP, seules ou associées à des faibles doses d'IL-2 ²⁰⁷. Dans le cas de l'étude sur les lymphomes folliculaires, le BrHPP était testé en combinaison avec l'anticorps monoclonal anti-CD20 appelé Rituximab (voir partie II.II.B. du manuscrit). La réponse clinique de ces différentes études est globalement assez décevante mais des réponses thérapeutiques partielles ont été observées (par exemple la réponse objective de l'étude de Dieli était de 3/18) ainsi que des réponses complètes (24%) chez les patients atteints de lymphomes folliculaires.

Immunothérapie anti-cancéreuse passive

L'immunothérapie anti-cancéreuse est dite passive lorsque l'expansion des LT $\gamma\delta$ est réalisée *ex-vivo* à partir de PBMCs en utilisant des phosphoantigènes ou des ABP, suivie de l'administration des LT V γ 9V δ 2 cultivés au patient, on parle de transfert adoptif. L'expansion *ex-vivo* des LT $\gamma\delta$ était généralement réalisée à partir des propres cellules du patient (autologue, partie bleue du Tableau 3) mais il existe quelques études avec une expansion hétérologue (PBMCs d'un donneur sain, non présentées dans le Tableau 3). La première étude testant le transfert adoptif autologue de LT $\gamma\delta$ a été réalisée chez des patients atteints de carcinome rénal ²⁰⁹. Dans cette étude, l'expansion des LT $\gamma\delta$ du patient a été réalisée grâce au PAg 2M3B1PP (2-méthyl-3-butenyl-1-pyrophosphate) puis ces LT $\gamma\delta$ ont été administrés au patient par des injections multiples, combinées à de faibles doses d'IL-2. Les résultats ont montré une réponse objective moyenne via un ralentissement de la croissance

tumorale (3/7) mais aucune réponse complète. Une autre étude clinique, réalisée sur des patients atteints de cancers du foie (carcinome hépatocellulaire), combine la technique de traitement d'ablation par radiofréquence (ARF) avec un transfert adoptif autologue de LT $\gamma\delta$ ²¹⁰. Les 30 patients retenus dans le bras combinaison ont reçu 3 à 6 injections intraveineuses de LT $\gamma\delta$ amplifiés *ex-vivo* au préalable par le zolédronate. Les résultats ont montré une survie sans progression supérieure dans le bras combinaison, par rapport au bras ARF seul. Les meilleurs pronostics ont été rapportés chez les patients ayant reçu 6 injections de LT $\gamma\delta$ amplifiés. Cette étude n'a pas rapporté d'importants effets secondaires à cette combinaison, suggérant la possibilité de développer d'autres études associant l'immunothérapie anti-cancéreuse utilisant les LT $\gamma\delta$ avec une thérapie conventionnelle.

Tolérance de l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle

Quel que soit le type d'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle utilisant des LT V γ 9V δ 2, elles présentent une sécurité d'utilisation satisfaisante mais des résultats d'efficacité assez décevants. Les essais thérapeutiques pionniers ont définis les conditions pour une utilisation sans risque des phosphoantigènes et des ABP afin d'induire les LT V γ 9V δ 2 chez les patients. L'effet indésirable le plus fréquent correspond à l'apparition d'un syndrome pseudo-grippal sans expansion de LT V γ 9V δ 2, généralement provoqué après administration de faibles doses de stimuli. La plupart des effets indésirables sont de grade 1-2 (avec de la fièvre, fatigue, augmentation des transaminases hépatiques et une éosinophilie)⁹⁰. Les effets indésirables sévères, de grade 3 et 4, ayant été reportés sont caractérisés par une thrombose, une hyperglycémie, une hypocalcémie, des douleurs de la mâchoire et musculosquelettiques, une gastrite, un infarctus du myocarde et une toxicité rénale²⁰⁴.

Limites de l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle

Alors que la sécurité de l'utilisation des LT V γ 9V δ 2 a été démontrée et que les paramètres pharmacodynamiques des PAg administrés chez l'homme sont bien connus, l'efficacité de cette thérapie reste limitée puisque la moyenne de réponse est de 21% associée à un taux moyen de bénéfice clinique de 57%. Cette efficacité modeste pourrait être liée à l'anergie des LT V γ 9V δ 2 activés, associée à une diminution du nombre de LT V γ 9V δ 2 du sang périphérique après administration des stimulants (PAg et N-bis)^{204,211}.

En effet, l'anergie des LT V γ 9V δ 2 et la diminution du nombre de LT V γ 9V δ 2 du sang périphérique après administration des activateurs représentent des problèmes qualitatifs et

quantitatifs pour l'immunothérapie conventionnelle à base de LT V γ 9V δ 2. Concernant le problème qualitatif, la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 peut être affectée par le MET suppresseur et le stade tumoral, pouvant tous deux limiter les fonctions anti-tumorales des LT V γ 9V δ 2. Par exemple, dans les carcinomes pancréatiques, les capacités cytotoxiques des LT V γ 9V δ 2 sont diminuées par des faibles niveaux des facteurs solubles MICA/B dans le MET ²¹¹. Concernant le problème quantitatif, la polarisation des LT $\gamma\delta$ va entraîner une baisse du nombre de LT V γ 9V δ 2 anti-tumoraux, via des cytokines telles que l'IL-23, l'IL-15 et le TGF β qui sont présentes dans le MET. Par exemple, dans les cancers squameux de la peau, on retrouve significativement plus de LT $\gamma\delta$ 17 chez des patients atteints par des stades avancés de cette maladie (stades III et IV), par rapport aux patients atteints par des stades plus précoces (stades I et II). A l'inverse, les fréquences de LT V γ 9V δ 2 sont plus importantes chez les patients atteints par les stades précoces (stade I et II), mais diminuent de façon significative chez les patients atteints de stades plus avancés (stades III et IV) ²¹². Ainsi, une hypothèse a été que la polarisation des LT $\gamma\delta$ limite l'efficacité de l'immunothérapie conventionnelle utilisant les LT $\gamma\delta$ en influençant la balance entre les LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux et anti-tumoraux. Puisque que les LT $\gamma\delta$ V δ 1 ont un rôle controversé dans l'immunité anti-tumorale, il serait important d'éliminer au préalable les sous-groupes de LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux avant le transfert adoptif au patient. De plus, l'expansion *in vivo* rend possible la prolifération de certains sous-groupes pro-tumoraux, donc cette expansion devrait se faire en évitant d'être dans un MET immunosuppresseur puisque cela augmenterait la probabilité de polarisation des LT $\gamma\delta$ en sous-groupes pro-tumoraux. Pour éviter ce phénomène, une équipe a suggéré la mise en œuvre de ces stratégies thérapeutiques à un stade TNM précoce de la maladie pour éviter que le MET soit déjà immunosuppresseur chez le patient. Moduler cette polarisation pourrait ainsi améliorer l'efficacité au long terme de ces thérapies.

Les LT $\gamma\delta$ sont capables de changer leur fonction immunitaire en réponse à une stimulation cytokinique, puisque des LT $\gamma\delta$ anti-tumoraux peuvent devenir pro-tumoraux après stimulation par différentes cytokines du MET. Au vue de l'importance de la balance cytokinique tumorale, il est envisageable de modifier artificiellement cette balance afin de favoriser la reprogrammation des LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux en anti-tumoraux. Ainsi, mesurer les taux de cytokines immunosuppressives (comme par exemple l'IL-23, l'IL-1 β , l'IL-15, l'IL-17, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-36 γ ou le TGF β) pourrait permettre de prédire le statut immunitaire du patient avant de débiter l'immunothérapie à base de LT $\gamma\delta$. Par exemple, l'IL-36 γ va promouvoir la production de l'IFN- γ par les cellules T CD8⁺, les cellules NK et les LT $\gamma\delta$, ce qui va transformer le MET, favoriser l'élimination tumorale et exercer des puissants effets anti-tumoraux ²¹³.

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

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

La compréhension des mécanismes moléculaires indispensables à l'activation des LT $\gamma\delta$ et l'étude de leurs récepteurs nécessaires à leur action anti-tumorale a été essentiel pour éviter la tolérance lymphocytaire et la délétion des LT $\gamma\delta$ naturels chez des patients atteints de cancers à stades avancés^{151,214-216}. Des stratégies alternatives à l'immunothérapie anti-cancéreuse conventionnelle sont actuellement en cours de développement, visant par exemple à recruter de façon sélective des LT $\gamma\delta$ résidents par des molécules bispécifiques combinant un anti-TCR $\gamma\delta$ avec un anti-EGFR, ciblant le récepteur à l'*Epidermal Growth Factor*, afin de lier les LT $\gamma\delta$ à l'EGFR exprimé par les cellules tumorales²¹⁷. Ce concept pourrait être plus efficace que les molécules bispécifiques classiques liant les cellules exprimant le CD3 à l'aide d'un anti-CD3 (incluant ainsi les LT $\gamma\delta$ et les LT $\alpha\beta$) car la distribution intra-tumorale de TILs n'est pas toujours égale entre les LT $\gamma\delta$ et les LT $\alpha\beta$ ⁹⁷. Chez des patients atteints de glioblastomes, l'injection topique (sur la peau) de LT $\gamma\delta$ génétiquement modifiés pour être chimiorésistants a été testée après administration du traitement standard²¹⁸. Ainsi, l'injection des LT $\gamma\delta$ permet de rétablir le pool de TILs $\gamma\delta$ supprimé par la chimiothérapie standard sans concession de dose pour le patient. Une observation faite à partir de l'ibrutinib, un inhibiteur de la *Bruton tyrosine kinase* (BTK) couramment prescrit dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques, conforte la potentielle efficacité des LT $\gamma\delta$ endogènes. En effet, l'ibrutinib peut partiellement reverser la tolérance des LT V γ 9V δ 2 de patients atteints cultivés *in vitro*²¹⁹. De plus, la plupart des inhibiteurs de checkpoints développés en clinique vont également affecter le répertoire de LT $\gamma\delta$ anti-tumoraux. En effet, les patients traités avec l'inhibiteur de CTLA-4 nommé Ipilimumab

vont avoir une plus forte proportion de LT $V\gamma 9V\delta 2$ endogènes par rapport aux patients non traités par cet anticorps thérapeutique, ce qui montre que le succès de cette thérapie n'est pas seulement lié au répertoire anti-tumoral de LT $\alpha\beta$ conventionnel ⁷¹. De façon surprenante, cette étude présente des effets différents entre les répertoires $\delta 2^+$ et $\delta 2^-$ avec une augmentation de la proportion pour les $\delta 2^+$ et une diminution pour les $\delta 2^-$ montrant ainsi des mécanismes de régulation divergents entre ces deux sous-types.

Dans le cadre des nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant les LT $\gamma\delta$, trois concepts de thérapies sélectives sont intéressants à présenter et sont repris dans la Figure 20 ci-dessous.

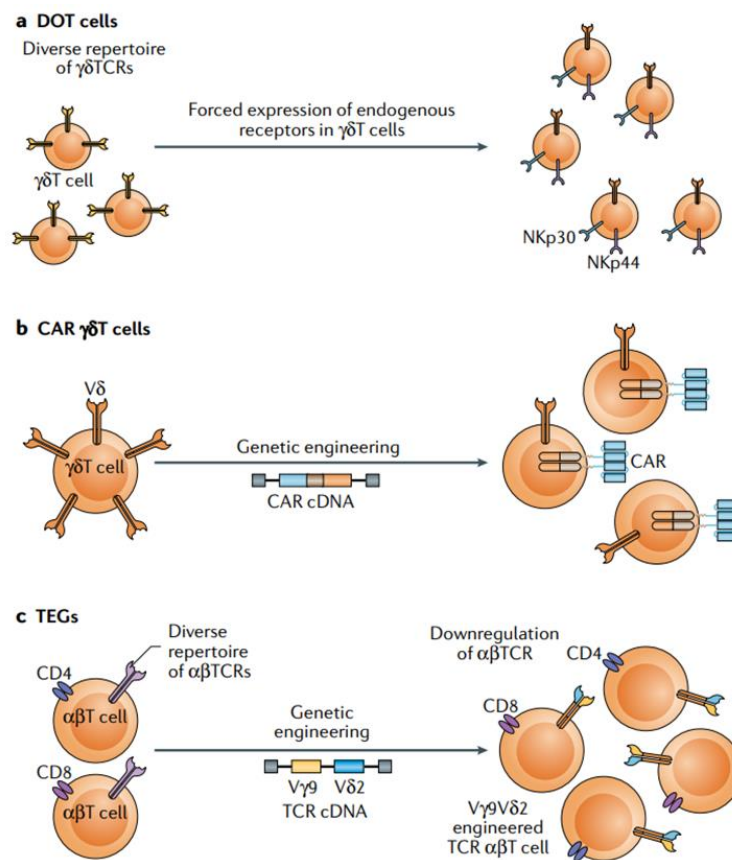


Figure 20: Les nouveaux concepts de thérapies sélectives applicables aux LT $\gamma\delta$. ¹³³

Delta one T cells (DOT)

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

chroniques, comprenant notamment trois semaines de stimulation par des agonistes du TCR et des cytokines (comme l'IL-4 et l'IL-15) ²²⁰. Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de ces cellules $\delta 1^+$ ainsi obtenues ont été réalisées *in vitro* et *in vivo*. Les LT $\delta 1^+$ obtenus sont cytotoxiques via l'expression *de novo* des récepteurs cytotoxiques NKp30 et NKp44, et ont une expression de NKG2D et DNAM1 uprégulée. Lorsqu'ils sont transférés *in vivo*, les DOTs peuvent infiltrer les tumeurs et les organes périphériques de façon persistante. Ainsi, les DOTs injectés vont proliférer *in vivo* et seront capables de produire de l'IFN- γ et du TNF- α sans produire pour autant de l'IL-17. Dans des modèles de xénogreffes, cette étude a montré que les DOTs sont capables d'inhiber la croissance tumorale et de prévenir la dissémination des cellules tumorales. Cependant, une des limites de cette technique est la possible et progressive downrégulation naturelle des récepteurs cytotoxiques après infusion chez le patient.

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

Afin de maîtriser les limites des DOTs, des LT $\gamma\delta$ ont été modifiés génétiquement afin de forcer l'expression de récepteurs d'antigènes chimériques (CAR) réactifs contre les tumeurs ^{221,222}. A la différence des DOTs, les cellules utilisées dans ce concept sont des LT V $\gamma 9$ V $\delta 2$ porteurs du TCR transgénique, en raison de leur forte abondance dans le sang périphérique et la facilité d'accès pour la conception *in vitro*. Cette technique permet la persistance à long terme des récepteurs nouvellement introduits génétiquement sans downrégulation. Les CAR T conventionnels ont été développés plus précocement que les CAR T $\gamma\delta$ et sont en cours d'utilisation dans des essais cliniques. Cette thérapie innovante est toutefois freinée par un effet indésirable critique correspondant au risque de syndrome de relargage cytokinique (ou appelé également orage cytokinique), qui peut être sévère et mortel pour le patient s'il n'est pas pris en charge immédiatement ou limité grâce à l'injection préalable du Tocilizumab (anticorps monoclonal anti-IL-6). Un des avantages que pourraient présenter les CAR T $\gamma\delta$ serait que ce risque est moindre pour cette population cellulaire, notamment en comparaison aux cellules NK ²²³. Cependant, les cellules NK et les LT $\gamma\delta$ sont étroitement contrôlés par les récepteurs cytotoxiques naturels et les KIRs et doivent être éduqués au fil du temps ²²⁴. A ce jour, cette stratégie est majoritairement développée pour traiter des cancers hématologiques car les récepteurs transgéniques nouvellement introduits sont souvent spécifiques de ces tumeurs, comme par exemple le CD19, mais il y a encore peu de développement pour des récepteurs exprimés par des cancers solides ²²⁵.

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

Ce concept exploite les capacités de réactivité tumorale des TCR $\gamma\delta$, pouvant être isolés à partir de cellules $\gamma\delta$ $V\gamma9V\delta2^+$ ou $V\gamma9V\delta2^-$. Dans cette construction, le porteur du TCR modifié est un LT $\alpha\beta$ et les chercheurs peuvent ainsi créer des LT *helpers* et/ou effecteurs afin d'induire la réponse immunitaire la plus durable possible. Ainsi, ce concept combine le ciblage tumoral réalisé par le TCR $\gamma\delta$ avec les capacités importantes de prolifération et de mémoire des LT $\alpha\beta$ conventionnels. Cette technique permet de forcer l'expression des TCR $\gamma\delta$ sur les LT $\alpha\beta$ grâce à des transductions ce qui empêchera l'expression endogène des TCR $\alpha\beta$, permettant ainsi de s'affranchir des problèmes classiques d'allo-compatibilité dus à la reconnaissance dépendante des molécules du CMH du TCR $\alpha\beta$. Ce concept permet également d'éradiquer la fréquente diminution des LT $\gamma\delta$ chez les patients atteints par des stades avancés de la maladie, peu prolifératifs ou après polarisation en LT $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 entraînant ainsi une tolérance des cellules cancéreuses⁸⁷. Ce concept de nouvelle génération de CAR T cells, appelé TEGs, correspond à une découverte majeure dans ce domaine^{151,214,226,227}. Contrairement aux CAR T cells, l'antigène n'est pas un antigène spécifique de la tumeur mais les PAg, dont on a vu précédemment qu'ils étaient exprimés dans les cancers. Ainsi, l'utilisation des TEGs est beaucoup plus large que celle des CAR T cells et permettrait de s'appliquer à des tumeurs solides et hématologiques^{214,228}. Par exemple, il a été montré que les TEGs peuvent cibler les cellules souches leucémiques et éliminer un myélome multiple primaire^{171,229}. De plus, une fois que le TCR $V\gamma9V\delta2$ est exprimé sur le LT $\alpha\beta$, le signal activateur délivré par le TCR $\gamma\delta$ est moins sensible à l'inhibition par les KIRs car ils sont moins fréquents à la surface de ces LT conventionnels. Si les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ sont reprogrammés avec un TCR $V\gamma9V\delta2$, ils acquièrent tous deux des propriétés cytotoxiques, mais les TEGs $CD4^+$ ont également la capacité de maturation en CPA professionnelle, comme les DC²¹⁴. La maturation des DC est médiée par les TEGs $CD4^+$ qui détectent via le TCR modifié l'augmentation des niveaux de PAg dans des DC immatures traitées par des ABP¹⁵¹. Cette propriété favorise la diffusion du TEG et sa rencontre avec des antigènes classiques associés aux tumeurs. Les TEGs exprimant un TCR $V\gamma9V\delta2$ de haute affinité sont en cours d'utilisation dans une phase I d'un essai clinique chez des patients réfractaires ou en rechute d'une leucémie aigüe myéloïde ou d'un myélome multiple²³⁰. Cette stratégie thérapeutique représente l'une des nombreuses possibilités de développement dérivant des LT $\gamma\delta$ et de leurs récepteurs²²⁷.

Un des paramètres important à appréhender sera l'éventuelle cross-réactivité de ces thérapies avec les tissus sains dans un contexte probable d'inflammation afin d'éviter le phénomène d'*off-target*, qui a notamment été observé lors du développement des thérapies de LT $\alpha\beta$ modifiés²³¹. Pour les thérapies à base de TCR $V\gamma9V\delta2$ des recherches continuent

pour déterminer des biomarqueurs de susceptibilité, tels que des polymorphismes ou la relocalisation de RhoB du noyau vers la membrane plasmique. L'analyse d'échantillons de biopsies liquides afin de déterminer ces critères de relocalisation de RhoB pourrait faire partie des critères d'inclusion pour les patients.

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

Ainsi les immunothérapies anti-cancéreuses utilisant des LT $\gamma\delta$ montrent des résultats encourageants mais des progrès restent nécessaires. Même si à ce jour les résultats cliniques ne sont pas encore connus, il est probable que les nouvelles stratégies thérapeutiques améliorent l'efficacité de ces traitements. Il est aussi possible de tester l'efficacité de ces nouvelles stratégies en association avec d'autres thérapies. Par exemple, la combinaison de ces nouvelles stratégies thérapeutiques avec des chimiothérapies ou d'autres immunothérapies pourrait permettre de contrecarrer le MET immunosuppresseur présent dans les tumeurs. En effet, une association avec des inhibiteurs d'immunes checkpoints pourrait améliorer l'activité anti-tumorale des lymphocytes utilisés dans ces thérapies. L'interaction entre PD-1 exprimé sur les LT $\alpha\beta$ et son ligand PD-L1 sur les LT $\gamma\delta$ va limiter l'activation des effecteurs T $\alpha\beta$. Ainsi le blocage de cette interaction par l'utilisation d'un inhibiteur de PD-1 va favoriser l'activation des LT $\alpha\beta$. De plus, une étude réalisée à partir de patients atteints de lymphomes folliculaires a montré une abondante proportion de TILs $\gamma\delta$ exprimant PD1²³². Ces LT $\gamma\delta$ PD1⁺ présentent une capacité diminuée d'ADCC par rapport aux PD1⁻, qui pourrait être restaurée après blocage de ce récepteur par un traitement inhibiteur de checkpoint (anti-PD1). Ces stratégies ont également été envisagées pour d'autres récepteurs ou ligands d'immunes checkpoints tels que CTLA-4,IDO, VISTA, Galectin-9, LAG-3 et TIM-3²³³⁻²³⁵.

Enfin, l'association des LT $\gamma\delta$ avec d'autres cellules T cytotoxiques (tel que les LT $\alpha\beta$ ou les cellules NK) pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la thérapie grâce à une double action synergique : la reconnaissance non restreinte au CMH des LT $\gamma\delta$ avec la réponse adaptative et/ou cytotoxique des cellules T spécifique de la tumeur. On dénombre actuellement une augmentation d'études combinant des immunothérapies ciblant différentes cellules du système immunitaire^{236,237}.

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

mécanisme d'activation.

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

DÉMARCHE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE

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

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

Au cours de l'introduction de ce manuscrit, nous avons détaillé les différents acteurs nécessaires à l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes, comme par exemple les BTN2A1 et BTN3A1, formant un complexe autour du TCR V γ 9V δ 2 et permettant la reconnaissance du PAg. D'autres acteurs interviennent également pour réguler ce mécanisme ; comme le transporteur ABCA-1 ou encore la protéine RhoB.

Dès lors que le rôle de RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par des cancers solides n'est pas clairement défini, le premier objectif de mes travaux de thèse visait à préciser davantage ce mécanisme, grâce à un modèle *in vitro* de cancer du poumon. Ce travail, réalisé en collaboration avec une autre équipe du CRCT, a abouti à la publication d'un article scientifique dans *Frontiers in Immunology*²³⁸.

Par ailleurs, les LT V γ 9V δ 2 présentent la faculté originale mais peu étudiée de pouvoir s'activer en l'absence de cellule cible. Ainsi, l'objectif de la seconde partie de mes travaux de thèse était de caractériser cette « self-activation ».

L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de la compréhension du mécanisme complexe d'activation des LT V γ 9V δ 2 pour améliorer leur efficacité en clinique.

RÉSULTATS

Résultats – Partie I

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

I.I. Contexte et objectifs du projet

Le projet a été initié suite à la publication de l'article « *RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by V γ 9V δ 2 T Cell Receptor* » par le Dr Zsolt Sebestyen dans le journal *Cell Report* ¹⁷¹. Pour rappel, cette étude a montré que RhoB pouvait interagir avec le phosphoantigène endogène dans la cellule cible afin d'induire une modification de la conformation de la BTN3A1 et permettre l'activation du TCR V γ 9V δ 2.

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

Ce projet de recherche avait pour but, à partir de la publication de Z. Sebestyen, de préciser l'implication de la protéine RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes endogènes et exogènes. De plus, il permettait d'étudier le rôle de RhoB dans ce mécanisme à partir d'un modèle tumoral de cancer solide, ce qui était inédit puisque les travaux précédents portaient sur des cancers hématologiques. Dans ce projet, le modèle d'étude retenu est un modèle de NSCLC, cancer dans lequel il a été montré que les LT V γ 9V δ 2 ré-infusés chez des patients malades présentaient un effet tumoral potentiel ^{239,240}. Nous avons utilisé dans ces travaux un modèle classique d'activation des LT V γ 9V δ 2, c'est-à-dire hétérologue entre les lymphocytes et des cibles tumorales sécrétrices de phosphoantigènes. Nous avons donc analysé le rôle de RhoB dans les réponses à deux types de lignées NSCLC, les lignées PC9 et A549, représentatives des deux mutations les plus fréquemment retrouvées dans ces cancers qui sont respectivement EGFR et KRAS. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in Immunology* présentée dans la suite de ce manuscrit (partie résultats I.III.) ²³⁸. Les résultats complémentaires, non publiés et obtenus dans le cadre de ce projet, seront présentés par la suite (partie résultats I.IV.)

Avant de présenter les résultats obtenus dans cette partie de ma thèse, il est d'abord important d'introduire certaines notions sur la protéine RhoB et son rôle dans les cancers et l'immunité.

I.II. Introduction sur la protéine RhoB

La protéine RhoB appartient à la famille des petites GTPases Rho, qui comprend 20 membres regroupés dans 5 sous-familles. Ainsi, RhoB appartient à la sous-famille des protéines « Rho », comme RhoA et RhoC.

I.II.A. Structure de RhoB

La plupart des acides aminés divergents entre RhoB et le couple RhoA/RhoC sont situés près de l'extrémité C-terminale, connue pour être une région hypervariable. La Figure 21 ci-dessous représente de façon schématique la structure de la protéine RhoB.

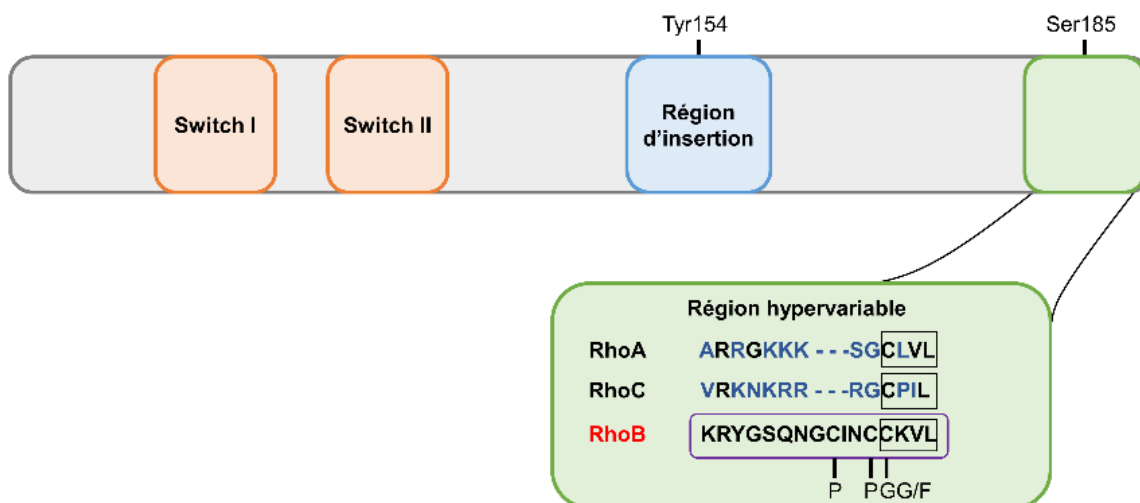


Figure 21 : Structure schématique de la protéine RhoB (adapté de ²⁴¹).

D'après ce schéma, nous voyons que la protéine RhoB est composée de deux régions switch, d'une région d'insertion et d'une région hypervariable. Cette dernière est schématisée par le rectangle vert zoomé et présente les différences de séquences entre les protéines RhoA, RhoC et RhoB. Le rectangle violet correspond à la séquence d'acides aminés de la protéine RhoB. Les acides aminés bleus sont différents entre la séquence de RhoB et celle du couple RhoA/RhoC. Enfin, le rectangle noir en fin de chaque séquence correspond à la boîte CAAX (C=Cystéine, A=Acide aminé aliphatique, X=autre acide aminé).

En comparaison avec la séquence du couple RhoA/RhoC, la région hypervariable de RhoB contient principalement des résidus polaires. La proportion entre les résidus polaires et basiques va impacter la capacité de fixation des protéines effectrices et régulatrices dans la région hypervariable ²⁴².

I.II.B. Régulation de RhoB

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

Modifications post-traductionnelles de RhoB

La protéine RhoB se différencie de RhoA et RhoC au niveau de la boîte CAAX C-terminale dans laquelle la Cystéine est modifiée par les lipides isoprénoïdes. En effet, la protéine RhoB peut être modifiée à la fois par des isoprénoïdes farnesyl et geranyl-geranyl (GG/F sur la Figure 21), alors que RhoA et RhoC peuvent être uniquement geranylgeranylés ^{243,244}. Il est possible d'inhiber ces isoprénoïdes en utilisant des inhibiteurs de farnésylation comme la *farnesyltransferase inhibitor* (FTI) ou de géranylgéranylation comme le *geranylgeranyltransferase inhibitor* (GGTI). Contrairement à RhoA et RhoC, RhoB ne présente pas de domaine polybasique mais elle peut être palmitoylée en position Cys189 et 192, juste en amont de la cystéine prénylée ²⁴³. La prénylation semble indispensable à la localisation cellulaire correcte et la conduction de la plupart des fonctions des trois protéines RhoGTPases ^{245,246}.

Localisation cellulaire de la protéine RhoB

Les diverses modifications lipidiques possibles sur RhoB présentées précédemment vont affecter sa localisation cellulaire, qui sera différente de celles de RhoA et RhoC. En effet, RhoA et RhoC sont essentiellement localisées au niveau de la membrane plasmique et du cytoplasme. En revanche, la protéine RhoB a été jusqu'alors décrite au niveau des endosomes, des corps multivésiculaires (CMV), de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi et du noyau ²⁴⁷⁻²⁵⁰. La forme isoprénylée de RhoB va modifier sa localisation. De ce fait, la forme farnésylée de la protéine RhoB entraîne une localisation majoritairement membranaire, alors que la forme géranylgéranylée entraîne une localisation endosomale de RhoB ²⁵¹.

Le système endosomal est un réseau complexe jouant un rôle important dans le tri de molécules incorporées dans les cellules. Il peut être divisé en deux voies, chacune caractérisée par des structures bien particulières. La première voie est celle des endosomes précoces, caractérisée par les endosomes de tri et les endosomes de recyclage. La seconde voie est celle des endosomes tardifs, définie par les CMV. Par la suite, les endosomes tardifs formeront un endo-lysosome après fusion avec un lysosome primaire provenant du réseau trans-golgien. Cette structure lysosomale nouvellement formée sera finalement dégradée dans les lysosomes.

Ainsi, en fonction de sa localisation endosomale, RhoB aura un devenir distinct. La protéine RhoB est essentiellement localisée au niveau des endosomes précoces et du compartiment pré-lysosomal²⁴⁷. Cependant, la protéine RhoB présente une demi-vie courte, d'environ 30 minutes, car elle peut être rapidement dégradée via la voie endo-lysosomale^{252,253}. Sa dégradation peut être retardée par l'inhibition de l'isoprénnylation. Par conséquent, l'altération de la dynamique lipidique des endosomes tardifs entraîne une accumulation de RhoB dans les CMV²⁵⁴.

La localisation endosomale de RhoB peut être influencée par d'autres facteurs. Par exemple, une étude a récemment identifié une autre petite GTPase *ADP-ribosylation factor 6* (Arf6) comme pouvant s'associer avec RhoB sous forme de complexe, afin de réguler sa localisation et sa stabilité²⁵⁵. En effet, la déplétion d'Arf6 entraîne une perte de RhoB au niveau des membranes endosomales, conduisant à l'élimination de RhoB via la voie endo-lysosomale.

Expression de la protéine RhoB

Comme toutes les Rho GTPases, l'activité de RhoB est régulée par la charge du GTP/GDP via les protéines GEF et GAP (voir partie III.I.B. de ce manuscrit). La plupart des GEFs et des GAPs testées ont une action *in vitro* sur RhoA, RhoB et RhoC mais il existe des différences. Par exemple, la GEF3 (RhoGEF XPLM/ARH) se lie à RhoA et RhoB mais pas à RhoC²⁵⁶. De plus la protéine chaperonne SmgGDS se lie aux régions C-terminales polybasiques de RhoA et RhoC mais pas RhoB²⁵⁷. Parmi les trois Rho GDIs, c'est uniquement la Rho GDI-3 qui pourra se lier à RhoB²⁵⁸. En revanche, Rho GDI-1 se liera à RhoA et RhoC mais pas à RhoB.

Les niveaux d'expression de RhoB sont profondément régulés en réponse à divers stimuli. Par exemple, RhoB peut être ciblé par les ubiquitines ligases Smurf1 et le complexe

Cullin2-RBX1 entraînant sa dégradation dans le protéasome ^{259,260}. RhoA et RhoC peuvent également être ubiquitinylés mais leurs dégradations seront beaucoup plus lentes que celle de RhoB. Ainsi, la protéine RhoB est normalement présente à faible niveau dans les cellules à l'état basal, mais peut être rapidement et transitoirement uprégulée par différents stimuli tels que les radiations UV, les facteurs de croissance, les cytokines ou encore lors du cycle cellulaire ²⁶¹. Par exemple, le stress génotoxique va rapidement activer RhoB, probablement médié par les GEFs nucléaires Ect2 et Net1 ²⁶².

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

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

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

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

Modulation de l'activité de RhoB

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

pénétration cellulaire et donc son utilisation *in vivo*.

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

Afin de monitorer l'activation des petites GTPases, les stratégies d'étude consistent en général à évaluer la liaison de la forme active des petites GTPases (liée au GTP) avec un domaine spécifique de liaison aux GTPases présent sur des protéines effectrices immobilisées sur des billes^{268,269}. Cependant cette méthode présente des limites car la liaison des GTPases au GTP est extrêmement labile et dynamique. De plus l'activation des petites GTPases étant étroitement modulée par la localisation subcellulaire des régulateurs et des effecteurs des GTPases, de nouvelles approches permettant d'observer en temps réel ces phénomènes ont dû être développées²⁷⁰. Ainsi, le système tripartite split-GFP (triSFP) a été développé et validé dans les années 2000 afin de monitorer les interactions protéines-protéines dans les cellules vivantes²⁷¹⁻²⁷³. Par la suite, ce système a été adapté pour la détection de l'interaction entre une GTPase et son effecteur²⁷⁴. Dans ce système, la molécule GFP est séparée en trois parties liées à des acteurs indispensables pour l'activation des GTPases, que l'on peut nommer la proie, l'appât et le détecteur. Ainsi, la recombinaison du système suite à l'engagement de ces différents acteurs va entraîner la complémentation de la molécule de GFP et donc l'émission de sa fluorescence (Figure 22).

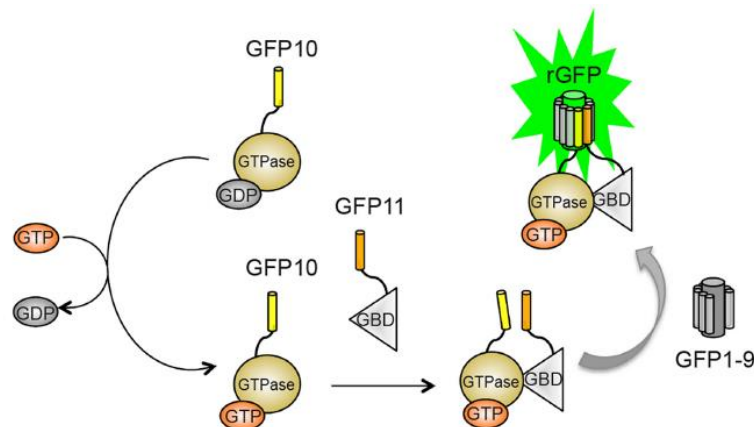


Figure 22 : Adaptation du système Split-GFP pour le monitoring des petites RhoGTPases.²⁷⁴

D'après la Figure 22, la GTPase est fusionnée avec la partie C-terminale du brin β -10 de la GFP (GFP10 sur la Figure 22). Le domaine de liaison de l'effecteur (GBD) est quant à lui lié à l'extrémité N-terminale du brin β -11 de la GFP (GFP11 sur la Figure 22). Lorsque la GTPase est activée (donc liée au GTP), elle va interagir avec son domaine effecteur

entraînant une proximité entre le GFP10 et le GFP11. Après ajout du détecteur GFP1-9 qui correspond à la troisième partie de la GFP, il va pouvoir se compléter avec la GFP10 et la GFP11 pour reconstituer entièrement la protéine GFP et émettre la fluorescence verte : on parle de GFP recombinante (rGFP).

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

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

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

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

Tableau 4: Résumé du rôle bivalent de la protéine RhoB dans différents cancers (adapté de ²⁴¹).

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

Rôle pro-tumoral de la protéine RhoB

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

Dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire, une étude a montré que le gène codant pour la protéine RhoB présente une activité pro-métastatique ²⁸⁰. Grâce à des expériences fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* qui sur-exprimaient ou diminuaient l'expression génique, cette étude démontre que RhoB va promouvoir à la fois les stades précoces et tardifs des métastases dans ces cancers pulmonaires. En effet, l'injection systémique de cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 RhoB *knockdown* dans des souris a montré une diminution significative des métastases osseuses. Des analyses cliniques ont montré une

forte association entre des hauts niveaux d'expression de RhoB et une faible survie associée chez des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires. Par conséquent, de hauts niveaux d'expression de RhoB chez ces patients vont promouvoir la progression tumorale, la chimio-résistance et contribuer à l'augmentation de la survie cellulaire après traitement par rayons γ .

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

Rôle suppresseur de tumeurs de la protéine RhoB

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

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

Une étude plus récente s'est intéressée à l'utilisation de l'expression de RhoB comme marqueur pronostic dans les NSCLC ²⁸⁴. Dans cette étude multicentrique, l'expression de RhoB a été analysée par RT-qPCR et immunohistochimie sur des échantillons de patients

malades, montrant que la perte de l'expression de RhoB était à nouveau significativement associée à une mauvaise survie globale et une faible survie sans progression. De plus, la perte de l'expression de RhoB est plus forte dans les stades tumoraux plus avancés et plus agressifs (stade IV). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* grâce à des souris transgéniques EGFR(L858R)/RhoB^{+/-}. Cette étude suggère ainsi que RhoB représente un marqueur pronostic important dans les NSCLC et serait critique dans la progression vers un phénotype agressif de cancers.

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

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

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

La plupart des études de l'impact des RhoGTPases sur les lymphocytes portent sur la petite GTPase Rac1 (implication dans la sélection thymique, l'activation lymphocytaire et la présentation antigénique) et RhoA (implication dans la cytotoxicité). Néanmoins, des souris transgéniques pour la C3-transférane (voir partie des résultats I.II.C.) présentent une baisse de la thymopoïèse liée à une forte diminution des sous-types DN2 et DN3 suite à une augmentation de leur apoptose ^{288,289}. Outre le développement des cellules T, les RhoGTPases influencent également l'activation, la différenciation et la migration des lymphocytes T, ainsi que les fonctions des effecteurs T. Là encore, peu de ces travaux

incluent RhoB. Nous pouvons toutefois citer une étude qui a investigué le rôle de RhoB dans le crawling des lymphocytes ²⁹⁰. Dans ces travaux, l'inhibition de RhoB induite par la C3 transférase induisait une baisse de l'invasion des lymphocytes. De plus, une autre étude a montré que la diminution de RhoA dans les thymocytes induite par la C3 transférase limitait leur capacité d'adhésion et par conséquent leur migration, notamment via les $\beta 1$ intégrines ²⁹¹. Cependant les observations des trois études citées dans ce paragraphe ont été obtenues suite à l'utilisation de la C3 transférase, dont nous avons vu précédemment qu'elle inhibait RhoB mais aussi RhoA et RhoC. Par conséquent, ces résultats sont à modérer puisque l'inhibition de RhoB n'était pas spécifique.

Ainsi la protéine RhoB exerce des fonctions diverses dans l'organisme et participe notamment à la régulation de la réponse immunitaire. Cependant, le rôle de RhoB dans la régulation lymphocytaire reste peu étudié. Par exemple, très peu de travaux portent sur l'implication de RhoB dans l'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes ^{170,171}. Les résultats de notre étude présentés dans le paragraphe suivant s'inscrivent dans cette thématique et permettent une meilleure compréhension de la régulation du mécanisme d'activation des lymphocytes T V γ 9V δ 2 par la protéine RhoB.

I.III. Publication scientifique



V γ 9V δ 2 T Cells Activation Through Phosphoantigens Can Be Impaired by a RHOB Rerouting in Lung Cancer

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

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



V γ 9V δ 2 T Cells Activation Through Phosphoantigens Can Be Impaired by a RHOB Rerouting in Lung Cancer

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

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Ilan Bank,
Sheba Medical Center, Israel

Reviewed by:

Emmanuel Scotet,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale
(INSERM), France
Zsolt Sebestyen,
University Medical Center
Utrecht, Netherlands

*Correspondence:

Mary Poupot
mary.poupot@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
T Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 01 April 2020

Accepted: 01 June 2020

Published: 07 July 2020

Citation:

Laplagne C, Meddour S, Figarol S, Michelas M, Calvayrac O, Favre G, Laurent C, Fournié J-J, Cabantous S and Poupot M (2020) V γ 9V δ 2 T Cells Activation Through Phosphoantigens Can Be Impaired by a RHOB Rerouting in Lung Cancer. *Front. Immunol.* 11:1396. doi: 10.3389/fimmu.2020.01396

V γ 9V δ 2 T cells are known to be efficient anti-tumor effectors activated through phosphoantigens (PAG) that are naturally expressed by tumor cells or induced by amino bisphosphonates treatment. This PAG-activation which is TCR and butyrophilin BTN3A dependent can be modulated by NKG2D ligands, immune checkpoint ligands, adhesion molecules, and costimulatory molecules. This could explain the immune-resistance observed in certain clinical trials based on V γ 9V δ 2 T cells therapies. In NSCLC, encouraging responses were obtained with zoledronate administrations for 50% of patients. According to the *in vivo* results, we showed that the *in vitro* V γ 9V δ 2 T cell reactivity depends on the NSCLC cell line considered. If the PAG-pretreated KRAS mutated A549 is highly recognized and killed by V γ 9V δ 2 T cells, the EGFR mutated PC9 remains resistant to these killers despite a pre-treatment either with zoledronate or with exogenous BrHPP. The immune resistance of PC9 was shown not to be due to immune checkpoint ligands able to counterbalance NKG2D ligands or adhesion molecules such as ICAM-1 highly expressed by PC9. RHOB has been shown to be involved in the V γ 9V δ 2 TCR signaling against these NSCLC cell lines, in this study we therefore focused on its intracellular behavior. In comparison to a uniform distribution of RHOB in endosomes and at the plasma membrane in A549, the presence of large endosomal clusters of RHOB was visualized by a split-GFP system, suggesting that RHOB rerouting in the PC9 tumor cell could impair the reactivity of the immune response.

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

INTRODUCTION

Gamma delta ($\gamma\delta$) T lymphocytes expressing the T cell receptor (TCR) V γ 9V δ 2 are a prominent $\gamma\delta$ T cell subset in human peripheral blood representing 1–3% of blood mononuclear cells. Upon activation with non-peptide phosphoantigens (PAGs), these V γ 9V δ 2 T cells proliferate, produce chemokines and cytokines, and mediate cell cytotoxicity against a large spectrum of tumor cells (1). These molecules are metabolites from the methyl erythritol phosphate pathway in microbial pathogens (2) and from the eukaryotic mevalonate pathway in tumor cells which are thus spontaneously recognized and killed by V γ 9V δ 2 T cells (3, 4). In humans, treatment with aminobisphosphonates such as zoledronate can exacerbate V γ 9V δ 2 T cell reactivity through

the upregulation of the endogenous biosynthesis of PAg in mammalian cells (5). This PAg activation was clearly shown to be TCR-dependent. However, as $V\gamma 9V\delta 2$ T cells express different activator and inhibitor receptors such as immune checkpoint inhibitors and natural killer (NK) receptors, their reactivity can also be exacerbated or curbed by ligands expressed by target cells (6, 7). Thus, even overproduction of endogenous PAg might reflect the metabolic biases of cancer cells, and presumably occurs in most if not all types of tumors, some of which are resistant to $V\gamma 9V\delta 2$ T killing. Accordingly, tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells have been detected in several solid and hematopoietic malignancies but are not always correlated with a good prognosis (8, 9). However, these cells remain very attractive candidates for cancer immunotherapies regarding a tumor regression associated with their significant amplification in the blood for some clinical trials based on PAg treatment or adoptive transfers of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (10–12). In patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), administration of zoledronate was correlated with an increase of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells in blood and a higher overall survival (13). A phase I clinical study showed the safety and potential anti-tumor effect of reinfused *ex-vivo* expanded $V\gamma 9V\delta 2$ T cells in patients with advanced NSCLC refractory to or intolerant to current conventional treatment (14). These partial responses and the inevitable relapse with classical treatments make NSCLC incurable pathologies for which many mechanisms of acquired resistance have been elucidated, but the recurrent immune-resistance remains obscure. RHOB is a known tumor suppressor in lung cancer, and its downregulation, frequently observed in aggressive tumors (15), is associated with decreased overall survival (16). More recently, RHOB has also been shown to confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in NSCLC (17), suggesting different roles of this GTPase depending on the oncogenic and/or therapeutic context. Interestingly, RHOB was recently shown to mediate endogenous PAg recognition by the $V\gamma 9V\delta 2$ TCR (18). RHOB interaction with endogenous PAg in the target cell could induce a modification of the conformation of the membrane butyrophilin BTN3A1 which then activates the $V\gamma 9V\delta 2$ TCR (19). Here, we investigated the role of RHOB in the response to PAg-mediated $\gamma\delta$ T cell activation in two NSCLC cell lines with the most represented oncogenic mutations KRAS and EGFR. After showing that A549 was well-recognized and killed by $V\gamma 9V\delta 2$ T cells compared to PC9, we found different patterns of surface molecule expression for these two NSCLC cell lines. However, the resistance of PC9 to $V\gamma 9V\delta 2$ T cell killing could be due to a rerouting of RHOB in late/degradation compartments that may prevent its function with BTN3A1 at the plasma membrane in PC9 cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Antibodies

Antibodies for flow cytometry analysis: BV310 anti-CD3, FITC anti-TCRV $\gamma 9V\delta 2$, PE or PeCy5 anti-CD107a, PeCy7 anti-IFN γ , PE anti-TIM3, PE anti-Galectin9, PeCy7 anti-PD1, APC anti-PDL1, PeCy5 anti-CD80, PE anti-CD80, PeCy5 anti-HLAABC, AF647 anti-CD31, PeCy7 anti-CD38, FITC anti-CD226, FITC anti-CD112, FITC anti-CD155, PE anti-LFA1, and isotype

controls (BD Biosciences, Pont de Claix, France); BV421 anti-CD69 and isotype control (Miltenyi Biotech, Paris, France); PE anti-HLAE (eBiosciences); PE anti-ULPB2,5,6 (R&D Systems, Minneapolis, USA); APC anti-MICA/B (Biolegend, St-Quentin-en-Yvelines, France); PE anti-ICAM1 and PE anti-ICAM3 (Immunotech, Marseille, France); PE anti-LFA3 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

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

Flow Cytometry Analysis

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

$V\gamma 9V\delta 2$ T Cell Cultures

Primary $V\gamma 9V\delta 2$ T cell cultures were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Toulouse, France). Briefly, PBMC were stimulated with BrHPP (3 μ M) and rhIL-2 (300 IU/ml) in complete RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Hy1, Thermo Scientific, USA), 100 g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin and 1 mM sodium-pyruvate (Cambrex Biosciences, Rockland, ME, USA) for 14 days. Purity of the $V\gamma 9V\delta 2$ T cells was >95% as determined by flow cytometry using an anti-TCRV $\gamma 9V\delta 2$ mAb.

Lung Cancer Cell Lines

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

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

Cytotoxicity Assay

Lung cancer cell lines were treated at 70% of confluence with BrHPP (1 μ M, 4 h, Innate Pharma, Marseille, France) or

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

Trogocytosis Analysis

Lung cancer cells were stained with the lipophilic green-emitting dye PKH67 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, PKH67-positive cells were co-cultured for 4 h in complete culture medium with PKH67-negative V γ 9V δ 2 T cells in 96-well U-bottom culture plates at a cell ratio of 1:1. After gentle centrifugation (110 g for 1 min) and co-cultures for 3 min or 4 h at 37°C, cells were washed with 0.5 mM PBS/EDTA. Trogocytosis was measured as the acquisition of PKH67 fluorescence, which was characterized via the increase of the mean fluorescence intensity (mfi) of PKH67 by a flow cytometry.

Monitoring RHOB Activity With a Split-GFP Reporter System

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

For both fluorescence quantifications of RHOB activity and analysis of RHOB localization, reporter cells were grown on μ -Slide 8-well ibiTreat chambered coverslips (Ibidi, Biovalley). Cells were seeded at a density of 15,000 cells/well for PC9 and 35,000 cells/well for A549 for 24 h. Split-GFP reporter expression was induced for 24 h with 0.25 μ g/ml Doxycycline in RPMI culture medium supplemented with 2% serum (PC9) and 10% serum (A549), and subsequently treated with PAG for 16 h with Zoledronic acid monohydrate or 4 h of BrHPP. To stop the experiment, cells were fixed with 4% PFA, PBS then stained with a cytoplasmic cell mask, HCS CellMask[™] Blue Stain (Thermo Fisher Scientific) according to the supplier's

instructions. Quantitative image acquisition was performed using an Operetta high-content imaging system (Perkin Elmer) with a 20 \times objective lens in the 488/525 nm (GFP) and 360/405 nm (cell mask) channels. Analysis was performed with Harmony[®] software on an average of 1500 cells/well. The number of objects and the sum of cell area was determined from the cell mask staining. The percentage of GFP cells was calculated as: percentage GFP cells = (number of GFP-positive cells/number of all objects) \times 100, where GFP-positive cells are defined by cells following this criteria: mean of fluorescence intensity (MFI) of the object > mean of MFI in the control wells without doxycycline. GFP intensity sum/cell area was defined as the (GFP intensity sum of GFP+ cells)/(HCS intensity sum of GFP+ cells).

For confocal analysis, cells were fixed with 3.7% PFA and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS buffer. Blocking was performed with 8% BSA, PBS for 30 min before adding primary antibodies. Anti-GFP10 polyclonal antibody (20) was used at 1:1,000 dilution for 1 h, followed by secondary antibody Alexa fluor 594 conjugate anti rabbit IgG (Life technologies) for 40 min. For labeling endosomes, the following primary antibodies were used: Rab7 [(D95F2) XP 9367, Cell signaling] 1:50, LAMP1 (H5G11) sc-18821, Santa Cruz Biotechnology 1:50. After overnight incubation, secondary antibodies were added Alexa fluor 594 conjugate anti rabbit IgG (Life technologies) and Alexa fluor 647 conjugate anti mouse IgG (Life technologies). Microscopy images were acquired using LSM 780 or LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, Germany) confocal laser scanning microscopes using a 488 Argon laser with a 490–553 nm emission filter (GFP) Alexa 594 and DAPI labeling were acquired with Argon laser (543 nm) and 405 UV diode lasers, respectively, using 20 \times and 63 \times /1.4 oil immersion objectives. Image analysis was performed with ImageJ[®] software.

Statistical Analysis

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

RESULTS

Differential Activation of V γ 9V δ 2 T Cells by Different PAG-Treated NSCLC Cell Lines

To analyze the role of RHOB in V γ 9V δ 2 T cell reactivity against NSCLC, we first screened the basal reactivity of V γ 9V δ 2 T cells against four cell lines with different mutation statuses: A549 (KRAS mutant), H1299 (HRAS mutant), PC9 and H827 (EGFR mutant). The expression of CD107a and IFN γ by V γ 9V δ 2 T cells after co-cultures with the different tumor cell lines was measured by flow cytometry. Compared to the Daudi control target cells, which induced CD107a and IFN γ expression by V γ 9V δ 2 T cells, no basal reactivity was detected with the four NSCLC cell lines (Figures 1A,B black dots). However, incubation of these cell lines with zoledronate (red dots) or with an exogenous synthetic PAG, BrHPP (blue dots), induced a high increase of the percentage of IFN γ and CD107a positive V γ 9V δ 2 T cells in co-culture with A549, H827, and H1299 but

not with PC9 (**Figure 1B**). We then checked that this reactivity was due to an immunological synapse following a contact between $V\gamma 9V\delta 2$ T cells and NSCLC target cells and not to PAG excreted in the co-culture medium. $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were thus incubated for 4 h with A549 or PC9, previously treated with PAG, and separated by a Transwell (TW) membrane or with their conditioned medium. As shown in **Figure 1C**, no CD107a expression was detected in $V\gamma 9V\delta 2$ T cells in the TW condition or in the conditioned medium condition (CM) (**Figure 1C** for a representative experiment and **Supplementary Figure 1** for pooled experiments). Trogocytosis was also evaluated to confirm the contact dependent reactivity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against A549. Trogocytosis is the transfer of membrane patches following the establishment of an immunological synapse between a T lymphocyte and a target cell. The membrane transfer was measured by the increase of green (PKH67) fluorescence expressed by the $V\gamma 9V\delta 2$ T following contact with the A549 cell line previously stained with the PKH67 fluorescent probe stably inserted into the plasma membrane. $V\gamma 9V\delta 2$ T cells expressed PKH67 fluorescence after 4 h of contact with PAG-treated PKH67⁺A549 compared to 5 min of contact (**Figure 1D** for a representative experiment and **Supplementary Figure 2** for pooled experiments). CD107a and IFN γ expression by $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, and their trogocytosis in reaction to A549 were correlated with the death of A549 (**Figure 1E** and **Supplementary Figure 3A**). On the contrary, PC9, even treated by phosphoantigens was relatively resistant to $V\gamma 9V\delta 2$ T cell killing (**Figure 1F** and **Supplementary Figure 3B**).

$V\gamma 9V\delta 2$ T cells can thus be highly activated to kill A549 but not PC9, when previously treated with phosphoantigens.

Expression of Different Patterns of Surface Ligands and Adhesion Molecules on A549 and PC9

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

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

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

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

RHOB Deletion in PAG-Treated A549 Cell Lines Decreases $V\gamma 9V\delta 2$ T Cell Activation

BTN3A1 was previously shown to be involved in $V\gamma 9V\delta 2$ T cell TCR-dependent activation. BTN3A1 may interact with the $V\gamma 9V\delta 2$ TCR upon association with RHOB activated by its interaction with endogenous phosphoantigens (18). Thus, we investigated the role of RHOB in $V\gamma 9V\delta 2$ T cell activation by these NSCLC cell lines. Firstly, A549 and PC9 cell lines were shown to express BTN3A1 at the transcriptomic and protein level (**Figures 3A,B**). Interestingly, PAG treatment of these cell lines had no impact on their BTN3A1 expression. We then determined whether $V\gamma 9V\delta 2$ T cell activation by zoledronate- or BrHPP-treated NSCLC cell lines was BTN3A1-dependent using a blocking antibody (103.2 clone). The percentage of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells expressing IFN γ , CD107a and CD69 following contact with BrHPP- or zoledronate-treated A549 was highly decreased by the presence of anti-BTN3A1 during the co-culture (**Figure 3C** for a representative experiment and **Figure 3D** for pooled experiments). BTN3A1 blocking also abrogated the weak activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells by the PC9 cell line (**Figure 3E** for a representative experiment and **Figure 3F** for pooled experiments). Thus, the high activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells by PAG-treated A549 and the weak activation by PAG-treated PC9 are totally dependent on BTN3A1. As RHOB has been implicated in the regulation of the immune response through BTN3A1 modulation (18), we studied the implication of this GTPase in $V\gamma 9V\delta 2$ T cell activation by NSCLC cell lines. RHOB was knocked out in the A549 and PC9 cell lines by the TALEN gene silencing method (**Supplementary Figure 5**). We then assessed the effect of this knockdown (KO) on $V\gamma 9V\delta 2$ T cell activation by measuring IFN γ and CD107a expression, and trogocytosis

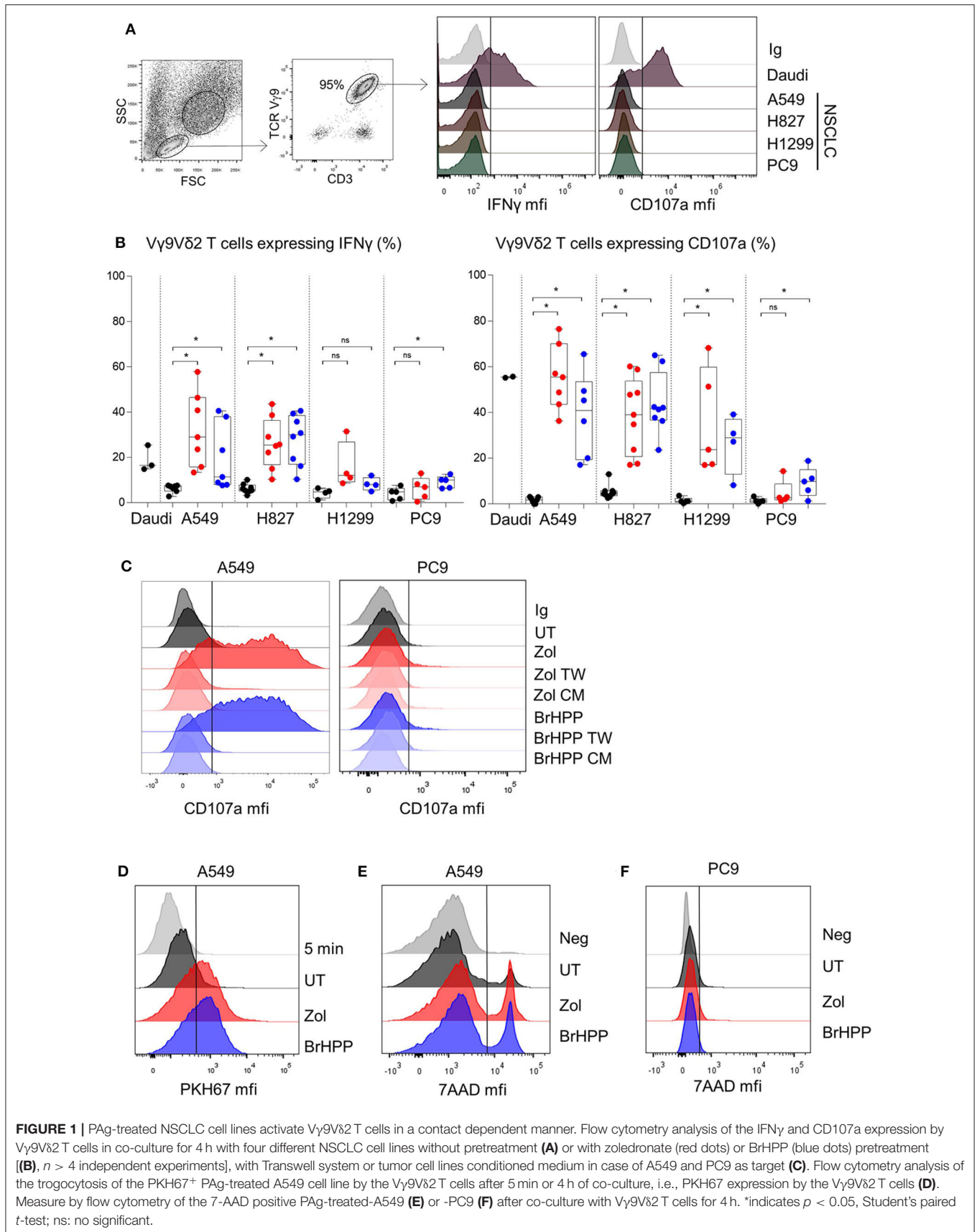


FIGURE 1 | PAg-treated NSCLC cell lines activate V γ 9V δ 2 T cells in a contact dependent manner. Flow cytometry analysis of the IFN γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture for 4 h with four different NSCLC cell lines without pretreatment **(A)** or with zoledronate (red dots) or BrHPP (blue dots) pretreatment **(B)**, $n > 4$ independent experiments, with Transwell system or tumor cell lines conditioned medium in case of A549 and PC9 as target **(C)**. Flow cytometry analysis of the trogocytosis of the PKH67⁺ PAg-treated A549 cell line by the V γ 9V δ 2 T cells after 5 min or 4 h of co-culture, i.e., PKH67 expression by the V γ 9V δ 2 T cells **(D)**. Measure by flow cytometry of the 7-AAD positive PAg-treated-A549 **(E)** or -PC9 **(F)** after co-culture with V γ 9V δ 2 T cells for 4 h. *indicates $p < 0.05$, Student's paired t -test; ns: no significant.

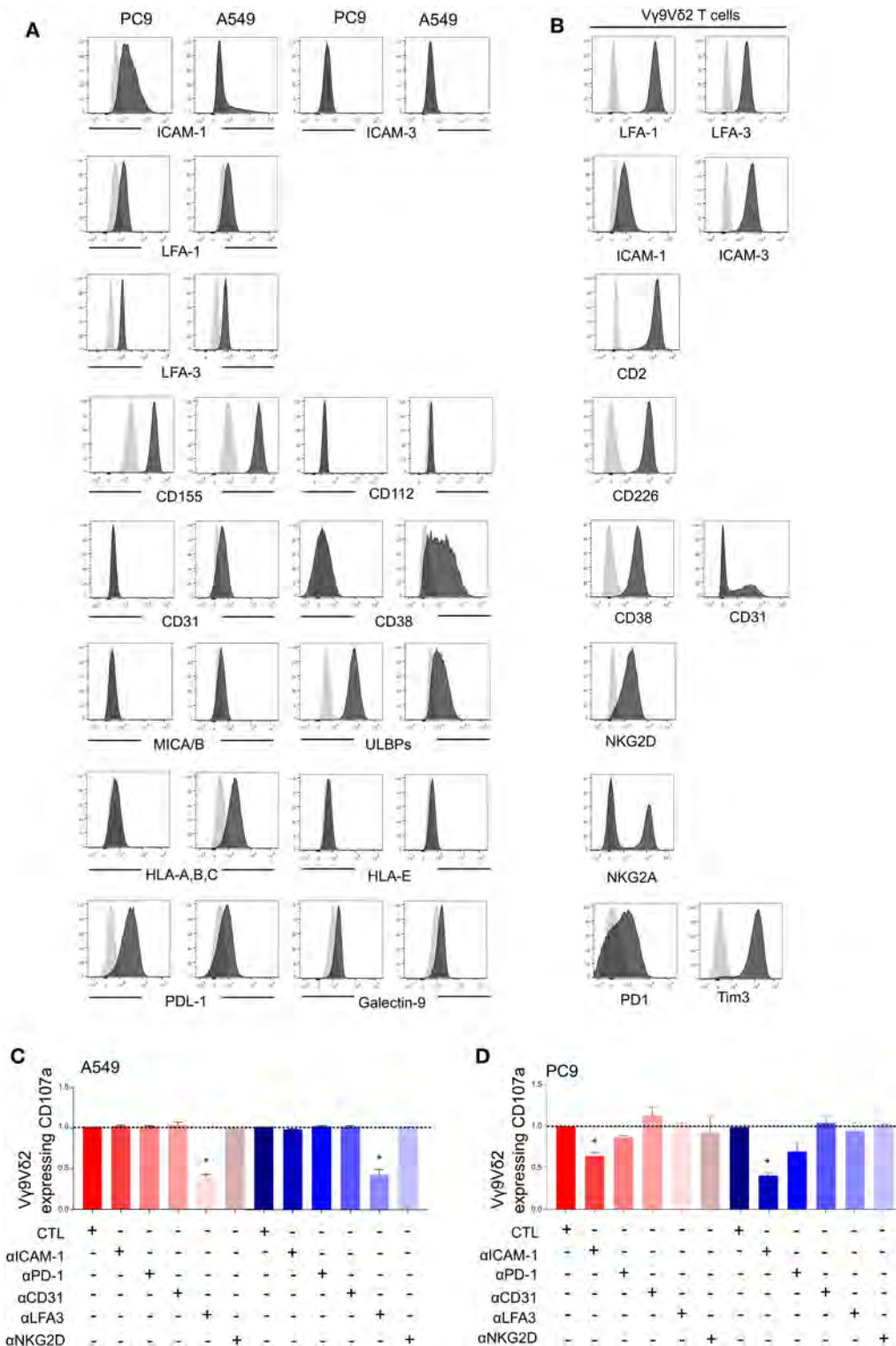


FIGURE 2 | $V\gamma 9V\delta 2$ T cells activation by PAg-treated-A549 or -PC9 is dependent on different adhesion molecules. Flow cytometry analysis of the expression of surface markers (black) by PC9 and A549 cell lines **(A)** or by the $V\gamma 9V\delta 2$ T cells **(B)** compared to the respective isotypic control (gray). CD107a expression by the $V\gamma 9V\delta 2$ T cells after 4 h of co-culture with zoledronate-treated A549 **(C)**, red] or BrHPP-treated A549 **(C)**, blue] or with zoledronate-treated PC9 **(D)**, red] or BrHPP-treated PC9 **(D)**, blue] in the presence of different blocking antibodies normalized to the control condition (CTL) without blocking antibody. * indicates $p < 0.05$.

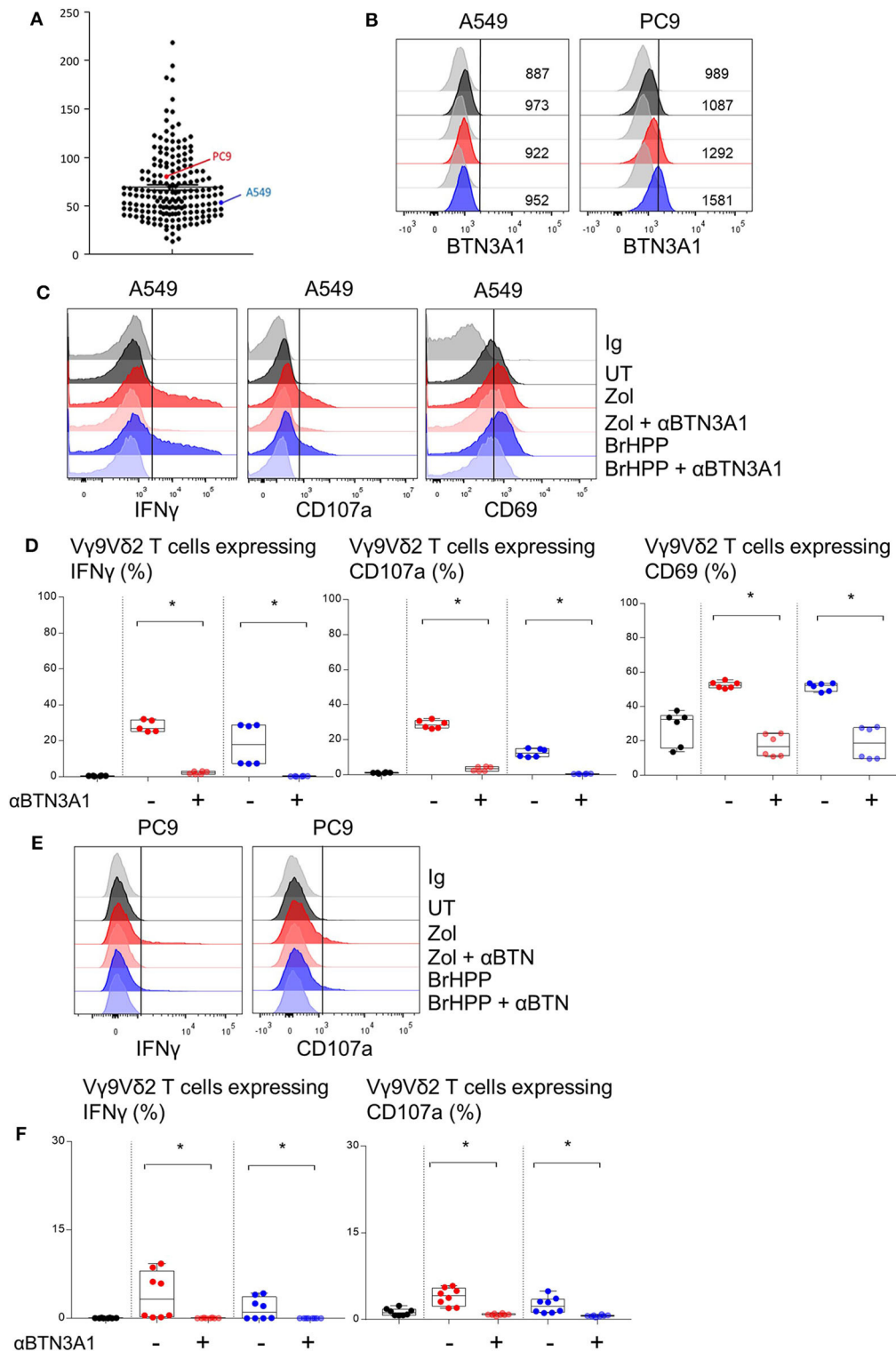


FIGURE 3 | PAg-treated A549/PC9 cell lines activating $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is BTN3A1 dependent. **(A)** mRNA expression of the BTN3A1 by A549 and PC9 cell lines among cancer cell lines in the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). **(B)** Flow cytometry analysis of the BTN3A1 expression by A549 and PC9 pre-treated or not (black) by zoledronate (red) or BrHPP (blue) and compared to the isotopic control (gray). **(C–F)** Flow cytometry analysis of the IFN γ , CD107a, and CD69 expression by $V\gamma 9V\delta 2$ T cells in co-culture for 4 h with A549 [(C,D): six independent experiments] or PC9 [(E,F): six independent experiments] without pretreatment (black) or with zoledronate (red) or BrHPP (blue) pretreatment. *indicates $p < 0.05$.

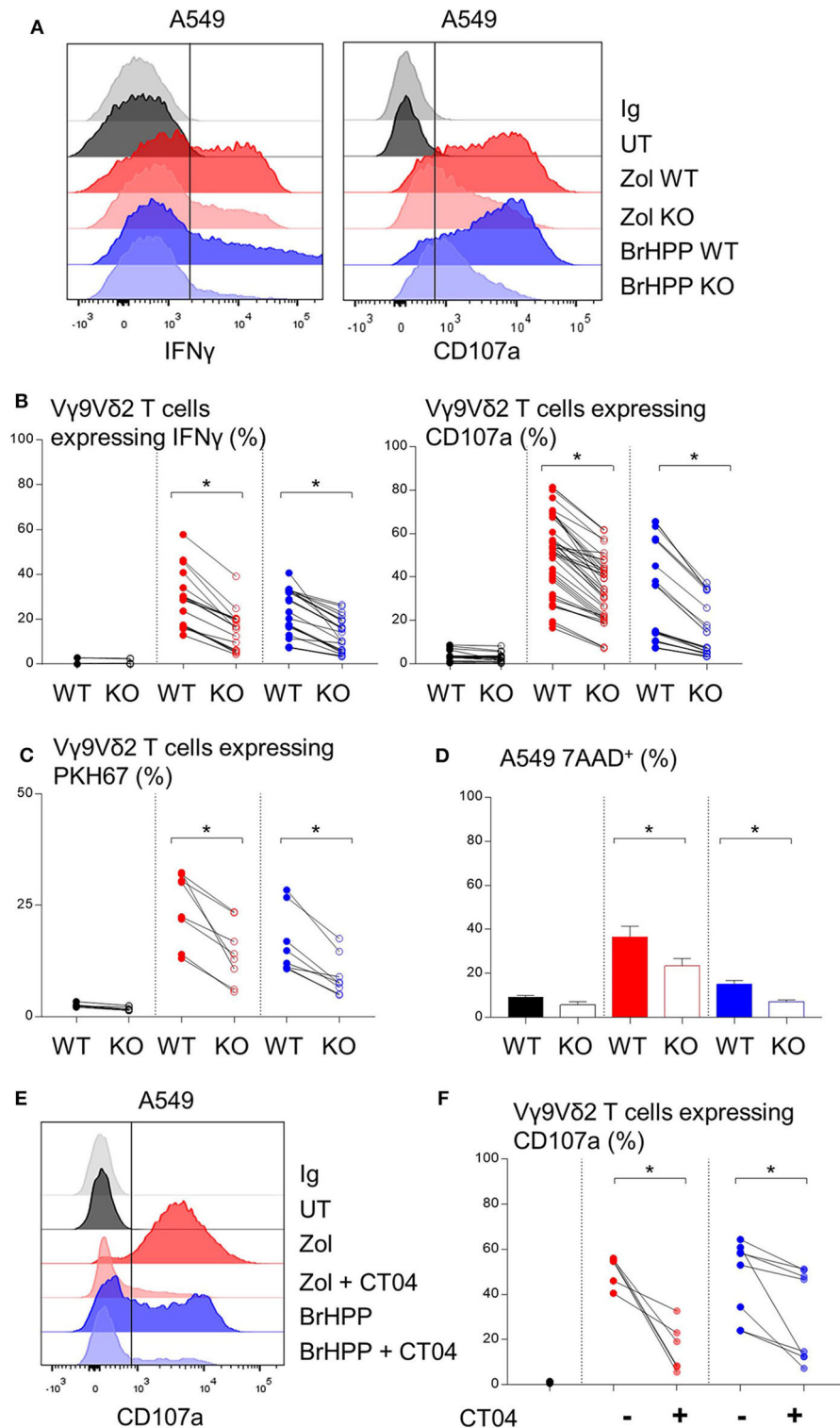


FIGURE 4 | Decrease of the V γ 9V δ 2 T cells activation by A549 with RHOB knock down. Flow cytometry analysis of the IFN γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture for 4 h with A549 wild type (WT) or knock down for RHOB (KO) with zoledronate (red) or BrHPP (blue) pretreatment [(A): one representative experiment, (B): $n > 10$ independent experiments]. (C) Flow cytometry analysis of the trogocytosis of the PKH67⁺ PAg-pretreated-A549 cell line WT or KO by the V γ 9V δ 2 T cells (ratio of the V γ 9V δ 2 T cells expressing PKH67 4 h/5 min). (D) Flow cytometry analysis of the 7AAD expression by the WT or KO A549 cell line PAg-treated (zoledronate: red, BrHPP: blue) or not (black) in co-culture for 4 h with the V γ 9V δ 2 T cells. (E,F) CD107a expression by the V γ 9V δ 2 T cells analyzed by flow cytometry after 4 h of contact with PAg-pretreated A549 in the presence or not of the CT04 inhibitor [(E): one representative experiment, (F): $n > 4$ independent experiments]. *indicates $p < 0.05$.

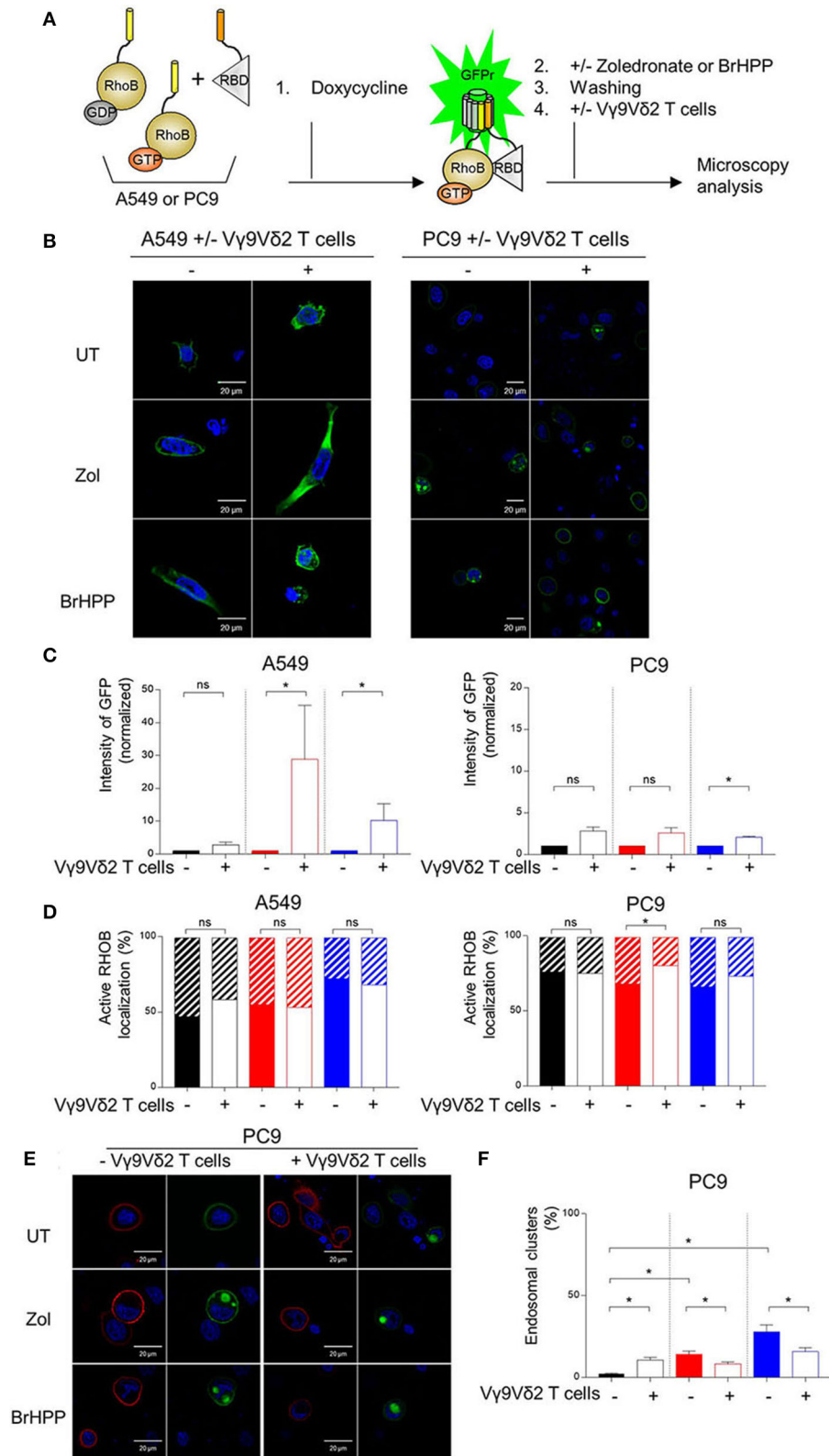


FIGURE 5 | Membrane localization of RHOB favored in A549 cells in contact with V γ 9V δ 2 T cells. **(A)** A549 and PC9 cells were engineered to stably express RHOB GTPase and monitor active RHOB using a split GFP system. Induction by Doxycycline of the tripartite split-GFP system in A549 and PC9, with or without (UT) pretreatment with zoledronate (zol) or BrHPP, and co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells. Active RHOB (green fluorescence) was visualized by confocal microscopy (Continued)

FIGURE 5 | (B) and quantified by Operetta **(C)**: zoledronate: red, BrHPP: blue]. **(D)** Percentage of endosomal (hatched bars) or membrane (full bars) active RHOB quantified by confocal microscopy in A549 and PC9 cell lines PAG-treated (zoledronate: red, BrHPP: blue) or not (black) co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells. **(E,F)** Confocal microscopy of total (red) and active (green) RHOB in PC9 cell line after PAG-treatment (zoledronate: red, BrHPP: blue) or not (black) and co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells **(E)**: representative images; **(F)**: % of PC9 presenting endosomal clusters based on 3 independent experiments among 30 cells]. *indicates $p < 0.05$, Student's paired *t*-test; ns: no significant.

after co-culture with the PAG-treated RHOB KO A549 or the PAG-treated RHOB KO PC9. IFN γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells was lower in the co-culture with A549 RHOB KO treated either by zoledronate or BrHPP compared to the co-culture with PAG-treated A549 wild type (WT) (**Figure 4A** for a representative experiment and **Figure 4B** for pooled experiments). Trogocytosis of A549 by V γ 9V δ 2 T cells was also reduced when RHOB was knocked down which was correlated with reduced death of A549 RHOB KO compared to A549 WT (**Figures 4C,D**).

Furthermore, we used a RHO GTPase inhibitor, the exoenzyme C3 transferase (CT04) that specifically inhibits RHOA, B, C. We showed that inhibition of RHO GTPases abrogated CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture with A549 previously treated with zoledronate or BrHPP (**Figure 4E** for a representative experiment and **Figure 4F** for pooled experiments).

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

Rerouting of RHOB in Endosomal Clusters Could Impair the PAG-Dependent V γ 9V δ 2 T Activation in PC9 Cells

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

Surprisingly, active RHOB was significantly twice as abundant in the endosomal compartment of A549 cells compared to PC9 cells (**Figure 5D**, quantification). High resolution microscopy allowed us to analyze endosomal organization in PC9. Untreated reporter PC9 showed faint plasma membrane localization of RHOB/RBD complexes. Interestingly, treatment with zoledronate or BrHPP induced an accumulation of large endosomal clusters (**Figure 5E**, representative images). Quantification of the number of these structures indicated an increase of activated RHOB located in endosomal clusters in PAG-treated PC9 co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells (**Figure 5F**). These endosomal clusters were reported randomly in PC9 cells co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells independently of the treatment. Interestingly, these endosomal structures did not appear in the PAG-treated A549 co-cultured or not with V γ 9V δ 2 T cells (**Supplementary Figure 7**), suggesting that this endosomal reorganization was not due to the treatment with P-Ag mevalonate inhibitors. To identify the nature of these structures, we analyzed the localization of activated RHOB with different endosomal markers. Representative images and plot profile analysis on confocal stacks indicated a co-localization partly with late endosomal marker Rab7 and to a lesser extent with the LAMP1 lysosomal marker only after PAG-treated PC9 were co-cultured with V γ 9V δ 2 T cells independently of the treatment (**Figure 6**). These results indicate that in PC9 cells, endosomal RHOB is located in the late endosomal and on route to the lysosomal compartment.

DISCUSSION

The anti-tumor effect of V γ 9V δ 2 T cells depends on the phosphoantigens expressed by tumor cells but also on certain activator ligands (MICA/B and ULBPs) and adhesion molecules, essential to stabilize the immunological synapse. As PAG is not expressed by all tumor cells, treatment with exogenous PAG such as BrHPP or with aminobisphosphonates which induce endogenous PAG production such as isopentenyl pyrophosphate (IPP), is required to activate the anti-tumor functions of V γ 9V δ 2 T cells. However, V γ 9V δ 2 T cell activation can also be lowered by inhibitory signals that can be expressed by the tumor microenvironment and in particular by tumor cells. In this study, none of the NSCLC cell lines were able to spontaneously activate V γ 9V δ 2 T cells. However, pre-treatment with BrHPP or zoledronate sensitized some of them to V γ 9V δ 2 T cell killing. Indeed, amongst them, A549 was able to strongly activate IFN γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells whereas PC9 induced a weak activation of these lymphocytes. Interestingly, these two cell lines express RHOB but wear different mutation, KRAS for A549 and EGFR for PC9. However, nothing was described

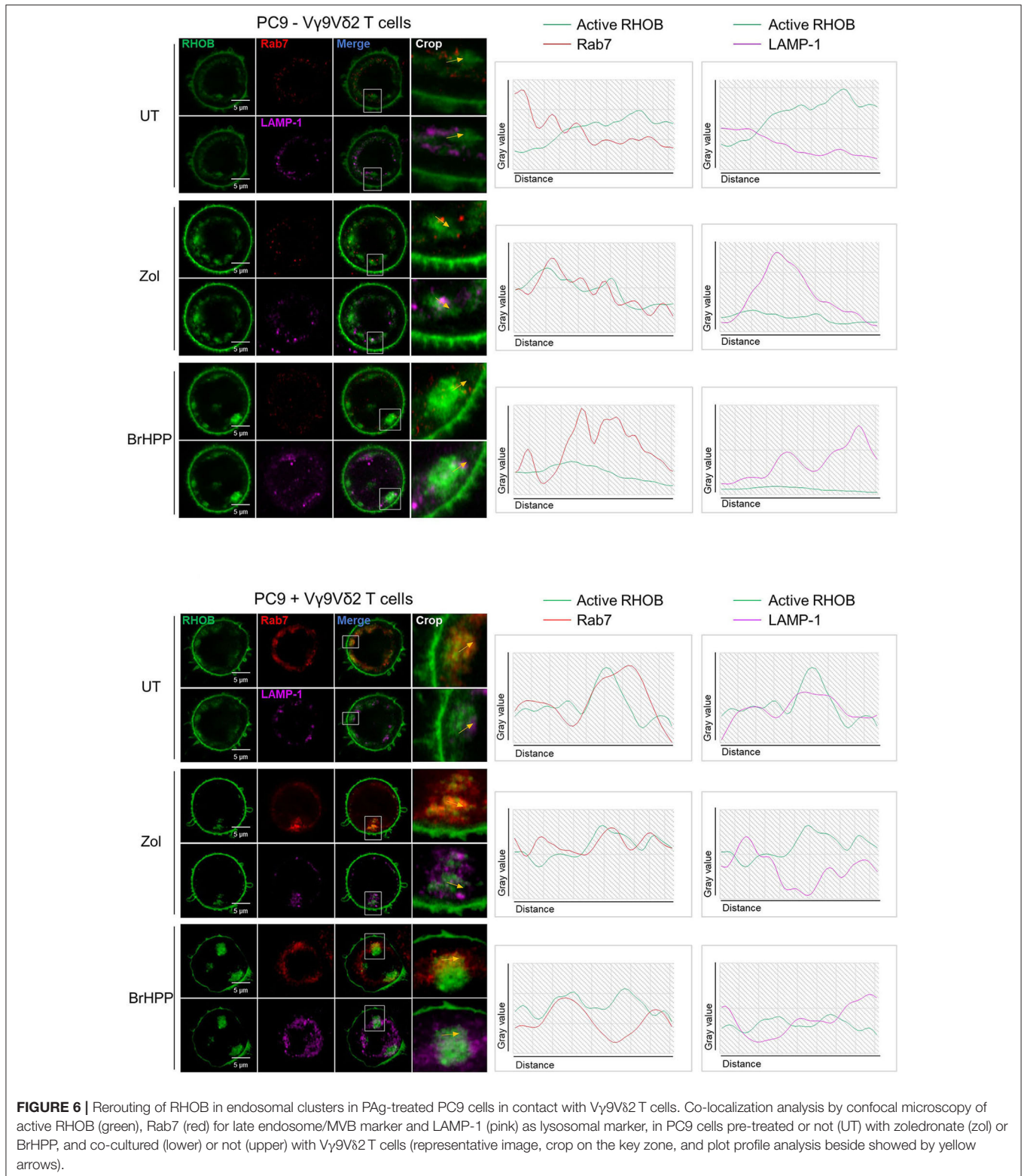


FIGURE 6 | Retrouting of RHOB in endosomal clusters in PAg-treated PC9 cells in contact with $\gamma\delta$ T cells. Co-localization analysis by confocal microscopy of active RHOB (green), Rab7 (red) for late endosome/MVB marker and LAMP-1 (pink) as lysosomal marker, in PC9 cells pre-treated or not (UT) with zoledronate (zol) or BrHPP, and co-cultured (lower) or not (upper) with $\gamma\delta$ T cells (representative image, crop on the key zone, and plot profile analysis beside showed by yellow arrows).

concerning some phenotypic specificities which could explain the different sensitivity of these cells toward $\gamma\delta$ T killers.

Surprisingly, exploring their surface molecule pattern, we showed that these two NSCLC cell lines could differentially

express NKG2D ligands, immune checkpoint ligands, and adhesion molecules. PC9 highly expressed ICAM-1, ULBPs, and PDL1 whereas A549 highly expressed CD38 and HLA-A,B,C, the two cell lines expressed LFA-1, LFA-3, and CD155

but not ICAM-3, CD112, MICA/B, HLA-E, or galectin-9. The presence of ULBPs ligands could partially explain the reactivity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against NSCLC cell lines. However, blocking NKG2D expressed at the surface of $V\gamma 9V\delta 2$ T did not decrease their activation which is thus only induced here by PAg and not by other activator ligands. Furthermore, we showed that blocking of ICAM-3/LFA-3 decreased the cytolytic activity of $V\gamma 9V\delta 2$ T against A549 and blocking of ICAM-1/LFA-1 decreased this activity against PC9. For these two cell lines, stabilization of the immunological synapse around TCR/BTN3A1 is thus coordinated by two different adhesion systems. If LFA-1 engagement by ICAM-1 is sufficient to activate iNKT cells (23) in this model of lung cancer/ $V\gamma 9V\delta 2$ T, interactions of adhesion molecules are not sufficient to induce an activating signaling in $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. However, according to the literature, these interactions are necessary when their inhibition highly decreases $V\gamma 9V\delta 2$ T activation (9, 24). But this does not explain the difference between A549 and PC9. First, we thought that the high expression of PDL1 by PC9 could explain the inhibition of $V\gamma 9V\delta 2$ T activation. However, PD1 blocking did not induce an increase in CD107a or IFN γ expression by $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. As surface inhibitor markers were not at the origin of the weak activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, we focused on RHOB inside the cells. According to the literature (18) and thanks to NSCLC cell lines with a RHOB KO, we showed that RHOB was involved in the $V\gamma 9V\delta 2$ T activation through endogenous PAg induced by a zoledronate treatment but also through exogenous PAg such as BrHPP. The non-reactivity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells with the conditioned medium of BrHPP pre-treated tumor cells or in co-culture with these cells separated by a porous membrane (Transwell), demonstrated that BrHPP was able to penetrate inside the tumor cell and to activate membrane BTN3A1 shown to be essential for this activation (19). RHOB is thus also involved in the activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells through the exogenous PAg, BrHPP. Interestingly, the ICAM-1 signaling cascade is also highly dependent on RHO proteins, as ICAM-1 crosslinking induces actin reorganization which involves RHOB proteins (25). PC9 expresses a high amount of ICAM-1 which is involved in the immunological synapse with $V\gamma 9V\delta 2$ T but does not efficiently activate the latter. To explain the weak reactivity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against PAg-pre-treated PC9, we examined RHOB activity and its localization. The similar reactivity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against A549 and PC9 pulsed with the 20.1 BTN3A1 agonist (**Supplementary Figure 8**) supports the important role of RHOB in the PAg-induced response in this model. Our results show that active RHOB is localized in endosomes and at the plasma membrane of both A549 and PC9 cell lines. This is in agreement with previous reports of GFP-RHOB fusions in human epithelial cells (26). Our results indicate that active RHOB is increased in PAg-treated A549 cells co-cultured with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, whereas only a slight increase of active RHOB is observed in PC9 cells co-cultured with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells independently of PAg treatment. It is important to note that the activation of RhoB in co-culture of A549 and $V\gamma 9V\delta 2$ T is mainly dependent on the treatment by the PAg (**Figure 5C**). It has been previously established that treatment with PAg induces an increase of active RHOB that will modify the conformation of the

BTN3A1 at the plasma membrane, which allows the activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (18). The fact that the presence of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells further increases RHOB activity suggests that RHOB may be activated by exogenous stress signals and cytokines that would come from activated $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. Indeed, in other contexts involving immune cells, RHOB has been shown to be upregulated by environmental stress, cytokines, and LPS, and regulating this latter signaling (27–29). Our hypothesis would be that signals secreted by activated $V\gamma 9V\delta 2$ T cells would contribute to RHOB activation in a cooperative manner with PAg. These results corroborate with the $V\gamma 9V\delta 2$ T cell activation observed with A549 or -PC9 treated with PAg (**Figure 1** and **Supplementary Figure 1**). Altogether this indicates that the reactivity of these cell lines is strongly linked to RHOB function. In terms of subcellular localization, both cell lines contain active RHOB at the plasma membrane, with a stronger distribution in PC9 cells. A higher proportion of active RHOB is present in the endosomal compartment in A549 compared to PC9, however they differ strongly in terms of endosomal distribution. Whereas in A549, endosomal RHOB is diffusely distributed, in PC9 endosomal active RHOB was found in large clusters that co-localized with late Rab7 endosomal and LAMP-1 lysosomal markers. It is known that $V\gamma 9V\delta 2$ T cell activation occurs at the plasma membrane through the involvement of BTN3A1 that is addressed by RHOB vesicles from the endosomes to the plasma membrane (18). In our model, PAg treatment of PC9 cells is not sufficient to trigger an increase in RHOB activation but requires the contact with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, as untreated conditions in the presence of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells did not induce a significant increase in RHOB activity. One hypothesis of the weaker activation of RHOB in PC9 cells is that beyond the mode of recognition with T cells, the organization of endosomal RHOB-mediated signaling is not efficient for addressing important signaling molecules such as BTN3A1 at the plasma membrane. It was reported that RHOB interacts with the intracellular domain of BTN3A1 at the plasma membrane (18). BTN3A1 was shown as essential to $V\gamma 9V\delta 2$ T cell recognition but not sufficient for this process as its homologous BTN2A1, the phosphoantigen being also essential. Actually, it was recently described that BTN2A1 synergized with BTN3A1 in sensitizing PAg-exposed cells for $V\gamma 9V\delta 2$ TCR-mediated responses, these two butyrophilins being key ligands that bind possibly two different domains of this TCR (30, 31). As for BTN3A1, the level of expression of BTN2A1 mRNA in PC9 is very close to that in A549 (**Supplementary Figure 9**). Thus, we can expect that these two cell lines express a similar level of BTN2A1 at their membrane, the BNT3A1 expression being equivalent (**Figure 3B**). Therefore, the weak activation of the $V\gamma 9V\delta 2$ T cell by the PC9 cell line should not be due to the lack of BTN2A1. RHOB has not yet been shown to be associated to the intracellular B30.2 domain of the BTN2A1. Actually, it could be interesting to know if RHOB, as for BNT3A1, can be involved in the modification of the conformation of the BTN2A1. The organization of endosomal RHOB could then have an impact also on the BTN2A1. Further investigations should be pursued to evaluate whether such a mechanism is preserved in PC9. This endosomal signaling could be favored due to the genetic background of these cells, i.e., as they express an activated

EGFR mutant whose expression may modify intracellular RHOB mediated trafficking. Indeed, RHOB is known to prolong endosomal signaling of EGFR following its internalization (32). RHOB is a short-lived protein that is rapidly degraded through the endo-lysosomal pathway (33) and its degradation is delayed by inhibition of its isoprenylation. Treatment with PAG, while necessary for the activation of V γ 9V δ 2 T cells, contributes to a rerouting of RHOB in late/degradation compartments that may accelerate its degradation and prevent its function in endocytic trafficking to the plasma membrane in PC9 cells.

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

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://portals.broadinstitute.org/ccle/data>, CCLE.

AUTHOR'S NOTE

The precise mechanism of V γ 9 T cells phosphoantigen (PAG)-activation remains elusive even the butyrophilin BTN3A and the RHOB GTPase are known as essential in this activation. RHOB which can have a dualistic role in cancer, was shown as conferring resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in

lung cancer and frequently downregulated in aggressive lung cancer. Besides, V γ 9 T cells based therapies could be an issue for advanced lung cancers refractory to or intolerant of current conventional treatment. The role of RHOB in the PAG-activation of V γ 9 T cells in lung cancer has to be depicted when V γ 9 T cells reactivity depends on the lung tumor cell lines status.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CLap, SM, MM, and SF performed the experiments. SF and OC performed the KO cell lines. SC, OC, J-JE, GF, and CLau participated to the discussion of the results. MP and SC designed experiments and wrote the manuscript. MP supervised the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was funded by INSERM, CNRS, the University Hospital of Bordeaux and Toulouse III University.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to our healthcare professionals for their boundless investment during the COVID-19 crisis. We acknowledge ImCheck Therapeutics for giving us the 103.2 antibody. We acknowledge the Technologic Platform of the CRCT.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01396/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zöller M. Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells *in vitro* and in SCID mice *in vivo*. *J Immunol*. (2004) 173:6767–76. doi: 10.4049/jimmunol.173.11.6767
- Poupot M, Fournié J-J. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol Lett*. (2004) 95:129–38. doi: 10.1016/j.imlet.2004.06.013
- Gober H-J, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, de Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. (2003) 197:163–8. doi: 10.1084/jem.200.21500
- Hebbeler AM, Cairo C, Cummings JS, Pauza CD. Individual Vgamma2-Jgamma1.2+ T cells respond to both isopentenyl pyrophosphate and Daudi cell stimulation: generating tumor effectors with low molecular weight phosphoantigens. *Cancer Immunol Immunother CII*. (2007) 56:819–29. doi: 10.1007/s00262-006-0235-6
- Roelofs AJ, Jauhainen M, Mönkkönen H, Rogers MJ, Mönkkönen J, Thompson K. Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol*. (2009) 144:245–50. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07435.x
- Rossi C, Gravelle P, Decaup E, Bordenave J, Poupot M, Tosolini M, et al. Boosting $\gamma\delta$ T cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by PD-1 blockade in follicular lymphoma. *Oncimmunology*. (2019) 8:1554175. doi: 10.1080/2162402X.2018.1554175
- Girard P, Charles J, Cluzel C, Degeorges E, Manches O, Plumas J, et al. The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. *Oncimmunology*. (2019) 8:1601483. doi: 10.1080/2162402X.2019.1601483
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1999) 96:6879–84. doi: 10.1073/pnas.96.12.6879
- Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier J-F, Scotet E, et al. V γ 9V δ 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol*. (2005) 175:5481–8. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5481
- Fournié J-J, Sicard H, Poupot M, Bezombes C, Blanc A, Romagné F, et al. What lessons can be learned from $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol*. (2013) 10:35–41. doi: 10.1038/cmi.2012.39
- Casetti R, Perretta G, Taglioni A, Mattei M, Colizzi V, Dieli F, et al. Drug-induced expansion and differentiation of V γ 9V δ 2 T cells *in vivo*: the role of exogenous IL-2. *J Immunol*. (2005) 175:1593–8. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1593
- Sicard H, Ingoure S, Luciani B, Serraz C, Fournié J-J, Bonneville M, et al. *In vivo* immunomanipulation of V γ 9V δ 2 T cells with a synthetic phosphoantigen in a preclinical nonhuman primate model. *J Immunol*. (2005) 175:5471–80. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5471

13. Izumi H, Yamasaki A, Takeda K, Kodani M, Touge H, Tanaka N, et al. Acute-phase reaction induced by zoledronate and its effect on prognosis of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* (2018) 122:200–5. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.06.022
14. Kakimi K, Matsushita H, Murakawa T, Nakajima J. $\gamma\delta$ T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* (2014) 3:23–33. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.01
15. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* (2004) 10:2742–50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0149
16. Calvayrac O, Pradines A, Raymond-Letron I, Rouquette I, Bousquet E, Lauwers-Cances V, et al. RhoB determines tumor aggressiveness in a murine EGFR^{L858R}-induced adenocarcinoma model and is a potential prognostic biomarker for Lepidic lung cancer. *Clin Cancer Res.* (2014) 20:6541–50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0506
17. Calvayrac O, Mazières J, Figarol S, Marty-Detraves C, Raymond-Letron I, Bousquet E, et al. The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Mol Med.* (2017) 9:238–50. doi: 10.15252/emmm.201606646
18. Sebestyen Z, Scheper W, Vyborova A, Gu S, Rychnavska Z, Schiffler M, et al. RhoB mediates phosphoantigen recognition by $\gamma\gamma$ 9V δ 2 T cell receptor. *Cell Rep.* (2016) 15:1973–85. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.081
19. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné C-M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood.* (2012) 120:2269–79. doi: 10.1182/blood-2012-05-430470
20. Koraïchi F, Gence R, Bouchenot C, Grosjean S, Lajoie-Mazenc I, Favre G, et al. High-content tripartite split-GFP cell-based assays to screen for modulators of small GTPase activation. *J Cell Sci.* (2018) 131:jcs210419. doi: 10.1242/jcs.210419
21. Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics MCP.* (2008) 7:282–9. doi: 10.1074/mcp.M700342-MCP200
22. Cabantous S, Nguyen HB, Pedelacq J-D, Koraïchi F, Chaudhary A, Ganguly K, et al. A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci Rep.* (2013) 3:2854. doi: 10.1038/srep02854
23. Sharma A, Lawry SM, Klein BS, Wang X, Sherer NM, Zumwalde NA, et al. LFA-1 ligation by high-density ICAM-1 is sufficient to activate IFN- γ release by innate T lymphocytes. *J Immunol.* (2018) 201:2452–61. doi: 10.4049/jimmunol.1800537
24. Liu Z, Guo B, Lopez RD. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 or ICAM-2 is critical in determining sensitivity of pancreatic cancer cells to cytolysis by human gammadelta-T cells: implications in the design of gammadelta-T-cell-based immunotherapies for pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* (2009) 24:900–11. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05668.x
25. Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol.* (2000) 165:3375–83. doi: 10.4049/jimmunol.165.6.3375
26. Wherlock M, Gampel A, Futter C, Mellor H. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J Cell Sci.* (2004) 117:3221–31. doi: 10.1242/jcs.01193
27. Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, et al. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J.* (2006) 25:4108–19. doi: 10.1038/sj.emboj.7601286
28. Ocana-Morgner C, Wahren C, Jessberger R. SWAP-70 regulates RhoA/RhoB-dependent MHCII surface localization in dendritic cells. *Blood.* (2009) 113:1474–82. doi: 10.1182/blood-2008-04-152587
29. Liu S, Huang L, Lin Z, Hu Y, Chen R, Wang L, et al. RhoB induces the production of proinflammatory cytokines in TLR-triggered macrophages. *Mol Immunol.* (2017) 87:200–6. doi: 10.1016/j.molimm.2017.04.015
30. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells. *Science.* (2020) 367:eaay5516. doi: 10.1126/science.aay5516
31. Karunakaran MM, Willcox CR, Salim M, Paletta D, Fichtner AS, Noll A, et al. Butyrophilin-2A1 directly binds germline-encoded regions of the $\gamma\gamma$ 9V δ 2 TCR and is essential for phosphoantigen sensing. *Immunity.* (2020) 52:487–98.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2020.02.014
32. Gampel A, Parker PJ, Mellor H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol CB.* (1999) 9:955–8. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80422-9
33. Pérez-Sala D, Boya P, Ramos I, Herrera M, Stamatakis K. The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS ONE.* (2009) 4:e8117. doi: 10.1371/journal.pone.0008117

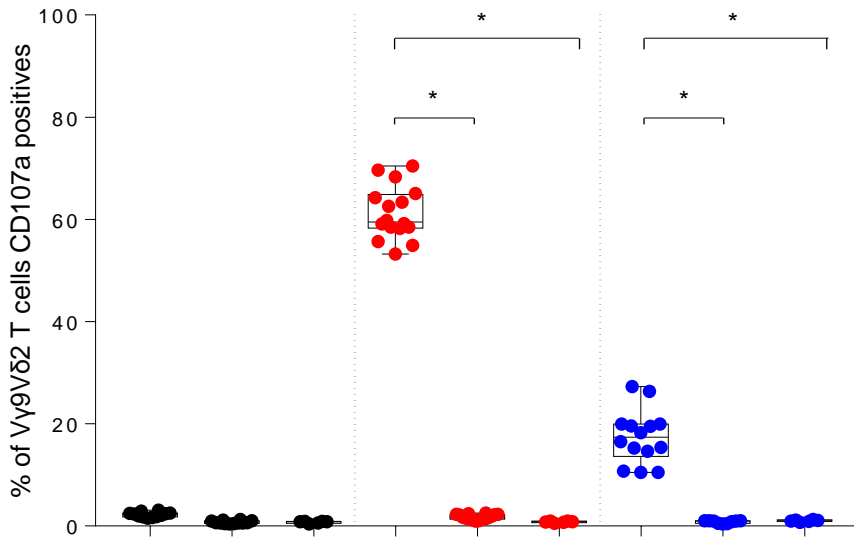
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Laplagne, Meddour, Figarol, Michelas, Calvayrac, Favre, Laurent, Fournié, Cabantous and Poupot. 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) and the copyright owner(s) 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.

Supplementary figure 1

A

Co-culture V γ 9V δ 2 T cells with A549

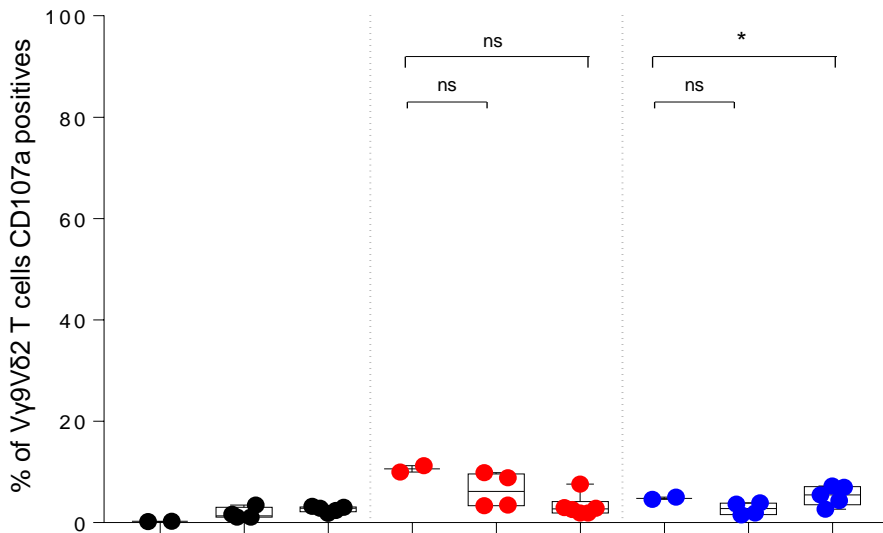


- Untreated A549 WT
- Zol-treated A549 WT
- BrHPP-treated A549 WT

CTL	+			+			+		
CM		+			+			+	
TW			+			+			+

B

Co-culture V γ 9V δ 2 T cells with PC9

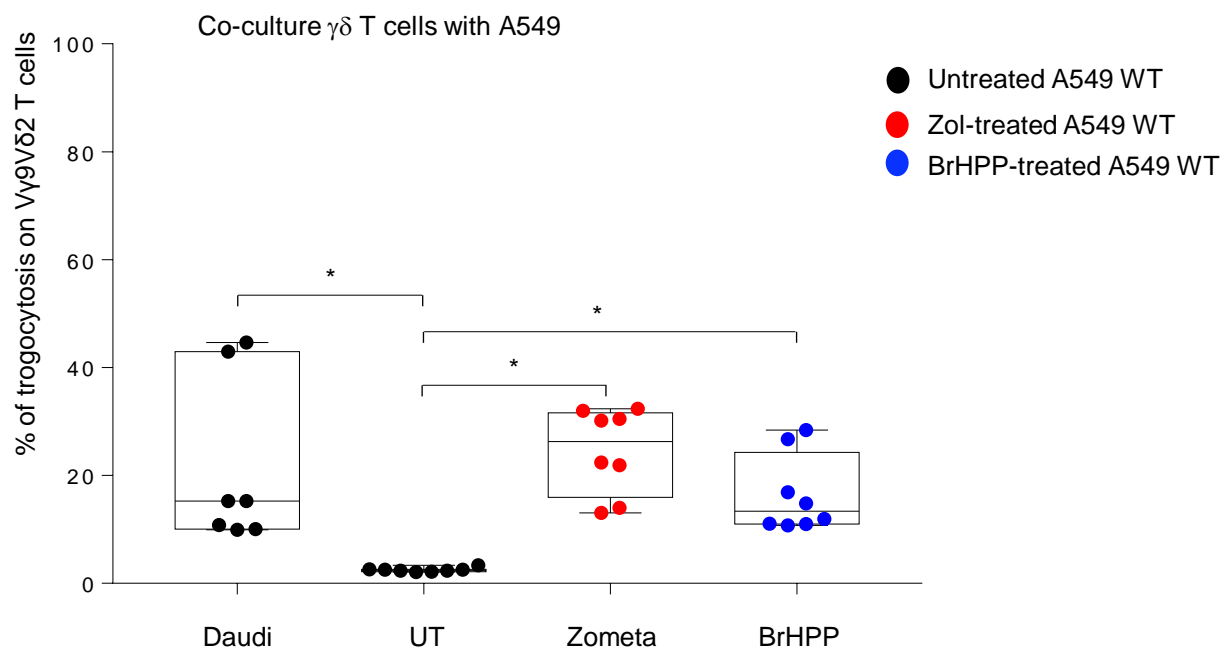


- Untreated PC9 WT
- Zol-treated PC9 WT
- BrHPP-treated PC9 WT

CTL	+			+			+		
CM		+			+			+	
TW			+			+			+

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

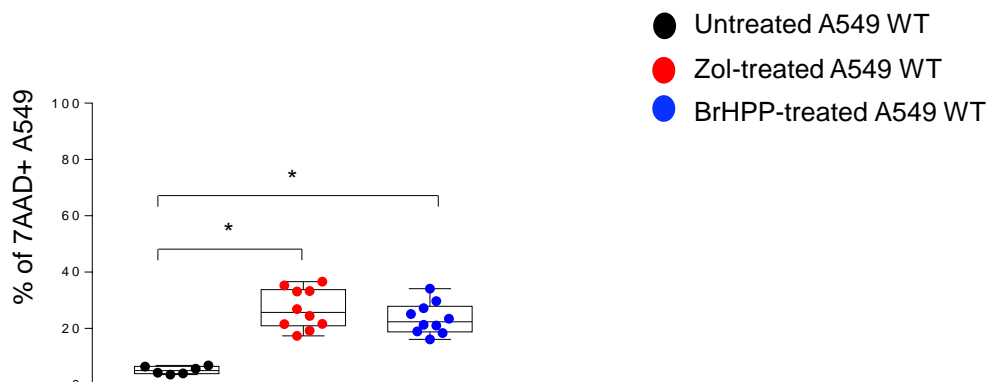
Supplementary figure 2



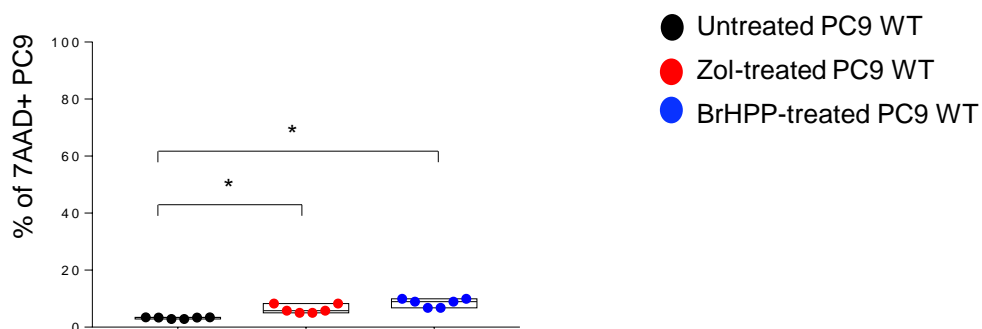
Percentage of V γ 9V δ 2 T cells expressing PKH67 (trogocytosis), analyzed by flow cytometry, after a co-culture with beforehand PKH67 stained Daudi or A549 pretreated or not (UT) by zoledronate (red dots) or BrHPP (blue dots) ($n > 4$ independent experiments).

Supplementary figure 3

A

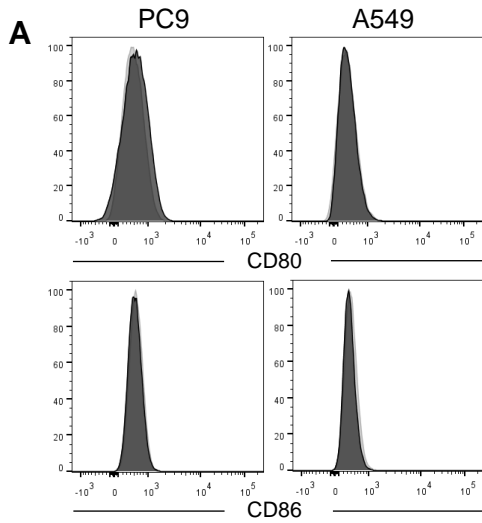


B

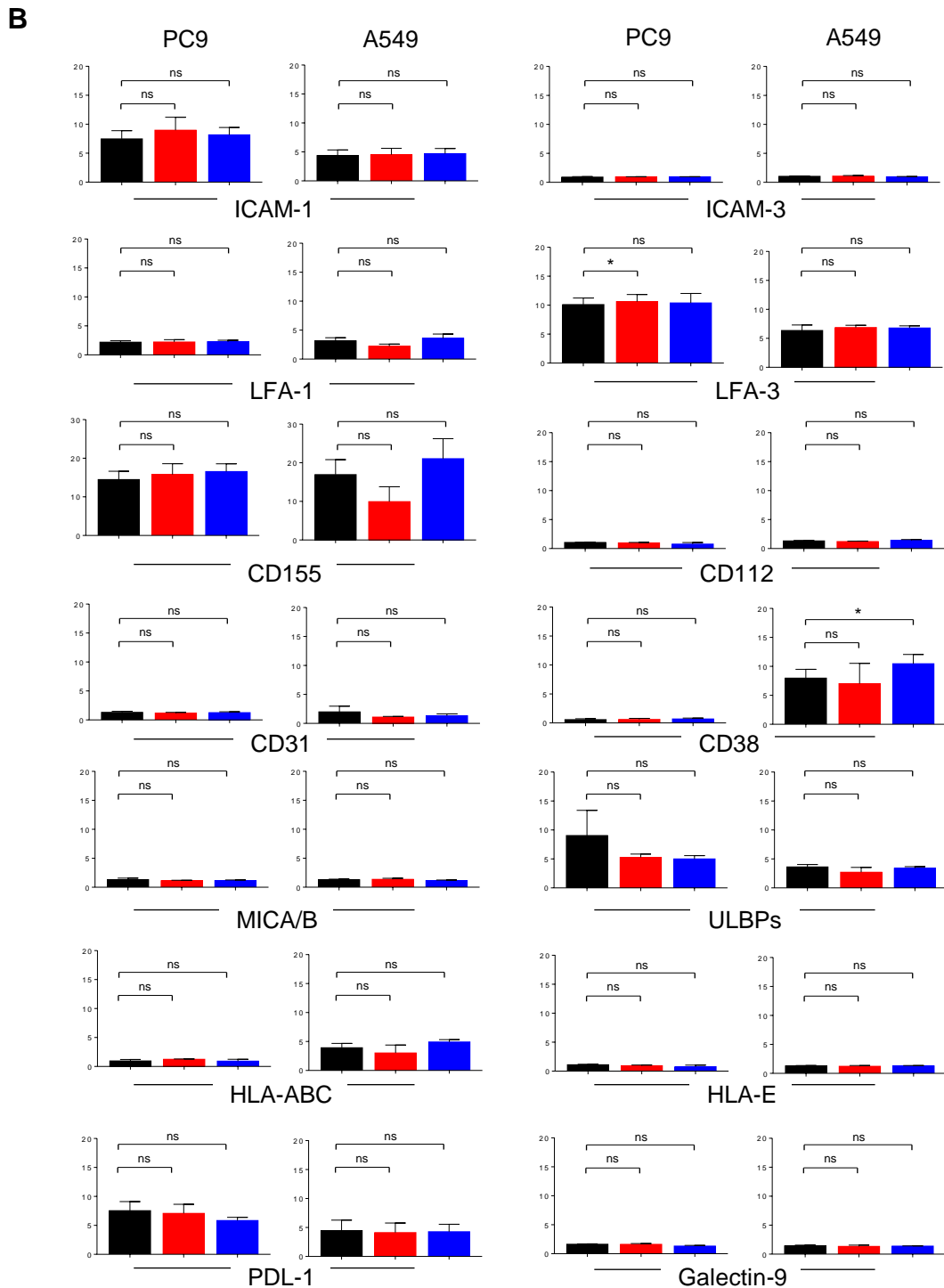
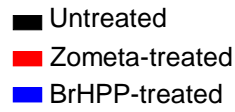


Percentage of A549 (A) or PC9 (B) pretreated or not (black dots) by zoledronate (red dots) or BrHPP (blue dots) expressing 7-AAD, after a co-culture with V γ 9V δ 2 T cells (flow cytometry analysis). (n > 4 independent experiments).

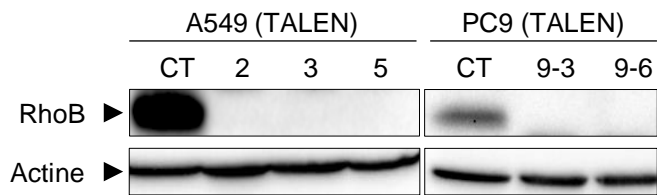
Supplementary figure 4



Surface molecule expression by A549 and PC9 untreated (black) or after treatment with zoledronate (red) or BrHPP (blue) analyzed by flow cytometry.

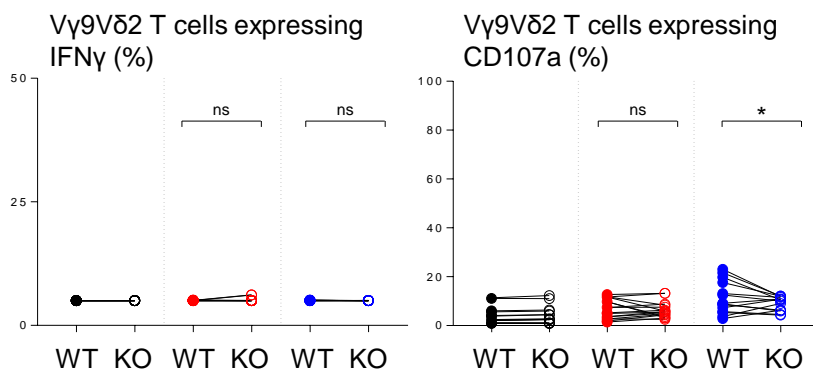


Supplementary figure 5



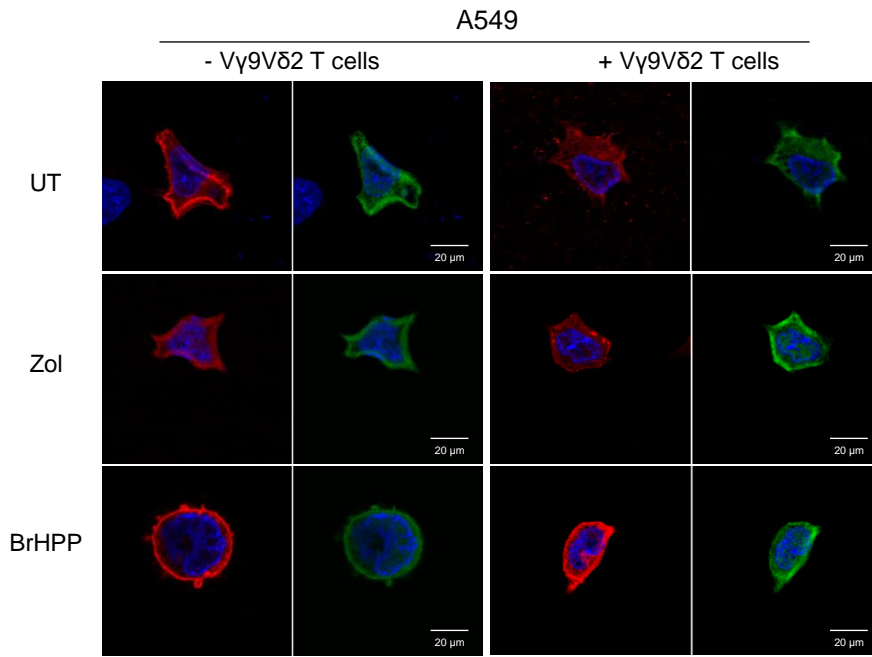
Western blot of A549 and PC9 wild type (CT) or KO for RHOB (2, 3, 5, 9-3, 9-6).

Supplementary figure 6



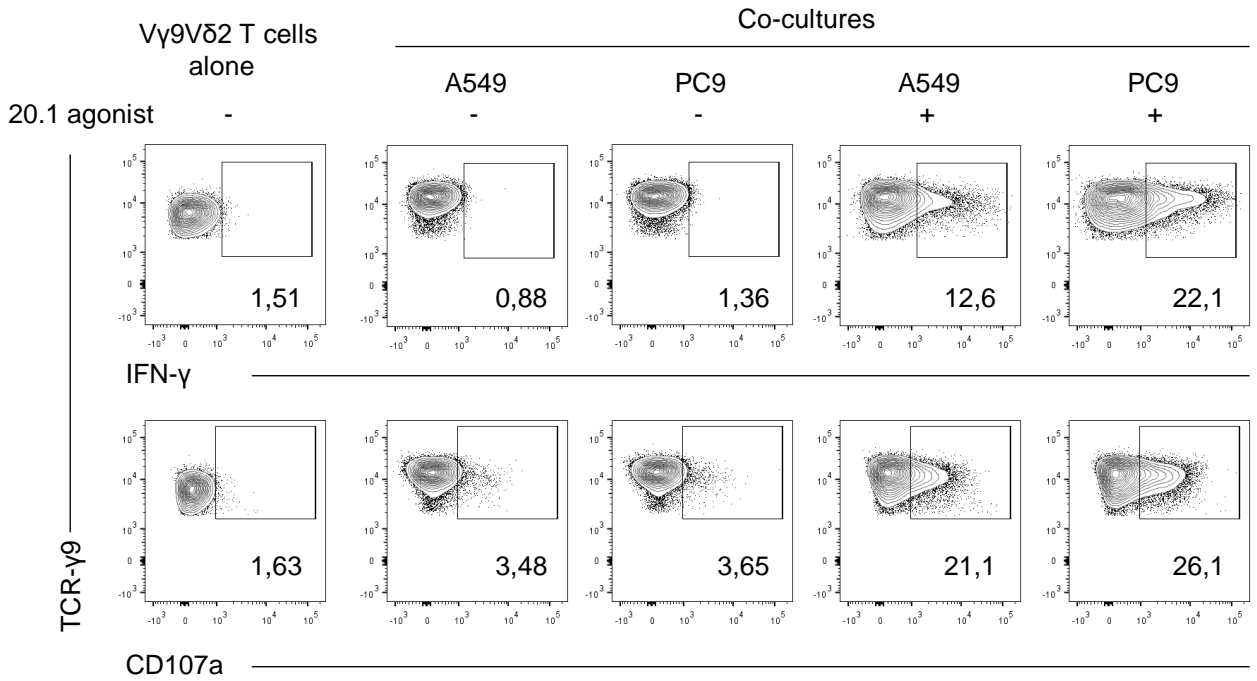
Flow cytometry analysis of the IFN γ and CD107a expression by V γ 9V δ 2 T cells in co-culture for 4h with PC9 wild type (WT) or knock down for RHOB (KO) with Zoledronate (red) or BrHPP (blue) pretreatment.

Supplementary figure 7



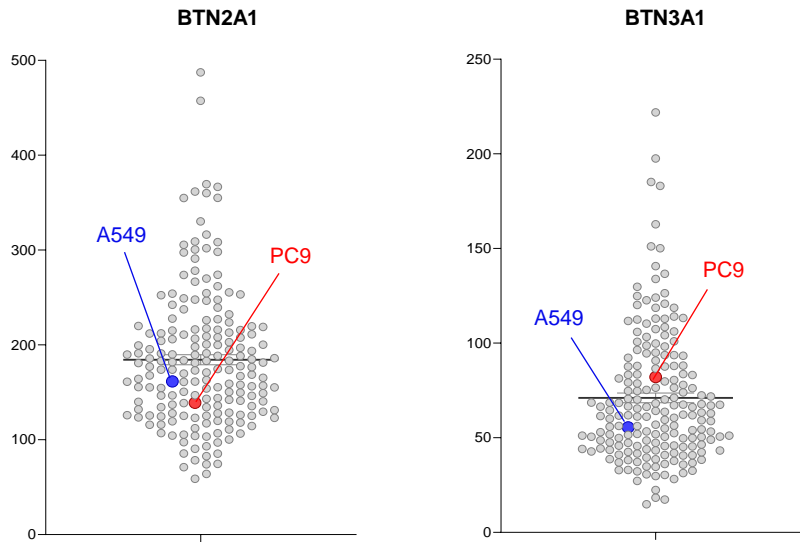
Confocal imaging of total (red) and active (green) RHOB localization in A549 pre-treated or not by zoledronate (5 μ M, overnight) or BrHPP (1 μ M, 4h), in presence or not of V γ 9V δ 2 T cells (one representative image).

Supplementary figure 8



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

Supplementary figure 9



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

I.IV. Résultats complémentaires

L'expression de la BTN2A1 dans les A549 et PC9 n'est pas modulée par les phosphoantigènes.

Le blocage d'ABCA-1 par le Probucol n'impacte pas l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les cibles tumorales A549 et PC9 traitées aux phosphoantigènes.

L'expression de la BTN2A1 dans les A549 et PC9 n'est pas modulée par les phosphoantigènes.

Suite aux récents travaux présentant le rôle de la BTN2A1 dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 détaillé dans la partie II.IV.C.1. de l'introduction ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ et aux différentes questions des reviewers pour la publication de notre article ²³⁸, nous avons voulu savoir si l'expression de la BTN2A1 était modulée à la surface des A549 et PC9 traitées aux PAg.

Méthodologie :

Pour cette expérience, nous avons traité les A549 et les PC9 parentales (sauvages) par le BrHPP (1 μ M, 4h) ou le zolédronate (5 μ M, *overnight*). L'expression membranaire de la BTN2A1 à la surface des cibles tumorales a été quantifiée après marquage avec un anticorps anti-BTN2A1 (polyclonal, Biorbyt) non couplé pendant 20 minutes à l'obscurité puis par un anticorps secondaire goat anti-rabbit FITC (Sigma-Aldrich). L'expression de la protéine BTN2A1 à la surface des cibles tumorales non traitées par les PAg est comparée à celle sur les cibles traitées au zoledronate ou au BrHPP.

Résultats :

Les résultats obtenus dans cette expérience sont présentés dans la Figure 23 ci-dessous.

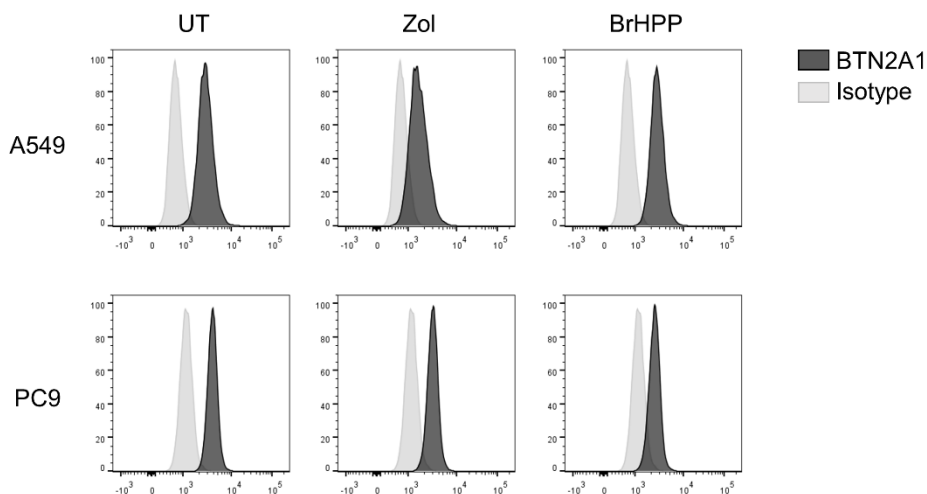


Figure 23 : L'expression de la BTN2A1 sur les A549 et PC9 WT n'est pas modulée suite au traitement par les phosphoantigènes. *Analyse de l'expression de la BTN2A1 à la surface des lignées A549 et PC9 non traitées (UT) ou traitées aux PAg solubles (BrHPP) ou endogènes (Zol : zolédronate pour induire les PAg endogènes) par cytométrie en flux.*

Ces résultats montrent que le niveau d'expression surfacique de la BTN2A1 est comparable entre les A549 et les PC9. De plus, le traitement des cibles tumorales par les PAgS ne modifie pas cette expression. Pour rappel, les données transcriptomiques des PC9 et A549 présentées dans la Figure Supplemental S9 de l'article montraient une expression de mARN de BTN2A1 similaire entre les deux types cellulaires ²³⁸. Ainsi, nous pouvons réfuter l'hypothèse que la faible activation des LT V γ 9V δ 2 par les PC9 traitées aux PAgS résultait d'une faible expression de la BTN2A1. Par conséquent, le défaut d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PC9 traitées aux PAgS n'est pas dû à une expression altérée de la BTN2A1. Au vue de nos résultats, cela semble être principalement lié à la localisation différentielle de la protéine RhoB dans les PC9 par rapport aux A549. Ces résultats confortent ainsi l'hypothèse d'une forte implication de RhoB, et notamment de par sa localisation, dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 analysée lors de notre étude.

Le blocage d'ABCA-1 par le Probucol n'impacte pas l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les cibles tumorales A549 et PC9 traitées aux phosphoantigènes.

D'après la publication de Castella et al. décrite dans l'introduction (partie II.IV.C.2.), le transporteur ABCA-1 est impliqué dans le relargage de l'IPP à l'extérieur de la DC traitée au zoledronate, en coopération avec apoA-1 et la BTN3A1¹⁶⁹. Ainsi, l'IPP relargé dans le surnageant suite à cette stimulation pourrait alors permettre l'activation des LT V γ 9V δ 2 par un mécanisme qui n'est pas encore totalement clarifié. Dans cette étude, un des moyens utilisé pour inhiber le transporteur ABCA-1 était le traitement par le Probucol à la concentration de 10 μ M.

Méthodologie :

Afin de voir si ce transporteur était impliqué dans le modèle de co-culture utilisé dans notre étude, nous avons testé l'effet du Probucol en suivant les mêmes conditions d'utilisation (10 μ M). Ainsi, nous avons réalisé une expérience de co-culture entre des LT V γ 9V δ 2 issus de trois lignées cellulaires primaires (PCL) et des A549 et PC9 parentales non traitées ou traitées au préalable *overnight* par le Probucol (10 μ M). Après 4h de co-culture (proportion 1 :1), nous avons quantifié l'activation des LT V γ 9V δ 2 grâce à l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69.

Résultats :

Les résultats, présentés dans la Figure 24, n'ont pas montré de modification significative de l'activation des LT V γ 9V δ 2 dans les A549 ni dans les PC9 traitées au Probucol.

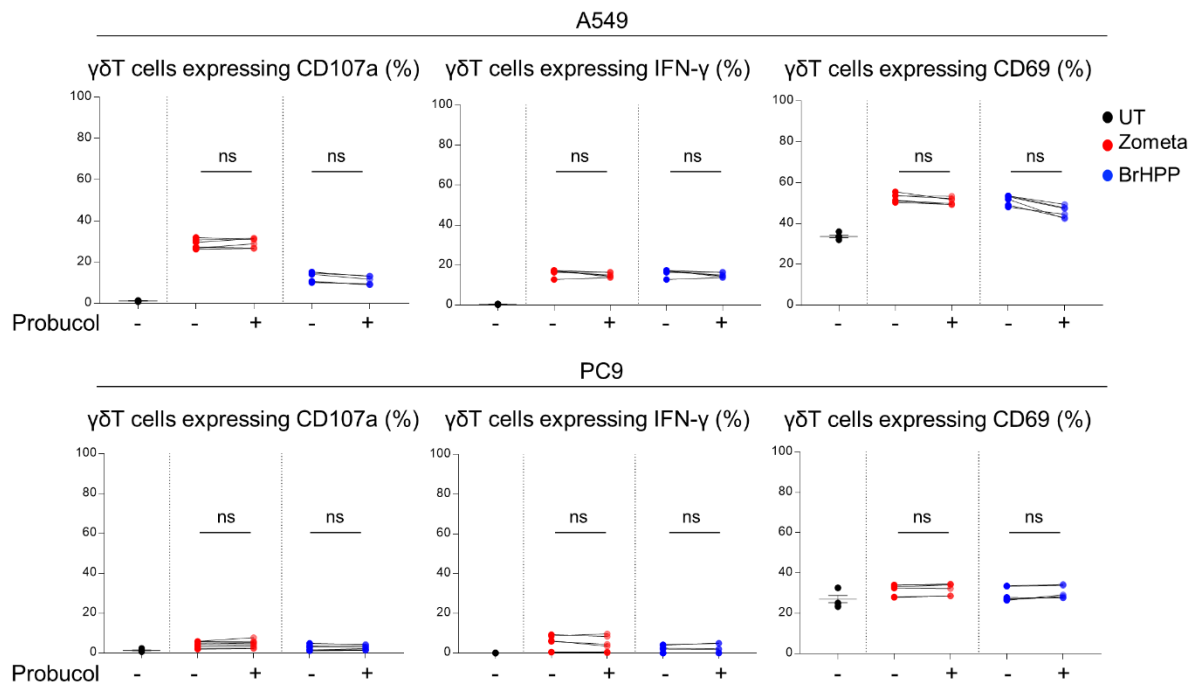


Figure 24 : Le blocage de l'ABCA-1 dans les A549 et PC9 n'impacte pas l'activation des LT V γ 9V δ 2. *Expérience de cytométrie en flux analysant l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69 par les LT V γ 9V δ 2 activés avec des cibles tumorales (A549 et PC9) prétraitées aux PAg (endogènes : rouge ou exogènes : bleu) +/- au Probucole.*

Dans cette expérience, nous avons cherché à inhiber le transporteur ABCA-1 dans notre modèle d'étude. Ces résultats ont montré que l'inhibition du transporteur ABCA-1 par le Probucole sur les cibles tumorales ne semble pas modifier leur capacité d'activation des LT V γ 9V δ 2. Dans l'étude qui a identifié le transporteur ABCA-1, les chercheurs ont montré qu'il régulait le transport de l'IPP dans le surageant des DC traitées au zolédronate sans pour autant regarder le niveau d'activation des LT V γ 9V δ 2 face aux DC ¹⁶⁹. Nos résultats pourraient suggérer que le transporteur ABCA-1 n'exporte pas le phosphoantigène exogène en dehors de la cible tumorale pour permettre l'activation du lymphocyte. Afin de valider cette conclusion, il serait toutefois nécessaire de bloquer le transporteur ABCA-1 par un autre moyen plus spécifique, comme par exemple en utilisant un siRNA ciblant ABCA-1.

I.V. Conclusion

A l'aide d'un modèle de co-culture des LT V γ 9V δ 2 par des lignées NSCLC traitées aux PAg, nous avons étudié dans cette première partie l'implication de la protéine RhoB dans le processus d'activation des lymphocytes. Nos résultats permettent de confirmer l'implication de la protéine RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg endogènes, et nouvellement par les PAg solubles, grâce à un modèle de cancer solide du poumon non à petites cellules (NSCLC)²³⁸.

Cette étude est appliquée de façon inédite à un type de cancer solide. Tout d'abord nous avons vu que la réactivité des LT V γ 9V δ 2 face à des lignées tumorales NSCLC pouvait être variable suivant la lignée utilisée puisque les A549 traitées aux PAg activent très fortement les LT V γ 9V δ 2 par rapport aux PC9. La résistance des LT V γ 9V δ 2 face aux PC9 ne peut pas être simplement expliquée par les mécanismes classiques d'immuno-échappement comme par exemple les modulations d'expression des ligands d'immune checkpoints et des molécules d'adhésion. De plus, nous avons montré une absence de modulation de l'expression des BTN2A1 et BTN3A1 à la surface des lignées NSCLC A549 et PC9 suite au traitement par les PAg. Par conséquent, ces résultats permettent d'exclure que les différences de profils d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les A549 et PC9 traitées par les PAg observées dans notre étude était en fait la conséquence d'une expression altérée des BTN à la surface des lignées PC9 non activatrices des LT V γ 9V δ 2. Enfin, nous avons montré que le blocage du transporteur ABCA-1 par le Probucof ne semble pas modifier l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les cibles tumorales traitées aux PAg. Ces résultats sont cohérents avec nos précédentes observations qui montraient que les LT V γ 9V δ 2 n'étaient pas activés par le relargage de PAg par les lignées tumorales prétraitées aux PAg. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse que le PAg ne sort pas de la cellule tumorale pour activer le LT V γ 9V δ 2 directement.

Nous avons ainsi montré que RhoB était un acteur clé dans le processus d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les lignées NSCLC traitées par des PAg. La localisation de la protéine RhoB dans la cible tumorale lors de sa rencontre avec le LT V γ 9V δ 2 est primordiale pour permettre d'exercer son action dans la modification de la conformation extracellulaire des BTN3A. En effet, dans la lignée NSCLC PC9, qui n'active pas les LT V γ 9V δ 2 malgré le traitement par des PAg, RhoB a une localisation particulièrement endosomale, notamment au niveau des MVB, rendant la protéine peu accessible pour effectuer son rôle de modification de la conformation de la BTN3A1 afin de permettre l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg. Ainsi, la localisation de RhoB dans la cellule est à l'origine d'une activation

différentielle des LT V γ 9V δ 2 face aux cibles traitées par les PAgS. De plus, la capacité de la cellule cible à utiliser les pools de stockage intracellulaires de la BTN3A pourrait être finement liée à sa capacité à activer RhoB. Par conséquent, la protéine RhoB se situe à la fin du processus, au niveau de la membrane et induit des changements dans la mobilité membranaire et la conformation de la BTN3A. Ainsi, la protéine RhoB est grandement impliquée dans le processus d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS.

En parallèle de ces travaux, j'ai étudié au cours de ma thèse la capacité originale des LT V γ 9V δ 2 à s'activer par les PAgS en l'absence de cellule cible. Les résultats obtenus dans ce projet sont présentés dans la partie suivante de mon manuscrit.

Résultats – Partie II

L'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes solubles indépendante des cellules cibles ne requiert pas de contact cellulaire et dépend des butyrophilines et du TCR.

II.I. Contexte et objectifs du projet

Outre l'activation classique d'un LT V γ 9V δ 2 avec une cible infectieuse ou tumorale traitée par un PAg, ces lymphocytes ont la capacité originale de s'activer directement par le PAg en l'absence de toute cellule cible ou accessoire.

En effet, il y a une quinzaine d'années, des équipes ont proposé des modèles d'activation directe des LT V γ 9V δ 2 par les PAg solubles en l'absence de cellule cible ^{128,130,152,167,292}. Par exemple, Lang et ses collaborateurs ont montré une activation directe et quasi immédiate des clones V γ 9V δ 2 G115 par les antigènes non peptidiques phosphorylés d'origine mycobactérienne (TUBags) ¹⁵². En effet, les chercheurs ont détecté une production de TNF- α déjà significative 20 minutes après ajout des TUBags. De plus, la lyse fratricide des clones V γ 9V δ 2 G115 marqués au ⁵¹Cr en l'absence de cellule cible était détectable 6 minutes après ajout des TUBags, avec un plateau entre 60 et 90 minutes. Enfin, ils ont démontré que l'activation de la machinerie lytique des LT V γ 9V δ 2 par les TUBags est dépendante du TCR $\gamma\delta$ et nécessite un contact entre les effecteurs. Pourtant, d'autres équipes ont écarté l'hypothèse d'une activation directe du TCR V γ 9V δ 2 notamment à cause de la petite taille des PAg ¹⁶⁷.

Cependant, au vue de la rapidité du phénomène d'activation et du temps de mise en place des systèmes de détection (readouts), le modèle d'activation exact des LT V γ 9V δ 2 par les PAg en l'absence de cellule cible reste partiellement inconnu. Ainsi, dans le cadre de mes travaux de thèse doctorale, nous avons souhaité étudier plus en détail ce phénomène d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg en l'absence de cellule cible. Les résultats présentés dans cette partie font l'objet d'une publication en cours d'écriture.

Dans cette étude, nous montrons que les LT V γ 9V δ 2 peuvent s'activer directement par les PAg solubles en l'absence de cellule cible et sans contact cellulaire. Comme pour l'activation classique des LT V γ 9V δ 2 avec une cible traitée aux PAg, cette auto-activation sur cellule isolée est dépendante du TCR $\gamma\delta$, de la BTN2A1 et de la BTN3A1. De plus, nous avons montré que le transporteur ABCA-1 était également impliqué dans l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg solubles en l'absence de cellule cible. Enfin, nous avons montré qu'il existe une proximité préexistante entre le TCR $\gamma\delta$ et la BTN3A1 à la surface du LT V γ 9V δ 2 isolé, même en l'absence de PAg. De plus, nous avons montré une augmentation progressive de l'expression de la BTN3A1 à la surface du LT V γ 9V δ 2 au cours de son auto-activation par le BrHPP.

II.II. Résultats

Les LT V γ 9V δ 2 activés par le PAg ne présentent pas l'antigène aux autres LT V γ 9V δ 2 naïfs de la culture autologue.

Le but de notre étude était de déterminer comment les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés pouvaient s'activer par les PAg solubles comme le BrHPP en l'absence de cellule accessoire. Nous avons vu précédemment que de façon conventionnelle, les cellules cibles comme les cellules tumorales activent les LT V γ 9V δ 2 via leurs BTNn après stimulation par les PAg endogènes. De plus, il est connu que les LT V γ 9V δ 2 naïfs et activés peuvent réaliser de l'AICD par crosslinking de leur TCR²⁹³. Cependant, le dialogue entre les LT V γ 9V δ 2 après stimulation par les PAg en l'absence de cellule accessoire reste très peu connu. Ainsi, nous avons tout d'abord voulu savoir si les LT V γ 9V δ 2 étaient également capables de réaliser de la lyse (fratricide ou suicide) suite à la stimulation par le PAg en l'absence de cellule accessoire. En d'autres termes, nous avons regardé si la mort des LT V γ 9V δ 2 requiert l'activation par le PAg ou si le prétraitement du partenaire homologue par le PAg est suffisant.

Méthodologie :

Tout d'abord, nous avons séparé artificiellement les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés naïfs d'un même donneur en deux groupes : le groupe « cellules cibles » et le groupe « effecteurs ». Les cellules cibles sont marquées avec un marqueur lipidique membranaire PKH-67 (Sigma-Aldrich) suivant les instructions du fabricant. Les effecteurs sont marqués avec un marqueur cytoplasmique orange CMTMR (Molecular Probes). Puis, les cellules des deux groupes sont stimulées ou non par le BrHPP pendant 4 heures. Dans cette expérience, nous avons utilisé la lignée Daudi marquée au PKH-67 comme cible contrôle. Après la co-culture, nous avons quantifié l'activation des LT V γ 9V δ 2 grâce à l'expression du CD107a ; la trogocytose via le pourcentage d'expression du PKH-67 à la membrane des LT V γ 9V δ 2 « effecteurs » ; et la lyse cellulaire dans la culture autologue via l'expression du 7-AAD et du DAPI.

Résultats :

Les résultats obtenus dans cette expérience sont présentés dans la Figure 25 ci-contre.

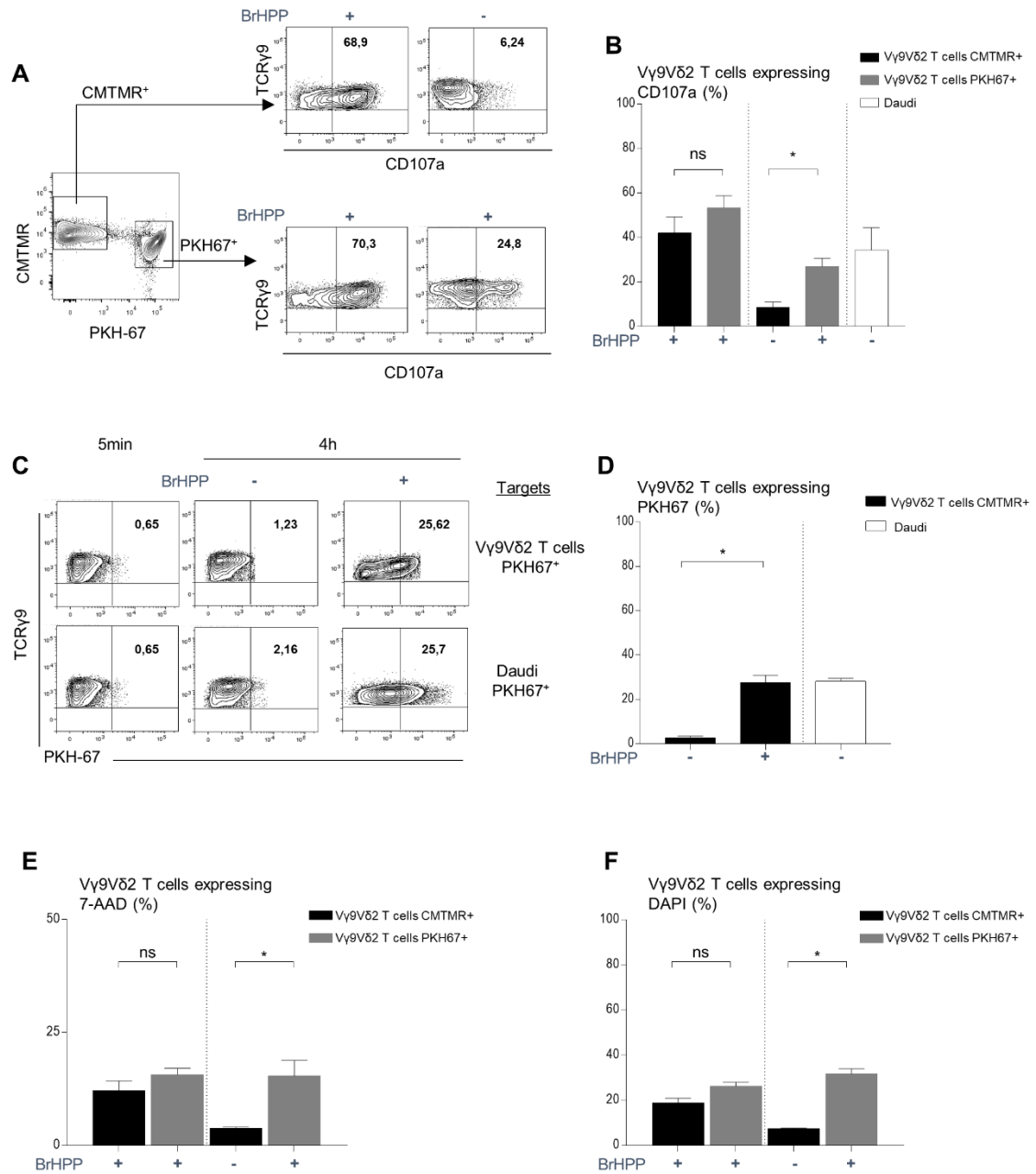


Figure 25 : La lyse autologue des LT Vγ9Vδ2 purifiés nécessite l'activation des lymphocytes par les PAg. Analyse de l'expression du CD107a (**A**, **B**), du PKH-67 (**C**, **D**) et de la mortalité (**E** : 7-AAD, **F** : DAPI) par des LT Vγ9Vδ2 en co-culture autologue en présence ou non de BrHPP.

Dans cette Figure, nous pouvons voir que les LT Vγ9Vδ2 expriment le CD107a après 4h de co-culture uniquement si les deux groupes ont été prétraités par le BrHPP (Figure **25A**, expérience représentative et **25B**, regroupement de 12 expériences indépendantes). En effet, les LT Vγ9Vδ2 « effecteurs » (CMTMR⁺) non prétraitées au BrHPP n'expriment pas de CD107a après 4h de co-culture avec les LT Vγ9Vδ2 « cibles » (PKH-67⁺) prétraités au BrHPP. En parallèle, nous avons contrôlé que les LT Vγ9Vδ2 « effecteurs » exprimaient bien

le CD107a lorsqu'elles étaient en co-culture avec la lignée Daudi, lignée connue pour exprimer naturellement les PAgS endogènes¹⁵³ (Figure **25B**).

Le CD107a est exprimé suite à l'établissement d'une synapse immunologique (SI) au cours de laquelle des morceaux de membranes sont échangés entre les deux partenaires, phénomène appelé trogocytose. L'acquisition de la fluorescence du PKH-67 par les LT V γ 9V δ 2 « effecteurs » (CMTMR⁺) après 4h de contact reflète ainsi l'existence d'une SI stable, essentielle pour l'activation du lymphocyte. Si les deux partenaires sont stimulés par le BrHPP, le groupe des LT V γ 9V δ 2 « effecteurs » acquiert une fluorescence PKH-67⁺. Cependant, si ce groupe n'est pas prétraité par le BrHPP, il n'acquiert pas de fluorescence PKH-67⁺ après co-culture avec le groupe des LT V γ 9V δ 2 « cibles » (Figure **25C**, expérience représentative et **25D**, regroupement de 7 expériences indépendantes). En revanche, le groupe « effecteurs » non prétraité par le BrHPP émettra une fluorescence PKH-67⁺ après 4h de co-culture avec les Daudi PKH-67⁺.

Afin de savoir si les LT V γ 9V δ 2 étaient lysés après la trogocytose, nous avons quantifié l'expression du 7-AAD et du DAPI dans le groupe « effecteurs » (LT V γ 9V δ 2 CMTMR⁺) et « cibles » (LT V γ 9V δ 2 PKH-67⁺). Lorsque les deux partenaires sont pré-activés par le BrHPP, les deux groupes de LT V γ 9V δ 2 expriment du 7-AAD et du DAPI (Figure **25E**, pour le 7-AAD et **25F** pour le DAPI). En revanche, nous détectons une très faible expression de 7-AAD et DAPI dans le groupe des LT V γ 9V δ 2 « effecteurs » lorsqu'on prétraite uniquement le groupe des LT V γ 9V δ 2 « cibles ».

Ainsi, nous pouvons dire que les LT V γ 9V δ 2 doivent être activés par le PAg avant de lyser des LT V γ 9V δ 2 autologues.

Modulation pharmacologique de la trogocytose des LT V γ 9V δ 2 en PCL.

Afin de confirmer cette observation dans des expériences complémentaires et valider qu'il s'agit bien de trogocytose, nous avons utilisé des modulateurs pharmacologiques présentant des mécanismes d'action divers et impactant la trogocytose. En effet, la trogocytose est un phénomène actif d'échange de morceaux de membranes qui dépend de la structure de la membrane, du cytosquelette ou encore de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Par conséquent, les drogues ciblant ces différents éléments auront un impact sur la trogocytose.

Méthodologie :

Dans cette expérience, nous avons utilisé différentes drogues testées dans une précédente publication et ayant démontré un impact sur la trogocytose²⁹⁴. Tout d'abord, nous avons utilisé un inhibiteur de Src appelé SU6656 (1 μ M) ; ainsi que deux inhibiteurs de la PI3K, le Ly-294002 (1 μ M) et la Wortmannin (1 μ M) qui ciblent la transduction des modules nécessaires pour l'adhésion cellulaire. L'inhibition des kinases Src conduit à une augmentation de la trogocytose tandis que l'inhibition de la PI3K diminue la trogocytose. De plus, nous avons utilisé deux inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, la Cytochalasin D (10 μ M) et la Latrunculin B (25 μ M), qui ont montré une action inhibitrice sur la trogocytose. Enfin, nous avons utilisé le Taxol (1 μ M) qui est un inhibiteur de la polymérisation des microtubules et module la trogocytose.

Les LT V γ 9V δ 2 issus de PCL ont été séparés en deux groupes : les cellules « vertes » préalablement marquées au PKH-67 et celles non marquées (non vertes). Les LT V γ 9V δ 2 « verts » ont ensuite été traités pendant 2h par ces drogues à la concentration précisée ci-dessus ou laissées non traitées. Après un rinçage, les LT V γ 9V δ 2 « verts » et « non verts » ont été mélangés en quantité égale (1 :1) en présence de BrHPP (200nM ou 1 μ M) dans le milieu de culture pendant 4h. L'expression du marqueur PKH-67 (fluorescence verte) à la surface des LT V γ 9V δ 2 « non verts » a été détectée en cytométrie en flux (LSRII) et analysé sur FlowJo[®] et Prism[®].

Résultats :

Les résultats obtenus dans cette expérience sont présentés dans la Figure 26 ci-dessous. Ces résultats sont issus d'une expérience réalisée en triplicat et incluant 3 donneurs différents.

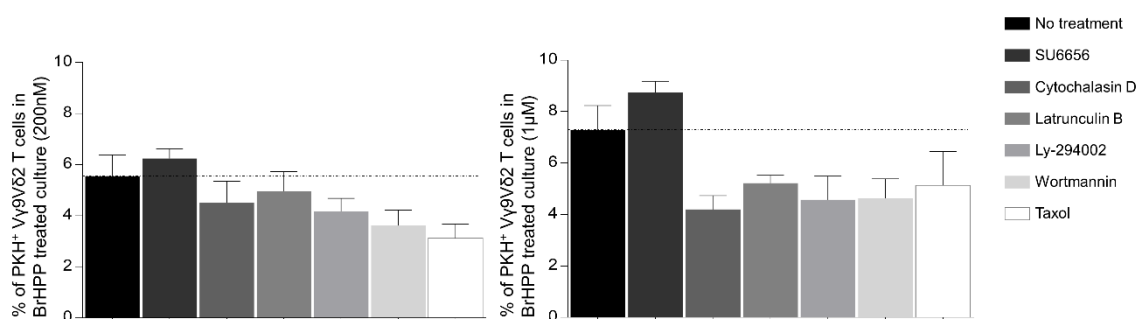


Figure 26: Modulation pharmacologique de la trogocytose des LT V γ 9V δ 2 en PCL. Analyse de l'expression du PKH-67 à la surface des LT V γ 9V δ 2 pré-traités par différents modulateurs de la trogocytose en co-culture autologue en présence de BRHPP.

La trogocytose entre LT V γ 9V δ 2 est légèrement augmentée après le prétraitement par SU6656 en comparaison à la condition non traitée. Les autres drogues utilisées ici entraînent une diminution du pourcentage d'expression du PKH-67 à la surface des cellules non vertes, quel que soit la drogue et la concentration de BrHPP testée. Ces résultats sont intéressants puisqu'ils permettent de confirmer que nous avons effectivement observé de la trogocytose dans la Figure précédente. Ainsi, nous pouvons affirmer que les LT V γ 9V δ 2 sont capables de réaliser de la trogocytose entre eux après activation par le BrHPP. Cependant, un LT V γ 9V δ 2 ne peut pas activer un autre LT V γ 9V δ 2 par contact si ce dernier n'a pas été lui-même activé par le BrHPP. Ainsi, lorsque deux LT V γ 9V δ 2 ont été prétraités par le BrHPP, un contact s'établit entre eux et une synapse immunologique se met en place avec échange de matériel membranaire. Ces résultats montrent que l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS solubles précède le contact et la synapse immunologique.

L'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS solubles ne requiert pas de contact cellulaire.

Suite aux résultats précédents, nous pouvons nous demander comment un LT V γ 9V δ 2 purifié peut être activé par les PAgS solubles en l'absence de cellule cible, et sans contact cellulaire.

Tout d'abord, nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux présentées dans la Figure 27 afin d'étudier l'activation des LT V γ 9V δ 2 par l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69.

Dans cette Figure, nous pouvons confirmer que les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés sont capables de s'activer par les PAgS solubles (BrHPP, cHDMAPP ou IPP) en l'absence de cellule cible ou accessoire (Figure **27A**, expérience représentative et Figure **27B**, regroupement de 6 expériences indépendantes). En effet, dans les conditions où les LT V γ 9V δ 2 sont traités par les PAgS solubles pendant 4h (BrHPP 200nM, cHDMAPP 2nM et IPP 15 μ M) ou par les billes CD3/CD28, nous détectons une expression de CD107a, d'IFN- γ et de CD69 par les LT V γ 9V δ 2.

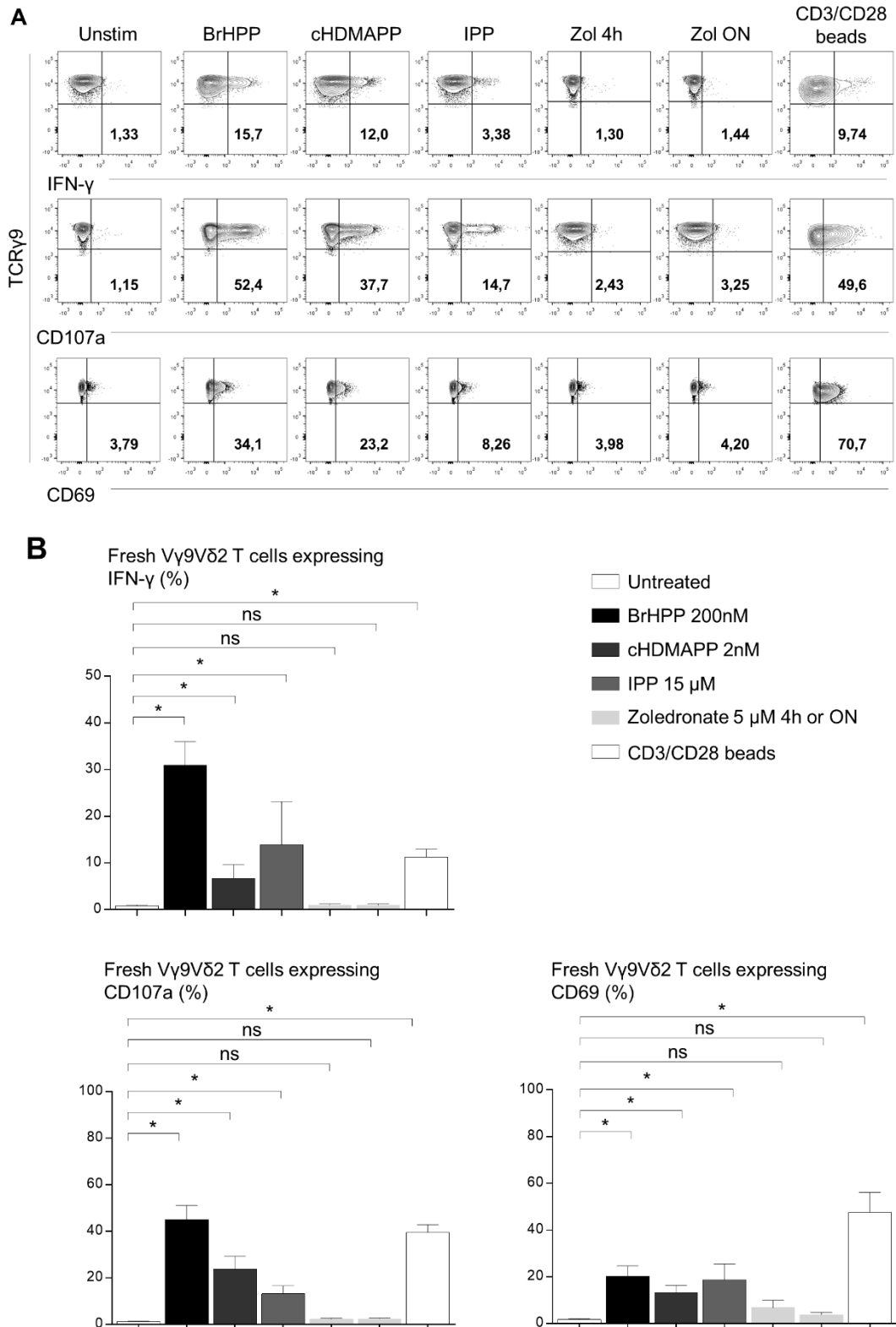


Figure 27 : Les LT V γ 9V δ 2 s'activent par les PAgS solubles en l'absence de cellule cible. Analyse de l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69 par les LT V γ 9V δ 2 autologues en présence de PAgS solubles (BrHPP, cHDMAPP et IPP), de zolédronate ou des billes CD3/CD28.

Résultats – Partie II

De façon intéressante, les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés ne sont pas activés par le zolédronate (5 μ M pendant 4 heures ou *overnight*), alors qu'ils peuvent être amplifiés à partir de PBMCs en présence d'IL-2 et de zolédronate (1 μ M), de la même manière qu'avec le BrHPP (3 μ M) (Figure 28A et 28B).

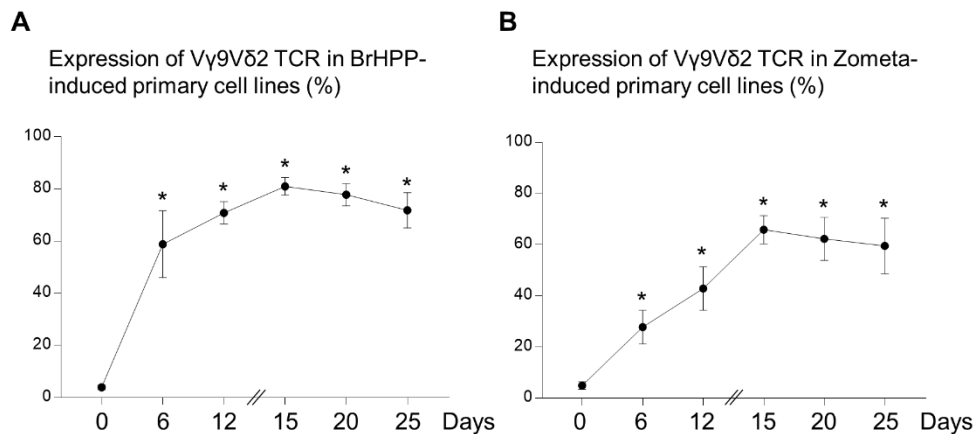


Figure 28 : Induction de lignée primaire de LT V γ 9V δ 2 par le zolédronate et comparaison avec le BrHPP. Analyse de l'expression du TCR V γ 9V δ 2 lors de l'induction d'une PCL de LT V γ 9V δ 2 par du BrHPP (A) ou du zolédronate (B).

Par la suite, nous avons souhaité savoir si un contact cellulaire autologue était nécessaire lors de l'activation d'un LT V γ 9V δ 2 purifié par les PAgS solubles en l'absence de cellule cible.

Méthodologie :

Pour ce faire, nous avons monitoré le flux calcique d'un LT V γ 9V δ 2 isolé par vidéo-microscopie au cours de son activation par des PAgS solubles (BrHPP 200nM, IPP 15 μ M et cHDMAPP 2nM), ou par de la Ionomycine (1 μ g/mL) comme contrôle positif. Après purification des LT V γ 9V δ 2 à partir de PBMCs de donneurs sains, les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 37°C avec 2 μ g de sonde calcique marquée au GFP (Fluo-8 AM, Abcam). Puis, les cellules sont lavées, resuspendues dans du milieu HBSS FCS 1% et déposées sur le support (lames μ slides Angiogenesis, Ibidi) préalablement traité à la poly-D-lysine (10 μ g/mL, 5 minutes à 37°C, Sigma-Aldrich). L'ensemencement s'effectue à très faible densité afin d'éviter les contacts cellulaires. Les séquences sont acquises sur un microscope confocal Zeiss LSM780 ou 880 FAST Airyscan.

Résultats :

Les résultats obtenus dans cette expérience sont présentés dans la Figure 29. Afin de détecter le flux calcique caractérisé par la fluorescence GFP, l'activateur (BrHPP, IPP, cHDMAPP ou Ionomycine) est ajouté avec précaution dans le puits directement sous le microscope après mise en route de la vidéo afin de suivre la même cellule au cours du temps (Figure **29A**).

Tout d'abord, nous pouvons voir que la stimulation d'un LT V γ 9V δ 2 isolé par la Ionomycine (1 μ g/mL) ajoutée après 30 secondes de vidéo entraîne une augmentation rapide de la fluorescence GFP suivie par une stabilisation (Figure **29B**). Les profils de GFP obtenus après stimulation d'un LT V γ 9V δ 2 isolé par les PAgS solubles (BrHPP 200nM, IPP 15 μ M ou cHDMAPP 2nM) ajoutés après 2 minutes de vidéo sont différents et présentent une succession de pics de flux calciques (Figure **29C** pour le BrHPP, **29D** pour l'IPP et **29E** pour le cHDMAPP). Ces profils ont été reproduits sur plusieurs LT V γ 9V δ 2 isolés, à partir de différentes expériences indépendantes issus de différents donneurs sains (Figure **29F** regroupement de 6 expériences indépendantes). Cette quantification représente la différence quantitative entre les valeurs maximales et minimales (écart-type de 5%) des intensités de GFP émise par une cellule isolée pour chaque condition.

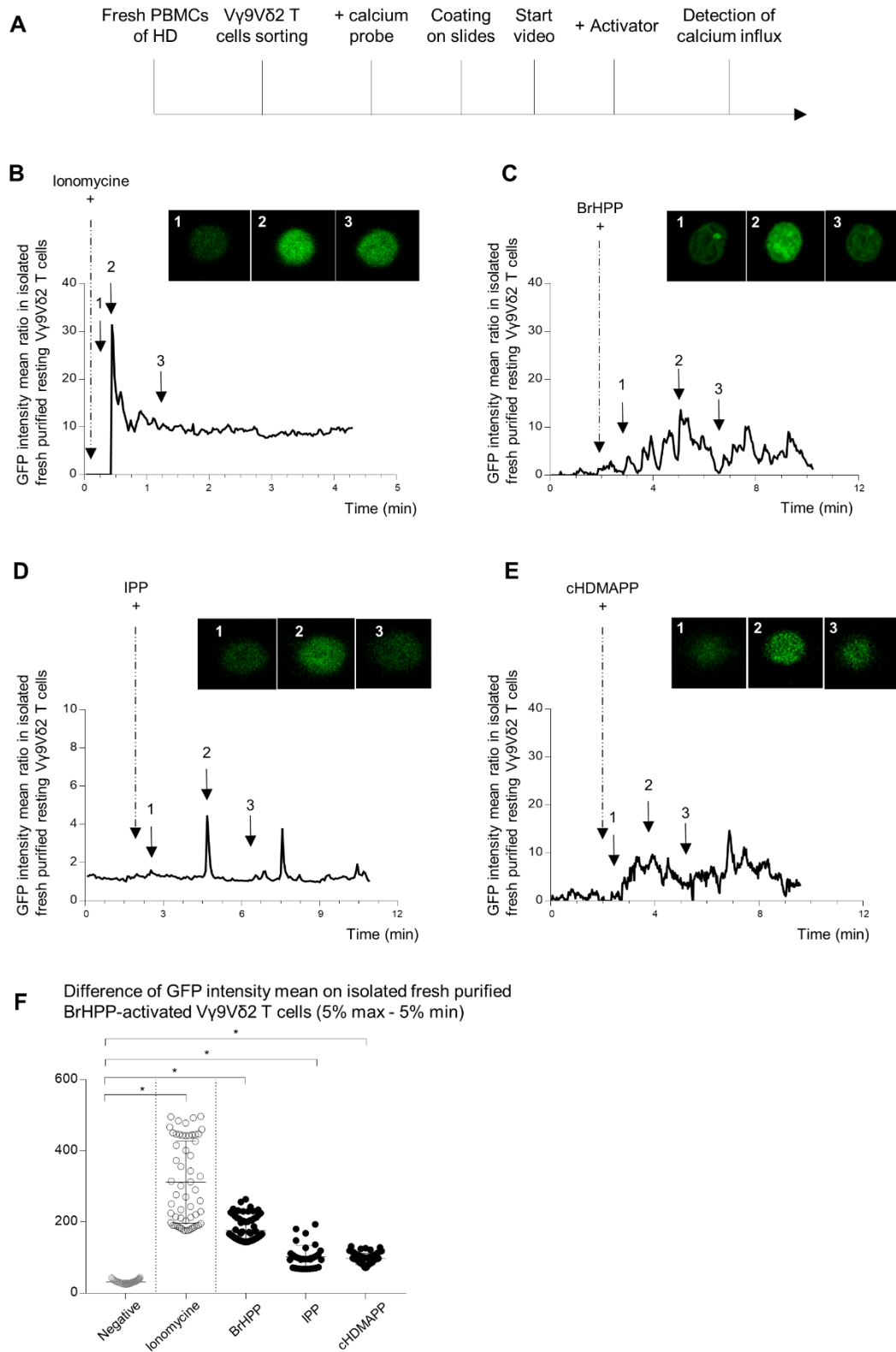


Figure 29 : L'activation des LT Vγ9Vδ2 par les PAgS solubles ne requiert pas de contact cellulaire. Suivi du flux calcique des LT Vγ9Vδ2 frais purifiés isolés et activés par la Ionomycine (**B**) ou des PAgS solubles (**C** : BrHPP, **D** : IPP et **E** : cHDMAPP) (profils : **B-E**, quantification : **F**).

Ces différents résultats montrent que les LT V γ 9V δ 2 peuvent s'auto-activer par les PAgS solubles sans aucun contact cellulaire.

L'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP dépend du TCR $\gamma\delta$ et des BTN.

Pour aller plus loin, nous avons voulu savoir si l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS solubles implique les mêmes acteurs que ceux identifiés pour leur activation classique par contact avec une cellule tumorale traitée aux PAgS. Ainsi, nous avons étudié le rôle du TCR $\gamma\delta$, de la BTN2A1 et de la BTN3A1 dans le modèle d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS solubles.

Méthodologie :

Pour ce faire, nous avons tout d'abord quantifié l'expression en cytométrie en flux de la BTN3A1 avec l'anticorps anti-BTN3A1 (clone 223-5, BD Biosciences) et de la BTN2A1 avec l'anti-BTN2A1 (Biorbyt) sur les LT V γ 9V δ 2 en PCL. Puis, nous avons utilisé l'anticorps activateur des BTN3A (1h, 10 μ g/mL, clone 20.1, ImCheck Therapeutics, Marseille) directement sur les LT V γ 9V δ 2 en PCL.

Par ailleurs, nous avons prétraité les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés par différents anticorps bloquants : un anticorps bloquant le TCR $\gamma\delta$ (1h, 0.5mg/mL, clone B1, Biolegend), un anticorps bloquant la BTN2A1 (1h, 10 μ g/mL, ICT03-1005, ImCheck Therapeutics) ou la BTN3A1 (1h, 10 μ g/mL, clone 103.2, ImCheck Therapeutics). Puis, les LT V γ 9V δ 2 sont rincés deux fois au PBS 1X puis activés par le BrHPP (200nM) ou les billes CD3/CD28 pendant 4h. L'activation des LT V γ 9V δ 2 est quantifiée par l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69 ; et par le monitoring du flux calcique suivant le mode opératoire décrit précédemment.

Résultats :

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la Figure 30.

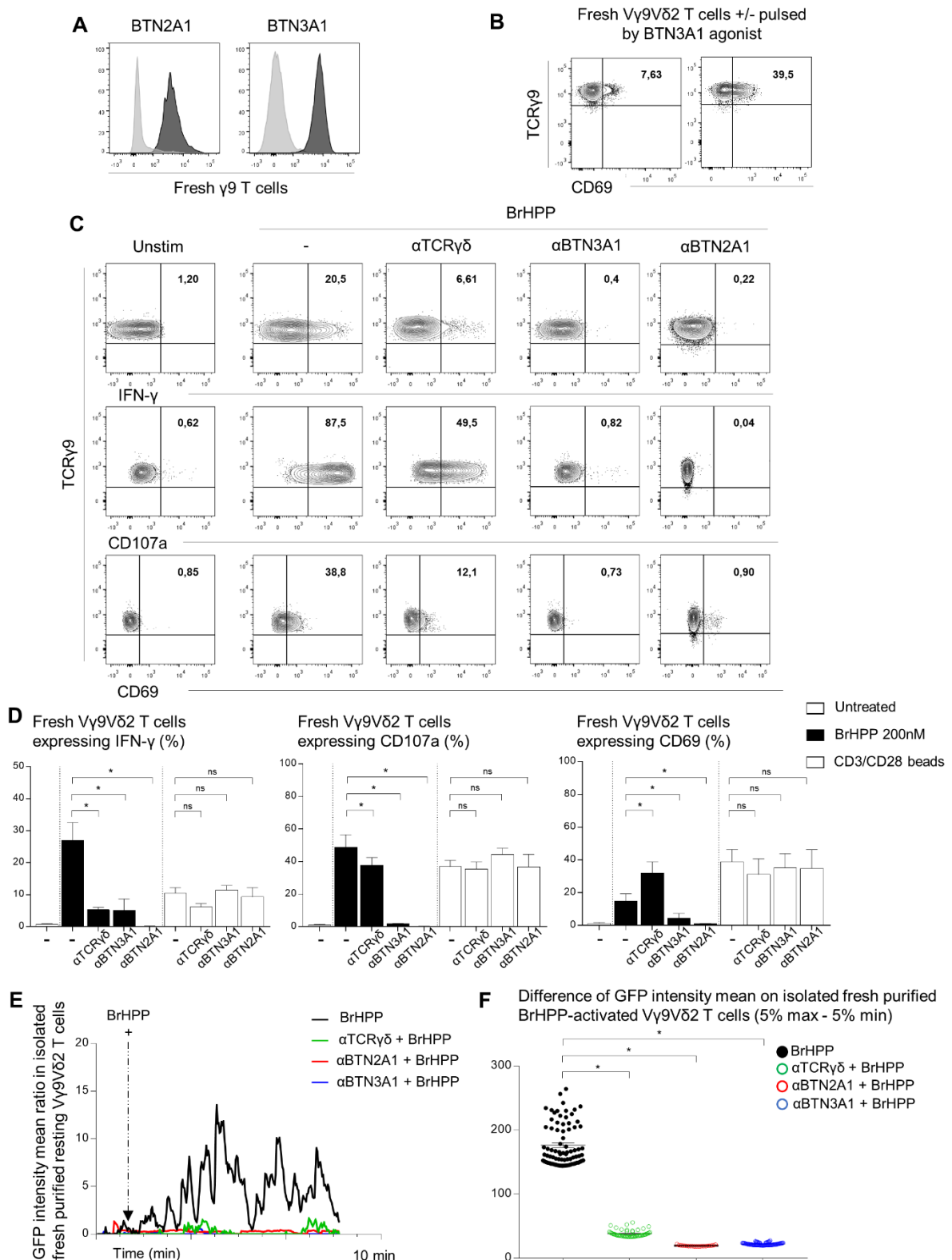


Figure 30: L'auto-activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ par le BrHPP dépend du TCR $\gamma\delta$ et des BTNs. Analyse de l'expression de la **BTN2A1** et **BTN3A1** à la surface des LT $V\gamma 9V\delta 2$ frais naïfs (**A**), de l'expression du **CD69** par les LT $V\gamma 9V\delta 2$ traités par l'agoniste de la **BTN3A1** (**B**) et de l'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ activés par le BrHPP ou les billes **CD3/CD28** préalablement traités par des anticorps bloquants (**C-D** : cytométrie en flux, **E-F** : flux calcique).

Les LT V γ 9V δ 2 naïfs exprimant la BTN2A1 et la BTN3A1 à leur surface (Figure **30A**) et pouvant être activés par l'agoniste de la BTN3A1 (Figure **30B**), nous avons mesuré par cytométrie en flux l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69 par les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés naïfs stimulés par le BrHPP et prétraités par les trois anticorps bloquants utilisés précédemment. Nous pouvons observer que le blocage du TCR $\gamma\delta$, de la BTN2A1 et de la BTN3A1 impacte et diminue très fortement l'activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP mais pas par les billes anti-CD3/CD28 (Figure **30C**, expérience représentative et **30D**, regroupement de 12 expériences indépendantes). De plus, nous avons analysé le flux calcique de LT V γ 9V δ 2 naïfs isolés stimulés par 200nM de BrHPP en présence d'anticorps bloquant les BTNs ainsi que le TCR. Nous pouvons observer une diminution importante de l'intensité de la GFP lorsque les LT V γ 9V δ 2 ont été prétraités par l'anti-TCR $\gamma\delta$ (vert) et une quasi-totale inhibition après prétraitement par les anticorps bloquants anti-BTN2A1 (rouge) et BTN3A1 (bleu) (Figure **30E**, expérience représentative et **30F**, regroupement de 6 expériences indépendantes).

L'activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP dépend de la BTN3A1 et du TCR $\gamma\delta$ en l'absence de cellule cible.

Par la suite, nous avons voulu savoir dans une nouvelle expérience si le traitement exogène par l'IPP, qui correspond au phosphoantigène endogène, entraînait une activation des LT V γ 9V δ 2 dépendante de la BTN3A1 et du TCR $\gamma\delta$ en l'absence de cellule cible.

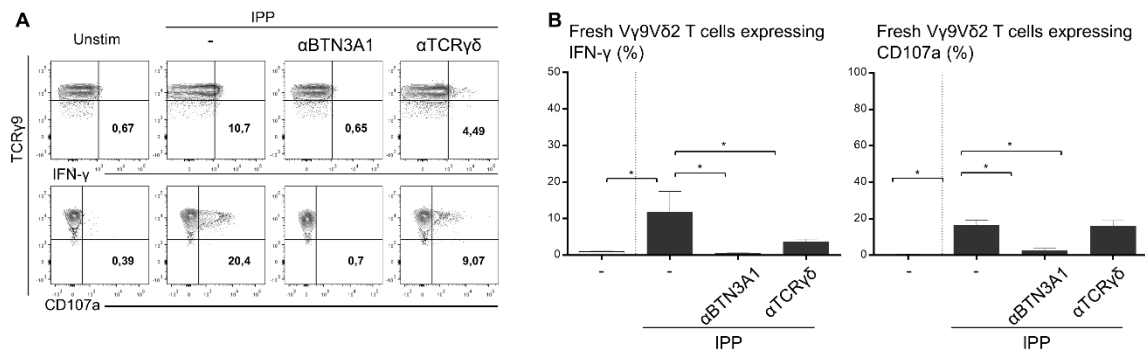
Méthodologie :

Pour ce faire, nous avons prétraité les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés par un anticorps bloquant la BTN3A1 (1h, 10 μ g/mL, clone 103.2) ou le TCR $\gamma\delta$ (1h, 0.5mg/mL, clone B1). Après un rinçage par du PBS 1X, les LT V γ 9V δ 2 sont traités par l'IPP à 15 μ M pendant 2 heures (37°C et 5%CO₂). Après incubation, nous avons quantifié l'activation des LT V γ 9V δ 2 grâce à l'expression du CD107a et de l'IFN- γ .

Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 31 ci-dessous. Dans cette expérience, nous pouvons observer que l'activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP est significativement diminuée par le blocage de la BTN3A1 et plus modérément limitée par le blocage du TCR $\gamma\delta$ (Figure **31A**, expérience représentative et **31B**, regroupement de 3 expériences indépendantes). C'est pourquoi, nous pouvons conclure que l'activation des LT

V γ 9V δ 2 par l'IPP en l'absence de cellule cible est également dépendante de la BTN3A1 et du TCR $\gamma\delta$. Cependant, nous n'avons pas encore de données concernant le blocage de la BTN2A1 pour valider l'impact de ce partenaire ni de suivi de flux calcique pour montrer



l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP sans contact cellulaire.

Figure 31: L'activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP dépend de la BTN3A1 et du TCR $\gamma\delta$ en l'absence de cellule cible. *Analyse de l'activation des LT V γ 9V δ 2 activés par le l'IPP préalablement traités par des anticorps bloquants (A, B).*

Ainsi, nous pouvons dire que les différents partenaires impliqués dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 après contact avec une cible tumorale traitée aux PAgS (TCR $\gamma\delta$, BTN2A1 et BTN3A1) jouent également un rôle dans l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP en l'absence de cellule cible et de tout contact cellulaire. Nous avons retrouvé également une implication du TCR $\gamma\delta$ et de la BTN3A1 dans l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP.

Au-delà des trois partenaires identifiés (TCR $\gamma\delta$, BTN2A1 et BTN3A1), nous pensons que d'autres acteurs sont impliqués dans le processus d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS solubles en l'absence de cellule cible.

L'inhibition du transporteur ABCA-1 par le Probucol perturbe l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP.

Dans la suite de ces travaux, nous avons étudié l'implication du transporteur ABCA-1 dans le mécanisme d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP. Comme il a été montré précédemment dans la littérature que ce transporteur pouvait être impliqué dans le trafic de l'IPP à travers la membrane ¹⁶⁹, nous nous sommes demandé si le transporteur ABCA-1 pouvait jouer un rôle dans le transport du BrHPP soluble lors de l'auto-activation du LT V γ 9V δ 2. Ainsi, après avoir vérifié la non toxicité du traitement au Probucol (inhibiteur du transporteur ABCA-1) sur les LT V γ 9V δ 2, nous avons réalisé une expérience pour répondre à cette question.

Méthodologie :

Pour évaluer l'éventuelle toxicité du traitement au Probucol, nous avons quantifié l'expression du DAPI et du 7-AAD par les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés traités par des concentrations croissantes de Probucol (10 μ M à 100 μ M, *overnight*).

Pour tester l'impact de l'ABCA-1 dans le mécanisme d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 en l'absence de cellule cible, nous avons inhibé ce transporteur en traitant les LT V γ 9V δ 2 par le Probucol (10 μ M, *overnight*, Sigma Aldrich). Après rinçage des cellules par du PBS 1X, nous avons activé les LT V γ 9V δ 2 par du BrHPP (200nM, 4h) ou des billes CD3/CD28. Le niveau d'activation de ces cellules a été quantifié par cytométrie en flux (expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69) et par le suivi du flux calcique au confocal.

Résultats :

Tout d'abord, nous avons observé que le Probucol n'exerce pas d'action toxique sur les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés car le pourcentage de viabilité reste constant (80% de LT V γ 9V δ 2 viables) quel que soit la concentration en probucol utilisée (Figure 32A pour le dapi et 32B pour le 7-AAD).

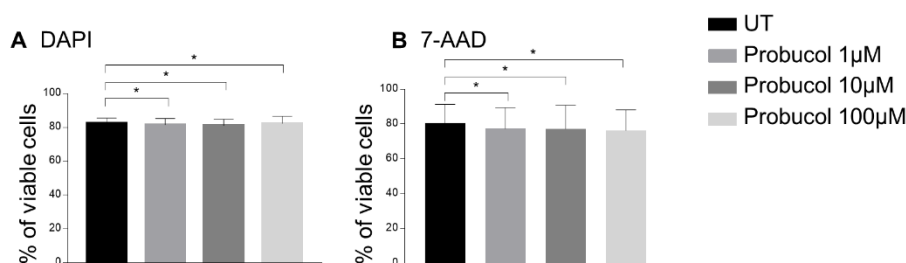


Figure 32 : Le traitement par le Probucol n'est pas toxique sur les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés. *Analyse de la viabilité des LT V γ 9V δ 2 traités par des doses croissantes de Probucol (A : DAPI, B : 7-AAD).*

Nous avons alors utilisé cette drogue pour tester l'implication du transporteur ABCA-1 dans l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 en l'absence de cellule cible. Les différents résultats obtenus sont présentés dans la Figure 33 ci-contre.

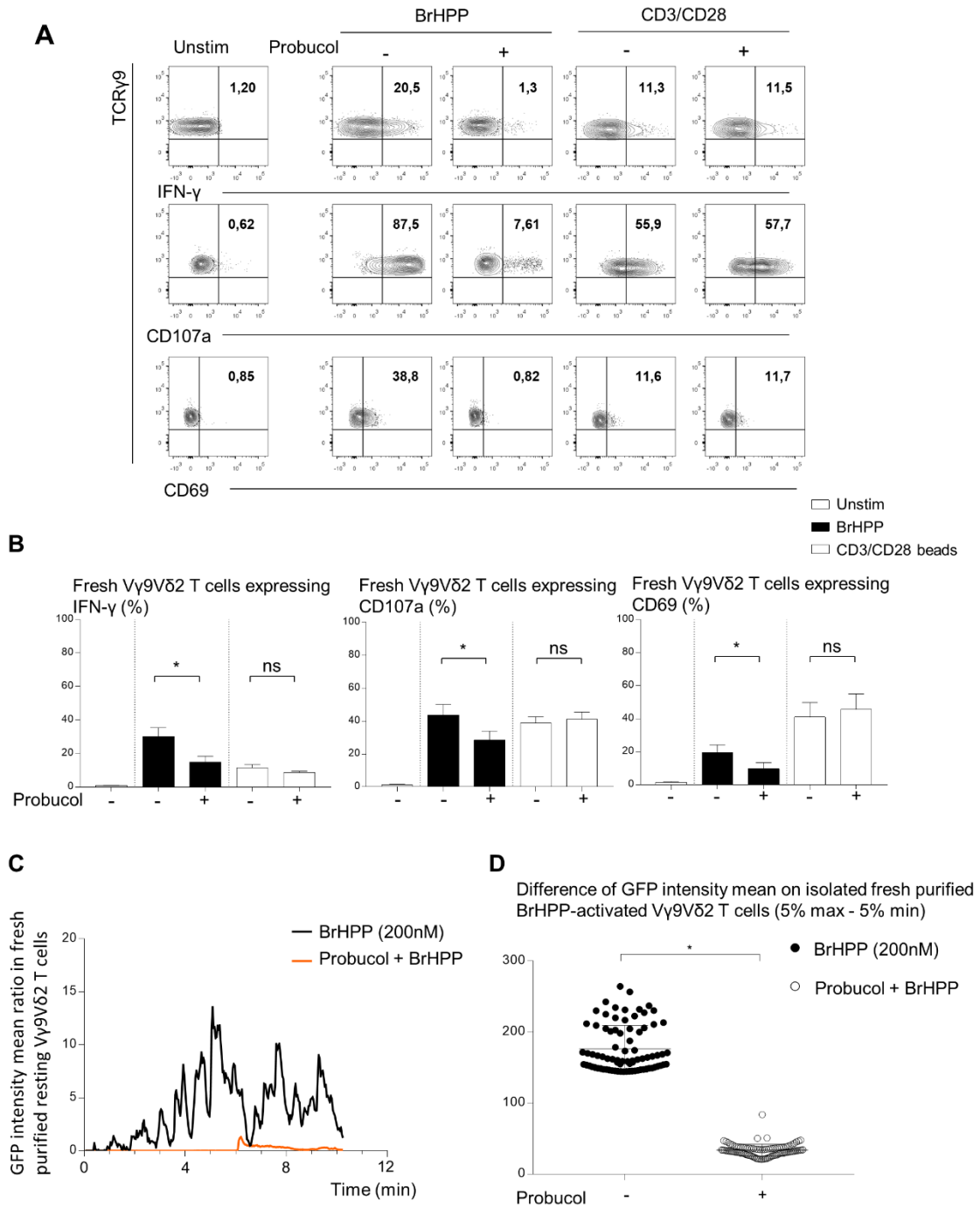


Figure 33 : L'inhibition du transporteur ABCA-1 par le Probuco perturbe l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP. Analyse de l'activation des LT V γ 9V δ 2 activés par le BrHPP et préalablement traités par le Probuco par cytométrie en flux (A, B) et suivi de flux calcique (C, D).

Nos résultats montrent que l'inhibition du transporteur ABCA-1 par le Probucol sur les LT V γ 9V δ 2 entraîne une diminution significative de l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69 lorsqu'ils sont stimulés par du BrHPP (200nM) (Figure **33A**, expérience représentative et **33B**, regroupement de 5 expériences indépendantes). Cependant, l'activation des LT V γ 9V δ 2 avec des billes CD3/CD28 n'est pas affectée par le probucol. De plus, le blocage du transporteur impacte l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 puisqu'on observe une diminution du flux calcique dans les cellules traitées au Probucol et stimulées par le BrHPP (Figure **33C**, expérience représentative et **33D**, quantification de 2 expériences).

Le Probucol inhibe l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP.

Pour aller plus loin, nous avons voulu savoir si le transporteur ABCA-1 était également impliqué dans l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP.

Méthodologie :

Comme dans nos précédentes expériences, nous avons bloqué le transporteur ABCA-1 par le traitement au Probucol. Ainsi, les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés ont été prétraités au Probucol (10 μ M, *overnight*), puis rincés deux fois au PBS 1X. Les cellules ont été ensuite activées par l'IPP à 15 μ M pendant 2 heures (37°C et 5% CO₂). Après incubation, nous avons quantifié l'activation des LT V γ 9V δ 2 grâce à l'expression du CD107a ainsi que la production de l'IFN- γ .

Résultats :

La Figure 34 ci-dessous présente les résultats obtenus dans cette expérience.

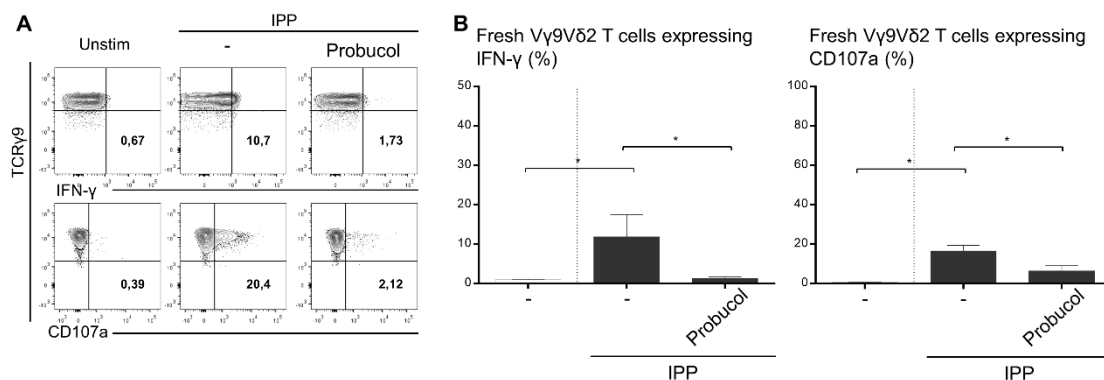


Figure 34 : Le Probucol inhibe l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP. Analyse de l'activation des LT V γ 9V δ 2 activés par l'IPP et préalablement traités par le Probucol par cytométrie en flux (A, B).

Dans cette expérience, nous pouvons observer que l'activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP est très fortement diminuée par le blocage de l'ABCA-1 par le Probucol. Par conséquent, nous pouvons conclure que ce transporteur est également impliqué dans le mécanisme d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP.

Ainsi, ces différents résultats tendent vers l'hypothèse d'une implication du transporteur ABCA-1 dans le trafic du BrHPP pour permettre l'auto-activation du LT V γ 9V δ 2 en l'absence de cellule cible, et notamment dans le passage du BrHPP vers le cytoplasme.

Des résultats complémentaires sont en faveur de cette hypothèse. En effet, nous avons montré qu'en co-culture avec la lignée tumorale A549 prétraitée au BrHPP, les LT V γ 9V δ 2 ne sont pas activés lorsque les deux partenaires sont séparés par une membrane poreuse (utilisation d'un transwell) ni par le milieu conditionné de ces mêmes lignées prétraitées au BrHPP (Figure 35, CM : condition medium, TW : transwell).

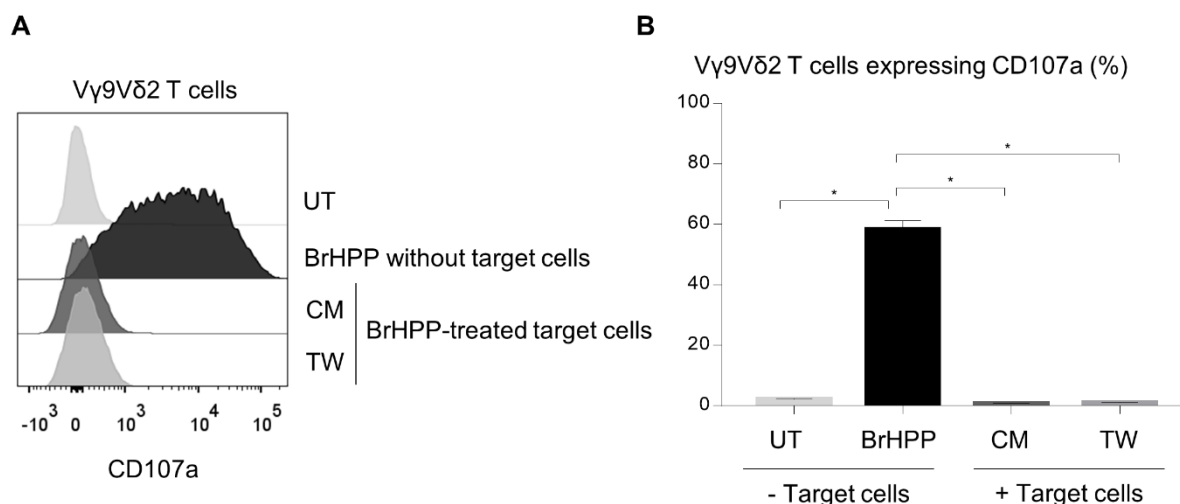


Figure 35 : Les LT V γ 9V δ 2 ne sont pas activés après co-culture avec les A549 traitées au BrHPP séparé par un transwell ou par le milieu conditionné de cette lignée. *Analyse de l'expression du CD107a par les LT V γ 9V δ 2 activés par le BrHPP en l'absence de cellule cible ou après co-culture avec des A549 prétraitées au BrHPP séparés par un transwell (TW) ou leur milieu conditionné (CM) (A, B).*

Ceci tend à dire que l'ABCA-1 pourrait être impliqué dans l'entrée du BrHPP dans le LT V γ 9V δ 2 induisant ainsi son auto-activation. Néanmoins, il sera important de confirmer le rôle de ce transporteur par une technique plus précise, comme par exemple par siRNA.

Ainsi, nous avons montré qu'en plus des trois partenaires (TCR $\gamma\delta$, BTN2A1, et BTN3A1) impliqués dans l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS solubles, le transporteur ABCA-1 était également acteur de ce processus. Cependant et à la différence

du modèle classique hétérologue de l'activation des LT V γ 9V δ 2, ces différents acteurs sont ici localisés directement sur la cellule isolée.

Augmentation progressive de l'expression de la BTN3A1 à la surface du LT V γ 9V δ 2 auto-activé au BrHPP.

Pour poursuivre la compréhension du mécanisme d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 sans contact cellulaire, nous avons décidé d'étudier par microscopie confocale la configuration des trois partenaires (TCR $\gamma\delta$, BTN2A1 et BTN3A1) à la surface d'un LT V γ 9V δ 2 isolé pendant sa stimulation par le BrHPP. Pour l'envoi du manuscrit, nous avons uniquement intégré les résultats pour les partenaires TCR $\gamma\delta$ et BTN3A1 car les expériences concernant la BTN2A1 sont encore en cours de finalisation.

Méthodologie :

Les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés ont été marqués par un anti-TCR $\gamma\delta$ (FITC, clone B3, BD Biosciences) et un anti-BTN3A1 (BV421, clone 232-5, BD Biosciences) pendant 20 minutes à 4°C. Après deux rinçages au PBS 1X, les cellules ont été traitées ou non par le BrHPP (200nM, à 3 minutes, 10 minutes ou 45 minutes) à 37°C et 5% de CO₂. Comme contrôle positif, nous avons utilisé la Ionomycine (10 μ g/mL, 10 minutes). De plus, nous avons étudié la localisation de ces marqueurs après une activation au zolédronate (5 μ M, 1 heure). A la fin de l'incubation, les cellules sont déposées à faible concentration sur les lames de microscopie prétraitées par la poly-D-lysine (10 μ g/mL, *overnight* à température ambiante, Sigma-Aldrich). Enfin, les lames sont montées à l'aide du milieu Fluoromount-G et analysées sur un microscope confocal Zeiss LSM780 ou 880 FAST Airyscan.

Les analyses quantitatives de la colocalisation entre le TCR $\gamma\delta$ et la BTN3A1 à la surface des LT V γ 9V δ 2 sont réalisées via *RGB profiler* disponible sur le logiciel ImageJ[®]. Dans cette analyse, nous avons déterminé les coefficients de Manders²⁹⁵ sur des sections médianes à l'aide du plug-in JACoP disponible sur ImageJ[®].

Résultats :

Les résultats obtenus dans cette partie sont présentés dans la Figure 36 ci-contre.

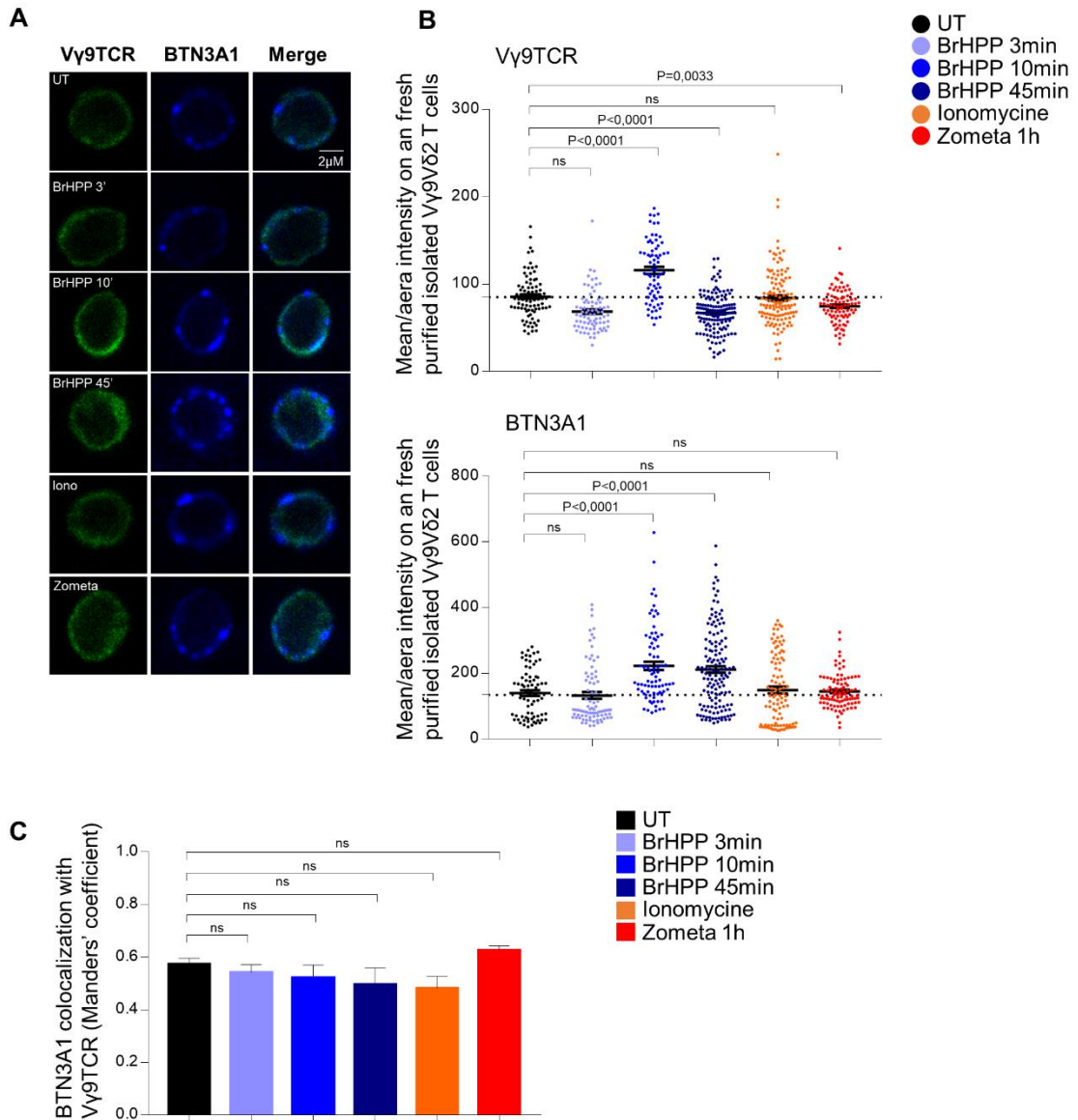


Figure 36 : Augmentation progressive de l'expression de la BTN3A1 à la surface du LT Vγ9Vδ2 auto-activé au BrHPP. *Analyse de la localisation du TCR γδ et de la BTN3A1 à la surface des LT Vγ9Vδ2 non traités ou activés avec le BrHPP, la Ionomycine ou le zolédronate (A : photos représentatives, B : intensités de fluorescence, C : coefficients de colocalisation).*

Tout d'abord, nous avons imagé le TCR γδ et la BTN3A1 à la surface des LT Vγ9Vδ2 frais purifiés naïfs, ou suivant l'activation avec le BrHPP, la Ionomycine ou encore le zolédronate (Figure 36A). Comme attendu, l'expression du TCR γδ (fluorescence verte) est répartie de façon assez homogène à la surface du LT Vγ9Vδ2. De plus, on observe que la distribution spatiale de la BTN3A1 (fluorescence bleue) n'est pas homogène à la surface du

LT V γ 9V δ 2 isolé.

Par la suite, nous avons quantifié les intensités de ces deux marqueurs à la surface des LT V γ 9V δ 2 frais purifiés (Figure **36B**). Ces résultats montrent que l'intensité du TCR $\gamma\delta$ est légèrement modulée au cours de l'activation par le BrHPP. En effet, les cellules expriment moins de TCR $\gamma\delta$ après 3 et 45 minutes de stimulation au BrHPP, en comparaison avec les non traitées. En revanche, l'intensité du signal TCR $\gamma\delta$ détectée après 10 minutes de stimulation au BrHPP est supérieure au contrôle non traité. De plus, l'intensité du TCR $\gamma\delta$ n'est pas modulée par l'activation à la Ionomycine mais est légèrement diminuée par un traitement au zolédronate (5 μ M, 1h). Par ailleurs, ces résultats montrent que l'expression de la BTN3A1 à la surface d'un LT V γ 9V δ 2 isolé n'est pas modulée au cours de la phase précoce de l'activation (3 minutes de traitement au BrHPP) mais augmente dans la phase plus tardive de l'activation (10 et 45 minutes de traitement au BrHPP) en comparaison avec les cellules non traitées. Enfin, on constate que l'expression de la BTN3A1 n'est pas modulée après 10 minutes de stimulation à la Ionomycine, ni par le traitement au zolédronate par rapport aux cellules non traitées.

De plus, nous avons analysé la colocalisation entre le TCR $\gamma\delta$ et la BTN3A1 sur des LT V γ 9V δ 2 frais purifiés individuels au cours de leur auto-activation par le BrHPP (Figure **36C**). On observe que la BTN3A1 colocalise de façon modérée avec le TCR $\gamma\delta$ car nous avons quantifié un coefficient de Manders de 0,57 à la surface des LT V γ 9V δ 2 non activés. Cette colocalisation partielle tend à diminuer au cours de l'activation au BrHPP (coefficient de Manders de 0,54 pour BrHPP 3min ; 0,52 pour BrHPP 10min et 0,49 pour BrHPP 45min). De plus, on observe une diminution de la colocalisation entre la BTN3A1 et le TCR $\gamma\delta$ après traitement à la Ionomycine (coefficient de Manders de 0,48) mais une augmentation en présence de zolédronate (coefficient de Manders de 0,626) par rapport aux LT V γ 9V δ 2 non activés.

Ainsi, ces résultats montrent qu'un LT V γ 9V δ 2 frais purifié isolé va moduler de façon transitoire l'expression du TCR V γ 9 et de la BTN3A1 au cours de son auto-activation, et de façon séquentielle. Nos résultats montrent notamment une augmentation progressive de l'expression de la BTN3A1 à la surface du LT V γ 9V δ 2 auto-activé au BrHPP. De plus, nous avons montré qu'il existe une proximité préexistante entre le TCR $\gamma\delta$ et la BTN3A1 à la surface du LT V γ 9V δ 2 isolé, même en l'absence de PAg.

Afin de poursuivre cette étude, nous avons prévu de terminer prochainement des nouvelles expériences d'immunofluorescence incluant la BTN2A1 ainsi que de réaliser des nouvelles expériences incluant la phosphotyrosine (pTyr) pour mesurer l'activation lymphocytaire. En effet, nous pourrions ainsi comparer l'expression des pTyr sur un LT V γ 9V δ 2 isolé au cours de son activation au BrHPP (200nM). De plus, il serait intéressant de regarder la localisation des pTyr au sein du LT V γ 9V δ 2 isolé auto-activé au BrHPP. Enfin, nous regarderons s'il existe une colocalisation entre les pTyr et les différents acteurs impliqués dans le processus d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP en l'absence de cellule cible (TCR $\gamma\delta$, BTN2A1 et BTN3A1).

II.III. Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié la capacité originale des LT V γ 9V δ 2 à s'activer par les PAg solubles en l'absence de contact cellulaire. En effet, nous avons montré que les LT V γ 9V δ 2 naïfs étaient capables de s'activer par des phosphoantigènes solubles comme par exemple le BrHPP en l'absence de cellule accessoire. Tout d'abord, nous avons vu que le LT V γ 9V δ 2 doit rencontrer le PAg soluble avant de pouvoir s'activer et qu'il peut réaliser de la trogocytose avec un de ses homologues ayant également rencontré le BrHPP. Ainsi le LT V γ 9V δ 2 traité par le BrHPP n'agit pas comme une CPA envers un de ses homologues naïfs. De plus, nous avons mis en évidence par des expériences de flux calciques qu'un LT V γ 9V δ 2 isolé peut s'activer par le BrHPP, sans aucun contact cellulaire. Puis, nous avons caractérisé ce mécanisme original en montrant que cette auto-activation par un PAg soluble dépendait des BTN2A1 et BTN3A1, ainsi que du TCR $\gamma\delta$. Par ailleurs, le transporteur ABCA-1 participe également à ce mécanisme d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP. De plus, nous avons observé une augmentation progressive de l'expression de la BTN3A1 à la surface des LT V γ 9V δ 2 activés au BrHPP et une colocalisation préexistante du TCR $\gamma\delta$ avec la BTN3A1 dans les LT V γ 9V δ 2 naïfs. Enfin, nous avons montré que ce phénomène d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP était également applicable à l'IPP, un autre phosphoantigène soluble.

Ce mécanisme inédit confirme la singularité de cette population lymphocytaire et montre la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes d'activation des LT V γ 9V δ 2 pour leur manipulation à grande échelle.

DISCUSSION

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

Parmi les différents acteurs impliqués dans le mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS, la protéine RhoB participe grandement à ce processus. Notre étude a montré que les LT V γ 9V δ 2 ne répondaient pas à la lignée PC9 traitée par des PAgS suite à un réacheminement de la protéine RhoB dans les endosomes tardifs de cette lignée. Ainsi, RhoB est séquestré dans les unités endosomales de PC9, ce qui empêche son apprêtement à la membrane afin d'exercer son action modulatrice sur la conformation de la BTN3A1. Ces résultats confortent ainsi l'hypothèse d'une forte implication de RhoB, et notamment de par sa localisation, dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 analysée lors de notre étude.

Dès lors, la localisation de la protéine RhoB pourrait correspondre à un des mécanismes de résistance utilisé par les cellules tumorales pour se protéger de l'action cytotoxique des LT V γ 9V δ 2. En effet, l'immuno-échappement des tumeurs pourrait être médié par une dérégulation du trafic intracellulaire de RhoB, ce qui constitue une connaissance supplémentaire importante aux différents modèles décrivant le ciblage des cellules tumorales par les LT V γ 9V δ 2 via les molécules de BTN.

Puisque la protéine RhoB est impliquée dans l'activation des LT V γ 9V δ 2, nous avons concentré nos travaux sur cette population cellulaire. En effet, dans l'étude précédente du Dr. Z. Sebestyen ¹⁷¹, il a été montré que la protéine RhoB était spécifiquement impliquée dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 et non des LT $\alpha\beta$ conventionnels, contrairement à RhoA qui était impliqué pour les deux populations lymphocytaires. Cependant, nous avons vu que la protéine RhoB est impliquée dans le système immunitaire via des interactions avec d'autres cellules immunitaires, comme les macrophages ²⁸⁶ et les DC ²⁸⁷. Ainsi, il serait intéressant de savoir si le phénomène de signalisation d'inside-out de RhoB est spécifique des LT V γ 9V δ 2. De plus, il n'existe à ce jour aucune publication étudiant le rôle de RhoB dans l'activation des cellules NK. Puisque ces dernières partagent de nombreuses caractéristiques communes aux LT V γ 9V δ 2, nous pourrions nous demander si la réactivité des cellules NK est dépendante de l'activité de RhoB. En effet, si la protéine RhoB n'intervient pas dans l'activation de ces cellules, son rôle de modulateur spécifique de la réactivité des LT V γ 9V δ 2 par les PAgS serait alors conforté.

Parmi les résultats inédits de notre étude, nous avons montré une augmentation de

Discussion

l'activation de RhoB après le contact entre la cible tumorale A549 et les LT V γ 9V δ 2, qui a lieu uniquement après traitement par le PAg. Donc, l'activation de RhoB dans les co-cultures des A549 avec les LT V γ 9V δ 2 est principalement dépendante du traitement par les PAg. Afin d'expliquer cette observation, nous pouvons émettre l'hypothèse que RhoB pourrait être activé par des signaux de stress exogènes ou par des cytokines pouvant provenir des LT V γ 9V δ 2. En effet, dans d'autres contextes impliquant les cellules immunitaires, il a été montré que la protéine RhoB était uprégulée par un stress environnemental, des cytokines et du LPS, et régulée par ces signaux^{286,287,296}. Par conséquent, notre hypothèse serait que ces signaux sécrétés par les LT V γ 9V δ 2 activés pourraient contribuer à l'activation de RhoB de façon coopérative avec les PAg.

Dans la littérature, il est connu que la protéine RhoB interagit avec la BTN3A1 afin de moduler l'activation des LT V γ 9V δ 2. Dans notre étude, l'utilisation d'un anticorps bloquant la BTN3A1 abroge complètement l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les A549 traitées aux PAg. Néanmoins, peu de choses sont connues concernant l'interaction possible entre la BTN2A1 et RhoB et à ce jour, aucune publication n'a montré une interaction entre ces deux protéines. Néanmoins, nous n'avons pas observé de modification du niveau d'expression de la BTN2A1 sur les lignées A549 et PC9 traitées aux PAg. Ainsi, nous pouvons constater que l'augmentation de l'activité de RhoB suite au traitement par les PAg n'impacte pas le niveau d'expression de la BTN2A1. Même si ces deux BTN semblent intervenir de façon séquentielle dans le processus d'activation des LT V γ 9V δ 2, on ne peut quand même pas exclure que la protéine RhoB module l'activation des LT V γ 9V δ 2 également par la BTN2A1. Pour ce faire, nous pourrions utiliser un anticorps bloquant la BTN2A1 dans les A549 pour voir si l'activation est aussi dépendante de cette protéine. Ainsi, cette hypothèse serait intéressante à vérifier afin d'améliorer la compréhension du mécanisme d'activation des LT V γ 9V δ 2 par les cibles traitées aux PAg.

Une des limites de notre étude est l'absence de données cliniques. En effet, nos expériences ont été réalisées uniquement *in vitro*, à partir de lignées tumorales NSCLC humaines. Afin de poursuivre ces travaux, il pourrait être intéressant d'étudier l'activation des LT V γ 9V δ 2 dépendante de RhoB après co-culture avec des cellules de patients NSCLC traitées aux PAg. Par ailleurs, nous pourrions regarder la localisation de la protéine RhoB sur des coupes histologiques de cellules de patients NSCLC. Par la suite, il serait possible de corrélérer les données de localisation à l'infiltrat lymphocytaire de ces patients, à leurs réponses au traitement et à l'évolution de leur pathologie. Par exemple, nous pouvons nous demander si une faible expression de la protéine RhoB dans la tumeur est corrélée à un faible infiltrat lymphocytaire, et notamment une proportion limitée de LT V γ 9V δ 2. Enfin, nous

Discussion

pourrions étudier les caractéristiques d'activation de ces LT V γ 9V δ 2 infiltrés pour savoir s'ils sont anergiques.

De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'enrichissement juxta-membranaire de RhoB pourrait être un paramètre d'étude intéressant afin de prédire la susceptibilité des cellules tumorales à des thérapies utilisant les LT V γ 9V δ 2. Cependant ces prédictions ne peuvent pas être basées uniquement sur ce critère puisque la cible tumorale Daudi ne présente pas un enrichissement juxta-membranaire de RhoB ¹⁷¹. Ainsi, ce mécanisme n'explique qu'en partie le processus de reconnaissance de la cible par les LT V γ 9V δ 2.

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

Ainsi tous ces résultats tendent à confirmer l'implication de la protéine RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par des cibles tumorales traitées par les PAgS. Cependant, nos résultats montrent qu'il n'est pas l'unique médiateur de ce mécanisme. En effet, les A549 traitées aux PAgS qui sont *KO* pour RhoB activent faiblement les LT V γ 9V δ 2, même si le niveau de cette activation est fortement diminué par rapport au contrôle *WT*. Il est donc très fortement probable qu'un ou plusieurs partenaires supplémentaires soient également impliqués dans ce phénomène. Par exemple, nous nous sommes demandé si le transporteur ABCA-1 participait à l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les cibles NSCLC traitées aux PAgS comme cela a été montré pour un autre modèle d'étude ¹⁶⁹. Or, l'inhibition de ce transporteur par le Probucol n'impacte pas l'activation des LT V γ 9V δ 2 dans notre modèle. Ainsi, le transporteur ABCA-1 ne semble pas impliqué dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les cibles NSCLC traitées aux PAgS. De plus, au vue des expériences de Rhodes et ses collaborateurs ¹⁷², il serait intéressant d'étudier le rôle de la Périplakine dans notre modèle d'étude des LT V γ 9V δ 2 avec des cibles tumorales NSCLC traitées aux PAgS. Par ailleurs, il est probable que le ligand du TCR δ 2 qui n'est pas connu à ce jour pourrait également jouer un rôle important dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par des lignées NSCLC traitées aux PAgS.

II. L'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les phosphoantigènes solubles indépendante des cellules cibles ne requiert pas de contact cellulaire et dépend des butyrophilines et du TCR

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous avons vu que les LT V γ 9V δ 2 présentent la capacité originale de s'activer par les PAg solubles en l'absence de cellule cible et de contact cellulaire. Dans nos travaux, nous avons montré que ce mécanisme atypique se déroulait de façon inattendue et inédite sur cellule isolée.

Nous avons vu que les LT V γ 9V δ 2 activés par le BrHPP exercent une lyse envers leurs homologues également activés par le PAg (détection de trogocytose et de mort cellulaire). Cette lyse exercée par les cellules cytotoxiques peut être qualifiée de « fratricide » si elle a lieu entre deux homologues, ou « suicide » si elle se déroule directement sur la cellule cytotoxique. Par exemple, une étude a montré que l'engagement du récepteur activateur NKG2D potentialise la lyse fratricide des cellules NK ²⁹⁷. De plus, les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) vont également réaliser de la lyse fratricide en présence d'un peptide spécifiquement reconnu par ces cellules ²⁹⁸. Leurs résultats ont montré que le contact cellulaire entre deux CTLs était nécessaire pour entraîner la lyse des lymphocytes, ce qui correspond ainsi à la lyse fratricide. Même si nous pensons que la lyse observée dans notre étude de l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP est fratricide, nous pourrions le vérifier par une expérience de microscopie. Pour ce faire, nous pourrions pré-marquer les LT V γ 9V δ 2 frais purifiés avec de la calcéine et suivre l'expression de ce marqueur sur la cellule isolée après ajout du PAg soluble à l'aide d'une vidéo au confocal. Si le LT V γ 9V δ 2 isolé auto-activé par le PAg réalise une lyse suicide, nous observerons une chute de l'expression de ce marqueur. En revanche, si la lyse est fratricide, alors l'expression de la calcéine sur le LT V γ 9V δ 2 isolé restera semblable au niveau initial.

Les LT V γ 9V δ 2 n'ont pas besoin de cellule cible ou accessoire pour s'activer en présence de PAg et leur activation peut se dérouler sur cellule isolée en présence de PAg solubles (BrHPP, IPP ou cHDMAPP). En effet, nos résultats montrent que les LT V γ 9V δ 2 s'activent directement en présence de BrHPP, de façon isolée et dépendante du TCR $\gamma\delta$ et des BTN (BTN2A1 et BTN3A1). De plus, nous avons vu que les LT V γ 9V δ 2 s'auto-activent également en présence d'IPP, de façon dépendante du TCR $\gamma\delta$ et de la BTN3A1. Cependant, nous ne savons pas encore si l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par l'IPP dépend aussi de la BTN2A1. Par conséquent, nous envisageons de réaliser prochainement une

Discussion

expérience pour voir si l'utilisation en amont d'un anticorps bloquant la BTN2A1 abroge l'expression du CD107a, de l'IFN- γ et du CD69 par les LT V γ 9V δ 2 traités par l'IPP. De plus, il serait intéressant de valider ce phénomène d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par d'autres PAgS solubles, comme le cHDMAPP, en regardant si elle dépend du TCR $\gamma\delta$ et des BTN2A1 et BTN3A1.

Nous ne savons pas encore si l'auto-activation du LT V γ 9V δ 2 sur cellule isolée se déroule entièrement à la surface du lymphocyte. En d'autres termes, nous ne savons pas si le BrHPP pénètre dans le LT V γ 9V δ 2 ou s'il est « capté » par le TCR $\gamma\delta$ en surface. L'étude de Lang et ses collaborateurs a émis l'hypothèse que la production de TNF- α et la nécessité d'un contact cellule-cellule pour induire la lyse de l'effecteur indiquait que les TUBags devaient se lier à la surface cellulaire avant la reconnaissance¹⁵². Ainsi, les TUBags seraient reconnus par le TCR V γ 9V δ 2, probablement en association avec une molécule de surface conservée au cours du temps. Dans nos travaux, nous n'avons pas pu montrer que le BrHPP restait en surface du LT V γ 9V δ 2 isolé et entraînait son activation. Pour répondre à cette question, il faudrait rendre imperméable la membrane des LT V γ 9V δ 2 frais purifiés puis les activer avec le BrHPP. Si l'activation n'est pas modulée par ce traitement, alors le BrHPP restera en surface et interagira directement avec la BTN3A1 et le TCR $\gamma\delta$.

Même si ne pouvons pas encore conclure sur ce point, les résultats concernant l'ABCA-1 sont intéressants et tendent vers l'hypothèse d'une entrée du BrHPP dans le LT V γ 9V δ 2. En effet, l'inhibition de ce transporteur par le Probucol limite cette activation donc impacte probablement le trafic du BrHPP. Tout d'abord, il serait important de confirmer ces résultats en utilisant une technique plus spécifique comme un siRNA ciblant ce transporteur. Si le LT V γ 9V δ 2 isolé traité par le siRNA répond de façon différentielle ou limitée au BrHPP par rapport à celui traité par le siRNA contrôle, alors ces résultats confirmeraient une implication du transporteur ABCA-1 dans le trafic du BrHPP. De plus, il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres PAgS solubles, et notamment de tester le flux calcique sur des LT V γ 9V δ 2 frais purifiés traités au Probucol en présence d'IPP ou de cHDMAPP pour voir si ce phénomène est généralisable. Enfin, nous pourrions envisager une expérience utilisant un PAg soluble marqué (par exemple du BrHPP radiomarqué) afin de suivre le cheminement du PAg soluble autour et/ou à l'intérieur du LT V γ 9V δ 2 isolé.

Nous avons vu que des acteurs intracellulaires supplémentaires sont impliqués dans le modèle classique d'activation des LT V γ 9V δ 2 par des cellules cibles traitées aux PAgS, comme par exemple la Périplakine ou la protéine RhoB et nous pensons qu'ils pourraient également jouer un rôle dans l'activation autologue. Ainsi, nous pourrions nous demander si

Discussion

la protéine RhoB est impliquée dans l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 en l'absence de cellule cible. Pour ce faire, nous pourrions envisager différentes expériences, comme par exemple l'inhibition de RhoB par la C3-transférase ou encore par un siRNA ciblant la protéine sur des LT V γ 9V δ 2 frais purifiés. Pour étudier l'implication de cette protéine, nous pourrions alors comparer l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg solubles dans les conditions où nous avons bloqué la protéine par rapport au contrôle. Cependant, nous devrions être vigilants dans l'interprétation des résultats puisque le spectre d'action de la protéine RhoB est large et cela pourrait impacter indirectement les readouts d'activation (par exemple via l'utilisation du réseau de cytosquelette).

A partir des résultats de nos travaux, nous pourrions proposer un modèle d'auto-activation d'un LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP en l'absence de cellule cible et sans aucun contact cellulaire. Après ajout du BrHPP sur un LT V γ 9V δ 2 naïf, le PAg soluble pourrait rentrer dans le lymphocyte via le transporteur ABCA-1 et activer différents partenaires intracellulaires. Tout d'abord, la Périplakine pourrait favoriser le rapprochement entre le TCR V γ 9 et la BTN2A1 à la membrane du lymphocyte. Puis, comme nous l'avons vu dans la première partie, le PAg pourrait augmenter l'activation de la protéine RhoB, qui pourrait alors changer de localisation pour aller moduler la conformation de la BTN3A1 au niveau de la membrane du LT V γ 9V δ 2. Alors, la BTN3A1 interagirait avec un ligand restant à déterminer également situé à la surface du lymphocyte isolé. Tous ces éléments pourront ainsi entraîner l'activation directe du lymphocyte, sans l'aide d'une cellule cible ou accessoire.

Nos résultats montrent que les LT V γ 9V δ 2 s'activent en présence de PAg solubles en l'absence de cellule cible et sans aucun contact cellulaire. Ce mécanisme pourrait être partiellement responsable d'une apparition rapide de l'anergie lymphocytaire observée *in vitro* et *in vivo* ; mais aussi lors de la conduction des essais cliniques²⁰⁴. En effet, nous pouvons imaginer que les LT V γ 9V δ 2 amplifiés *in vitro* par le BrHPP et réinfusés au patient rentrent précocement en anergie suite à une auto-activation rapide et une lyse fratricide *in vitro*. Or, puisque l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 n'est pas observée par le traitement au zolédronate, ces résultats sont en faveur des essais thérapeutiques utilisant le zolédronate (et plus largement les autres ABP). Par exemple, les LT V γ 9V δ 2 amplifiés et activés *in vivo* suite à l'injection de zolédronate au patient ne réaliseraient pas de mort fratricide retardant l'entrée des lymphocytes en anergie, phénomène régulée par divers paramètres.

Pour aller plus loin, nous pourrions émettre l'hypothèse que la propriété d'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 par les PAg solubles en l'absence de cellule cible pourrait correspondre à un moyen d'auto-régulation de ces lymphocytes. En effet, nous avons vu

Discussion

dans l'introduction de ce manuscrit que les LT V δ 1⁺ ont des propriétés régulatrices, au même titre que les LT CD4 régulateurs (Foxp3⁺), à l'inverse des LT V γ 9V δ 2. Ainsi, les LT V γ 9V δ 2 pourraient exercer leur fonction régulatrice via cette capacité et la lyse fratricide, en une sorte de rétrocontrôle négatif, afin de maintenir un équilibre entre auto-immunité et réponse immunitaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Steinman, R. M. The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271–296 (1991).
2. Shortman, K. & Liu, Y.-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151–161 (2002).
3. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004).
4. Kono, H. & Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279–289 (2008).
5. Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J. & Steinman, R. M. The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation. *J. Exp. Med.* **199**, 1607–1618 (2004).
6. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* **517**, 293–301 (2015).
7. Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M. & Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 671–688 (2018).
8. Bacon, L. *et al.* Two Human ULBP/RAET1 Molecules with Transmembrane Regions Are Ligands for NKG2D. *J. Immunol.* **173**, 1078–1084 (2004).
9. Bauer, S. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science* **285**, 727–729 (1999).
10. D’Andrea, A. *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* **176**, 1387–1398 (1992).
11. Ogasawara, K. & Lanier, L. L. NKG2D in NK and T Cell-Mediated Immunity. *J. Clin. Immunol.* **25**, 534–540 (2005).
12. Epling-Burnette, P. K. *et al.* Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood* **109**, 4816–4824 (2007).
13. Oppenheim, D. E. *et al.* Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat. Immunol.* **6**, 928–937 (2005).
14. Mamessier, E. *et al.* Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* **121**, 3609–3622 (2011).
15. Croxatto, D. *et al.* IL15 induces a potent antitumor activity in NK cells isolated from malignant pleural effusions and overcomes the inhibitory effect of pleural fluid. *Oncolmmunology* **6**, e1293210 (2017).
16. Bertone, S. *et al.* Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **29**, 23–29 (1999).
17. Ruggeri, L. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* **295**, 2097–2100 (2002).
18. Benson, D. M. *et al.* A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* **120**, 4324–4333 (2012).
19. Vey, N. *et al.* A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood* **120**, 4317–4323 (2012).
20. Poggi, A. & Zocchi, M. R. Cyclosporin A regulates human NK cell apoptosis induced by soluble HLA-I or by target cells. *Autoimmun. Rev.* **4**, 532–536 (2005).
21. Lugli, E., Marcenaro, E. & Mavilio, D. NK Cell Subset Redistribution during the Course of Viral Infections. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
22. Brandt, C. S. *et al.* The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans. *J. Exp. Med.* **206**, 1495–1503 (2009).

23. Pesce, S. *et al.* B7-H6-mediated downregulation of NKp30 in NK cells contributes to ovarian carcinoma immune escape. *Oncolimmunology* **4**, e1001224 (2015).
24. Arnon, T. I., Markel, G. & Mandelboim, O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 348–358 (2006).
25. Thorén, F. B. *et al.* Human NK Cells Induce Neutrophil Apoptosis via an NKp46- and Fas-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **188**, 1668–1674 (2012).
26. Pesce, S. *et al.* The Innate Immune Cross Talk between NK Cells and Eosinophils Is Regulated by the Interaction of Natural Cytotoxicity Receptors with Eosinophil Surface Ligands. *Front. Immunol.* **8**, 510 (2017).
27. Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J. Exp. Med.* **198**, 557–567 (2003).
28. Shibuya, A. *et al.* DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes. *Immunity* **4**, 573–581 (1996).
29. Martinet, L. & Smyth, M. J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 243–254 (2015).
30. 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).
31. Pesce, S. *et al.* Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 335-346.e3 (2017).
32. Zeh, H. J., Hurd, S., Storkus, W. J. & Lotze, M. T. Interleukin-12 Promotes the Proliferation and Cytolytic Maturation of Immune Effectors: Implications for the Immunotherapy of Cancer. *J. Immunother.* **14**, 155–161 (1993).
33. Waldmann, T. A. Interleukin-15 in the treatment of cancer. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1689–1701 (2014).
34. Böttcher, J. P. *et al.* NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* **172**, 1022-1037.e14 (2018).
35. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
36. Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G. & Coligan, J. E. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood* **121**, 4672–4683 (2013).
37. Wallin, R. P. A., Screpanti, V., Michaëlsson, J., Grandien, A. & Ljunggren, H.-G. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2727–2735 (2003).
38. Smyth, M. J. *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**, 501–510 (2005).
39. Zhang, Q. *et al.* Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* **19**, 723–732 (2018).
40. Schantz, S. P., Savage, H. E., Racz, T., Taylor, D. L. & Sacks, P. G. Natural killer cells and metastases from pharyngeal carcinoma. *Am. J. Surg.* **158**, 361–366 (1989).
41. Carrega, P. *et al.* Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56brightCD16– cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* **112**, 863–875 (2008).
42. Goral, S. The three-signal hypothesis of lymphocyte activation/targets for immunosuppression. *Dial. Transplant.* **40**, 14–16 (2011).

43. Nakayama, T. & Yamashita, M. The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Semin. Immunol.* **22**, 303–309 (2010).
44. Weigelin, B., Krause, M. & Friedl, P. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol. Lett.* **138**, 19–21 (2011).
45. Kennedy, R. & Celis, E. Multiple roles for CD4⁺ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.* **222**, 129–144 (2008).
46. Janssen, E. M. *et al.* CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852–856 (2003).
47. Shedlock, D. J. Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory. *Science* **300**, 337–339 (2003).
48. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480–483 (1998).
49. Brenner, M. B. *et al.* Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* **322**, 145–149 (1986).
50. Saito, H. *et al.* A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **312**, 36–40 (1984).
51. Kobayashi, H., Tanaka, Y., Yagi, J., Toma, H. & Uchiyama, T. Gamma /delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 115–124 (2001).
52. Carding, S. R., McNamara, J. G., Pan, M. & Bottomly, K. Characterization of γ/δ T cell clones isolated from human fetal liver and thymus. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1327–1335 (1990).
53. McVay, L. D. & Carding, S. R. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157**, 2873–2882 (1996).
54. Ciofani, M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 657–663 (2010).
55. Carding, S. R. & Egan, P. J. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 336–345 (2002).
56. Lanier, L. L. *et al.* Structural and serological heterogeneity of γ/δ T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1985–1992 (1988).
57. Falini, B. *et al.* Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **143**, 2480–2488 (1989).
58. Groh, V. *et al.* Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* **169**, 1277–1294 (1989).
59. Parker, C. M. *et al.* Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J. Exp. Med.* **171**, 1597–1612 (1990).
60. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., Baker, D. L. & Baker, A. *Cellular and molecular immunology*. (Elsevier, 2018).
61. Pereira, P. & Boucontet, L. Rates of Recombination and Chain Pair Biases Greatly Influence the Primary $\gamma\delta$ TCR Repertoire in the Thymus of Adult Mice. *J. Immunol.* **173**, 3261–3270 (2004).
62. Chien, Y., Meyer, C. & Bonneville, M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 121–155 (2014).
63. Chien, Y. & Königshofer, Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol. Rev.* **215**, 46–58 (2007).

64. Harly, C., Peigné, C.-M. & Scotet, E. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Front. Immunol.* **5**, (2015).
65. Zhao, Y., Niu, C. & Cui, J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development? *J. Transl. Med.* **16**, 3 (2018).
66. Caccamo, N. *et al.* Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood* **118**, 129–138 (2011).
67. Kimura, Y. *et al.* IL-17A-producing CD30⁺ V δ 1 T cells drive inflammation-induced cancer progression. *Cancer Sci.* **107**, 1206–1214 (2016).
68. Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev. Cell* **14**, 818–829 (2008).
69. Rong, L. *et al.* Analysis of tumor-infiltrating gamma delta T cells in rectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**, 3573–3580 (2016).
70. Wistuba-Hamprecht, K. *et al.* Phenotypic characterization and prognostic impact of circulating $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T-cells in metastatic malignant melanoma: Prognostic Value of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T-Cells in Malignant Melanoma. *Int. J. Cancer* **138**, 698–704 (2016).
71. Wistuba-Hamprecht, K. *et al.* Proportions of blood-borne V δ 1⁺ and V δ 2⁺ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **64**, 116–126 (2016).
72. Mao, Y. *et al.* A new effect of IL-4 on human $\gamma\delta$ T cells: promoting regulatory V δ 1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of V δ 2 T cells. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 217–228 (2016).
73. Peng, G. *et al.* Tumor-Infiltrating $\gamma\delta$ T Cells Suppress T and Dendritic Cell Function via Mechanisms Controlled by a Unique Toll-like Receptor Signaling Pathway. *Immunity* **27**, 334–348 (2007).
74. Casetti, R. *et al.* Cutting Edge: TGF- β 1 and IL-15 Induce FOXP3⁺ $\gamma\delta$ Regulatory T Cells in the Presence of Antigen Stimulation. *J. Immunol.* **183**, 3574–3577 (2009).
75. Ye, J. *et al.* Specific Recruitment of Regulatory T Cells in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **73**, 6137–6148 (2013).
76. Daley, D. *et al.* $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation. *Cell* **166**, 1485-1499.e15 (2016).
77. Ye, J. *et al.* Tumor-Derived $\gamma\delta$ Regulatory T Cells Suppress Innate and Adaptive Immunity through the Induction of Immunosenescence. *J. Immunol.* **190**, 2403–2414 (2013).
78. Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 479–489 (2010).
79. Patil, R. S. *et al.* IL17 producing $\gamma\delta$ T cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients: T $\gamma\delta$ 17 in Gallbladder Cancer. *Int. J. Cancer* **139**, 869–881 (2016).
80. Wakita, D. *et al.* Tumor-infiltrating IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1927–1937 (2010).
81. Kong, X., Sun, R., Chen, Y., Wei, H. & Tian, Z. $\gamma\delta$ T Cells Drive Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated CD8⁺ T Cell Exhaustion in Hepatitis B Virus-Induced Immunotolerance. *J. Immunol.* **193**, 1645–1653 (2014).
82. Wu, P. *et al.* $\gamma\delta$ T17 Cells Promote the Accumulation and Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Human Colorectal Cancer. *Immunity* **40**, 785–800 (2014).
83. Welte, T. & Zhang, X. H.-F. Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm.* **2015**, 1–6 (2015).

84. Cai, Y. *et al.* Differential developmental requirement and peripheral regulation for dermal V γ 4 and V γ 6T17 cells in health and inflammation. *Nat. Commun.* **5**, 3986 (2014).
85. Bunt, S. K., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J. & Ostrand-Rosenberg, S. Inflammation Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells that Facilitate Tumor Progression. *J. Immunol.* **176**, 284–290 (2006).
86. Rei, M. *et al.* Murine CD27(-) V 6(+) T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E3562–E3570 (2014).
87. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
88. Sabbione, F. *et al.* Neutrophils suppress $\gamma\delta$ T-cell function: Innate Immunity. *Eur. J. Immunol.* **44**, 819–830 (2014).
89. Kalyan, S., Chandrasekaran, V., Quabius, E. S., Lindhorst, T. K. & Kabelitz, D. Neutrophil uptake of nitrogen-bisphosphonates leads to the suppression of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2335–2346 (2014).
90. Kobayashi, H. & Tanaka, Y. $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy—A Review. *Pharmaceuticals* **8**, 40–61 (2015).
91. Girardi, M. Regulation of Cutaneous Malignancy by gamma delta T Cells. *Science* **294**, 605–609 (2001).
92. Silva-Santos, B., Serre, K. & Norell, H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 683–691 (2015).
93. Ma, Y. *et al.* Contribution of IL-17–producing $\gamma\delta$ T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J. Exp. Med.* **208**, 491–503 (2011).
94. Dadi, S. *et al.* Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* **164**, 365–377 (2016).
95. Donia, M., Ellebaek, E., Andersen, M. H., Straten, P. thor & Svane, I. M. Analysis of V δ 1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes. *Oncolimmunology* **1**, 1297–1304 (2012).
96. Devaud, C. *et al.* Anti-metastatic potential of human V δ 1+ $\gamma\delta$ T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 1199–1210 (2013).
97. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **21**, 938–945 (2015).
98. Tosolini, M. *et al.* Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncolimmunology* **6**, e1284723 (2017).
99. Pizzolato, G. *et al.* Single-cell RNA sequencing unveils the shared and the distinct cytotoxic hallmarks of human TCRV δ 1 and TCRV δ 2 $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201818488 (2019) doi:10.1073/pnas.1818488116.
100. Godder, K. T. *et al.* Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased $\gamma\delta$ T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 751–757 (2007).
101. Dieli, F. *et al.* Granulysin-Dependent Killing of Intracellular and Extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V γ 9/V δ 2 T Lymphocytes. *J. Infect. Dis.* **184**, 1082–1085 (2001).

102. Niu, C. *et al.* In vitro analysis of the proliferative capacity and cytotoxic effects of ex vivo induced natural killer cells, cytokine-induced killer cells, and gamma-delta T cells. *BMC Immunol.* **16**, 61 (2015).
103. Dieli, F. *et al.* Differentiation of Effector/Memory V δ 2 T Cells and Migratory Routes in Lymph Nodes or Inflammatory Sites. *J. Exp. Med.* **198**, 391–397 (2003).
104. Angelini, D. F. *et al.* Fc γ RIII discriminates between 2 subsets of V γ 9V δ 2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* **104**, 1801–1807 (2004).
105. Dhar, S. & Chiplunkar, S. V. Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells by V γ 9V δ 2 T cells. *Cancer Immunol.* **10**, 10 (2010).
106. Gao, Y. *et al.* $\gamma\delta$ T Cells Provide an Early Source of Interferon γ in Tumor Immunity. *J. Exp. Med.* **198**, 433–442 (2003).
107. Ramstead, A. G. & Jutila, M. A. Complex Role of $\gamma\delta$ T-Cell-Derived Cytokines and Growth Factors in Cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* **32**, 563–569 (2012).
108. Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M. & Cao, X. Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF- β 1. *J. Immunol.* **182**, 240–249 (2009).
109. Sedlak, C., Patzl, M., Saalmüller, A. & Gerner, W. IL-12 and IL-18 induce interferon- γ production and de novo CD2 expression in porcine $\gamma\delta$ T cells. *Dev. Comp. Immunol.* **47**, 115–122 (2014).
110. Dokouhaki, P. *et al.* NKG2D regulates production of soluble TRAIL by ex vivo expanded human $\gamma\delta$ T cells: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* **43**, 3175–3182 (2013).
111. Li, Z. *et al.* IFN- γ enhances HOS and U2OS cell lines susceptibility to $\gamma\delta$ T cell-mediated killing through the Fas/Fas ligand pathway. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 496–503 (2011).
112. Fisher, J. P. H. *et al.* Neuroblastoma Killing Properties of V δ 2 and V δ 2-Negative T Cells Following Expansion by Artificial Antigen-Presenting Cells. *Clin. Cancer Res.* **20**, 5720–5732 (2014).
113. Couzi, L. *et al.* Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human $\gamma\delta$ T cells expressing CD16 (Fc γ RIIIa). *Blood* **119**, 1418–1427 (2012).
114. Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J. P. & Favero, J. Production of TNF- α by Human V γ 9V δ 2 T Cells Via Engagement of Fc γ RIIIa, the Low Affinity Type 3 Receptor for the Fc Portion of IgG, Expressed upon TCR Activation by Nonpeptidic Antigen. *J. Immunol.* **166**, 7190–7199 (2001).
115. Huang, Y. *et al.* $\gamma\delta$ T Cells Shape Preimmune Peripheral B Cell Populations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 217–231 (2016).
116. Bansal, R. R., Mackay, C. R., Moser, B. & Eberl, M. IL-21 enhances the potential of human $\gamma\delta$ T cells to provide B-cell help. *Eur. J. Immunol.* **42**, 110–119 (2012).
117. Brandes, M. Professional Antigen-Presentation Function by Human $\gamma\delta$ T Cells. *Science* **309**, 264–268 (2005).
118. Muto, M., Baghdadi, M., Maekawa, R., Wada, H. & Seino, K. Myeloid molecular characteristics of human $\gamma\delta$ T cells support their acquisition of tumor antigen-presenting capacity. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 941–949 (2015).
119. Mao, C. *et al.* Tumor-Activated TCR $\gamma\delta$ + T Cells from Gastric Cancer Patients Induce the Antitumor Immune Response of TCR $\alpha\beta$ + T Cells via Their Antigen-Presenting Cell-Like Effects. *J. Immunol. Res.* **2014**, 1–10 (2014).
120. Van Acker, H. H., Anguille, S., Van Tendeloo, V. F. & Lion, E. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncolimmunology* **4**, e1021538 (2015).

121. Moser, B. & Eberl, M. $\gamma\delta$ T-APCs: a novel tool for immunotherapy? *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2443–2452 (2011).
122. Münz, C., Steinman, R. M. & Fujii, S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes. *J. Exp. Med.* **202**, 203–207 (2005).
123. Conti, L. *et al.* Reciprocal Activating Interaction Between Dendritic Cells and Pamidronate-Stimulated $\gamma\delta$ T Cells: Role of CD86 and Inflammatory Cytokines. *J. Immunol.* **174**, 252–260 (2005).
124. Devilder, M.-C. *et al.* Potentiation of Antigen-Stimulated V γ 9V δ 2 T Cell Cytokine Production by Immature Dendritic Cells (DC) and Reciprocal Effect on DC Maturation. *J. Immunol.* **176**, 1386–1393 (2006).
125. Maniar, A. *et al.* Human $\gamma\delta$ T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood* **116**, 1726–1733 (2010).
126. Caccamo, N. *et al.* Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human V γ 9V δ 2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1764–1772 (2005).
127. Caccamo, N. *et al.* CXCR5 Identifies a Subset of V γ 9V δ 2 T Cells which Secrete IL-4 and IL-10 and Help B Cells for Antibody Production. *J. Immunol.* **177**, 5290–5295 (2006).
128. Constant, P. *et al.* Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* **264**, 267–270 (1994).
129. Pfeffer, K. *et al.* A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V gamma 9+ human gamma delta T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **148**, 575–583 (1992).
130. Morita, C. T. *et al.* Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* **3**, 495–507 (1995).
131. Eric Espinosa. Activation et mode d'activation des lymphocytes T(gamma)9(delta)2 humains par les phosphoantigènes. (Université Paul Sabatier, 2002).
132. Tanaka, Y. *et al.* Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* **375**, 155–158 (1995).
133. Sebestyen, Z., Prinz, I., Déchanet-Merville, J., Silva-Santos, B. & Kuball, J. Translating gammadelta ($\gamma\delta$) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 169–184 (2020).
134. Nedellec, S., Bonneville, M. & Scotet, E. Human V γ 9V δ 2 T cells: From signals to functions. *Semin. Immunol.* **22**, 199–206 (2010).
135. Belmant, C., Decise, D. & Fournié, J.-J. Phosphoantigens and aminobisphosphonates: New leads targeting $\gamma\delta$ T lymphocytes for cancer immunotherapy. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **3**, 17–23 (2006).
136. Ali, Z. *et al.* Prolonged (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl Pyrophosphate-Driven Antimicrobial and Cytotoxic Responses of Pulmonary and Systemic V γ 2V δ 2 T Cells in Macaques. *J. Immunol.* **179**, 8287–8296 (2007).
137. Viey, E. *et al.* Phosphostim-Activated $\gamma\delta$ T Cells Kill Autologous Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J. Immunol.* **174**, 1338–1347 (2005).
138. Coppens, I. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 823–835 (2013).
139. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. & Sahm, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517–524 (1993).

140. Poupot, M. & Fournié, J.-J. Non-peptide antigens activating human V γ 9/V δ 2 T lymphocytes. *Immunol. Lett.* **95**, 129–138 (2004).
141. Gober, H.-J. *et al.* Human T Cell Receptor $\gamma\delta$ Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *J. Exp. Med.* **197**, 163–168 (2003).
142. Morita, C. T., Jin, C., Sarikonda, G. & Wang, H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol. Rev.* **215**, 59–76 (2007).
143. Bukowski, J. F., Morita, C. T. & Brenner, M. B. Human $\gamma\delta$ T Cells Recognize Alkylamines Derived from Microbes, Edible Plants, and Tea. *Immunity* **11**, 57–65 (1999).
144. Dhillon, S. & Lyseng-Williamson, K. A. Zoledronic Acid: A Review of its Use in the Management of Bone Metastases of Malignancy. *Drugs* **68**, 507–534 (2008).
145. Catros, V. *et al.* [T γ delta lymphocytes in oncology: unconventional killer lymphocytes]. *Med. Sci. MS* **26**, 185–191 (2010).
146. Thompson, K. & Rogers, M. J. Statins Prevent Bisphosphonate-Induced γ,δ -T-Cell Proliferation and Activation In Vitro. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 278–288 (2003).
147. Kunzmann, V. *et al.* Stimulation of γ delta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* **96**, 384–392 (2000).
148. Rust, C. J. J., Verreck, F., Vietor, H. & Koning, F. Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V γ 9 region. *Nature* **346**, 572–574 (1990).
149. Rust, C., Orsini, D., Kooy, Y. & Koning, F. Reactivity of Human γ delta T Cells to Staphylococcal Enterotoxins: a Restricted Reaction Pattern mediated by Two Distinct Recognition Pathways. *Scand. J. Immunol.* **38**, 89–94 (1993).
150. Kalyan, S. & Chow, A. W. Human Peripheral $\gamma\delta$ T Cells Potentiate the Early Proinflammatory Cytokine Response to Staphylococcal Toxic Shock Syndrome Toxin–1. *J. Infect. Dis.* **189**, 1892–1896 (2004).
151. Marcu-Malina, V. *et al.* Redirecting $\alpha\beta$ T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Blood* **118**, 50–59 (2011).
152. Lang, F. *et al.* Early activation of human V γ 9V δ 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 5986–5994 (1995).
153. Fisch, P. *et al.* Recognition by human V γ 9/V δ 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* **250**, 1269–1273 (1990).
154. Martinet, L. *et al.* A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* **39**, 752–762 (2009).
155. Arnett, H. A. & Viney, J. L. Immune modulation by butyrophilins. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 559–569 (2014).
156. Compte, E., Pontarotti, P., Collette, Y., Lopez, M. & Olive, D. Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2089–2099 (2004).
157. Kabelitz, D. CD277 takes the lead in human $\gamma\delta$ T-cell activation. *Blood* **120**, 2159–2161 (2012).
158. Harly, C. *et al.* Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood* **120**, 2269–2279 (2012).

159. Gu, S., Nawrocka, W. & Adams, E. J. Sensing of Pyrophosphate Metabolites by V γ 9V δ 2 T Cells. *Front. Immunol.* **5**, (2015).
160. Vavassori, S. *et al.* Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 908–916 (2013).
161. Salim, M. *et al.* BTN3A1 Discriminates $\gamma\delta$ T Cell Phosphoantigens from Nonantigenic Small Molecules *via* a Conformational Sensor in Its B30.2 Domain. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2631–2643 (2017).
162. Gu, S. *et al.* Phosphoantigen-induced conformational change of butyrophilin 3A1 (BTN3A1) and its implication on V γ 9V δ 2 T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E7311–E7320 (2017).
163. Riaño, F. *et al.* V γ 9V δ 2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (*BTN3A1*) and additional genes on human chromosome 6: Antigen processing. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2571–2576 (2014).
164. Rigau, M. *et al.* Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells. *Science* **367**, eaay5516 (2020).
165. Karunakaran, M. M. *et al.* Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity* **52**, 487-498.e6 (2020).
166. Vyborova, A. *et al.* $\gamma\delta$ 2T cell diversity and the receptor interface with tumor cells. *J. Clin. Invest.* (2020) doi:10.1172/JCI132489.
167. Scotet, E. *et al.* Tumor recognition following V γ 9V δ 2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* **22**, 71–80 (2005).
168. Mookerjee-Basu, J. *et al.* F1-Adenosine Triphosphatase Displays Properties Characteristic of an Antigen Presentation Molecule for V γ 9V δ 2 T Cells. *J. Immunol.* **184**, 6920–6928 (2010).
169. Castella, B. *et al.* The ATP-binding cassette transporter A1 regulates phosphoantigen release and V γ 9V δ 2 T cell activation by dendritic cells. *Nat. Commun.* **8**, 15663 (2017).
170. Rhodes, D. A. *et al.* Regulation of Human $\gamma\delta$ T Cells by BTN3A1 Protein Stability and. *Front. Immunol.* **9**, 662 (2018).
171. Sebestyen, Z. *et al.* RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by V γ 9V δ 2 T Cell Receptor. *Cell Rep.* **15**, 1973–1985 (2016).
172. Rhodes, D. A. *et al.* Activation of human $\gamma\delta$ T cells by cytosolic interactions of BTN3A1 with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor periplakin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 2390–2398 (2015).
173. Rubio, G., Aramburu, J., Ontañón, J., López-Botet, M. & Aparicio, P. A novel functional cell surface dimer (kp43) serves as accessory molecule for the activation of a subset of human $\gamma\delta$ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **151**, 1312–1321 (1993).
174. Kong, Y. *et al.* The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR $\gamma\delta$ and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR $\gamma\delta$ and NKG2D. *Blood* **114**, 310–317 (2009).
175. Ribeiro, S. T., Ribot, J. C. & Silva-Santos, B. Five Layers of Receptor Signaling in $\gamma\delta$ T-Cell Differentiation and Activation. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
176. Wrobel, P. *et al.* Lysis of a Broad Range of Epithelial Tumour Cells by Human $\gamma\delta$ T Cells: Involvement of NKG2D ligands and T-cell Receptor- versus NKG2D-dependent Recognition. *Scand. J. Immunol.* **66**, 320–328 (2007).
177. Gundermann, S. *et al.* A Comprehensive Analysis of Primary Acute Myeloid Leukemia Identifies Biomarkers Predicting Susceptibility to Human Allogeneic V γ 9V δ 2 T Cells: *J. Immunother.* **37**, 321–330 (2014).

178. Corvaisier, M. *et al.* V γ 9V δ 2 T Cell Response to Colon Carcinoma Cells. *J. Immunol.* **175**, 5481–5488 (2005).
179. Poccia, F. *et al.* CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **159**, 6009–6017 (1997).
180. Angelini, D. F. *et al.* NKG2A inhibits NKG2C effector functions of $\gamma\delta$ T cells: implications in health and disease. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 75–84 (2011).
181. Boullier, S. *et al.* Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94- peripheral Vgamma9 Vdelta2 T cells but not on CD94- thymic or mature gammadelta T cell clones. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3399–3410 (1998).
182. Lesport, E. *et al.* Inhibition of human V γ 9V δ 2 T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3385–3399 (2011).
183. Trichet, V. *et al.* Complex Interplay of Activating and Inhibitory Signals Received by V γ 9V δ 2 T Cells Revealed by Target Cell β_2 -Microglobulin Knockdown. *J. Immunol.* **177**, 6129–6136 (2006).
184. Wesch, D. *et al.* Direct Costimulatory Effect of TLR3 Ligand Poly(I:C) on Human $\gamma\delta$ T Lymphocytes. *J. Immunol.* **176**, 1348–1354 (2006).
185. Deetz, C. O. *et al.* Gamma Interferon Secretion by Human V γ 2V δ 2 T Cells after Stimulation with Antibody against the T-Cell Receptor plus the Toll-Like Receptor 2 Agonist Pam3Cys. *Infect. Immun.* **74**, 4505–4511 (2006).
186. Serrano, R., Wesch, D. & Kabelitz, D. Activation of Human $\gamma\delta$ T Cells: Modulation by Toll-Like Receptor 8 Ligands and Role of Monocytes. *Cells* **9**, 713 (2020).
187. Wesch, D., Peters, C., Oberg, H.-H., Pietschmann, K. & Kabelitz, D. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2357–2370 (2011).
188. Treisman, J. *et al.* Interleukin-2-transduced lymphocytes grow in an autocrine fashion and remain responsive to antigen. *Blood* **85**, 139–145 (1995).
189. Espinosa, E. *et al.* Chemical Synthesis and Biological Activity of Bromohydrin Pyrophosphate, a Potent Stimulator of Human $\gamma\delta$ T Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 18337–18344 (2001).
190. Baccala, R. *et al.* $\gamma\delta$ T Cell Homeostasis Is Controlled by IL-7 and IL-15 Together with Subset-Specific Factors. *J. Immunol.* **174**, 4606–4612 (2005).
191. Zeng, R. *et al.* Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* **201**, 139–148 (2005).
192. Barjon, C. *et al.* IL-21 promotes the development of a CD73-positive Vgamma9Vdelta2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology* **7**, e1379642 (2017).
193. Duault, C. *et al.* TCRV γ 9 $\gamma\delta$ T Cell Response to IL-33: A CD4 T Cell-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **196**, 493–502 (2016).
194. Duault, C. *et al.* IL-33-expanded human V γ 9V δ 2 T cells have anti-lymphoma effect in a mouse tumor model. *Eur. J. Immunol.* **47**, 2137–2141 (2017).
195. Bromley, S. K. *et al.* The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 375–396 (2001).
196. Uchida, R. *et al.* $\gamma\delta$ T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 613–618 (2007).
197. Wang, P. & Malkovsky, M. Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human V gamma 9/V delta 2 T cells. *Mol. Med. Camb. Mass* **6**, 196–207 (2000).

198. Kato, Y., Tanaka, Y., Hayashi, M., Okawa, K. & Minato, N. Involvement of CD166 in the Activation of Human $\gamma\delta$ T Cells by Tumor Cells Sensitized with Nonpeptide Antigens. *J. Immunol.* **177**, 877–884 (2006).
199. Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 299–308 (2008).
200. Kenna, T. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin. Immunol.* **113**, 56–63 (2004).
201. Capietto, A.-H., Martinet, L. & Fournié, J.-J. Stimulated $\gamma\delta$ T Cells Increase the In Vivo Efficacy of Trastuzumab in HER-2⁺ Breast Cancer. *J. Immunol.* **187**, 1031–1038 (2011).
202. Dieli, F. *et al.* Targeting Human T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res.* **67**, 7450–7457 (2007).
203. Lang, J. M. *et al.* Pilot trial of interleukin-2 and zoledronic acid to augment $\gamma\delta$ T cells as treatment for patients with refractory renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 1447–1460 (2011).
204. Fournié, J.-J. *et al.* What lessons can be learned from $\gamma\delta$ T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell. Mol. Immunol.* **10**, 35–41 (2013).
205. Zou, C. *et al.* $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Oncotarget* **8**, 8900–8909 (2017).
206. Wilhelm, M. *et al.* $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* **102**, 200–206 (2003).
207. Bennouna, J. *et al.* Phase I study of bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, IPH 1101), a V γ 9V δ 2 T lymphocyte agonist in patients with solid tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 1521–1530 (2010).
208. Brégeon, D. *et al.* Synthesis of phosphoantigens: Scalable accesses to enantiomers of BrHPP and studies on N-HDMAPP synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5807–5810 (2012).
209. Kobayashi, H. *et al.* Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 469–476 (2007).
210. Cui, J. *et al.* Combination of radiofrequency ablation and sequential cellular immunotherapy improves progression-free survival for patients with hepatocellular carcinoma: Radiofrequency Ablation with Cellular Immunotherapy for HCC. *Int. J. Cancer* **134**, 342–351 (2014).
211. Märten, A., von Lilienfeld-Toal, M., Büchler, M. W. & Schmidt, J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity. *Int. J. Cancer* **119**, 2359–2365 (2006).
212. Lo Presti, E. *et al.* Squamous Cell Tumors Recruit $\gamma\delta$ T Cells Producing either IL17 or IFN γ Depending on the Tumor Stage. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 397–407 (2017).
213. Wang, X. *et al.* IL-36 γ Transforms the Tumor Microenvironment and Promotes Type 1 Lymphocyte-Mediated Antitumor Immune Responses. *Cancer Cell* **28**, 296–306 (2015).
214. Gründer, C. *et al.* γ 9 and δ 2CDR3 domains regulate functional avidity of T cells harboring γ 9 δ 2TCRs. *Blood* **120**, 5153–5162 (2012).
215. Scheper, W., Sebestyen, Z. & Kuball, J. Cancer Immunotherapy Using $\gamma\delta$ T Cells: Dealing with Diversity. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
216. Scheper, W., Gründer, C. & Kuball, J. Multifunctional $\gamma\delta$ T cells and their receptors for targeted anticancer immunotherapy. *Oncolimmunology* **2**, e23974 (2013).

217. de Bruin, R. C. G. *et al.* A bispecific nanobody approach to leverage the potent and widely applicable tumor cytolytic capacity of V γ 9V δ 2-T cells. *Oncolmmunology* **7**, e1375641 (2018).
218. Lamb, L. S. *et al.* Engineered Drug Resistant $\gamma\delta$ T Cells Kill Glioblastoma Cell Lines during a Chemotherapy Challenge: A Strategy for Combining Chemo- and Immunotherapy. *PLoS ONE* **8**, e51805 (2013).
219. Correia, D. V. *et al.* Differentiation of human peripheral blood V δ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood* **118**, 992–1001 (2011).
220. Almeida, A. R. *et al.* Delta One T Cells for Immunotherapy of Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical-Grade Expansion/Differentiation and Preclinical Proof of Concept. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5795–5804 (2016).
221. Capsomidis, A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation. *Mol. Ther.* **26**, 354–365 (2018).
222. Fisher, J. & Anderson, J. Engineering Approaches in Human Gamma Delta T Cells for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **9**, 1409 (2018).
223. Li, Y., Hermanson, D. L., Moriarity, B. S. & Kaufman, D. S. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell* **23**, 181-192.e5 (2018).
224. de Witte, M. A. *et al.* Early Reconstitution of NK and $\gamma\delta$ T Cells and Its Implication for the Design of Post-Transplant Immunotherapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **24**, 1152–1162 (2018).
225. Hartmann, J., Schüßler-Lenz, M., Bondanza, A. & Buchholz, C. J. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1183–1197 (2017).
226. Straetemans, T. *et al.* GMP-Grade Manufacturing of T Cells Engineered to Express a Defined gammadeltaTCR. *Front. Immunol.* **9**, 1062 (2018).
227. Bouchie, A., DeFrancesco, L., Sheridan, C. & Webb, S. Nature Biotechnology's academic spinouts of 2016. *Nat. Biotechnol.* **35**, 322–333 (2017).
228. Scheper, W., Gründer, C., Straetemans, T., Sebestyen, Z. & Kuball, J. Hunting for clinical translation with innate-like immune cells and their receptors. *Leukemia* **28**, 1181–1190 (2014).
229. Braham, M. V. J. *et al.* Cellular immunotherapy on primary multiple myeloma expanded in a 3D bone marrow niche model. *Oncolmmunology* **7**, e1434465 (2018).
230. Netherlands Trial Register 2017.
231. Linette, G. P. *et al.* Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* **122**, 863–871 (2013).
232. Rossi, C. *et al.* Boosting $\gamma\delta$ T cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by PD-1 blockade in follicular lymphoma. *Oncolmmunology* **8**, 1554175 (2019).
233. Li, Z. *et al.* Immune checkpoint proteins PD-1 and TIM-3 are both highly expressed in liver tissues and correlate with their gene polymorphisms in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma: *Medicine (Baltimore)* **95**, e5749 (2016).
234. He, Y. *et al.* LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J. Thorac. Oncol.* **12**, 814–823 (2017).
235. Lines, J. L. *et al.* VISTA Is an Immune Checkpoint Molecule for Human T Cells. *Cancer Res.* **74**, 1924–1932 (2014).

236. Du, S.-H. *et al.* Co-Expansion of Cytokine-Induced Killer Cells and V γ 9V δ 2 T Cells for CAR T-Cell Therapy. *PLOS ONE* **11**, e0161820 (2016).
237. Chen, H. *et al.* Synergistic targeting of breast cancer stem-like cells by human $\gamma\delta$ T cells and CD8⁺ T cells. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 620–629 (2017).
238. Laplagne, C. *et al.* V γ 9V δ 2 T Cells Activation Through Phosphoantigens Can Be Impaired by a RHOB Rerouting in Lung Cancer. *Front. Immunol.* **11**, 1396 (2020).
239. Izumi, H. *et al.* Acute-phase reaction induced by zoledronate and its effect on prognosis of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **122**, 200–205 (2018).
240. Kakimi, K., Matsushita, H., Murakawa, T. & Nakajima, J. $\gamma\delta$ T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **3**, 23–33 (2014).
241. Ju, J. & Gilkes, D. RhoB: Team Oncogene or Team Tumor Suppressor? *Genes* **9**, 67 (2018).
242. Schaefer, A., Reinhard, N. R. & Hordijk, P. L. Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases* **5**, e968004 (2014).
243. Adamson, P., Marshall, C. J., Hall, A. & Tilbrook, P. A. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 20033–20038 (1992).
244. Baron, R. *et al.* RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: Evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 11626–11631 (2000).
245. Allal, C., Pradines, A., Hamilton, A. D., Sebti, S. M. & Favre, G. Farnesylated RhoB Prevents Cell Cycle Arrest and Actin Cytoskeleton Disruption Caused by the Geranylgeranyltransferase I Inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle* **1**, 430–437 (2002).
246. Lebowitz, P. F., Casey, P. J., Prendergast, G. C. & Thissen, J. A. Farnesyltransferase Inhibitors Alter the Prenylation and Growth-stimulating Function of RhoB. *J. Biol. Chem.* **272**, 15591–15594 (1997).
247. Adamson, P., Paterson, H. F. & Hall, A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J. Cell Biol.* **119**, 617–627 (1992).
248. Michaelson, D. *et al.* Differential Localization of Rho Gtpases in Live Cells. *J. Cell Biol.* **152**, 111–126 (2001).
249. Vega, F. M. & Ridley, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* **582**, 2093–2101 (2008).
250. Gerald, D. *et al.* RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription. *Nat. Commun.* **4**, 2824 (2013).
251. Wherlock, M. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J. Cell Sci.* **117**, 3221–3231 (2004).
252. Zalzman, G. *et al.* Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* **10**, 1935–1945 (1995).
253. Pérez-Sala, D., Boya, P., Ramos, I., Herrera, M. & Stamatakis, K. The C-Terminal Sequence of RhoB Directs Protein Degradation through an Endo-Lysosomal Pathway. *PLoS ONE* **4**, e8117 (2009).
254. Valero, R. A. *et al.* Structural Determinants Allowing Endolysosomal Sorting and Degradation of Endosomal GTPases. *Traffic* **11**, 1221–1233 (2010).
255. Zaoui, K., Rajadurai, C. V., Duhamel, S. & Park, M. Arf6 regulates RhoB subcellular localization to control cancer cell invasion. *J. Cell Biol.* **218**, 3812–3826 (2019).

256. Arthur, W. T., Ellerbroek, S. M., Der, C. J., Burridge, K. & Wennerberg, K. XPLN, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for RhoA and RhoB, But Not RhoC. *J. Biol. Chem.* **277**, 42964–42972 (2002).
257. Hamel, B. *et al.* SmgGDS Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor That Specifically Activates RhoA and RhoC. *J. Biol. Chem.* **286**, 12141–12148 (2011).
258. Zalzman, G. *et al.* RhoGDI-3 Is a New GDP Dissociation Inhibitor (GDI): identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J. Biol. Chem.* **271**, 30366–30374 (1996).
259. Wang, M. *et al.* ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nat. Commun.* **5**, 4901 (2014).
260. Xu, J. *et al.* The Neddylation-Cullin 2-RBX1 E3 Ligase Axis Targets Tumor Suppressor RhoB for Degradation in Liver Cancer. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 499–509 (2015).
261. Huang, M. & Prendergast, G. C. RhoB in cancer suppression. *Histol. Histopathol.* **21**, 213–218 (2006).
262. Srougi, M. C. & Burridge, K. The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS One* **6**, e17108 (2011).
263. Liu, M. *et al.* miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett.* **585**, 2998–3005 (2011).
264. Tan, Y. *et al.* Sp1-driven up-regulation of miR-19a decreases RHOB and promotes pancreatic cancer. *Oncotarget* **6**, 17391–17403 (2015).
265. Tillement, V. *et al.* Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp. Cell Res.* **314**, 2811–2821 (2008).
266. Ballif, B. A., Carey, G. R., Sunyaev, S. R. & Gygi, S. P. Large-Scale Identification and Evolution Indexing of Tyrosine Phosphorylation Sites from Murine Brain. *J. Proteome Res.* **7**, 311–318 (2008).
267. Schmidt, M. *et al.* Specific inhibition of phorbol ester-stimulated phospholipase D by *Clostridium sordellii* lethal toxin and *Clostridium difficile* toxin B-1470 in HEK-293 cells. Restoration by Ral GTPases. *J. Biol. Chem.* **273**, 7413–7422 (1998).
268. Benard, V. & Bokoch, G. M. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol.* **345**, 349–359 (2002).
269. Chuang, T. H., Xu, X., Quilliam, L. A. & Bokoch, G. M. SmgGDS stabilizes nucleotide-bound and -free forms of the Rac1 GTP-binding protein and stimulates GTP/GDP exchange through a substituted enzyme mechanism. *Biochem. J.* **303 (Pt 3)**, 761–767 (1994).
270. Ellenbroek, S. I. J. & Collard, J. G. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 657–672 (2007).
271. Cabantous, S., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **23**, 102–107 (2005).
272. Cabantous, S. & Waldo, G. S. In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP. *Nat. Methods* **3**, 845–854 (2006).
273. Cabantous, S. *et al.* A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci. Rep.* **3**, 2854 (2013).
274. Koraïchi, F. *et al.* High-content tripartite split-GFP cell-based assays to screen for modulators of small GTPase activation. *J. Cell Sci.* **131**, (2018).

275. Prendergast, G. C. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 162–168 (2001).
276. Prendergast, G. C. *et al.* Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* **10**, 2289–2296 (1995).
277. Du, W., Lebowitz, P. F. & Prendergast, G. C. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1831–1840 (1999).
278. Liu Ax, null, Cerniglia, G. J., Bernhard, E. J. & Prendergast, G. C. RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6192–6197 (2001).
279. Liu, A. x, Du, W., Liu, J. P., Jessell, T. M. & Prendergast, G. C. RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6105–6113 (2000).
280. Luis-Ravelo, D. *et al.* RHOB influences lung adenocarcinoma metastasis and resistance in a host-sensitive manner. *Mol. Oncol.* **8**, 196–206 (2014).
281. Calvayrac, O. *et al.* The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Mol. Med.* **9**, 238–250 (2017).
282. Sato, N. *et al.* RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int. J. Cancer* **120**, 543–551 (2007).
283. Mazieres, J. *et al.* Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 2742–2750 (2004).
284. Calvayrac, O. *et al.* RhoB determines tumor aggressiveness in a murine EGFR^{L858R}-induced adenocarcinoma model and is a potential prognostic biomarker for Lepidic lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 6541–6550 (2014).
285. Tybulewicz, V. L. J. & Henderson, R. B. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 630–644 (2009).
286. Liu, S. *et al.* RhoB induces the production of proinflammatory cytokines in TLR-triggered macrophages. *Mol. Immunol.* **87**, 200–206 (2017).
287. Kamon, H. *et al.* TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J.* **25**, 4108–4119 (2006).
288. Galandrini, R., Henning, S. W. & Cantrell, D. A. Different functions of the GTPase Rho in prothymocytes and late pre-T cells. *Immunity* **7**, 163–174 (1997).
289. Henning, S. W., Galandrini, R., Hall, A. & Cantrell, D. A. The GTPase Rho has a critical regulatory role in thymus development. *EMBO J.* **16**, 2397–2407 (1997).
290. Verschueren, H. *et al.* ADP-ribosylation of Rho-proteins with botulinum C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* **73**, 182–187 (1997).
291. Vielkind, S., Gallagher-Gambarelli, M., Gomez, M., Hinton, H. J. & Cantrell, D. A. Integrin regulation by RhoA in thymocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 350–357 (2005).
292. Belmont, C. *et al.* A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human δ T cells. *FASEB J.* **14**, 1669–1670 (2000).
293. Gan, Y. H., Lui, S. S. & Malkovsky, M. Differential susceptibility of naïve and activated human gammadelta T cells to activation-induced cell death by T-cell receptor cross-linking. *Mol. Med. Camb. Mass* **7**, 636–643 (2001).

Bibliographie

294. Poupot. Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **37**, (2010).
295. Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., van Driel, R. & Aten, J. A. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* **103 (Pt 3)**, 857–862 (1992).
296. Ocana-Morgner, C., Wahren, C. & Jessberger, R. SWAP-70 regulates RhoA/RhoB-dependent MHCII surface localization in dendritic cells. *Blood* **113**, 1474–1482 (2009).
297. Nakamura, K. *et al.* Fratricide of natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9421–9426 (2013).
298. Su, M. W., Walden, P. R., Golan, D. B. & Eisen, H. N. Cognate peptide-induced destruction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes is due to fratricide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **151**, 658–667 (1993).

ANNEXE

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons publié en 2019 une revue dans *International Journal of Molecular Sciences* à propos des dernières avancées pour le ciblage du micro-environnement tumoral pour entraîner la suppression de la tumeur.





International Journal of
Molecular Sciences



Review

Latest Advances in Targeting the Tumor Microenvironment for Tumor Suppression

Chloé Laplagne ^{1,2,3}, Marcin Domagala ^{1,2,3}, Augustin Le Naour ^{1,2,4}, Christophe Quemerais ^{1,2,3}, Dimitri Hamel ^{2,5}, Jean-Jacques Fournié ^{1,2,3}, Bettina Couderc ^{1,2,4} , Corinne Bousquet ^{1,2,3} , Audrey Ferrand ^{2,5} and Mary Poupot ^{1,2,3,*}

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Inserm UMR1037, 31037 Toulouse, France; chloe.laplagne@inserm.fr (C.L.); marcin.domagala@inserm.fr (M.D.); augustin.lenaour@inserm.fr (A.L.N.); christophe.quemerais@inserm.fr (C.Q.); jean-jacques.fournie@inserm.fr (J.-J.F.); bettina.couderc@inserm.fr (B.C.); corinne.bousquet@inserm.fr (C.B.)

² Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31400 Toulouse, France; dimitri.hamel@inserm.fr (D.H.); audrey.ferrand@inserm.fr (A.F.)

³ ERL 5294 CNRS, 31037 Toulouse, France

⁴ Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, 31000 Toulouse, France

⁵ Institut de Recherche en Santé Digestive, Inserm U1220, INRA, ENVT, 31024 Toulouse, France

* Correspondence: mary.poupot@inserm.fr



Received: 29 July 2019; Accepted: 19 September 2019; Published: 23 September 2019





Review

Latest Advances in Targeting the Tumor Microenvironment for Tumor Suppression

Chloé Laplagne^{1,2,3}, Marcin Domagala^{1,2,3}, Augustin Le Naour^{1,2,4}, Christophe Quémerais^{1,2,3}, Dimitri Hamel^{2,5}, Jean-Jacques Fournié^{1,2,3}, Bettina Couderc^{1,2,4} , Corinne Bousquet^{1,2,3} , Audrey Ferrand^{2,5} and Mary Poupot^{1,2,3,*}

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Inserm UMR1037, 31037 Toulouse, France; chloe.laplagne@inserm.fr (C.L.); marcin.domagala@inserm.fr (M.D.); augustin.lenaour@inserm.fr (A.L.N.); christophe.quemerais@inserm.fr (C.Q.); jean-jacques.fournie@inserm.fr (J.-J.F.); bettina.couderc@inserm.fr (B.C.); corinne.bousquet@inserm.fr (C.B.)

² Université Toulouse III Paul-Sabatier, 31400 Toulouse, France; dimitri.hamel@inserm.fr (D.H.); audrey.ferrand@inserm.fr (A.F.)

³ ERL 5294 CNRS, 31037 Toulouse, France

⁴ Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, 31000 Toulouse, France

⁵ Institut de Recherche en Santé Digestive, Inserm U1220, INRA, ENVT, 31024 Toulouse, France

* Correspondence: mary.poupot@inserm.fr

Received: 29 July 2019; Accepted: 19 September 2019; Published: 23 September 2019



Abstract: The tumor bulk is composed of a highly heterogeneous population of cancer cells, as well as a large variety of resident and infiltrating host cells, extracellular matrix proteins, and secreted proteins, collectively known as the tumor microenvironment (TME). The TME is essential for driving tumor development by promoting cancer cell survival, migration, metastasis, chemoresistance, and the ability to evade the immune system responses. Therapeutically targeting tumor-associated macrophages (TAMs), cancer-associated fibroblasts (CAFs), regulatory T-cells (T-regs), and mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) is likely to have an impact in cancer treatment. In this review, we focus on describing the normal physiological functions of each of these cell types and their behavior in the cancer setting. Relying on the specific surface markers and secreted molecules in this context, we review the potential targeting of these cells inducing their depletion, reprogramming, or differentiation, or inhibiting their pro-tumor functions or recruitment. Different approaches were developed for this targeting, namely, immunotherapies, vaccines, small interfering RNA, or small molecules.

Keywords: tumor microenvironment; resistance; TAMs; CAFs; T-regs; MSCs

1. Introduction

Resistance to cancer treatment is not only related to intrinsic properties of tumor cells but also to other cellular or acellular parameters of the tumor microenvironment (TME) [1]. In general, the TME is a highly heterogeneous and dynamic network, composed of normal and cancerous tissue-resident cells, a large proportion of recruited immune cells, and extracellular matrix components. After the initial state of the tumor, the TME (in particular, the immune TME) is modified to support and promote the tumor development while suppressing immune cell-mediated cytotoxicity [2]. The cellular composition of the TME is highly variable and could include almost all immune cell types such as CD8, CD4, and $\gamma\delta$ T-lymphocytes, macrophages, natural killer (NK) cells, dendritic cells (DC), B-cells, and mast cells, as well as fibroblasts, neuroendocrine cells, adipose cells, endothelial cells, and mesenchymal cells [3]. All these cells, including tumor cells, take part in the tumor progression by promoting tumor growth, tumor dormancy, tumor invasion, and metastasis [4,5]. Tumor cells are able to release pro-tumor

factors directly or indirectly by inducing hypoxia or necrosis, and by modifying other actors of the TME in its favor. Tumor-infiltrating immune cells (T-cells and macrophages), fibroblasts, and mesenchymal cells drive tumor progression. Depending on the tumor type, infiltrated immune cells can be found in variable proportions and display heterogeneous phenotypes with either pro- or anti-inflammatory properties [6]. In the latter case, despite their dual role in cancer, regulatory T-cells (T-regs) are a subset of immunosuppressive infiltrated T-cells mostly involved in the immune escape [7]. Tumor-associated macrophages (TAMs) or cancer-associated fibroblasts (CAFs) can also produce a favorable environment for cancer cells, as well as mesenchymal stromal/stem cells (MSCs), as shown in Figure 1.

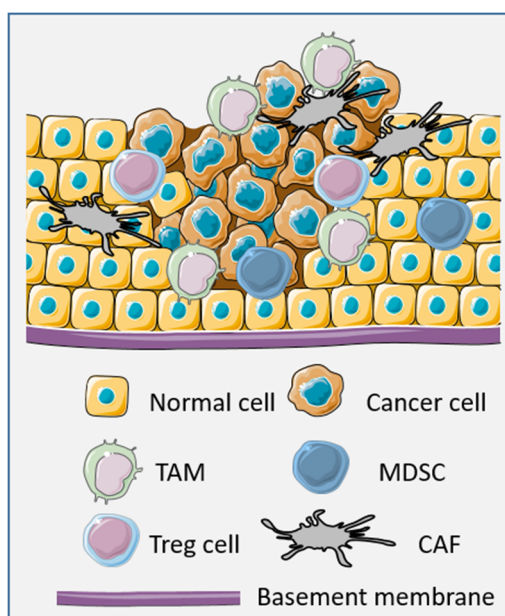


Figure 1. Representation of the tumor microenvironment (TME) with tumor-associated macrophages (TAMs), mesenchymal stromal/stem cells (MSCs), regulatory T-cells (T-regs), and cancer-associated fibroblasts (CAFs) infiltrating the tumor.

These cells are considered as targets in cancer in order to improve classical therapies or to find new strategies to reverse treatment resistance. In this review, we focus on the latest advances in targeting of TAMs, T-regs, MSCs, and CAFs which could provide new therapeutic approaches in cancer.

2. TAMs

2.1. Overview on Normal Macrophages and Their Physiological Functions

In normal tissue, resident macrophages have site-specific phenotypes, for example, microglia in the brain, Kupffer cells in the liver, alveolar macrophages in the lung, and peritoneal macrophages in the gut. These tissue-resident macrophages likely arise from embryonic precursors and are maintained by self-renewal [8]. However, all these macrophages display a common and principal role in maintaining steady-state homeostasis [9]. On the other hand, monocytes from the blood are recruited and transformed into mature macrophages in specific tissues, in response to cytokines and chemokines released during inflammation. Depending on the microenvironment, macrophages are differentiated into either classical activated (M1/Th1-activated) macrophages or into alternatively activated (M2/Th2-activated) macrophages [10].

M1 macrophages display pro-inflammatory properties involved in the resolution of infections and exert anti-tumor activities. Indeed, macrophages recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as lipopolysaccharides through Toll-like receptors (TLRs) at their surface, activating transcription factors (e.g., interferon regulatory factors and nuclear factor kappa B) and initiating

the inflammatory response [11]. These M1-oriented macrophages, which could also be induced by cytokines secreted by other Th1 cells (e.g., IFN- γ), release pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, and TNF- α) and type-1 cell-attracting chemokines (e.g., CXCL9 and CXCL10), favoring the recruitment of more macrophages and leucocytes to eliminate pathogens, characterized by the production of cytotoxic nitric oxide (NO) derived from the metabolism of arginine by inducible nitric oxide synthase (iNOS) [12]. There are no characteristic receptors at the surface of M1 macrophages, but they express CD16, CD86, CD80, IL-1RI, major histocompatibility complex class II (MHC-II), TLR2, and TLR4.

On the contrary, M2-oriented macrophages are involved in the wound-healing process and allergies, and they display pro-tumor activities [10,13]. M2 polarization is induced by the release of IL-4, IL-13, or IL-10 by damaged cells, resulting in activation of the STAT6 transcription factor through the JAK-STAT pathway [14]. M2 macrophages are characterized by many specific receptors, e.g., IL-1R II, the scavenging receptor I (CD204), the mannose receptor (CD206), and the hemoglobin scavenger receptor (CD163) [15]. These cells produce large amounts of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and chemokines such as CCL17, CCL22 and CCL24 [12,16]. However, all these macrophages are never in a completely blocked phenotype due to their plasticity and ability to switch between phenotypes depending on microenvironment cues. Wound sites can also be sensitive to pathogen attacks, and both macrophage types exist within this type of environment, essential for wound resolution [17].

2.2. Tumor-Associated Macrophages

Within tumors, macrophages can be in between or off the spectrum of the M1/M2 states depending on the tumor stage [18]. These TAMs can be derived from resident macrophages [19] or attracted from bone marrow and spleen to the tumor site thanks to the CCL2 (MCP-1) and CCL5 (RANTES) chemokines produced by the tumors, fibroblasts, endothelial cells, and even by the TAMs themselves [20]. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) is also a monocyte/macrophage attractant, as well as a macrophage survival and polarization signal, which is highly important in tumors [21]. Early in tumor development, M1 macrophages are able to kill and remove tumor cells, and to produce cytokines for the recruitment and activation of other immune effector cells [22]. Nevertheless, the evolution of the TME, depending on the stage of the tumor and on the type of cancer, can revert this anti-tumor program and favor a switch of infiltrated macrophages into an M2 phenotype with pro-tumor and immune-suppressive functions [23]. Pro-tumor functions of TAMs are the result of a macrophage polarization with a particular cytokine profile (macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), IL-4, IL-13, IL-10, Prostaglandin E2 (PGE2)) of the TME [24]. However, chemokines and signals in the TME originating from tumor cells, B-cells, and stromal cells (e.g., CSFs, TGF- β , IL-1) can deviate macrophage functions and phenotype, astray from the classical M1/M2 polarized cells. However, in general, TAMs stimulate tumor cell proliferation, migration, and genetic instability, and can protect them from apoptosis or therapy. TAMs are, thus, able to promote tumor development at primary sites, invasion, metastasis, angiogenesis, and lymphangiogenesis [25]. These cells express at their surface the scavenger receptor, CD163, and the mannose receptor, CD206, and also have immunosuppressive functions neutralizing recruitment and functions of cytotoxic CD8 T-cells and natural killer cells through the secretion of IL-10 and TGF- β in the TME [26,27]. TAMs also represent a strong source of iron, which is essential to tumor development [28]. Interestingly, several meta-analyses of more than 55 studies of different cancers showed that high infiltration of TAMs correlated with poor overall survival in the majority of cancers, indicating that infiltrating TAMs preferentially display a pro-tumor phenotype [29]. Through their pro-tumor functions, TAMs are also able to promote the recovery of tumors in mouse models following chemotherapies, radiotherapies, or immunotherapies [30].

For all these reasons, TAMs are good candidates to target in TME, and several therapy strategies modulating TAM functions, infiltration, and number are emerging. Figure 2 summarizes the different drugs targeting TAMs addressed in this review.

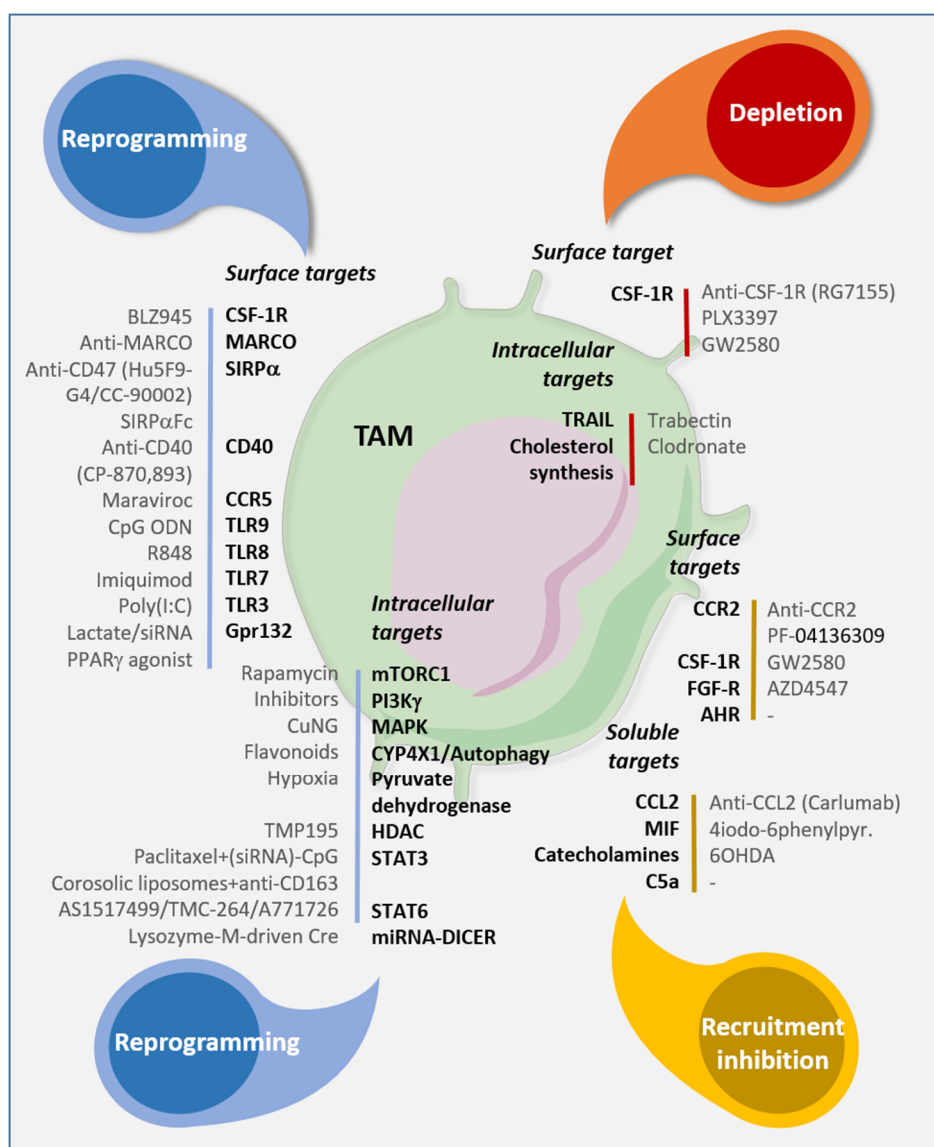


Figure 2. Targeting strategies to reprogram, eliminate, and inhibit TAM recruitment. Antibodies or molecules available to target surface, intracellular or soluble molecules involved in the phenotype, functions, and recruitment of TAMs in the TME (as outlined in the text).

2.3. TAM Targeting

2.3.1. Differentiation and Depletion

TAMs can be depleted by blocking CSF-1 receptor (CSF-1R), a tyrosine kinase receptor whose binding with CSF-1 or IL-34 leads to a signaling cascade promoting proliferation, function, and survival of macrophages [31]. Several antagonists and antibodies to CSF-1R were developed for the therapeutic modulation of infiltrating TAMs and tested in preclinical models. In a preclinical breast cancer model, anti-mouse CSF-1R antibodies were shown to deplete macrophages and to reduce tumor size [32]. Treatment with RG7155, a humanized monoclonal antibody, was associated with a reduction in tumor-infiltrating TAMs and an increase in infiltration of effector T-cells in a fibrosarcoma mouse model, as well as in colorectal cancer and cancer patients with advanced tenosynovial giant cell tumors [31].

Alongside antibodies blocking CSF-1R, small-molecule antagonists to CSF-1R, capable of penetrating the blood–brain barrier, were been developed. For example, PLX3397 (pexidartinib) was associated with a reduction in the number of tumor-associated microglia and glioblastoma

invasions in glioma mouse models [33]. In an ovarian cancer model, GW2580 induced a reduction of ascite volume and a decrease in the number of infiltrating macrophages [34]. In a phase II clinical trial, patients with recurrent glioblastoma displayed a good tolerance to GW2580, but only 8% of 37 patients showed a six-month progression-free survival [35].

To enhance the potential of these inhibitors, combination strategies with conventional chemotherapy were proposed. The efficacy of paclitaxel in a mammary adenocarcinoma mouse model was enhanced by the blockade of CSF-1R/CSF-1, with paclitaxel upregulating the production of CSF-1 [36]. However, a recent phase I study using a combination of a monoclonal anti-CSF-1R with paclitaxel in patients with advanced and metastatic solid tumors revealed TAM depletion but no clinically relevant anti-tumor activity [37]. In the case of gemcitabine, its activity was enhanced by its combination with GW2580 in the treatment of mice with pancreatic adenocarcinoma, through the upregulation of cytidine deaminase causing resistance to gemcitabine [38]. More recently, combination of anti-CSF-1R with docetaxel (microtubule-stabilizing agent) revealed TAM depletion in a murine epithelial ovarian cancer model, in correlation with the anti-tumor effect of docetaxel [39]. Moreover, PLX3397 was able to potentiate the therapeutic effects of radiotherapy in a preclinical mouse xenograft model with intracranial human glioblastoma through the neutralization of CSF-1, which was upregulated by radiotherapy [40].

Finally, it was shown that CSF-1R targeting by the BLZ945 inhibitor could lead to the switch of the TAM phenotype toward an anti-tumor phenotype in a glioma preclinical model thanks to GM-CSF and IFN- γ produced by glioma cells concomitantly to TAM depletion [21].

Another way to deplete TAMs is to use bisphosphonates (BP), which induce apoptosis of myeloid cells by inhibiting the essential farnesyl diphosphate synthase, a key enzyme for cholesterol synthesis and protein prenylation. These compounds have a high affinity for bone hydroxyapatite, where they are internalized by bone osteoclasts leading to their apoptosis, and they are, thus, indicated as treatment in pathologies with abnormal bone resorption such as osteoporosis or multiple myeloma [41]. However, all tissue-resident macrophages, including TAMs, can be targeted by BPs such as clodronate in a liposomal formulation with an increase in survival in some preclinical cancer models correlated with macrophage depletion [42]. In a murine xenograft model for cutaneous T-cell lymphoma, the reduction of tumor growth was associated with a decrease in pSTAT3 and macrophage number [43]; the same association was observed in other preclinical mouse models of bone metastasis from lung cancer [44], lung metastasis from breast cancer [45], or melanoma xenograft models [46]. At the clinical level, clodronate was shown to reduce the incidence of bone and visceral metastasis in human mammary carcinomas treated with a combination of clodronate/chemo- or hormonal therapy [47], and, in patients with prostate cancer, another BP reduced skeletal-related events and improved progression-free survival time [48].

Finally, trabectedin, a tetrahydroisoquinoline alkaloid with anti-neoplastic effects, was used for the treatment of advanced-stage tissue sarcoma and relapsed ovarian cancer and was shown to cause a partial depletion of circulating monocytes and TAMs [49]. Trabectedin activates a TRAIL-dependent pathway of apoptosis, and myeloid cells expressing very low levels of TRAIL are insensitive to TRAIL triggering of apoptosis [50].

2.3.2. Reprogramming

Even if TAMs generally display a pro-tumor role, they can be converted into anti-tumor cells and activate the immune system depending on the context. Regarding this plasticity, TAMs can be reprogrammed toward a tumoricidal phenotype to restore their anti-tumor properties thanks to the targeting of surface markers or signaling molecules, or to modifications in the metabolism.

Several markers at the surface of TAMs can be targeted to switch their phenotype such as the scavenger receptor MARCO, TLRs, CD40, or CCR5 [51–54]. The pattern recognition scavenger receptor MARCO was linked to clinical outcome [51]. An anti-MARCO monoclonal antibody was, thus, developed and was shown as having an anti-tumor activity in breast and colon carcinoma, and in

melanoma models through reprogramming of TAMs populations to a pro-inflammatory phenotype and increasing tumor immunogenicity. This was shown as being dependent on the inhibitory Fc-receptor, FcγRIIB [51]. The pro-inflammatory phenotype can also be activated by specific ligands of TLRs or of CD40. Some TLR synthetic ligands were tested in cancer, such as the TLR3 agonist Poly(I:C) which activates the NF-κB pathway, leading to pro-inflammatory M1 polarization with production of type I IFN [55]. Intratumoral delivery of a TLR9 agonist, such as cytosine–phosphate–guanine oligodeoxynucleotides (CpG ODN), or a TLR7/8 agonist (R848) showed a tumoricidal activity in mouse models of melanoma and breast cancer [52,56]. Clinical trials with IMQ and a DNA-based TLR9 immunomodulator in metastatic cancer also showed histological tumor regression and an increase in lymphoid immune infiltration [57]. TLRs can also be activated by sensing bacterial ligands such as the attenuated Δ actA/ Δ inlB strain of *Listeria monocytogenes*, which, when introduced into the aggressive ID8-Defb29/Vegf-A murine ovarian carcinoma, is preferentially phagocytosed by TAMs and reprograms the population from one of suppression to immunostimulation [58].

CD40 is also an important receptor at the TAM surface, as its ligation with the CD40 ligand at the T-cell surface stimulates T-cell-based anti-tumor responses. In preclinical studies, a rat anti-mouse CD40 antibody showed remarkable therapeutic activity in the treatment of CD40⁺ B-cell lymphomas [59]. The first class of modified anti-CD40 antibody, presenting five point mutations in the Fc domain (CP-870,893), showed efficient immunostimulation of effector T-cells in mouse models but little clinical effect in advanced cancer patients [60]. Recently, the same CD40 agonist was shown to increase pancreatic carcinoma sensitivity to chemotherapy in a PDAC mouse model associated with a switch of infiltrated macrophages due to an increase in CCL2 expression and IFN γ in these mice [54]. This last study opened promising perspectives for combination therapies. CCR5 antagonists such as maraviroc provided an anti-tumor effect in a phase I trial in patients with liver metastasis of advanced refractory colorectal cancer correlated with a macrophage repolarization [53].

Furthermore, a majority of cancer cells express a high amount of CD47 at their surface, which interacts with signal regulatory protein alpha SIRP α on myeloid cells such as macrophages to transmit the “do not eat me” signal. This inhibition of phagocytosis of autologous cells exists in homeostatic conditions by the prevention of myosin IIA accumulation at the phagocytic synapse. Anti-CD47 antibodies or engineered SIRP α –Fc fusion were shown to restore macrophage ability to phagocytose cancer cells and prime cytotoxic CD8 T-cells, leading to the tumor regression in several tumor models and in clinical trials. Two anti-CD47 antibodies (Hu5F9-G4 and CC-90002) and one soluble recombinant SIRP α -crystallizable fragment (Fc) fusion protein (TTI-621) are currently being tested in phase I clinical trials in AML and other hematological malignancies, pediatric brain tumors, and some multiple solid tumors (trial numbers NCT02678338 and NCT03957096). To minimize the off-target toxicity (transient anemia), bispecific antibodies targeting both CD47 and tumor-associated antigens were recently developed and obtained promising results [61].

Specific pathways involving STAT3 or STAT6 characteristic of an anti-inflammatory response can be targeted to modify M2 characteristics of TAMs. For instance, through its ligation to the IL-10 receptor, IL-10 and IL-6 induce the activation of STAT3 necessary to drive an anti-inflammatory effect. Formerly, microtubule-stabilizing agents such as paclitaxel were shown to promote polarization of MDSC to macrophages with the M1 phenotype via suppression of STAT3 phosphorylation [62]. The STAT3 axis was then more specifically targeted with an intravenous injection of a STAT3–small interfering RNA (siRNA)–CpG conjugate which was shown to silence the immune suppressor gene *STAT3*, reprogramming the functions of TAMs correlated with an immune-mediated tumor rejection [63]. A recent in vitro study showed that corosolic acid, packaged within long-circulating liposomes and coupled to an anti-CD163 antibody, inhibited the activation of STAT3 in human M2 type macrophages and their IL-10-induced gene expression [16]. In the same way, STAT6, one of the major signal transducers activated by IL-13, involved in M2 polarization, can be inhibited by different synthetic molecules (AS1517499, TMC-264, A771726), leading to an inhibition of tumor growth in the 4T1 mammary tumor model and modification of genetic markers for TAM infiltration [64].

Furthermore, microRNA (miRNA)-155 is best characterized as a pro-inflammatory miRNA since it enhances M1-like macrophage activation by decreasing inhibitors of pro-inflammatory responses and targets the IL-13 receptor to reduce alternative macrophage activation [65]. Currently, several miRNAs are implicated in the regulation of macrophage activation and polarization in cancer [66], and developments of pharmacological formulations that either suppress or enhance the activity of selected miRNAs to reprogram the TAM phenotype are emerging. For instance, targeting of miRNA-processing enzyme DICER in macrophages with lysozyme-M-driven Cre prompts M1-like TAM reprogramming in lung carcinoma and MC38 tumors [67].

The switch of M2 TAMs toward an M1-like phenotype can also be driven by rapamycin, which is an mTORC1-specific inhibitor, inducing an anti-tumor effect in a hepatocarcinoma mouse model [68]. Moreover, inhibitors of PI3ky, a molecule upstream of mTOR, are able to promote TAM-immunostimulatory responses in several cancer models [69]. Activation of MAPKs via production of ROS, thanks to a copper chelator, CuNG (*N*-(2-hydroxy acetophenone) glycinate), can convert suppressive TAMs toward a pro-inflammatory phenotype [70]. M1 genes such as *iNOS* and *CXCL9* can also be upregulated concomitantly with the downregulated expression of M2 genes, *arginase-1* and *CD206*, thanks to the inhibition of the CYP4X1 monooxygenase or the activation of the autophagy-induced RelB/p52 by flavonoids in glioma or hepatocellular carcinoma models [71,72]. Several synthetic molecules can also actively reverse the M2 phenotype of TAMs such as TMP195, an HDAC inhibitor, in breast cancer mouse models, or paclitaxel, an anti-microtubule agent, in patients with ovarian carcinoma [73,74].

Combination strategies were also reported to have a good effect on TAMs reprogramming. Anti-CD40 was combined with anti-CSF-1R to create a pro-inflammatory environment eliciting T-cell responses before depletion of TAMs [75] or with chemotherapies such as imatinib (tyrosine kinase inhibitor) with strong tumor regression in a gastrointestinal tumor mouse model [76]. A TLR9 agonist (IMO-2055) combined with chemotherapies and anti-VEGF showed anti-tumor activity in advanced or metastatic lung cancer [77]. Moreover, TLR9 agonists were also able to enhance radiofrequency-induced CTL responses, potentiating the inhibition of primary tumor growth and lung metastasis [78].

Regulating macrophage mitochondrial function is another way to activate the reprogramming of TAMs. Indeed, downregulation of the gene encoding pyruvate dehydrogenase is avoided by dampening the nuclear respiratory factor 1 degradation under hypoxia, which minimizes the Warburg effect and promotes M1 polarization of TAMs [79]. Moreover, cancer cells secrete lots of lactate through glycolysis, which is recognized by Gpr132 at the surface of TAMs and promotes M2 polarization. PPAR γ agonists, which are suppressive for the Gpr132 axis, or siRNA silencing of Gpr132, was successfully used to desensitize TAMs to lactate stimulation in a breast tumor model [80,81].

Finally, recent studies identified novel drug targets for further investigation in the future. For instance, loss of *Gadd45b*, a gene involved in the regulation of growth and apoptosis in myeloid cells, restored activation of pro-inflammatory functions of TAMs and intra-tumor immune infiltration in a fibrosarcoma mouse model [82]. Interfering with angiopoietin family molecules might be an effective strategy for reprogramming TAM polarization in NSCLC [83]. CaMKK2 was defined as a new myeloid-selective checkpoint and could be blocked to facilitate a favorable reprogramming of immune cells in the TME [84]. Several studies also proposed to reprogram the energetic metabolism in TAMs, in which fatty-acid oxidation is preponderant, decreasing lipid and cholesterol intake and metabolism [85,86].

2.3.3. Inhibition of Recruitment

Modulation of the recruitment of monocytes and macrophages to the tumor site in order to disrupt TAM populations represents a promising complementary therapeutic strategy. Inhibition of CCR2/CCL2- and CSF-1R-dependent signaling pathways is a major focus in this field, as direct targeting of CCR2/CCL2 showed positive outcomes in various experimental cancer models [87–91]. However, clinical translation proved to be problematic. Clinical trials with agents depleting CCL2

(carlumab or CNTO888) or blocking CCR2 (MLN1202) showed poor therapeutic responses when used as monotherapies [92,93]. In fact, administration of an anti-CCL2 antibody initially showed decreased levels of CCL2 but led to elevated levels of this chemokine in the long term. Moreover, additional precaution must be taken, as discontinuation of CCL2 therapy in murine models of breast cancer showed increased monocyte mobilization and tumor progression [92]. Phase I and II clinical trials with carlumab were carried out in patients with different type of tumors and indicated that CCL2 levels were only partially suppressed associated with no therapeutic efficacy [94,95]. The blockade of CCR2 by PF-04136309 was assessed in a phase Ib trial in patients with pancreatic cancer in combination with folfirinox chemotherapy. Compared to no response with the monotherapy, 97% of patients with the combination showed an objective tumor response and others showed a local tumor response [96]. These results showed high complexity and mechanistic redundancy within the CCR2/CCL2 axis, which still needs to be addressed. An alternative approach could be the indirect inhibition of the CCR2/CCL2 pathway. It was observed that, in a mouse model of glioblastoma, TAMs express aryl hydrocarbon receptor (AHR), which, upon activation by tumor released kynurenine (KYN), upregulates CCR2 expression. Blocking the AHR led to decreased TAM infiltration and tumor growth with concomitant increased survival of the animals [26].

Targeting of CSF-1R also showed a decrease in macrophage/monocyte recruitment [97]. In spite of this, numerous clinical trials showed a limited therapeutic effect when CSF-1R was targeted alone [98], with the exception of benign tenosynovial giant cell tumors, where a decrease in TAM infiltration and disease stabilization was achieved [99]. Efficacy of CSF-1R inhibitors is still being tested in anticancer therapies, also in the form of broad-spectrum kinase inhibitors such as chauranib (CSF-1R, VEGF1-3, PDGFR α , c-Kit, Aurora B inhibitor) [100] and pexidartinib (CSF-1R, KIT, FTL3 inhibitor), with potential anticancer results [101].

Research on a mouse model of lung adenocarcinoma showed that FGF released by CAF induced TAM recruitment. Blocking of FGF receptor (FGF-R) with the Fgfr tyrosine kinase family inhibitor AZD4547 showed strong TAM abolishment and tumor regression, making this receptor a potential therapeutic target [102]. In addition, targeting other important molecules for monocyte/macrophage recruitment in cancer, i.e., catecholamines by 6-hydroxydopamine [103] and complement components such as C5a, may also be promising in cancer treatment [104].

3. T-Regs

3.1. Overview on T-Regs and Their Physiological Functions

T-regs are a lymphoid cell population with a key function in modulating an immune-suppressed TME. T-regs are a subset of CD4⁺ T-cells identified by expression of transcription factor forkhead box P3 (FOXP3) and can be defined as CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T-cells [105]. Compared to naïve T-regs, activated T-regs express higher levels of CC chemokine receptor 4 (CCR4) [106], CD28 [107], glucocorticoid-induced TNFR family related gene (GITR) [108], cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) [109], lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3, also known as CD223) [110], neuropilin 1 (Nrp-1) [111], programmed cell death-1 (PD-1) [112], T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3) [113], T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) [114], and V-domain Ig suppressor of T-cell activation (VISTA) [115]. T-regs are essential to maintain immunity equilibrium (i.e., self-tolerance) and resolve inflammation [116]; depletion of T-regs leads to autoimmune diseases in murine models [117]. T-regs regulate immune responses through four major mechanisms [118]: (i) secretion of inhibitory cytokines such as IL-10, IL-35, and TGF- β ; (ii) direct cytotoxicity of target cells by the secretion granzyme-A, granzyme-B, and perforin [119]; (iii) IL-2 deprivation due to a high-affinity for CD25 (IL-2 receptor) [120]; and (iv) modulation of maturation and/or function of DC which permits activation of effector T-cells. Moreover, it was shown that LAG-3, a high-affinity binder of the MHC class II molecule required for maximal T-reg suppression,

could abort DC maturation through induction of an immune receptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated inhibitory signaling pathway [110].

3.2. Tumor-Infiltrating T-Regs

T-regs play a pernicious role in a tumor context by suppressing anti-tumor responses which limit the efficacy of cancer immunotherapy [111,121]. T-regs could infiltrate many solid human tumors since there are several studies which report an increased proportion of T-regs in the TME of melanoma patients [121], as well as lymphoma [122], breast and pancreatic cancers [123], and ovarian and lung [124] cancers. An increase in the proportion of tumor-infiltrating T-regs (TI T-regs) is often linked to a poor survival rate in many cancers. Despite the development of immunotherapies showing spectacular clinical responses, some patients do not respond to these therapies. As T-regs are mainly present in tumor tissues, they constitute an attractive target in T-cell infiltrating tumors. Therefore, depleting effector T-regs would modify the equilibrium in TME from immune suppression to active anti-tumor activity, while preserving a continual supply of effector T-regs from intact naïve T-regs.

The latest therapeutic advances targeting T-regs by using antibodies, vaccines, or small molecules specific for T-reg features are summarized in Figure 3.

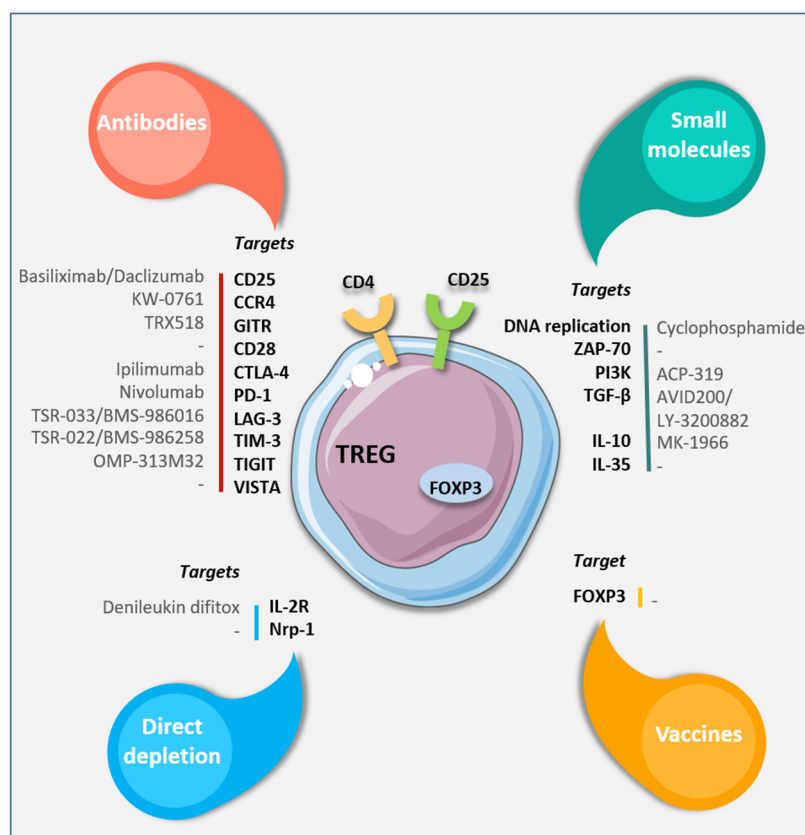


Figure 3. Targeting strategies to eliminate or modulate T-reg functions. Available antibodies, small molecules, or vaccines specific for different cell surface or intracellular targets (as outlined in the text).

3.3. T-Reg Targeting

3.3.1. Antibodies Depleting Tumor-Infiltrating T-Regs

Several antibodies were found to deplete T-reg cells including basiliximab, a chimeric anti-CD25 monoclonal antibody, which was first tested in kidney transplant patients and showed a transitional loss of FOXP3⁺ and FOXP3⁻ CD25⁺ T-cells in the circulation [125]. Daclizumab, an FDA-approved monoclonal antibody against the CD25 receptor, showed a durable decrease of circulating T-regs

without impairing vaccine-induced T-cell responses, reducing CD25 and FOXP3 expression of T-regs and increasing their secretion of IFN- γ [126].

The anti-CCR4 antibody displayed an effective role in specifically depleting effector T-regs and increasing the induction of tumor antigen-specific CD4 and CD8 T-cells in vivo [106]. Indeed, antibodies against CCR4 decrease the proportion of TI T-regs in murine tumors [127], and a humanized anti-CCR4 antibody, KW-0761, is being tested in early clinical trials in patients [128]. Recent studies showed that targeting the CCL22–CCR4 axis could also deplete T-regs and block their interaction with DC, allowing a stronger immune response as DCs regulate adaptive immunity through the constitutive expression of CCL22 [129]. Interestingly, treating T-cells with the CCR4 ligand, CCL17, can disable the production of IFN- γ , thus suggesting chemokines as factors that can directly reprogram the functionality of T-cells [127].

An agonistic anti-GITR antibody (non-depleting) can reduce the T-reg cell-mediated suppressive function and increase the effector function of conventional T-cells in mouse models [108]. The agonistic antibody for GITR is already being tested on melanomas and other advanced solid tumor patients. Recently, this antibody was shown to lead to an important reduction of TI T-regs in mice [130] and could overcome resistance to immunotherapy in human solid cancers [131]. This study showed a decrease of peripheral and TI T-regs after anti-GITR antibody TRX518 (NCT01239134) treatment, providing an easily assessable biomarker of anti-GITR activity. Nonetheless, these results do not reveal a major clinical response despite T-reg depletion and increased T-effector:T-reg ratios in patients and in advanced tumor-bearing mice. Yet, combination with PD-1 blockade could overcome resistance of advanced tumors to anti-GITR monotherapy. Furthermore, antibodies against GITR, while capable of reprogramming T-regs, can also enhance the proliferation and cytokine production of intra-tumor CD8 T-cells [132].

CD28 is a co-stimulatory receptor that represents the strongest secondary stimulus for T-reg functionality. Indeed, blocking CD28 signaling using anti-CD28 antibodies completely inhibits their stability and function. Furthermore, using anti-CD28 in cancer impairs TI T-reg differentiation and function, reducing their capacity to suppress anti-tumor immune responses and promoting tumor control [107]. CD28 binding is opposed by CTLA-4, an inhibitory receptor that competes for binding to the same ligands, B7-1 and B7-2, on antigen-presenting cells [133].

Immune checkpoint blockade antibodies, such as anti-CTLA-4, anti-PD-1, or anti-TIGIT, were tested to deplete T-regs since they are upregulated both on CD8 T-cells and T-regs in tumors, enhancing anti-tumor T-cell functions while simultaneously disabling T-regs to potentially enhance the liver cancer immune response [134]. Using an experimental model of Fc-receptor deficient mice, the anti-tumor effect of the anti-CTLA4 antibody was shown to be dependent on antibody-dependent cellular cytotoxicity of TI T-regs instead of re-activating conventional T-cells [135].

In cancer patients, strong correlations were reported between the clinical efficacy of ipilimumab and decrease in TI T-reg proportion. Some T-regs express PD-1, but possible effects of PD-1 blockade on PD-1-expressing T-regs in tumor tissues remain unknown [136]. A recent study showed that deletion or blockade of PD-1 increases proliferation and immunosuppressive activity of PD-1⁺ T-regs in humans and mice [137]. Apparently, PD-1⁺ effector T-regs could display a major role in hyper-progressive disease (HPD) development (i.e., rapid progression of the cancer instead of its regression in certain cancer patients treated with anti-PD-1 antibody), indicating that deletion of T-regs in tumor tissues could be effective in treating HPD during anti-PD-1 mAb therapy. CD28 blocking antibody can also be used to reprogram T-regs influencing effector T-cell activation, acquisition of the glycolytic metabolism essential for effector functions, and the effectiveness of PD-1 checkpoint blockade treatment. In tumor-bearing mice, B7 co-stimulation is required for successful PD-1 therapy. Moreover patients treated by PD-1 therapy exhibited CD8 T-cells expressing CD28 [138].

LAG-3 expression on T-regs was also shown to be required for maximal suppressive activity, as the blockade abrogates T-reg function in in vitro proliferation assays [110]. Additionally, transfection of LAG-3 in non-T-reg CD4 T-cells resulted in the acquisition of a regulatory phenotype, with reduced

proliferation of co-cultured responder T-cells. More recent studies showed that LAG-3 promotes T-reg differentiation, while LAG-3 blockade inhibits T-reg induction [139]. This study also showed that blockade or genetic deletion of LAG-3 maintained CD4 T-cells in a Th1 phenotype, with LAG-3 restricting IL-2 and STAT5 signaling, adjusting their capacity to be suppressed by T-regs.

However, unlike PD-1⁺/hi Tregs, TIM-3⁺ TI T-regs displayed higher a suppressive capacity due to a stronger expression of CTLA-4 and CD39. Increased ingress of TIM-3⁺ CD4 T-cells or TIM-3⁺ T-regs is associated with a poor prognosis in patients with various malignancies including non-small-cell lung cancer [140].

Several teams showed that TIGIT⁺ T-regs display higher immunosuppressive activity than TIGIT⁻ T-regs [141]. Nonetheless, the effect of the anti-TIGIT antibody on established tumors remains to be determined, especially if it acts on T-regs, CD8 T-cells, or both.

The VISTA monoclonal antibody increases the proportion of tumor-specific T-cells in the periphery, leading to ingress, spread, and effector function of TI T-cells within the TME. VISTA blockade changes the suppressive function of the TME by decreasing the proportion of MDSC, increasing the rate of activated dendritic cells within the TME, and reducing the appearance of tumor-specific T-regs [142]. Another study showed that VISTA monotherapy did not avoid recruitment of T-regs in the TME [143]. Indeed, VISTA blockade leads to transition of CD8 T-cells into functional effector T-cells, but is not sufficient to shrink tumor growth due to weak T-reg suppression in the TME. Nonetheless, combination of VISTA with CTLA-4 blocking antibodies efficiently inhibited T-reg recruitment and increased the ratios of both CD8 T-cells/T-regs and CD4 conventional T-cells/T-regs in the TME, which will be more effective than combined PD-1 and VISTA blockade for tumors in which T-reg-mediated immune regulation is dominant (such as head and neck squamous cell carcinoma).

Denileukin difitox (Ontak[®]) is a recombinant fusion protein product of the diphtheria toxin and IL-2 that selectively binds to the IL-2 receptor of cells and inhibits protein synthesis after its internalization [144]. Recently, a second-generation diphtheria-toxin-based fusion protein associated with a better tolerance (i.e., fewer vascular leak adverse events) showed interesting results both alone and in association with PD-1 blockade [145].

Depleting Nrp-1 in TME-infiltrating T-regs in a melanoma mouse model increases their ability to produce IFN- γ , which reinforces CD8 T-cell responses within the TME in a paracrine fashion and promotes the reprogramming of other TI T-regs into IFN- γ -producing cells [111].

3.3.2. Tumor-Infiltrating T-Reg Vaccine Approaches

As ectopic expression of FOXP3 in conventional T-cells confers an immunosuppressive phenotype, a strategy for targeting FOXP3 was developed to counteract imperfect immune responses against tumor cells. A recent study showed delayed tumor growth, decreased production of IL-10, IL-2, and TGF- β , and increased survival of mice after inoculation of the FOXP3-silenced B16F10 melanoma cell line compared to mice injected with the wild-type cell line [146]. Moreover, a tumor cell vaccine associated with *FOXP3* gene silencing can improve the efficacy of therapeutic anti-tumor vaccination [147]. Furthermore, a recent study showed that vaccination of mice with Fox-Fc DNA vaccine/recombinant FOXP3-Fc fusion protein induced a CTL response against FOXP3⁺ T-regs, which decreased tumor growth and prolonged survival rates [148]. These results showed that the FOXP3 vaccine displays an immune response against tumors by targeting both T-regs and MDSC, which could be used as a potential immunotherapy approach [149].

3.3.3. Small Molecules for T-Reg Depletion or Functional Modulation

Repeated exposition of high-dose chemotherapy, cyclophosphamide, an alkylating molecule which interferes with DNA replication, kills proliferating cells and impacts all T-cells. Low-dose administration of cyclophosphamide over a long period was shown to selectively deplete highly proliferating T-regs in tumor tissues, and enhance anti-tumor immune responses in humans and rodents [150,151]. Low doses

of cyclophosphamide deplete TI T-regs in metastatic colorectal cancer patients [152]. Several studies combined chemotherapeutic agents such as cyclophosphamide with other drugs targeting T-regs [153].

TCR signaling molecules which are differentially controlled in T-regs in comparison with conventional T-cells can also be targeted. Indeed, ZAP-70, which is specifically repressed in T-regs upon TCR activation, can be targeted to abrogate TCR signaling by interfering with TCR proximal signaling molecules, resulting in selective death of T-regs, in particular effector T-regs [154].

Moreover, anti-tumor immune responses were increased by an inactivating mutation (D910A mutation) in phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) p110 δ or a knockout of PI3K in T-regs in mice, without autoimmunity in the mutant mice [155]. However, PI3K activity seems to be essential for T-reg survival and function. Indeed, genetic deletion or pharmacological inhibition of the PI3K subunit p110 δ selectively impairs TI T-reg function and favors anti-tumor immune responses [156].

T-regs regulate immune responses through the secretion of inhibitory cytokines such as TGF- β , IL-10, and IL-35. Their increase in tumors is associated with a poor prognosis in various cancer types. TGF- β promotes the differentiation of induced T-regs in vitro [157]. Deletion of IL-10 in T-regs induces spontaneous colitis, highlighting the physiological importance of T-reg-derived IL-10 [158]. T-reg-derived IL-10 alters the myeloid compartment in the TME, indirectly providing regulation of T-cell-mediated anti-tumor immune responses through upregulation of T-cell stimulatory molecules such as major histocompatibility complex class II and CD80 on intra-tumor DCs [159].

Finally, the next challenge in T-reg targeting will be to use optimized antibodies specific for TI T-regs or engineered IL-2 molecules which do not bind T-regs [160]. Future generations of T-reg-based immunotherapies must consider (i) a suitable combination of targets to promote effector responses, (ii) abolishing specific TME T-reg infiltration or function, and (iii) determining the appropriate timeline of therapeutic administration leading to a better benefit/risk ratio.

4. MSCs

4.1. Overview on Normal MSCs and Their Physiological Functions

Mesenchymal progenitor cells were firstly isolated three decades ago from bone marrow (BM-MSCs). Since this first characterization, it was shown that MSCs can be isolated from most tissues including fat tissue (adipocyte-derived mesenchymal stem cells), skin, heart, kidney, etc., or from perivascular space (pericyte-derived MSCs) [161,162]. They are capable of differentiating into fibroblasts, adipocytes, osteoblasts, chondroblasts, vascular and perivascular structures, etc. They could be isolated on the basis of their ability to adhere to the plastic and for the expression of CD73, CD90, and CD105 markers. They do not express CD45, CD34, CD14, CD19, and human leucocyte antigen DR (HLA-DR) [161]. MSCs possess hallmark characteristics of stem cells or at least progenitor cells with regard to their self-renewal and differentiation properties [162]. MSCs could be used as therapeutic agents for regenerative medicine as they could contribute to tissue healing, mainly through the secretion of paracrine factors such as cellular adhesion molecules (including VCAM-1 and ICAM-1), growth factors (including TGF- β , EGF, HGF), cytokines (such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8), angiogenic factors (such as VEGF and PDGF), and immunomodulatory molecules (PGE2). In addition, MSCs play a role in immune tolerance, through their immunosuppressive effects on T- and B-lymphocytes, and their influence on macrophage and dendritic cell polarization, thus preventing immunoreaction in both physiological and pathological conditions [163,164].

4.2. MSCs in Cancer

Although MSCs can halt cancer progression by inducing apoptosis, suppressing signaling pathways, initiating cell-cycle arrest, and increasing infiltration of monocytes and granulocytes [165,166], the majority of publications report pro-tumor activities. MSCs are able to stimulate tumor growth, increase angiogenesis, and favor metastasis development mainly through the release of activating

factors such as cytokines and growth factors including IL-6 [167] and GDF15 in hematological malignancies [168].

In solid cancers, following recruitment to the tumor site, MSCs as CA-MSCs (cancer-associated MSCs) are distinct from the original cells. These infiltrated MSCs were described as having a role to play in ovarian cancer progression by releasing IL-6, CXCR1/2 ligands (CXCL1, CXCL2, and IL-8), and related cytokine leukemia inhibitory factor (LIF) [167,169]. MSCs are also able to promote tumor growth and metastasize through direct cell-to-cell contact or through their secreted exosomes, which are able to carry different molecules such as IL-6, TGF- β 1, CCL2, and fibronectin, or miR-375, miR340 and miR-155 [162]. These exosomes also participate in tumor homing in vivo, indicating that MSCs play a role in metastasis [170]. The mechanisms via which exosomes promote cell proliferation, increase cell survival, activate the AKT and the MAPK pathways, and also inhibit p38, p53, and JNK pathways are being studied.

They also were described to enhance vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumor cells by activating the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway [171]. Moreover, MSCs can inhibit the immune response mediated by NK cells [172], T-lymphocytes, or macrophages [173]. They are able to inhibit T-cell proliferation through the secretion of TGF- β and HGF, which induce T-cell proliferation arrest in the G1 phase and apoptosis of activated T-cells [172]. MSCs are also able to alter the activation and the differentiation process of T-cells and promote the generation of T-regs. In addition, MSCs could suppress the proliferation, differentiation, and activation of B-cells [172]. Through their inhibition of the T/B-cell immune response, MSCs are involved in tumor progression as tumor cells will not be recognized by the cellular and humoral effectors of the immune response.

MSCs could also inhibit the activation of dendritic cells, downregulating their endocytotic and IL-12 secreting activities [172] and activating the generation of TAMs through the release of CXCR1/2 ligands [174]. Finally, MSCs are also implicated in the acquisition of chemoresistance via i) the release of soluble factors by MSCs (IL-6, IL-8, VEGF), ii) an exchange of membrane proteins between MSCs and tumor cells, iii) the release of exosomes, or iv) through the direct interaction within tumor cells [175].

4.3. MSC Targeting

4.3.1. Inhibition of Recruitment

MSCs are recruited to the tumor site from the bone marrow in response to soluble factors produced by tumor cells, such as IL-1, SDF-1, CCL5, and more recently the aspartic acid protease cathepsin D [176–178]. They can also migrate with the tumor cells from the primary tumor to another site and promote the growth of distant metastasis [179]. In the hypothesis that the use of antibodies targeting these chemoattractive molecules could be a way to limit MSC recruitment to the tumor sites, no results on in vivo models are reported in the literature.

4.3.2. Reprogramming

CA-MSCs closely associated with both solid and hematologic malignancies were genetically and phenotypically analyzed [180]. As an example in myeloma patients, CA-MSCs which express alternative cytokines (IL-6, GDF15, IL-8) have an abnormal proliferative capacity, and present distinctive gene expression profiles [181]. In other hematological malignancies, it was shown that tumor cells activate the AKT/mTOR pathway in MSC and elicit VEGF and HIF-1 production. With regard to solid cancers, Rafii et al. [175] and more recently Mishra and Banerjee isolated mesothelial-like stem cells (which presented a typical fibroblast-like phenotype) and identified the expression of several membrane markers that could be targeted such as CD9, CD10, CD29, CD73, CD146, and CD166 [182]. Finally, Vishnubalaji showed that MSCs could even transform into sarcoma cells and become neoplastic [180].

Taken together, all these observations led to the affirmation that CA-MSCs acquired different potencies when they were activated by the tumor microenvironment. They express several proteins

that in theory could be targeted in order to eliminate CA-MSCs without affecting the other MSCs even if, to our knowledge, it is yet to be performed.

4.3.3. Blocking Functions

Pro-tumor molecules such as IL-6, IL-8, and HGF secreted by CA-MSCs or their receptors can be blocked to circumvent the pro-tumor effects of the MSC. Pasquier et al. showed that tocilizumab (anti-IL-6R therapy) in association with chemotherapy significantly reduced ovarian cancer progression induced by MSC recruitment in an in vivo model [183].

Le Naour et al. showed that ovarian CA-MSCs overexpress CXCR1/2 ligands, which are involved in ovarian cancer progression and the acquisition of chemoresistance. They used a CXCR1/2 inhibitor to sensitize ovarian tumor cells to carboplatin and circumvent the pro-tumor effects of CA-MSCs. They showed that CXCR1/2 inhibition could be a potential therapeutic strategy to revert carboplatin resistance mediated by MSCs [184].

Another strategy could be to inhibit the effects of the MSC-released molecules. Castells et al. showed that MSCs secreted molecules able to activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway, inducing the phosphorylation of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP; caspase inhibitor from inhibitor of apoptosis protein (IAP) family). This IAP activation leads to a chemoresistance acquisition of the ovarian cancer cells (inhibition of apoptosis). Targeting XIAP in ovarian cancer could be of particular interest to circumvent pro-tumor effects of MSCs. SMAC mimetics such as DEBIO1143 could inhibit cIAP proteins. This compound was evaluated in both hematological or solid malignancies for its capacities to inhibit cIAP and promote the sensitization of tumor cells to chemotherapies both in mice models [185] and in clinical trials [186]. SMAC mimetics potentiate the effect of chemotherapy such as platinum salt. They induce tumor stabilization and regression. They are currently being studied in phase III clinical trials.

4.3.4. Blocking the Cell-to-Cell Contact

MSCs could act on tumor cells through a direct cell-to-cell contact. BM-MSCs may affect developing myeloma cell lines via direct cell-to-cell interactions. Breast and ovarian cancer cells at least transiently acquire new functional properties following interaction with MSCs via gap junctional intercellular communication or Notch signaling in vitro and in vivo. Several molecules and receptors are involved in the interactions between cells, such as ICAM-1 expressed on MSC and mucin-1 (MUC-1) on the cell surface of breast cancer cells [187]. Blocking Eph/Ephrin signaling affects cell attachment in vitro leading to cell death [188]. Cell-to-cell contact and fusion are involved in chemoresistance acquisition mediated by MSCs, as this contact can induce membrane exchanges between the cells and the acquisition of new properties by the tumor cells (such as MDR proteins). Oncological trogocytosis and a fusion between the cells (hybrid) were described. The tetraspanin CD9 could be involved in the chemoresistance acquisition of the hybrid cells [175,189]. Targeting this molecule and inhibiting MSC/tumor cell fusion could be a way of inhibiting MSC pro-tumor activities.

4.3.5. Inhibition of the MSC Immune Suppressor Capacities

MSCs are known to inhibit the anti-tumor immune response through their action on T- and B-lymphocyte activation and M2 macrophage polarization. Recent work showed that the CXCR1/2 blockade could prevent M2 macrophage polarization mediated by the CXCL1/2 ligands secreted by MSCs. The macrophages retained an M1 polarization, allowing tumor cell phagocytosis and tumor regression [184].

To conclude on MSCs, it remains difficult to establish a therapeutic strategy that specifically targets the CA-MSCs and abolishes their pro-tumor effects. However, numerous studies enabled the description of MSC biology, particularly in a tumor context, such as recruitment to the tumor sites, activations, and secreted molecules. Therefore, it is possible to consider in the short term the establishment of new therapies that would target signaling pathways activated in cancer cells and

stromal cells by CA-MSCs. We can also decide to not eliminate MSCs but to use them as therapeutic agents. MSCs present well-established tumor-homing properties. They could, therefore, serve as promising systemic delivery tools. This idea was first suggested by Studeny et al. who showed that injected genetically engineered MSC cells (MSC-IFN- β) suppress the growth of pulmonary metastases, through the local production of IFN- β in the tumor microenvironment [190]. Since 2004, many researchers developed other genetically engineered MSCs producing TRAIL, IL-12, HSV-Tk, or sodium iodide symporter (NIS) and even a hepatocellular carcinoma-specific oncolytic adenovirus [191]. They both showed anti-tumor effects following injection of the genetically engineered MSCs to tumor-bearing animals. Taken together, all these studies revealed that, despite the fact that MSCs could promote tumor growth, they can serve as vehicles to specifically target anti-tumor molecules to tumor sites. This led to the proposal of clinical trials. Two trials are ongoing for ovarian cancer patients. The first involves the injection of genetically engineered MSCs expressing IFN β , and the other involves oncolytic virus-loaded MSCs [192]. Finally, exosomes participate in tumor cell-to-MSc communication and are implicated in cancer pathogenesis. MSC exosomes could even display anti-tumor activities. They can act alone or as valuable vehicles for drug delivery. Exosomes derived from MSC enhance radiation effects observed in the control of metastatic spread of melanoma cells [193]. MSC-derived exosomes were shown to suppress oral cancer cell proliferation, invasion, and migration through microRNA-101-3p-targeting [194]. Lastly, *in vivo* taxol-loaded MSC-derived exosomes not only reduce the subcutaneous primary tumor but also prevent metastasis [195].

Therefore, if we cannot specifically circumvent CA-MSc pro-tumor effects, they can be used to target tumors.

5. CAFs

5.1. Overview on Normal Fibroblasts and Their Physiological Functions

Under physiological conditions, fibroblasts are encased within the interstitial extracellular matrix, representing the main component of the connective stromal tissue. Amongst stromal cells, fibroblasts represent the major cell type and contribute to the main functions of the connective tissue. Indeed, by producing extracellular matrix (ECM) proteins and ensuring their reorganization, as well as secreting several cytokines, chemokines, growth factors, and metabolites, they shape the tissue architecture while providing mechanical and metabolic support to the other cell types, and particularly epithelia. Fibroblasts also contribute to the regulation of the tissue immune response by regulating the recruitment of immune cells and sensitizing them to bacterial lipopolysaccharide. Thus, fibroblasts play crucial roles in tissue development, homeostasis, and repair [196].

Tissue-resident fibroblasts remain quiescent and display low proliferative and secretive rates. To date, the molecular signature of this quiescent state remains largely incomplete due to the lack of specific markers. Fibroblast-specific protein 1 (FSP1), also named S100A4, was routinely used until it was shown to also be expressed by macrophages and cancer cells [197]. Interestingly, a definite interplay between fibroblasts and their tissue of residency was highlighted [198]. Indeed, depending on their organ and site of origin, fibroblasts display differential transcriptional programs under the control of specific epigenetic alterations, demonstrating the tissue-specific plasticity of these cells and explaining the ECM particularities depending on the organs [199]. The ECM is mainly composed of collagens (type I, III, and V), elastin, fibrin, fibronectins, proteoglycans, and glycosaminoglycans, creating a three-dimensional network sheltering other stromal cells (immune, vascular, and glial cells, and neurons) [200]. In fact, ECM production, degradation, and interactions are most certainly the main fibroblast functions, making them essential players in tissue homeostasis regulation and remodeling. Therefore, as described for fibroblast types, ECM composition and organization also varies depending on the organ and localization within the tissue.

However, in response to injury, leading to wound healing, or under pathological conditions such as chronic inflammation, epithelial and immune cells secrete several cytokines (IFN- γ , TNF- α ,

IL-1, IL-6, and IL-8) and growth factors (TGF- β , PDGF (platelet-derived growth factor), and FGF2) activating fibroblasts, which changes their morphology from an elongated and fusiform shape to a wide cruciform shape, mainly due to the expression of α SMA (smooth muscle actin). These now-called myofibroblasts display increased migratory, secretive, and proliferative capacities but are, in turn, also more susceptible to epigenetic alterations [201]. In wounds, these activated fibroblasts actively remodel the ECM via the secretion of several ECM components and matrix-degrading proteases, including metalloproteinases (MMPs), cathepsins, urokinase-plasminogen system proteins, tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), and aggrecanases, as well as protease inhibitors, facilitating the repair process [202]. In a physiological context, such as wound healing, fibroblast activation is reversible. Indeed, in response to other cell signals, they also express an intrinsic program aiming to control ECM remodeling and prevent any excessive scarring process, which could lead to fibrosis and dysfunctional regeneration, harmful for the tissue and the organ [203]. Epigenetic alterations, such as *RASAL1* promoter hypermethylation leading to Ras-GTP activity in renal fibrosis, seems to contribute to the mechanism underlying excessive fibroblast activation [204]. Aging and fibroblast senescence are also known to participate in tissue-resident fibroblast activation [205], and may play a role in malignancy.

5.2. Cancer-Associated Fibroblasts

CAFs are a complex of dynamically heterogeneous population of mesodermal cells in solid tumors, and represent a dominant cell type. CAF functions are different from those of tissue-resident fibroblasts, since these fibroblastic populations, with different origins, irreversibly develop an activated phenotype following chronic tumor-derived stimulation. This conversion stage is most likely epigenetic, as reported for skin fibroblasts upon leukemia-inhibitory factor chronic autocrine stimulation [206]. Intriguingly, global hypomethylation of the CAF genome was also reported, possibly involved in the upregulation of genes encoding for pro-tumorigenic secreted proteins [207]. Hence, CAFs are recognized as the main producers within the tumor of cytokines, chemokines, metabolites, and extracellular matrix-modifying enzymes such as matrix metalloproteases, which fuel tumor progression (growth and metastasis). Nevertheless, discrepancies regarding the pro- or anti-tumoral role of CAFs emerged and could be explained by either their different origins or their dynamic phenotypic evolution during tumor progression, implying heterogeneity in markers and in functions.

CAFs present in the tumor bed are a mix of mesodermal cells, mainly originating from the activation of tissue-resident quiescent fibroblasts, which expand in the host tissue upon chronic stress induced by the developing tumor. CAFs may also originate from distant sources such as the bone marrow, thereby forming a functionally distinct stromal cell population as reported in breast cancer [208]. Trans-differentiation of local stromal cells was also described to give rise to CAF-like populations, through program switches called endothelial-to-mesenchymal transition for pericytes or endothelial cells [207], and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) for epithelial cells [207]. Since CAFs display normal allelotypes, at least in pancreatic cancer [209], EMT-derived CAFs may not arise from tumor cells directly but from normal epithelial cells, which receive paracrine signals that induce alterations in their epithelial programs from the adjacent tumor, (i.e., cell polarity, cell-to-cell and cell-to-ECM junctions). Alongside the generation of CAFs, this EMT program may dampen the so-called epithelial intercellular surveillance, thereby fostering tumor progression [210]. Nevertheless, the biological origin of the different hypothetical CAF populations is still under debate due to the lack of specific markers for each population. Transcriptional analyses at the single-cell level in tumors will soon lead to the identification of molecular signatures of the different stromal cell populations and specific markers, which are necessary to clearly identify their biological origins (for example, through genetic lineage tracing) and respective functions.

Numerous non-specific markers for CAFs were reported due to the different cell origins. Tissue-resident fibroblasts exhibit different organ-specific transcriptomic profiles [198], implying organ-specific markers for CAFs derived in the respective tumors. For example, α SMA⁺ CAFs are predominant in pancreatic cancer arising from resident fibroblastic stellate cell activation [211],

whereas PDGFR α ⁺ CAFs reflect in melanoma the activation and expansion from dermal fibroblasts [212]. Lack of specific markers for each hypothetical CAF population implies the overlap of different markers, such as FSP1/S100A4 and α SMA markers in pancreatic or breast CAFs [207]. Based on the relative co-expression of six fibroblastic markers (α SMA, FAP α (fibroblastic-activated protein α), integrin β 1/CD29, S100-A4/FSP1, PDGFR β , and CAV1 (caveolin 1), Costa et al. identified, by fluorescent analysis cell-sorting, four distinct CAF subsets in human breast cancer that accumulate differentially in tumors and juxta-tumors, one of these being functionally endowed with immunosuppressive properties [213].

Neuzillet et al. proposed the “pCAFassigner” classification to segregate pancreatic patient tumors into prognosis groups depending on expression levels of three different markers, i.e., periostin, MYH11 (myosin-11), and podoplanin [214]. Prognostic signatures of stroma based on the identification of different marker sets (gene expression studies) were uncovered in patients to predict survival, recurrence, or resistance to neoadjuvant chemotherapies, in several cancers; however, the lack of uniformity between tumors, probably reflecting CAF heterogeneity, will require the design of specific signatures for each pathology [215].

Markers most commonly used to identify CAFs relate to the main biological functions of CAFs, as the main producers of ECM components (collagens I and II, fibronectin, tenascin-C, and periostin), remodeling enzymes (lysyl oxidases, matrix metalloproteases, and their inhibitors), secreted growth factors (e.g., TGF β , VEGF, PDGFs, EGF, FGFs, CTGF (connective growth factor), WNTs), and cytokines (IL-6, CXCL12), and as contractile cells (cytoskeletal components such as α SMA). Intriguingly, distinct spatial tissue distributions in pancreatic cancer between different reported CAF populations expressing specific markers may result from different dialogues with tumor cells; inflammatory IL-6⁺ CAFs, distant from tumor cells, receive an IL-1 signal which triggers the JAK–STAT pathway activation and promotes a CAF inflammatory state, whereas CAFs residing in the vicinity of tumor glands mainly receive a TGF β signal that favors a myofibroblastic SMA⁺ state by antagonizing the IL-1 signal [216,217]. This example provides a mechanism through which distinct spatial fibroblast niches are established in the tumor microenvironment, and also illuminates the importance of studying CAF functional heterogeneity by considering their spatial distribution [218]. Very recently, single-cell RNA sequencing to pancreatic tumor tissue identified distinct CAF subsets, confirming the existence of distinct myofibroblastic and inflammatory CAF subsets, and providing novel marker genes for these cells (TNC, TGFB1, THY1, TAGLN, COL12A1, and PDGFRB for myofibroblastic CAFs, or CLEC3B, COL14A1, GSN, LY6C1, and CXCL12 for inflammatory CAFs). This study also identified a new CAF subtype that expresses MHC class II-related genes and specific markers (SLPI, SAA3, CD74, H2-AB1, NKAIN4, IRF5), and induces T-cell receptor ligation in CD4⁺ T-cells in an antigen-dependent manner [219]. Since these CAFs lack the co-stimulatory molecules required to induce T-cell proliferation, they are hypothesized to inhibit optimal T-cell response.

Pro- and anti-tumoral functions were attributed to CAFs in cancers, most certainly due to their different origins, and phenotypic evolution during tumor progression. The two-step activation model differentiating normal active fibroblasts (part I) from CAFs further supports the concept of the fibroblast’s dual behavior against or supporting tumor cell growth during cancer initiation or progression, respectively. If one considers tumors as a wound that never heals, it is conceivable that acutely (reversibly) activated fibroblasts will restrain tumor initiation (such as in wound-healing process), whereas chronically (irreversibly) activated fibroblasts will sustain tumor progression [220].

Studies describing pro-tumorigenic functions for CAFs are more numerous than those attributing restraining activities. This may result from CAF heterogeneity within a same tumor and from ad-mixing experiments using ex vivo primary CAF cultures established from patient tumors; a possible enrichment in these cultures of tumor-promoting CAFs (at the expense of tumor-restraining CAFs) may result from the secretion by these CAFs of pro-survival factors that promote not only tumor cell growth and invasion but also autocrine growth stimulating loops in CAFs [221].

CAF pro-tumorigenic functions are mainly triggered by their altered secretomes, whereby paracrine signaling from CAFs boosts tumor progression by positively impacting on cancer cell survival,

proliferation, stemness, metabolism, metastasis-initiating capacity, and resistance to therapies (reviewed in Reference [221]). Soluble factors reported to be involved in such dialogues largely comprise soluble (growth factors, cytokines, and chemokines) and insoluble proteins (extracellular matrix (ECM)), such as CXCL12, TGF β , FGFs, HGF, IL-6, or periostin [222–227]. These proteins act on tumor cells, but also indirectly stimulate tumor growth by impacting other stromal cells, such as endothelial cells, thereby remodeling the tumor vasculature, or immune cells, favoring the specific recruitment or intra-tumor polarization of pro-tumorigenic inflammatory cells (reviewed in Reference [228]). An explanation for altered protein secretomes in pancreatic CAFs was reported to depend on exacerbated mTOR-induced protein synthesis, the targeting of which revealed a therapeutic benefit in vivo, restraining tumor growth and metastasis, as well as re-sensitizing cancer cells to chemotherapy [229,230]. Other paracrine factors secreted by CAFs that support tumor growth by improving tumor energy synthesis include lipids, such as recently demonstrated in pancreatic tumors, where CAFs undergo a dramatic lipid metabolic shift [231], or metabolites such as lactate or ketone bodies [232].

ECM proteins and ECM-remodeling enzymes secreted by CAFs not only support cancer cell survival by stimulating integrin receptor signaling in cancer cells or by releasing ECM-sequestered growth factors, respectively (reviewed in Reference [233]), but compose a crosslinked collagen fiber network organized into a parallel orientation forming stiff “migration highways” that promote the directionality and velocity of cancer cells (reviewed in Reference [234]), through cooperative collective invasion with CAFs [235]. Communication between CAFs and cancer cells also involve extracellular microvesicles that transmit biological information by carrying microRNAs, long non-coding RNAs (lncRNAs), proteins, or metabolites, both locally and at distance, thereby involved in preparing distant pre-metastatic niches (reviewed in Reference [236]. Such cargo functions for extracellular microvesicles may in the future have clinical utility.

Whether CAF populations involved in restraining tumor progression correspond to fibroblasts resistant to irreversible conversion into CAFs, or to distinct CAF subsets remains unknown. There is a growing body of evidence suggesting that cancer cells influence normal fibroblasts to suppress their tumor-suppressing activity. In a normal setting, stromal cells secrete TGF- β inhibitors [237] or the β -catenin-signaling inhibiting factor SLIT2 [238], or express safeguard checkpoints (e.g., p53) [239], which, upon epithelial stress (e.g., carcinogenesis initiation), will restrain epithelial cell proliferation. Inactivation of these stromal checkpoints was correlated with tumor progression. Tumor-suppressing functions of CAFs were reported in pancreatic cancer, in which targeting the believed pro-tumor hedgehog signaling pathway in CAFs, or genetic depletion of α SMA⁺ CAFs from tumors unexpectedly enhanced tumor progression. These results, therefore, suggest that Hedgehog-responsive and myofibroblastic α SMA⁺ CAFs may comprise two tumor-suppressive subsets. Interestingly, these two subsets may belong to the same CAF population since it was shown, using a Hedgehog pathway reporter allele, that nearly all α SMA⁺ fibroblasts are Hedgehog-responsive. Further supporting the tumor restraining effect of the Hedgehog pathway, a clinical trial that combined chemotherapy with IPI-926, a small-molecule inhibitor of the Hedgehog pathway, was aborted due to a shortened patient overall survival (NCT01130142) [240].

5.3. CAFs Targeting

Therapeutically targeting CAFs in cancer may have its use, as they are (i) the most numerous cell type in many fibrotic aggressive tumors, e.g., pancreatic cancer, (ii) endowed with tumor-growth features, and (iii) genetically stable and consequently less likely than tumor cells to acquire therapeutic resistance. Nevertheless, until CAF tumor-suppressive subsets are clearly identified and characterized, such targeting strategies may not be as promising as expected.

5.3.1. Depletion

Strategies attempting to ablate CAFs from tumors using cell subset markers provided promising therapeutic benefits when targeting the FAP α ⁺ fibroblasts in pancreatic carcinoma [241], but not the α SMA⁺ subsets [242], further strengthening the functional diversity of these distinct CAF populations. Preclinical studies targeting FAP α ⁺ fibroblasts with either a DNA vaccine against FAP α , an FAP α enzymatic inhibitor, an FAP α antibody, or chimeric antigen receptor T-cells targeting FAP α , also provided promising preclinical results in mice [243], but failed in clinical trials (phase II in metastatic colorectal cancer using a humanized anti-FAP α antibody or the inhibitor PT-100) [243,244]. Outcomes of a novel strategy targeting FAP α ⁺ cells using a recombinant fusion protein that targets an engineered variant form of IL-2 to human FAP α ⁺ cells, to stimulate a local immune response, are awaited (phase I and II clinical trials in combination with EGFR inhibitor (NCT02627274) or anti-PD-L1 antibody (NCT03386721)). Another CAF subset (CD10⁺ GPR77⁺) was identified in chemotherapy-resistant breast tumors, the targeting of which using a neutralizing anti-GPR77 antibody abolished tumor formation and restored tumor chemosensitivity of patient-derived xenografts [245]. CAFs from pancreatic cancer were described to express the somatostatin receptor sst1, whose activation using an sst1 agonist (SOM230, pasireotide) inhibited the mTOR protein synthesis pathway in CAFs, thereby dramatically decreasing the secretion of pro-tumor secreted proteins, including IL-6, inhibiting tumor growth and metastasis, and restoring chemosensitivity in preclinical mouse models including PDX [229,230]. Clinical phase I trials using pasireotide with the chemotherapies, gemcitabine or FOLFIRI, showed manageable safety profiles in patients with gastrointestinal malignancies and provided preliminary signals of activity. Larger phase II trials are, therefore, warranted. This therapeutic approach using SOM230 targeting CAF protein synthesis of secreted factors sounds wiser than drugs targeting single secreted proteins, since compensatory functions between the large panel of CAF secreted factors may occur. An example of such a strategy targets the HGF-cMet signal using a neutralizing anti-HGF antibody or cMet inhibitor, demonstrating early signs of anti-tumor activity in a phase I clinical trial [246,247].

5.3.2. Reprogramming

Strategies to reprogram CAFs to re-normalize tumor stroma targeted the epigenetic machinery, or pathways involved in CAF activation, e.g., TGF- β -mediated Smad2/3 signaling, using the viTAMsin-D derivative or the bioactive lipid lipoxin A4 [248,249], providing encouraging growth suppression in preclinical models.

Strategies using CAF's enzymatic features as a means of drug delivery are being developed, such as a prodrug or micelles encapsulating a chemotherapeutic drug, designed to be cleaved using the protease activity of CAF-expressed FAP α or MMPs, respectively [250,251]. LRRC15⁺ (leucine-rich-repeat-containing) CAFs were targeted using an LRRC15-antibody drug conjugate (phase I ABBV-085) to deliver an anti-mitotic drug. Recent approaches which may delay peritoneal metastasis were designed to use CAFs as ecological traps that attract disseminated cancer cells, by encapsulating live CAFs into microparticles that are intraperitoneally injected and then retrieved using the microparticle's magnetic properties [252].

6. Conclusions

In this review, we highlighted cellular components of the TME, notably TAMs, T-regs, MSCs, and CAFs, which can be pro-tumorigenic by promoting cancer cell survival, immune system evasion, chemoresistance, migration, and metastasis. Interestingly, these infiltrated cells share the ability to produce the same cytokines involved in all these pro-tumorigenic mechanisms, including, for instance, TGF- β , one of the key mechanisms suppressing immune effectors including NK cells [253]. Therapeutically targeting these cells or the soluble factors they secrete may have great benefits in cancer. The most promising preliminary results were obtained by exhausting TAMs with anti-CSF-1R

or abrogating T-reg functions with anti-PD-1. Even if no real response was achieved in vivo with monotherapy, combination strategies, in particular anti-CSF-1R/chemotherapy, showed a good tumor regression in patients. Targeting CAFs or MSCs could also be an interesting breakthrough. However, strategies available to date are not as promising as expected for targeting CAFs and not specific enough for targeting MSCs. Development of combination therapies acting both to suppress TME barriers and stimulate immune responses remains the most promising for patient survival. Many advances are yet to come with a better understanding of tumor immunology, identification of new targets, and optimization of immunotherapy protocols.

Acknowledgments: This work was supported by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Toulouse 3, and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

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

References

1. Roma-Rodrigues, C.; Mendes, R.; Baptista, P.V.; Fernandes, A.R. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 840. [[CrossRef](#)]
2. Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 309–322. [[CrossRef](#)]
3. Wang, M.; Zhao, J.; Zhang, L.; Wei, F.; Lian, Y.; Wu, Y.; Gong, Z.; Zhang, S.; Zhou, J.; Cao, K.; et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* **2017**, *8*, 761–773. [[CrossRef](#)]
4. Kim, K.; Marquez-Palencia, M.; Malladi, S. Metastatic Latency, a Veiled Threat. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Joyce, J.A.; Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 239–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pagès, F.; Mlecnik, B.; Marliot, F.; Bindea, G.; Ou, F.-S.; Bifulco, C.; Lugli, A.; Zlobec, I.; Rau, T.T.; Berger, M.D.; et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: A prognostic and accuracy study. *Lancet* **2018**, *391*, 2128–2139. [[CrossRef](#)]
7. Frydrychowicz, M.; Boruckowski, M.; Kolecka-Bednarczyk, A.; Dworacki, G. The Dual Role of Treg in Cancer. *Scand. J. Immunol.* **2017**, *86*, 436–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Hoeffel, G.; Ginhoux, F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Okabe, Y.; Medzhitov, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* **2014**, *157*, 832–844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sica, A.; Schioppa, T.; Mantovani, A.; Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 717–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 373–384. [[CrossRef](#)]
12. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 677–686. [[CrossRef](#)]
13. Murray, P.J.; Allen, J.E.; Biswas, S.K.; Fisher, E.A.; Gilroy, D.W.; Goerdt, S.; Gordon, S.; Hamilton, J.A.; Ivashkiv, L.B.; Lawrence, T.; et al. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **2014**, *41*, 14–20. [[CrossRef](#)]
14. Takeda, K.; Tanaka, T.; Shi, W.; Matsumoto, M.; Minami, M.; Kashiwamura, S.; Nakanishi, K.; Yoshida, N.; Kishimoto, T.; Akira, S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* **1996**, *380*, 627–630. [[CrossRef](#)]
15. Pilling, D.; Fan, T.; Huang, D.; Kaul, B.; Gomer, R.H. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7475. [[CrossRef](#)]

16. Andersen, M.N.; Etzerodt, A.; Graversen, J.H.; Holthof, L.C.; Moestrup, S.K.; Hokland, M.; Møller, H.J. STAT3 inhibition specifically in human monocytes and macrophages by CD163-targeted corosolic acid-containing liposomes. *Cancer Immunol. Immunother.* **2019**, *68*, 489–502. [[CrossRef](#)]
17. Martinez, F.O.; Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6*, 13. [[CrossRef](#)]
18. Tamura, R.; Tanaka, T.; Yamamoto, Y.; Akasaki, Y.; Sasaki, H. Dual role of macrophage in tumor immunity. *Immunotherapy* **2018**, *10*, 899–909. [[CrossRef](#)]
19. Zhu, Y.; Herndon, J.M.; Sojka, D.K.; Kim, K.-W.; Knolhoff, B.L.; Zuo, C.; Cullinan, D.R.; Luo, J.; Bearden, A.R.; Lavine, K.J.; et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity* **2017**, *47*, 597. [[CrossRef](#)]
20. Qian, B.-Z.; Li, J.; Zhang, H.; Kitamura, T.; Zhang, J.; Campion, L.R.; Kaiser, E.A.; Snyder, L.A.; Pollard, J.W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **2011**, *475*, 222–225. [[CrossRef](#)]
21. Pyonteck, S.M.; Akkari, L.; Schuhmacher, A.J.; Bowman, R.L.; Sevenich, L.; Quail, D.F.; Olson, O.C.; Quick, M.L.; Huse, J.T.; Teijeiro, V.; et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1264–1272. [[CrossRef](#)]
22. Evans, R.; Alexander, P. Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. *Nature* **1970**, *228*, 620–622. [[CrossRef](#)]
23. Cassetta, L.; Pollard, J.W. Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 887–904. [[CrossRef](#)]
24. Goswami, K.K.; Ghosh, T.; Ghosh, S.; Sarkar, M.; Bose, A.; Baral, R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell. Immunol.* **2017**, *316*, 1–10. [[CrossRef](#)]
25. Quail, D.F.; Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1423–1437. [[CrossRef](#)]
26. Takenaka, M.C.; Gabriely, G.; Rothhammer, V.; Mascanfroni, I.D.; Wheeler, M.A.; Chao, C.-C.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Kenison, J.; Tjon, E.C.; Barroso, A.; et al. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 729. [[CrossRef](#)]
27. Kato, Y.; Tabata, K.; Kimura, T.; Yachie-Kinoshita, A.; Ozawa, Y.; Yamada, K.; Ito, J.; Tachino, S.; Hori, Y.; Matsuki, M.; et al. Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8⁺ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212513. [[CrossRef](#)]
28. Jung, M.; Mertens, C.; Tomat, E.; Brüne, B. Iron as a Central Player and Promising Target in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 273. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, Q.; Liu, L.; Gong, C.; Shi, H.; Zeng, Y.; Wang, X.; Zhao, Y.; Wei, Y. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: A meta-analysis of the literature. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50946. [[CrossRef](#)]
30. Ruffell, B.; Coussens, L.M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 462–472. [[CrossRef](#)]
31. Ries, C.H.; Cannarile, M.A.; Hoves, S.; Benz, J.; Wartha, K.; Runza, V.; Rey-Giraud, F.; Pradel, L.P.; Feuerhake, F.; Klamann, I.; et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 846–859. [[CrossRef](#)]
32. Hume, D.A.; MacDonald, K.P.A. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* **2012**, *119*, 1810–1820. [[CrossRef](#)]
33. Yan, D.; Kowal, J.; Akkari, L.; Schuhmacher, A.J.; Huse, J.T.; West, B.L.; Joyce, J.A. Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor abrogates microenvironment-mediated therapeutic resistance in gliomas. *Oncogene* **2017**, *36*, 6049–6058. [[CrossRef](#)]
34. Moughon, D.L.; He, H.; Schokrpur, S.; Jiang, Z.K.; Yaqoob, M.; David, J.; Lin, C.; Iruela-Arispe, M.L.; Dorigo, O.; Wu, L. Macrophage Blockade Using CSF1R Inhibitors Reverses the Vascular Leakage Underlying Malignant Ascites in Late-Stage Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 4742–4752. [[CrossRef](#)]
35. Butowski, N.; Colman, H.; De Groot, J.F.; Omuro, A.M.; Nayak, L.; Wen, P.Y.; Cloughesy, T.F.; Marimuthu, A.; Haidar, S.; Perry, A.; et al. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: An Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro-Oncology* **2016**, *18*, 557–564. [[CrossRef](#)]

36. DeNardo, D.G.; Brennan, D.J.; Rexhepaj, E.; Ruffell, B.; Shiao, S.L.; Madden, S.F.; Gallagher, W.M.; Wadhwani, N.; Keil, S.D.; Junaid, S.A.; et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* **2011**, *1*, 54–67. [[CrossRef](#)]
37. Gomez-Roca, C.A.; Italiano, A.; Le Tourneau, C.; Cassier, P.A.; Toulmonde, M.; D'Angelo, S.P.; Campone, M.; Weber, K.L.; Loirat, D.; Cannarile, M.A.; et al. Phase I Study of Emactuzumab Single Agent or in Combination with Paclitaxel in Patients with Advanced/Metastatic Solid Tumors Reveals Depletion of Immunosuppressive M2-like Macrophages. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1381–1392. [[CrossRef](#)]
38. Weizman, N.; Krelin, Y.; Shabtay-Orbach, A.; Amit, M.; Binenbaum, Y.; Wong, R.J.; Gil, Z. Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* **2014**, *33*, 3812–3819. [[CrossRef](#)]
39. Lu, X.; Meng, T. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the anti-tumor effect of docetaxel in a murine epithelial ovarian cancer. *Immunobiology* **2019**, *224*, 355–361. [[CrossRef](#)]
40. Stafford, J.H.; Hirai, T.; Deng, L.; Chernikova, S.B.; Urata, K.; West, B.L.; Brown, J.M. Colony stimulating factor 1 receptor inhibition delays recurrence of glioblastoma after radiation by altering myeloid cell recruitment and polarization. *Neuro-Oncology* **2016**, *18*, 797–806. [[CrossRef](#)]
41. Michaelson, M.D.; Smith, M.R. Bisphosphonates for treatment and prevention of bone metastases. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 8219–8224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zeisberger, S.M.; Odermatt, B.; Marty, C.; Zehnder-Fjällman, A.H.M.; Ballmer-Hofer, K.; Schwendener, R.A. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: A new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer* **2006**, *95*, 272–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wu, X.; Schulte, B.C.; Zhou, Y.; Haribhai, D.; Mackinnon, A.C.; Plaza, J.A.; Williams, C.B.; Hwang, S.T. Depletion of M2-like tumor-associated macrophages delays cutaneous T-cell lymphoma development in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 2814–2822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hiraoka, K.; Zenmyo, M.; Watari, K.; Iguchi, H.; Fotovati, A.; Kimura, Y.N.; Hosoi, F.; Shoda, T.; Nagata, K.; Osada, H.; et al. Inhibition of bone and muscle metastases of lung cancer cells by a decrease in the number of monocytes/macrophages. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 1595–1602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Qian, B.; Deng, Y.; Im, J.H.; Muschel, R.J.; Zou, Y.; Li, J.; Lang, R.A.; Pollard, J.W. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gazzaniga, S.; Bravo, A.I.; Guglielmotti, A.; van Rooijen, N.; Maschi, F.; Vecchi, A.; Mantovani, A.; Mordoh, J.; Wainstok, R. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 2031–2041. [[CrossRef](#)]
47. Diel, I.J.; Solomayer, E.F.; Costa, S.D.; Gollan, C.; Goerner, R.; Wallwiener, D.; Kaufmann, M.; Bastert, G. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 357–363. [[CrossRef](#)]
48. Van Acker, H.H.; Anguille, S.; Willemen, Y.; Smits, E.L.; Van Tendeloo, V.F. Bisphosphonates for cancer treatment: Mechanisms of action and lessons from clinical trials. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *158*, 24–40. [[CrossRef](#)]
49. Germano, G.; Frapolli, R.; Belgiovine, C.; Anselmo, A.; Pesce, S.; Liguori, M.; Erba, E.; Uboldi, S.; Zucchetti, M.; Pasqualini, F.; et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 249–262. [[CrossRef](#)]
50. Liguori, M.; Buracchi, C.; Pasqualini, F.; Bergomas, F.; Pesce, S.; Sironi, M.; Grizzi, F.; Mantovani, A.; Belgiovine, C.; Allavena, P. Functional TRAIL receptors in monocytes and tumor-associated macrophages: A possible targeting pathway in the tumor microenvironment. *Oncotarget* **2016**, *7*, 41662–41676. [[CrossRef](#)]
51. Georgoudaki, A.-M.; Prokopec, K.E.; Boura, V.F.; Hellqvist, E.; Sohn, S.; Östling, J.; Dahan, R.; Harris, R.A.; Rantalainen, M.; Klevebring, D.; et al. Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 2000–2011. [[CrossRef](#)]
52. Sommariva, M.; Le Noci, V.; Storti, C.; Bianchi, F.; Tagliabue, E.; Balsari, A.; Sfondrini, L. Activation of NK cell cytotoxicity by aerosolized CpG-ODN/poly(I:C) against lung melanoma metastases is mediated by alveolar macrophages. *Cell. Immunol.* **2017**, *313*, 52–58. [[CrossRef](#)]
53. Halama, N.; Zoernig, I.; Berthel, A.; Kahlert, C.; Klupp, F.; Suarez-Carmona, M.; Suetterlin, T.; Brand, K.; Krauss, J.; Lasitschka, F.; et al. Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 587–601. [[CrossRef](#)]

54. Long, K.B.; Gladney, W.L.; Tooker, G.M.; Graham, K.; Fraietta, J.A.; Beatty, G.L. IFN γ and CCL2 Cooperate to Redirect Tumor-Infiltrating Monocytes to Degrade Fibrosis and Enhance Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 400–413. [[CrossRef](#)]
55. Maeda, A.; Digifico, E.; Andon, F.T.; Mantovani, A.; Allavena, P. Poly(I:C) stimulation is superior than Imiquimod to induce the antitumoral functional profile of tumor-conditioned macrophages. *Eur. J. Immunol.* **2019**, *49*, 801–811. [[CrossRef](#)]
56. Yin, T.; He, S.; Wang, Y. Toll-like receptor 7/8 agonist, R848, exhibits antitumoral effects in a breast cancer model. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 3515–3520. [[CrossRef](#)]
57. Weihrauch, M.R.; Richly, H.; von Bergwelt-Baildon, M.S.; Becker, H.J.; Schmidt, M.; Hacker, U.T.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Holtick, U.; Nokay, B.; Schroff, M.; et al. Phase I clinical study of the toll-like receptor 9 agonist MGN1703 in patients with metastatic solid tumours. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 146–156. [[CrossRef](#)]
58. Lizotte, P.H.; Baird, J.R.; Stevens, C.A.; Lauer, P.; Green, W.R.; Brockstedt, D.G.; Fiering, S.N. Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms M2-polarized tumor-associated macrophages in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. *Oncoimmunology* **2014**, *3*, e28926. [[CrossRef](#)]
59. Tutt, A.L.; O'Brien, L.; Hussain, A.; Crowther, G.R.; French, R.R.; Glennie, M.J. T Cell Immunity to Lymphoma Following Treatment with Anti-CD40 Monoclonal Antibody. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 2720–2728. [[CrossRef](#)]
60. Rüter, J.; Antonia, S.J.; Burris, H.A.; Huhn, R.D.; Vonderheide, R.H. Immune modulation with weekly dosing of an agonist CD40 antibody in a phase I study of patients with advanced solid tumors. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, *10*, 983–993. [[CrossRef](#)]
61. Dheilily, E.; Moine, V.; Broyer, L.; Salgado-Pires, S.; Johnson, Z.; Papaioannou, A.; Cons, L.; Calloud, S.; Majocchi, S.; Nelson, R.; et al. Selective Blockade of the Ubiquitous Checkpoint Receptor CD47 Is Enabled by Dual-Targeting Bispecific Antibodies. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 523–533. [[CrossRef](#)]
62. Mullins, D.W.; Burger, C.J.; Elgert, K.D. Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 6811–6818.
63. Kortylewski, M.; Swiderski, P.; Herrmann, A.; Wang, L.; Kowolik, C.; Kujawski, M.; Lee, H.; Scuto, A.; Liu, Y.; Yang, C.; et al. In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 925–932. [[CrossRef](#)]
64. Binnemars-Postma, K.; Bansal, R.; Storm, G.; Prakash, J. Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J.* **2018**, *32*, 969–978. [[CrossRef](#)]
65. Squadrito, M.L.; Etzrodt, M.; De Palma, M.; Pittet, M.J. MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 350–359. [[CrossRef](#)]
66. Sonda, N.; Simonato, F.; Peranzoni, E.; Cali, B.; Bortoluzzi, S.; Bisognin, A.; Wang, E.; Marincola, F.M.; Naldini, L.; Gentner, B.; et al. miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis. *Immunity* **2013**, *38*, 1236–1249. [[CrossRef](#)]
67. Baer, C.; Squadrito, M.L.; Laoui, D.; Thompson, D.; Hansen, S.K.; Kiialainen, A.; Hoves, S.; Ries, C.H.; Ooi, C.-H.; De Palma, M. Suppression of microRNA activity amplifies IFN- γ -induced macrophage activation and promotes anti-tumour immunity. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 790–802. [[CrossRef](#)]
68. Chen, W.; Ma, T.; Shen, X.; Xia, X.; Xu, G.; Bai, X.; Liang, T. Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1363–1372. [[CrossRef](#)]
69. Kaneda, M.M.; Messer, K.S.; Ralainirina, N.; Li, H.; Leem, C.J.; Gorjestani, S.; Woo, G.; Nguyen, A.V.; Figueiredo, C.C.; Foubert, P.; et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* **2016**, *539*, 437–442. [[CrossRef](#)]
70. Chakraborty, P.; Chatterjee, S.; Ganguly, A.; Saha, P.; Adhikary, A.; Das, T.; Chatterjee, M.; Choudhuri, S.K. Reprogramming of TAM toward proimmunogenic type through regulation of MAP kinases using a redox-active copper chelate. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *91*, 609–619. [[CrossRef](#)]
71. Wang, C.; Li, Y.; Chen, H.; Huang, K.; Liu, X.; Qiu, M.; Liu, Y.; Yang, Y.; Yang, J. CYP4 \times 1 Inhibition by Flavonoid CH625 Normalizes Glioma Vasculature through Reprogramming TAMs via CB2 and EGFR-STAT3 Axis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2018**, *365*, 72–83. [[CrossRef](#)]
72. Tan, H.-Y.; Wang, N.; Man, K.; Tsao, S.-W.; Che, C.-M.; Feng, Y. Autophagy-induced RelB/p52 activation mediates tumour-associated macrophage repolarisation and suppression of hepatocellular carcinoma by natural compound baicalin. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1942. [[CrossRef](#)]

73. Guerriero, J.L.; Sotayo, A.; Ponichtera, H.E.; Castrillon, J.A.; Pourzia, A.L.; Schad, S.; Johnson, S.F.; Carrasco, R.D.; Lazo, S.; Bronson, R.T.; et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature* **2017**, *543*, 428–432. [[CrossRef](#)]
74. Wanderley, C.W.; Colón, D.F.; Luiz, J.P.M.; Oliveira, F.F.; Viacava, P.R.; Leite, C.A.; Pereira, J.A.; Silva, C.M.; Silva, C.R.; Silva, R.L.; et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 5891–5900. [[CrossRef](#)]
75. Perry, C.J.; Muñoz-Rojas, A.R.; Meeth, K.M.; Kellman, L.N.; Amezquita, R.A.; Thakral, D.; Du, V.Y.; Wang, J.X.; Damsky, W.; Kuhlmann, A.L.; et al. Myeloid-targeted immunotherapies act in synergy to induce inflammation and antitumor immunity. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 877–893. [[CrossRef](#)]
76. Zhang, J.Q.; Zeng, S.; Vitiello, G.A.; Seifert, A.M.; Medina, B.D.; Beckman, M.J.; Loo, J.K.; Santamaria-Barria, J.; Maltbaek, J.H.; Param, N.J.; et al. Macrophages and CD8⁺ T Cells Mediate the Antitumor Efficacy of Combined CD40 Ligation and Imatinib Therapy in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Immunol. Res.* **2018**, *6*, 434–447. [[CrossRef](#)]
77. Smith, D.A.; Conkling, P.; Richards, D.A.; Nemunaitis, J.J.; Boyd, T.E.; Mita, A.C.; de La Bourdonnaye, G.; Wages, D.; Bexon, A.S. Antitumor activity and safety of combination therapy with the Toll-like receptor 9 agonist IMO-2055, erlotinib, and bevacizumab in advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients who have progressed following chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2014**, *63*, 787–796. [[CrossRef](#)]
78. Xu, A.; Zhang, L.; Yuan, J.; Babikr, F.; Freywald, A.; Chibbar, R.; Moser, M.; Zhang, W.; Zhang, B.; Fu, Z.; et al. TLR9 agonist enhances radiofrequency ablation-induced CTL responses, leading to the potent inhibition of primary tumor growth and lung metastasis. *Cell. Mol. Immunol.* **2018**. [[CrossRef](#)]
79. Ma, B.; Cheng, H.; Mu, C.; Geng, G.; Zhao, T.; Luo, Q.; Ma, K.; Chang, R.; Liu, Q.; Gao, R.; et al. The SIAH2-NRF1 axis spatially regulates tumor microenvironment remodeling for tumor progression. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1034. [[CrossRef](#)]
80. Colegio, O.R.; Chu, N.-Q.; Szabo, A.L.; Chu, T.; Rhebergen, A.M.; Jairam, V.; Cyrus, N.; Brokowski, C.E.; Eisenbarth, S.C.; Phillips, G.M.; et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **2014**, *513*, 559–563. [[CrossRef](#)]
81. Chen, P.; Zuo, H.; Xiong, H.; Kolar, M.J.; Chu, Q.; Saghatelian, A.; Siegwart, D.J.; Wan, Y. Gpr132 sensing of lactate mediates tumor-macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 580–585. [[CrossRef](#)]
82. Verzella, D.; Bennett, J.; Fischietti, M.; Thotakura, A.K.; Recordati, C.; Pasqualini, F.; Capece, D.; Vecchiotti, D.; D’Andrea, D.; Di Francesco, B.; et al. GADD45 β Loss Ablates Innate Immunosuppression in Cancer. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 1275–1292. [[CrossRef](#)]
83. Wei, X.; Nie, S.; Liu, H.; Sun, J.; Liu, J.; Li, J.; Li, S.; Wang, S.; Han, S.; Wang, J.; et al. Angiopoietin-like protein 2 facilitates non-small cell lung cancer progression by promoting the polarization of M2 tumor-associated macrophages. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 2220–2233.
84. Racioppi, L.; Nelson, E.R.; Huang, W.; Mukherjee, D.; Lawrence, S.A.; Lento, W.; Masci, A.M.; Jiao, Y.; Park, S.; York, B.; et al. CaMKK2 in myeloid cells is a key regulator of the immune-suppressive microenvironment in breast cancer. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2450. [[CrossRef](#)]
85. Zhang, Q.; Wang, H.; Mao, C.; Sun, M.; Dominah, G.; Chen, L.; Zhuang, Z. Fatty acid oxidation contributes to IL-1 β secretion in M2 macrophages and promotes macrophage-mediated tumor cell migration. *Mol. Immunol.* **2018**, *94*, 27–35. [[CrossRef](#)]
86. Goossens, P.; Rodriguez-Vita, J.; Etzerodt, A.; Masse, M.; Rastoin, O.; Gouirand, V.; Ulas, T.; Papantonopoulou, O.; Van Eck, M.; Auphan-Anezin, N.; et al. Membrane Cholesterol Efflux Drives Tumor-Associated Macrophage Reprogramming and Tumor Progression. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 1376–1389. [[CrossRef](#)]
87. Bartneck, M.; Schrammen, P.L.; Möckel, D.; Govaere, O.; Liepelt, A.; Krenkel, O.; Ergen, C.; McCain, M.V.; Eulberg, D.; Luedde, T.; et al. The CCR2⁺ Macrophage Subset Promotes Pathogenic Angiogenesis for Tumor Vascularization in Fibrotic Livers. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *7*, 371–390. [[CrossRef](#)]
88. Gui, P.; Ben-Neji, M.; Belozertseva, E.; Dalenc, F.; Franchet, C.; Gilhodes, J.; Labrousse, A.; Bellard, E.; Golzio, M.; Poincloux, R.; et al. The Protease-Dependent Mesenchymal Migration of Tumor-Associated Macrophages as a Target in Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* **2018**, *6*, 1337–1351. [[CrossRef](#)]

89. Li, F.; Kitajima, S.; Kohno, S.; Yoshida, A.; Tange, S.; Sasaki, S.; Okada, N.; Nishimoto, Y.; Muranaka, H.; Nagatani, N.; et al. Retinoblastoma inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3903–3915. [[CrossRef](#)]
90. Nywening, T.M.; Belt, B.A.; Cullinan, D.R.; Panni, R.Z.; Han, B.J.; Sanford, D.E.; Jacobs, R.C.; Ye, J.; Patel, A.A.; Gillanders, W.E.; et al. Targeting both tumour-associated CXCR2⁺ neutrophils and CCR2⁺ macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* **2018**, *67*, 1112–1123. [[CrossRef](#)]
91. Yang, Z.; Li, H.; Wang, W.; Zhang, J.; Jia, S.; Wang, J.; Wei, J.; Lei, D.; Hu, K.; Yang, X. CCL2/CCR2 Axis Promotes the Progression of Salivary Adenoid Cystic Carcinoma via Recruiting and Reprogramming the Tumor-Associated Macrophages. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 231. [[CrossRef](#)]
92. Bonapace, L.; Coissieux, M.-M.; Wyckoff, J.; Mertz, K.D.; Varga, Z.; Junt, T.; Bentires-Alj, M. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature* **2014**, *515*, 130–133. [[CrossRef](#)]
93. Vela, M.; Aris, M.; Llorente, M.; Garcia-Sanz, J.A.; Kremer, L. Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: Achievements and challenges. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 12. [[CrossRef](#)]
94. Sandhu, S.K.; Papadopoulos, K.; Fong, P.C.; Patnaik, A.; Messiou, C.; Olmos, D.; Wang, G.; Tromp, B.J.; Puchalski, T.A.; Balkwill, F.; et al. A first-in-human, first-in-class, phase I study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 1041–1050. [[CrossRef](#)]
95. Pienta, K.J.; Machiels, J.-P.; Schrijvers, D.; Alekseev, B.; Shkolnik, M.; Crabb, S.J.; Li, S.; Seetharam, S.; Puchalski, T.A.; Takimoto, C.; et al. Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest. New Drugs* **2013**, *31*, 760–768. [[CrossRef](#)]
96. Nywening, T.M.; Wang-Gillam, A.; Sanford, D.E.; Belt, B.A.; Panni, R.Z.; Cusworth, B.M.; Toriola, A.T.; Nieman, R.K.; Worley, L.A.; Yano, M.; et al. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: A single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 651–662. [[CrossRef](#)]
97. Leftin, A.; Ben-Chetrit, N.; Joyce, J.A.; Koutcher, J.A. Imaging endogenous macrophage iron deposits reveals a metabolic biomarker of polarized tumor macrophage infiltration and response to CSF1R breast cancer immunotherapy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 857. [[CrossRef](#)]
98. Papadopoulos, K.P.; Gluck, L.; Martin, L.P.; Olszanski, A.J.; Tolcher, A.W.; Ngarmchamnanrith, G.; Rasmussen, E.; Amore, B.M.; Nagorsen, D.; Hill, J.S.; et al. First-in-Human Study of AMG 820, a Monoclonal Anti-Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 5703–5710. [[CrossRef](#)]
99. Cassier, P.A.; Italiano, A.; Gomez-Roca, C.A.; Le Tourneau, C.; Toulmonde, M.; Cannarile, M.A.; Ries, C.; Brillouet, A.; Müller, C.; Jegg, A.M.; et al. CSF1R inhibition with emactuzumab in locally advanced diffuse-type tenosynovial giant cell tumours of the soft tissue: A dose-escalation and dose-expansion phase 1 study. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 949–956. [[CrossRef](#)]
100. Sun, Y.; Yang, L.; Hao, X.; Liu, Y.; Zhang, J.; Ning, Z.; Shi, Y. Phase I dose-escalation study of chiauranib, a novel angiogenic, mitotic, and chronic inflammation inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 9. [[CrossRef](#)]
101. Rosenbaum, E.; Kelly, C.; D'Angelo, S.P.; Dickson, M.A.; Gounder, M.; Keohan, M.L.; Movva, S.; Condy, M.; Adamson, T.; Mcfadyen, C.R.; et al. A Phase I Study of Binimetinib (MEK162) Combined with Pexidartinib (PLX3397) in Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor. *Oncologist* **2019**, *24*, 1–8. [[CrossRef](#)]
102. Hegab, A.E.; Ozaki, M.; Kameyama, N.; Gao, J.; Kagawa, S.; Yasuda, H.; Soejima, K.; Yin, Y.; Guzy, R.D.; Nakamura, Y.; et al. Effect of FGF/FGFR pathway blocking on lung adenocarcinoma and its cancer-associated fibroblasts. *J. Pathol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
103. Xia, Y.; Wei, Y.; Li, Z.-Y.; Cai, X.-Y.; Zhang, L.-L.; Dong, X.-R.; Zhang, S.; Zhang, R.-G.; Meng, R.; Zhu, F.; et al. Catecholamines contribute to the neovascularization of lung cancer via tumor-associated macrophages. *Brain Behav. Immun.* **2019**, *81*, 111–121. [[CrossRef](#)]

104. Piao, C.; Zhang, W.-M.; Li, T.-T.; Zhang, C.-C.; Qiu, S.; Liu, Y.; Liu, S.; Jin, M.; Jia, L.-X.; Song, W.-C.; et al. Complement 5a stimulates macrophage polarization and contributes to tumor metastases of colon cancer. *Exp. Cell Res.* **2018**, *366*, 127–138. [[CrossRef](#)]
105. Hori, S.; Nomura, T.; Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **2003**, *299*, 1057–1061. [[CrossRef](#)]
106. Sugiyama, D.; Nishikawa, H.; Maeda, Y.; Nishioka, M.; Tanemura, A.; Katayama, I.; Ezoe, S.; Kanakura, Y.; Sato, E.; Fukumori, Y.; et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3⁺CD4⁺ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 17945–17950. [[CrossRef](#)]
107. Tang, Q.; Henriksen, K.J.; Boden, E.K.; Tooley, A.J.; Ye, J.; Subudhi, S.K.; Zheng, X.X.; Strom, T.B.; Bluestone, J.A. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 3348–3352. [[CrossRef](#)]
108. Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y.; Sakaguchi, S. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 135–142. [[CrossRef](#)]
109. Read, S.; Malmström, V.; Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 295–302. [[CrossRef](#)]
110. Huang, C.-T.; Workman, C.J.; Flies, D.; Pan, X.; Marson, A.L.; Zhou, G.; Hipkiss, E.L.; Ravi, S.; Kowalski, J.; Levitsky, H.I.; et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **2004**, *21*, 503–513. [[CrossRef](#)]
111. Overacre-Delgoffe, A.E.; Chikina, M.; Dadey, R.E.; Yano, H.; Brunazzi, E.A.; Shayan, G.; Horne, W.; Moskovitz, J.M.; Kolls, J.K.; Sander, C.; et al. Interferon- γ Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* **2017**, *169*, 1130–1141. [[CrossRef](#)]
112. Asano, T.; Meguri, Y.; Yoshioka, T.; Kishi, Y.; Iwamoto, M.; Nakamura, M.; Sando, Y.; Yagita, H.; Koreth, J.; Kim, H.T.; et al. PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy. *Blood* **2017**, *129*, 2186–2197. [[CrossRef](#)]
113. Liu, Z.; McMichael, E.L.; Shayan, G.; Li, J.; Chen, K.; Srivastava, R.; Kane, L.P.; Lu, B.; Ferris, R.L. Novel Effector Phenotype of Tim-3⁺ Regulatory T Cells Leads to Enhanced Suppressive Function in Head and Neck Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 4529–4538. [[CrossRef](#)]
114. Joller, N.; Lozano, E.; Burkett, P.R.; Patel, B.; Xiao, S.; Zhu, C.; Xia, J.; Tan, T.G.; Sefik, E.; Jaynik, V.; et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* **2014**, *40*, 569–581. [[CrossRef](#)]
115. Wang, L.; Rubinstein, R.; Lines, J.L.; Wasiuk, A.; Ahonen, C.; Guo, Y.; Lu, L.-F.; Gondek, D.; Wang, Y.; Fava, R.A.; et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 577–592. [[CrossRef](#)]
116. Vignali, D.A.A.; Collison, L.W.; Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 523–532. [[CrossRef](#)]
117. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 531–562. [[CrossRef](#)]
118. Cao, X.; Cai, S.F.; Fehniger, T.A.; Song, J.; Collins, L.I.; Piwnica-Worms, D.R.; Ley, T.J. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **2007**, *27*, 635–646. [[CrossRef](#)]
119. 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.* **2007**, *8*, 1353–1362. [[CrossRef](#)]
120. Saito, T.; Nishikawa, H.; Wada, H.; Nagano, Y.; Sugiyama, D.; Atarashi, K.; Maeda, Y.; Hamaguchi, M.; Ohkura, N.; Sato, E.; et al. Two FOXP3⁺CD4⁺ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 679–684. [[CrossRef](#)]
121. Viguier, M.; Lemaître, F.; Verola, O.; Cho, M.-S.; Gorochov, G.; Dubertret, L.; Bachelez, H.; Kourilsky, P.; Ferradini, L. Foxp3 expressing CD4⁺CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 1444–1453. [[CrossRef](#)]

122. Yang, Z.-Z.; Novak, A.J.; Stenson, M.J.; Witzig, T.E.; Ansell, S.M. Intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **2006**, *107*, 3639–3646. [[CrossRef](#)]
123. Liyanage, U.K.; Moore, T.T.; Joo, H.-G.; Tanaka, Y.; Herrmann, V.; Doherty, G.; Drebin, J.A.; Strasberg, S.M.; Eberlein, T.J.; Goedegebuure, P.S.; et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 2756–2761. [[CrossRef](#)]
124. Woo, E.Y.; Chu, C.S.; Goletz, T.J.; Schlienger, K.; Yeh, H.; Coukos, G.; Rubin, S.C.; Kaiser, L.R.; June, C.H. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4766–4772.
125. Bluestone, J.A.; Liu, W.; Yabu, J.M.; Laszik, Z.G.; Putnam, A.; Belingheri, M.; Gross, D.M.; Townsend, R.M.; Vincenti, F. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am. J. Transplant.* **2008**, *8*, 2086–2096. [[CrossRef](#)]
126. Rech, A.J.; Mick, R.; Martin, S.; Recio, A.; Aqui, N.A.; Powell, D.J.; Colligon, T.A.; Trosko, J.A.; Leinbach, L.I.; Pletcher, C.H.; et al. CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 134ra62. [[CrossRef](#)]
127. Berlato, C.; Khan, M.N.; Schioppa, T.; Thompson, R.; Maniati, E.; Montfort, A.; Jangani, M.; Canosa, M.; Kulbe, H.; Hagemann, U.B.; et al. A CCR4 antagonist reverses the tumor-promoting microenvironment of renal cancer. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 801–813. [[CrossRef](#)]
128. Kurose, K.; Ohue, Y.; Wada, H.; Iida, S.; Ishida, T.; Kojima, T.; Doi, T.; Suzuki, S.; Isobe, M.; Funakoshi, T.; et al. Phase Ia Study of FoxP3⁺ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4327–4336. [[CrossRef](#)]
129. Rapp, M.; Wintergerst, M.W.M.; Kunz, W.G.; Vetter, V.K.; Knott, M.M.L.; Lisowski, D.; Haubner, S.; Moder, S.; Thaler, R.; Eiber, S.; et al. CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes. *J. Exp. Med.* **2019**, *216*, 1170–1181. [[CrossRef](#)]
130. Schoenhals, J.E.; Cushman, T.R.; Barsoumian, H.B.; Li, A.; Cadena, A.P.; Niknam, S.; Younes, A.I.; Caetano, M.D.S.; Cortez, M.A.; Welsh, J.W. Anti-glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor-Related Protein (GITR) Therapy Overcomes Radiation-Induced Treg Immunosuppression and Drives Abscopal Effects. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2170. [[CrossRef](#)]
131. Zappasodi, R.; Sirard, C.; Li, Y.; Budhu, S.; Abu-Akeel, M.; Liu, C.; Yang, X.; Zhong, H.; Newman, W.; Qi, J.; et al. Rational design of anti-GITR-based combination immunotherapy. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 759–766. [[CrossRef](#)]
132. Sabharwal, S.S.; Rosen, D.B.; Grein, J.; Tedesco, D.; Joyce-Shaikh, B.; Ueda, R.; Semana, M.; Bauer, M.; Bang, K.; Stevenson, C.; et al. GITR Agonism Enhances Cellular Metabolism to Support CD8⁺ T-cell Proliferation and Effector Cytokine Production in a Mouse Tumor Model. *Cancer Immunol. Res.* **2018**, *6*, 1199–1211. [[CrossRef](#)]
133. Marangoni, F.; Zhang, R.; Mani, V.; Thelen, M.; Ali Akbar, N.J.; Warner, R.D.; Äijö, T.; Zappulli, V.; Martinez, G.J.; Turka, L.A.; et al. Tumor Tolerance-Promoting Function of Regulatory T Cells Is Optimized by CD28, but Strictly Dependent on Calcineurin. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 3647–3661. [[CrossRef](#)]
134. Zheng, C.; Zheng, L.; Yoo, J.-K.; Guo, H.; Zhang, Y.; Guo, X.; Kang, B.; Hu, R.; Huang, J.Y.; Zhang, Q.; et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* **2017**, *169*, 1342–1356.e16. [[CrossRef](#)]
135. Simpson, T.R.; Li, F.; Montalvo-Ortiz, W.; Sepulveda, M.A.; Bergerhoff, K.; Arce, F.; Roddie, C.; Henry, J.Y.; Yagita, H.; Wolchok, J.D.; et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 1695–1710. [[CrossRef](#)]
136. Zou, W.; Wolchok, J.D.; Chen, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 328rv4. [[CrossRef](#)]
137. Kamada, T.; Togashi, Y.; Tay, C.; Ha, D.; Sasaki, A.; Nakamura, Y.; Sato, E.; Fukuoka, S.; Tada, Y.; Tanaka, A.; et al. PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 9999–10008. [[CrossRef](#)]
138. Kamphorst, A.O.; Wieland, A.; Nasti, T.; Yang, S.; Zhang, R.; Barber, D.L.; Konieczny, B.T.; Daugherty, C.Z.; Koenig, L.; Yu, K.; et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* **2017**, *355*, 1423–1427. [[CrossRef](#)]

139. Durham, N.M.; Nirschl, C.J.; Jackson, C.M.; Elias, J.; Kochel, C.M.; Anders, R.A.; Drake, C.G. Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T-cells to be suppressed in vivo. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109080. [[CrossRef](#)]
140. Du, W.; Yang, M.; Turner, A.; Xu, C.; Ferris, R.L.; Huang, J.; Kane, L.P.; Lu, B. TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 645. [[CrossRef](#)]
141. Fuhrman, C.A.; Yeh, W.-I.; Seay, H.R.; Saikumar Lakshmi, P.; Chopra, G.; Zhang, L.; Perry, D.J.; McClymont, S.A.; Yadav, M.; Lopez, M.-C.; et al. Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 145–155. [[CrossRef](#)]
142. Le Mercier, I.; Chen, W.; Lines, J.L.; Day, M.; Li, J.; Sergent, P.; Noelle, R.J.; Wang, L. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 1933–1944. [[CrossRef](#)]
143. Kondo, Y.; Ohno, T.; Nishii, N.; Harada, K.; Yagita, H.; Azuma, M. Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **2016**, *57*, 54–60. [[CrossRef](#)]
144. Foss, F.M. DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK): A new fusion protein technology. *Clin Lymphoma* **2000**, *1* (Suppl. 1), S27–S31. [[CrossRef](#)]
145. Cheung, L.S.; Fu, J.; Kumar, P.; Kumar, A.; Urbanowski, M.E.; Ihms, E.A.; Parveen, S.; Bullen, C.K.; Patrick, G.J.; Harrison, R.; et al. Second-generation IL-2 receptor-targeted diphtheria fusion toxin exhibits antitumor activity and synergy with anti-PD-1 in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 3100–3105. [[CrossRef](#)]
146. Franco-Molina, M.A.; Miranda-Hernández, D.F.; Mendoza-Gamboa, E.; Zapata-Benavides, P.; Coronado-Cerda, E.E.; Sierra-Rivera, C.A.; Saavedra-Alonso, S.; Taméz-Guerra, R.S.; Rodríguez-Padilla, C. Silencing of Foxp3 delays the growth of murine melanomas and modifies the tumor immunosuppressive environment. *Onco Targets Ther.* **2016**, *9*, 243–253. [[CrossRef](#)]
147. Miguel, A.; Sendra, L.; Noé, V.; Ciudad, C.J.; Dasí, F.; Hervas, D.; Herrero, M.J.; Aliño, S.F. Silencing of Foxp3 enhances the antitumor efficacy of GM-CSF genetically modified tumor cell vaccine against B16 melanoma. *Onco Targets Ther.* **2017**, *10*, 503–514. [[CrossRef](#)]
148. Mousavi Niri, N.; Memarnejadian, A.; Pilehvar-Soltanahmadi, Y.; Agha Sadeghi, M.; Mahdavi, M.; Kheshtchin, N.; Arab, S.; Namdar, A.; Jadidi, F.; Zarghami, N.; et al. Improved Anti-Treg Vaccination Targeting Foxp3 Efficiently Decreases Regulatory T Cells in Mice. *J. Immunother.* **2016**, *39*, 269–275. [[CrossRef](#)]
149. Namdar, A.; Mirzaei, R.; Memarnejadian, A.; Boghosian, R.; Samadi, M.; Mirzaei, H.R.; Farajifard, H.; Zavar, M.; Azadmanesh, K.; Elahi, S.; et al. Prophylactic DNA vaccine targeting Foxp3⁺ regulatory T cells depletes myeloid-derived suppressor cells and improves anti-melanoma immune responses in a murine model. *Cancer Immunol. Immunother.* **2018**, *67*, 367–379. [[CrossRef](#)]
150. Ghiringhelli, F.; Larmonier, N.; Schmitt, E.; Parcellier, A.; Cathelin, D.; Garrido, C.; Chauffert, B.; Solary, E.; Bonnotte, B.; Martin, F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 336–344. [[CrossRef](#)]
151. Ge, Y.; Domschke, C.; Stoiber, N.; Schott, S.; Heil, J.; Rom, J.; Blumenstein, M.; Thum, J.; Sohn, C.; Schneeweiss, A.; et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 353–362. [[CrossRef](#)]
152. Scurr, M.; Pembroke, T.; Bloom, A.; Roberts, D.; Thomson, A.; Smart, K.; Bridgeman, H.; Adams, R.; Brewster, A.; Jones, R.; et al. Low-Dose Cyclophosphamide Induces Antitumor T-Cell Responses, which Associate with Survival in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 6771–6780. [[CrossRef](#)]
153. Le, D.T.; Jaffee, E.M. Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: A current perspective. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3439–3444. [[CrossRef](#)]
154. Ohkura, N.; Hamaguchi, M.; Morikawa, H.; Sugimura, K.; Tanaka, A.; Ito, Y.; Osaki, M.; Tanaka, Y.; Yamashita, R.; Nakano, N.; et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* **2012**, *37*, 785–799. [[CrossRef](#)]
155. Ali, K.; Soond, D.R.; Pineiro, R.; Hagemann, T.; Pearce, W.; Lim, E.L.; Bouabe, H.; Scudamore, C.L.; Hancox, T.; Maecker, H.; et al. Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature* **2014**, *510*, 407–411. [[CrossRef](#)]

156. Ahmad, S.; Abu-Eid, R.; Shrimali, R.; Webb, M.; Verma, V.; Doroodchi, A.; Berrong, Z.; Samara, R.; Rodriguez, P.C.; Mkrtichyan, M.; et al. Differential PI3K δ Signaling in CD4⁺ T-cell Subsets Enables Selective Targeting of T Regulatory Cells to Enhance Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 1892–1904. [[CrossRef](#)]
157. Li, M.O.; Flavell, R.A. TGF-beta: A master of all T cell trades. *Cell* **2008**, *134*, 392–404. [[CrossRef](#)]
158. Wei, X.; Zhang, J.; Gu, Q.; Huang, M.; Zhang, W.; Guo, J.; Zhou, X. Reciprocal Expression of IL-35 and IL-10 Defines Two Distinct Effector Treg Subsets that Are Required for Maintenance of Immune Tolerance. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 1853–1869. [[CrossRef](#)]
159. Sawant, D.V.; Yano, H.; Chikina, M.; Zhang, Q.; Liao, M.; Liu, C.; Callahan, D.J.; Sun, Z.; Sun, T.; Tabib, T.; et al. Adaptive plasticity of IL-10⁺ and IL-35⁺ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 724–735. [[CrossRef](#)]
160. Arce Vargas, F.; Furness, A.J.S.; Solomon, I.; Joshi, K.; Mekkaoui, L.; Lesko, M.H.; Miranda Rota, E.; Dahan, R.; Georgiou, A.; Sledzinska, A.; et al. Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors. *Immunity* **2017**, *46*, 577–586. [[CrossRef](#)]
161. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, *284*, 143–147. [[CrossRef](#)]
162. Cominal, J.G.; da Costa Cacemiro, M.; Pinto-Simões, B.; Kolb, H.-J.; Malmegrim, K.C.R.; de Castro, F.A. Emerging Role of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Pathogenesis of Haematological Malignancies. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 6854080. [[CrossRef](#)]
163. He, S.; Gleason, J.; Fik-Rymarkiewicz, E.; DiFiglia, A.; Bharathan, M.; Morschauser, A.; Djuretic, I.; Xu, Y.; Krakovsky, M.; Jankovic, V.; et al. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal-Like Cells Enhance Angiogenesis via T Cell-Dependent Reprogramming of Macrophage Differentiation. *Stem Cells* **2017**, *35*, 1603–1613. [[CrossRef](#)]
164. Najjar, M.; Raicevic, G.; Fayyad-Kazan, H.; Bron, D.; Toungouz, M.; Lagneaux, L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* **2016**, *18*, 160–171. [[CrossRef](#)]
165. Khakoo, A.Y.; Pati, S.; Anderson, S.A.; Reid, W.; Elshal, M.F.; Rovira, I.I.; Nguyen, A.T.; Malide, D.; Combs, C.A.; Hall, G.; et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1235–1247. [[CrossRef](#)]
166. Qiao, L.; Xu, Z.-L.; Zhao, T.-J.; Ye, L.-H.; Zhang, X.-D. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 67–77. [[CrossRef](#)]
167. Castells, M.; Thibault, B.; Mery, E.; Golzio, M.; Pasquet, M.; Hennebelle, I.; Bourin, P.; Mirshahi, M.; Delord, J.P.; Querleu, D.; et al. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* **2012**, *326*, 59–68. [[CrossRef](#)]
168. Corre, J.; Hébraud, B.; Bourin, P. Concise review: Growth differentiation factor 15 in pathology: A clinical role? *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 946–952. [[CrossRef](#)]
169. McLean, K.; Tan, L.; Bolland, D.E.; Coffman, L.G.; Peterson, L.F.; Talpaz, M.; Neamati, N.; Buckanovich, R.J. Leukemia inhibitory factor functions in parallel with interleukin-6 to promote ovarian cancer growth. *Oncogene* **2019**, *38*, 1576–1584. [[CrossRef](#)]
170. Roccaro, A.M.; Sacco, A.; Maiso, P.; Azab, A.K.; Tai, Y.-T.; Reagan, M.; Azab, F.; Flores, L.M.; Campigotto, F.; Weller, E.; et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 1542–1555. [[CrossRef](#)]
171. Zhu, W.; Huang, L.; Li, Y.; Zhang, X.; Gu, J.; Yan, Y.; Xu, X.; Wang, M.; Qian, H.; Xu, W. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett.* **2012**, *315*, 28–37. [[CrossRef](#)]
172. Li, N.; Hua, J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 2345–2360. [[CrossRef](#)]
173. Castells, M.; Milhas, D.; Gandy, C.; Thibault, B.; Rafii, A.; Delord, J.-P.; Couderc, B. Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e887. [[CrossRef](#)]
174. Le Naour, A.; Couderc, B. Role of MSCs in antitumor drug resistance. In *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators*; Bolontrade, M., García, M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 295–333.

175. Rafii, A.; Mirshahi, P.; Poupot, M.; Faussat, A.-M.; Simon, A.; Ducros, E.; Mery, E.; Couderc, B.; Lis, R.; Capdet, J.; et al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3894. [[CrossRef](#)]
176. Madar, S.; Goldstein, I.; Rotter, V. 'Cancer associated fibroblasts'—more than meets the eye. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 447–453. [[CrossRef](#)]
177. Karnoub, A.E.; Dash, A.B.; Vo, A.P.; Sullivan, A.; Brooks, M.W.; Bell, G.W.; Richardson, A.L.; Polyak, K.; Tubo, R.; Weinberg, R.A. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **2007**, *449*, 557–563. [[CrossRef](#)]
178. Vangala, G.; Imhoff, F.M.; Squires, C.M.L.; Cridge, A.G.; Baird, S.K. Mesenchymal stem cell homing towards cancer cells is increased by enzyme activity of cathepsin D. *Exp. Cell Res.* **2019**, *383*, 111494. [[CrossRef](#)]
179. Gonzalez, M.E.; Martin, E.E.; Anwar, T.; Arellano-Garcia, C.; Medhora, N.; Lama, A.; Chen, Y.-C.; Tanager, K.S.; Yoon, E.; Kidwell, K.M.; et al. Mesenchymal Stem Cell-Induced DDR2 Mediates Stromal-Breast Cancer Interactions and Metastasis Growth. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 1215–1228. [[CrossRef](#)]
180. Vishnubalaji, R.; Elango, R.; Al-Toub, M.; Manikandan, M.; Al-Rikabi, A.; Harkness, L.; Ditzel, N.; Atteya, M.; Hamam, R.; Alfayez, M.; et al. Neoplastic Transformation of Human Mesenchymal Stromal Cells Mediated via LIN28B. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8101. [[CrossRef](#)]
181. Favreau, M.; Menu, E.; Gaublomme, D.; Vanderkerken, K.; Faict, S.; Maes, K.; De Bruyne, E.; Govindarajan, S.; Drennan, M.; Van Calenbergh, S.; et al. Leptin receptor antagonism of iNKT cell function: A novel strategy to combat multiple myeloma. *Leukemia* **2017**, *31*, 2678–2685. [[CrossRef](#)]
182. Mishra, P.J.; Banerjee, D. Activation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1554*, 201–209.
183. Pasquier, J.; Gosset, M.; Geyl, C.; Hoarau-Véchet, J.; Chevrot, A.; Pocard, M.; Mirshahi, M.; Lis, R.; Rafii, A.; Touboul, C. CCL2/CCL5 secreted by the stroma induce IL-6/PYK2 dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 47–51. [[CrossRef](#)]
184. Naour, A.L.; Prat, M.; Thibault, B.; Mével, R.; Lemaitre, L.; Leray, H.; Joubert, M.-V.; Coulson, K.; Golzio, M.; Lefevre, L.; et al. Tumor cells educate mesenchymal stromal cells to release chemoprotective and immunomodulatory factors. *J. Mol. Cell Biol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
185. Thibault, B.; Genre, L.; Le Naour, A.; Broca, C.; Mery, E.; Vuagniaux, G.; Delord, J.P.; Wiedemann, N.; Couderc, B. DEBIO 1143, an IAP inhibitor, reverses carboplatin resistance in ovarian cancer cells and triggers apoptotic or necroptotic cell death. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17862. [[CrossRef](#)]
186. DiPersio, J.F.; Erba, H.P.; Larson, R.A.; Luger, S.M.; Tallman, M.S.; Brill, J.M.; Vuagniaux, G.; Rouits, E.; Sorensen, J.M.; Zanna, C. Oral Debio1143 (AT406), an antagonist of inhibitor of apoptosis proteins, combined with daunorubicin and cytarabine in patients with poor-risk acute myeloid leukemia—results of a phase I dose-escalation study. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk* **2015**, *15*, 443–449. [[CrossRef](#)]
187. Melzer, C.; von der Ohe, J.; Hass, R. Enhanced metastatic capacity of breast cancer cells after interaction and hybrid formation with mesenchymal stroma/stem cells (MSC). *Cell Commun. Signal* **2018**, *16*, 2. [[CrossRef](#)]
188. Alfaro, D.; Zapata, A.G. Eph/Ephrin-mediated stimulation of human bone marrow mesenchymal stromal cells correlates with changes in cell adherence and increased cell death. *Stem Cell Res. Ther.* **2018**, *9*, 172. [[CrossRef](#)]
189. Ullah, M.; Akbar, A.; Ng, N.N.; Concepcion, W.; Thakor, A.S. Mesenchymal stem cells confer chemoresistance in breast cancer via a CD9 dependent mechanism. *Oncotarget* **2019**, *10*, 3435–3450. [[CrossRef](#)]
190. Studeny, M.; Marini, F.C.; Dembinski, J.L.; Zompetta, C.; Cabreira-Hansen, M.; Bekele, B.N.; Champlin, R.E.; Andreeff, M. Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 1593–1603. [[CrossRef](#)]
191. Yoon, A.-R.; Hong, J.; Li, Y.; Shin, H.C.; Lee, H.; Kim, H.S.; Yun, C.-O. Mesenchymal stem cell-mediated delivery of an oncolytic adenovirus enhances antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4503–4514. [[CrossRef](#)]
192. Yin, Z.; Jiang, K.; Li, R.; Dong, C.; Wang, L. Multipotent mesenchymal stromal cells play critical roles in hepatocellular carcinoma initiation, progression and therapy. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 178. [[CrossRef](#)]
193. de Araujo Farias, V.; O'Valle, F.; Serrano-Saenz, S.; Anderson, P.; Andrés, E.; López-Peñalver, J.; Tovar, I.; Nieto, A.; Santos, A.; Martín, F.; et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells enhance radiotherapy-induced cell death in tumor and metastatic tumor foci. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 122. [[CrossRef](#)]

194. Xie, C.; Du, L.-Y.; Guo, F.; Li, X.; Cheng, B. Exosomes derived from microRNA-101-3p-overexpressing human bone marrow mesenchymal stem cells suppress oral cancer cell proliferation, invasion, and migration. *Mol. Cell. Biochem.* **2019**, *458*, 11–26. [[CrossRef](#)]
195. Melzer, C.; Rehn, V.; Yang, Y.; Bähre, H.; von der Ohe, J.; Hass, R. Taxol-Loaded MSC-Derived Exosomes Provide a Therapeutic Vehicle to Target Metastatic Breast Cancer and Other Carcinoma Cells. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 798. [[CrossRef](#)]
196. Parsonage, G.; Filer, A.D.; Haworth, O.; Nash, G.B.; Rainger, G.E.; Salmon, M.; Buckley, C.D. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* **2005**, *26*, 150–156. [[CrossRef](#)]
197. Kikuchi, N.; Horiuchi, A.; Osada, R.; Imai, T.; Wang, C.; Chen, X.; Konishi, I. Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: An important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 1061–1069. [[CrossRef](#)]
198. Rinn, J.L.; Bondre, C.; Gladstone, H.B.; Brown, P.O.; Chang, H.Y. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* **2006**, *2*, e119. [[CrossRef](#)]
199. Rinn, J.L.; Kertesz, M.; Wang, J.K.; Squazzo, S.L.; Xu, X.; Bruggmann, S.A.; Goodnough, L.H.; Helms, J.A.; Farnham, P.J.; Segal, E.; et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **2007**, *129*, 1311–1323. [[CrossRef](#)]
200. Frantz, C.; Stewart, K.M.; Weaver, V.M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4195–4200. [[CrossRef](#)]
201. Marsh, T.; Pietras, K.; McAllister, S.S. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 1070–1078. [[CrossRef](#)]
202. Bainbridge, P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J. Wound Care* **2013**, *22*, 407–408.
203. Duffield, J.S.; Lupher, M.; Thannickal, V.J.; Wynn, T.A. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* **2013**, *8*, 241–276. [[CrossRef](#)]
204. Bechtel, W.; McGoohan, S.; Zeisberg, E.M.; Muller, G.A.; Kalbacher, H.; Salant, D.J.; Muller, C.A.; Kalluri, R.; Zeisberg, M. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 544–550. [[CrossRef](#)]
205. Procopio, M.G.; Laszlo, C.; Al Labban, D.; Kim, D.E.; Bordignon, P.; Jo, S.H.; Goruppi, S.; Menietti, E.; Ostano, P.; Ala, U.; et al. Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1193–1204. [[CrossRef](#)]
206. Albregues, J.; Bourget, I.; Pons, C.; Butet, V.; Hofman, P.; Tartare-Deckert, S.; Feral, C.C.; Meneguzzi, G.; Gaggioli, C. LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1664–1678. [[CrossRef](#)]
207. LeBleu, V.S.; Kalluri, R. A peek into cancer-associated fibroblasts: Origins, functions and translational impact. *Dis. Model Mech.* **2018**, *11*. [[CrossRef](#)]
208. Raz, Y.; Cohen, N.; Shani, O.; Bell, R.E.; Novitskiy, S.V.; Abramovitz, L.; Levy, C.; Milyavsky, M.; Leider-Trejo, L.; Moses, H.L.; et al. Bone marrow-derived fibroblasts are a functionally distinct stromal cell population in breast cancer. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 3075–3093. [[CrossRef](#)]
209. Walter, K.; Omura, N.; Hong, S.M.; Griffith, M.; Goggins, M. Pancreatic cancer associated fibroblasts display normal allelotypes. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 882–888. [[CrossRef](#)]
210. Klein, G. Toward a genetics of cancer resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 859–863. [[CrossRef](#)]
211. Ferdek, P.E.; Jakubowska, M.A. Biology of pancreatic stellate cells-more than just pancreatic cancer. *Pflug. Arch.* **2017**, *469*, 1039–1050. [[CrossRef](#)]
212. Lynch, M.D.; Watt, F.M. Fibroblast heterogeneity: Implications for human disease. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 26–35. [[CrossRef](#)]
213. Costa, A.; Kieffer, Y.; Scholer-Dahirel, A.; Pelon, F.; Bourachot, B.; Cardon, M.; Sirven, P.; Magagna, I.; Fuhrmann, L.; Bernard, C.; et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 463–479. [[CrossRef](#)]
214. Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Ragulan, C.; Cros, J.; Patil, Y.; Martinet, M.; Erkan, M.; Kleeff, J.; Wilson, J.; Apte, M.; et al. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Pathol.* **2019**, *248*, 51–65. [[CrossRef](#)]
215. Farmer, P.; Bonnefoi, H.; Anderle, P.; Cameron, D.; Wirapati, P.; Becette, V.; Andre, S.; Piccart, M.; Campone, M.; Brain, E.; et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 68–74. [[CrossRef](#)]

216. Ohlund, D.; Handly-Santana, A.; Biffi, G.; Elyada, E.; Almeida, A.S.; Ponz-Sarvise, M.; Corbo, V.; Oni, T.E.; Hearn, S.A.; Lee, E.J.; et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 579–596.
217. Biffi, G.; Tuveson, D.A. A FATal Combination: Fibroblast-Derived Lipids and Cancer-Derived Autotaxin Promote Pancreatic Cancer Growth. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 578–580. [[CrossRef](#)]
218. Bartoschek, M.; Oskolkov, N.; Bocci, M.; Lovrot, J.; Larsson, C.; Sommarin, M.; Madsen, C.D.; Lindgren, D.; Pekar, G.; Karlsson, G.; et al. Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5150. [[CrossRef](#)]
219. Elyada, E.; Bolisetty, M.; Laise, P.; Flynn, W.F.; Courtois, E.T.; Burkhart, R.A.; Teinor, J.A.; Belleau, P.; Biffi, G.; Lucito, M.S.; et al. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 1102–1123. [[CrossRef](#)]
220. Sugimoto, H.; Mundel, T.M.; Kieran, M.W.; Kalluri, R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 1640–1646. [[CrossRef](#)]
221. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 582–598. [[CrossRef](#)]
222. De Wever, O.; Nguyen, Q.D.; Van Hoorde, L.; Bracke, M.; Bruyneel, E.; Gespach, C.; Mareel, M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1016–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Orimo, A.; Gupta, P.B.; Sgroi, D.C.; Arenzana-Seisdedos, F.; Delaunay, T.; Naeem, R.; Carey, V.J.; Richardson, A.L.; Weinberg, R.A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **2005**, *121*, 335–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Erez, N.; Glanz, S.; Raz, Y.; Avivi, C.; Barshack, I. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *437*, 397–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Calon, A.; Tauriello, D.V.; Batlle, E. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *25*, 15–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Underwood, T.J.; Hayden, A.L.; Derouet, M.; Garcia, E.; Noble, F.; White, M.J.; Thirdborough, S.; Mead, A.; Clemons, N.; Mellone, M.; et al. Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in oesophageal adenocarcinoma. *J. Pathol.* **2015**, *235*, 466–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Subramaniam, K.S.; Omar, I.S.; Kwong, S.C.; Mohamed, Z.; Woo, Y.L.; Mat Adenan, N.A.; Chung, I. Cancer-associated fibroblasts promote endometrial cancer growth via activation of interleukin-6/STAT-3/c-Myc pathway. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 200–213. [[PubMed](#)]
228. Gascard, P.; Tlsty, T.D. Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1002–1019. [[CrossRef](#)]
229. Duluc, C.; Moatassim-Billah, S.; Chalabi-Dchar, M.; Perraud, A.; Samain, R.; Breibach, F.; Gayral, M.; Cordelier, P.; Delisle, M.B.; Bousquet-Dubouch, M.P.; et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 735–753. [[CrossRef](#)]
230. Moatassim-Billah, S.; Duluc, C.; Samain, R.; Jean, C.; Perraud, A.; Decaup, E.; Cassant-Sourdy, S.; Bakri, Y.; Selves, J.; Schmid, H.; et al. Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230: Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget* **2016**, *7*, 41584–41598. [[CrossRef](#)]
231. Auciello, F.R.; Bulusu, V.; Oon, C.; Tait-Mulder, J.; Berry, M.; Bhattacharyya, S.; Tumanov, S.; Allen-Petersen, B.L.; Link, J.; Kendersky, N.D.; et al. A Stromal Lysolipid-Autotaxin Signaling Axis Promotes Pancreatic Tumor Progression. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 617–627. [[CrossRef](#)]
232. Yang, L.; Achreja, A.; Yeung, T.L.; Mangala, L.S.; Jiang, D.; Han, C.; Baddour, J.; Marini, J.C.; Ni, J.; Nakahara, R.; et al. Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 685–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 786–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Kai, F.; Laklai, H.; Weaver, V.M. Force Matters: Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 486–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

235. Labernadie, A.; Kato, T.; Brugues, A.; Serra-Picamal, X.; Derzsi, S.; Arwert, E.; Weston, A.; Gonzalez-Tarrago, V.; Elosegui-Artola, A.; Albertazzi, L.; et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 224–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Wortzel, I.; Dror, S.; Kenific, C.M.; Lyden, D. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Dev. Cell* **2019**, *49*, 347–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Maris, P.; Blomme, A.; Palacios, A.P.; Costanza, B.; Bellahcene, A.; Bianchi, E.; Gofflot, S.; Drion, P.; Trombino, G.E.; Di Valentin, E.; et al. Asporin Is a Fibroblast-Derived TGF-beta1 Inhibitor and a Tumor Suppressor Associated with Good Prognosis in Breast Cancer. *PLoS Med.* **2015**, *12*, e1001871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Chang, P.H.; Hwang-Verslues, W.W.; Chang, Y.C.; Chen, C.C.; Hsiao, M.; Jeng, Y.M.; Chang, K.J.; Lee, E.Y.; Shew, J.Y.; Lee, W.H. Activation of Robo1 signaling of breast cancer cells by Slit2 from stromal fibroblast restrains tumorigenesis via blocking PI3K/Akt/beta-catenin pathway. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 4652–4661. [[CrossRef](#)]
239. Hill, R.; Song, Y.; Cardiff, R.D.; Van Dyke, T. Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell* **2005**, *123*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
240. Catenacci, D.V.; Junttila, M.R.; Karrison, T.; Bahary, N.; Horiba, M.N.; Nattam, S.R.; Marsh, R.; Wallace, J.; Kozloff, M.; Rajdev, L.; et al. Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 4284–4292. [[CrossRef](#)]
241. Lo, A.; Li, C.P.; Buza, E.L.; Blomberg, R.; Govindaraju, P.; Avery, D.; Monslow, J.; Hsiao, M.; Pure, E. Fibroblast activation protein augments progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *JCI Insight* **2017**, *2*, 92232. [[CrossRef](#)]
242. Ozdemir, B.C.; Pentcheva-Hoang, T.; Carstens, J.L.; Zheng, X.; Wu, C.C.; Simpson, T.R.; Laklai, H.; Sugimoto, H.; Kahlert, C.; Novitskiy, S.V.; et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 719–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Hofheinz, R.D.; Weisser, A.; Willer, A.; Hehlmann, R.; Hochhaus, A. Treatment of a patient with advanced esophageal cancer with a combination of mitomycin C and capecitabine: Activation of the thymidine phosphorylase as active principle? *Onkologie* **2003**, *26*, 161–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Narra, K.; Mullins, S.R.; Lee, H.O.; Strzemkowski-Brun, B.; Magalong, K.; Christiansen, V.J.; McKee, P.A.; Egleston, B.; Cohen, S.J.; Weiner, L.M.; et al. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1691–1699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Su, S.; Chen, J.; Yao, H.; Liu, J.; Yu, S.; Lao, L.; Wang, M.; Luo, M.; Xing, Y.; Chen, F.; et al. CD10⁺GPR77⁺ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* **2018**, *172*, 841–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Pant, S.; Saleh, M.; Bendell, J.; Infante, J.R.; Jones, S.; Kurkjian, C.D.; Moore, K.M.; Kazakin, J.; Abbadessa, G.; Wang, Y.; et al. A phase I dose escalation study of oral c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, 1416–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Parikh, P.K.; Ghatge, M.D. Recent advances in the discovery of small molecule c-Met Kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1103–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Sherman, M.H.; Yu, R.T.; Engle, D.D.; Ding, N.; Atkins, A.R.; Tiriach, H.; Collisson, E.A.; Connor, F.; Van Dyke, T.; Kozlov, S.; et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell* **2014**, *159*, 80–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Schnittert, J.; Heinrich, M.A.; Kuninty, P.R.; Storm, G.; Prakash, J. Reprogramming tumor stroma using an endogenous lipid lipoxin A4 to treat pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **2018**, *420*, 247–258. [[CrossRef](#)]
250. Brennan, W.N.; Rosen, D.M.; Wang, H.; Isaacs, J.T.; Denmeade, S.R. Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. *J. Natl. Cancer Inst.* **2012**, *104*, 1320–1334. [[CrossRef](#)]
251. Gao, W.; Xiang, B.; Meng, T.T.; Liu, F.; Qi, X.R. Chemotherapeutic drug delivery to cancer cells using a combination of folate targeting and tumor microenvironment-sensitive polypeptides. *Biomaterials* **2013**, *34*, 4137–4149. [[CrossRef](#)]

252. De Vlieghere, E.; Gremontprez, F.; Verset, L.; Marien, L.; Jones, C.J.; De Craene, B.; Berx, G.; Descamps, B.; Vanhove, C.; Remon, J.P.; et al. Tumor-environment biomimetics delay peritoneal metastasis formation by deceiving and redirecting disseminated cancer cells. *Biomaterials* **2015**, *54*, 148–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Cortez, V.S.; Ulland, T.K.; Cervantes-Barragan, L.; Bando, J.K.; Robinette, M.L.; Wang, Q.; White, A.J.; Gilfillan, S.; Cella, M.; Colonna, M. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF- β signaling. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 995–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T GAMMA DELTA DANS LES CANCERS

Les lymphocytes T (LT) $\gamma\delta$ présentent une hétérogénéité structurale et fonctionnelle et forment un pont entre l'immunité innée et adaptative. Ils comprennent notamment les LT V γ 9V δ 2, qui représentent 1 à 5% des LT circulants, proportion qui peut rapidement croître en réponse à un stress (inflammation, infection ou cancer). Les LT V γ 9V δ 2 sont très cytotoxiques et produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Ces fonctions sont permises suite à la reconnaissance d'antigènes non peptidiques par leur TCR, appelés phosphoantigènes (PAgs), de façon indépendante des molécules du CMH. Différentes études ont montré que les LT V γ 9V δ 2 sont capables de tuer un large panel de cellules tumorales provenant de cancers solides et hématologiques, mais cet effet est limité par l'apparition d'anergie.

Leur activation est médiée par différentes protéines, notamment les butyrophilines (BTN) BTN2A1 et BTN3A1, formant un complexe autour du TCR V γ 9V δ 2 et permettant la reconnaissance du PAg. D'autres acteurs interviennent également pour réguler ce mécanisme comme le transporteur ABCA-1 ou encore la protéine RhoB.

Dès lors que le rôle de RhoB dans l'activation des LT V γ 9V δ 2 par des cancers solides n'est pas clairement défini, le premier objectif de mes travaux de thèse visait à préciser davantage ce mécanisme, grâce à un modèle in vitro de cancer du poumon. Par ailleurs, les LT V γ 9V δ 2 présentent la faculté originale mais peu étudiée de pouvoir s'activer en l'absence de cellule cible. Ainsi, l'objectif de la seconde partie de mes travaux de thèse était de caractériser cette « self-activation ».

L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de la compréhension du mécanisme complexe d'activation des LT V γ 9V δ 2 pour améliorer leur efficacité en clinique.

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

MOTS-CLES : Lymphocytes T $\gamma\delta$, activation, cancer, RhoB, butyrophilines

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse – CRCT
UMR1037 Inserm/Université Toulouse III Paul Sabatier/ERL5294 CNRS
Oncopole de Toulouse – CS 537717
2 avenue Hubert Curien
31037 TOULOUSE CEDEX 1 – France

Directeur de thèse : Dr Mary POUPOT