



HAL
open science

Pathophysiologie des pDCs et des Lymphocytes $T\gamma\delta$ en contexte de mélanome, et potentiel de leur interaction pour le développement de nouvelles thérapies

Pauline Girard

► **To cite this version:**

Pauline Girard. Pathophysiologie des pDCs et des Lymphocytes $T\gamma\delta$ en contexte de mélanome, et potentiel de leur interaction pour le développement de nouvelles thérapies. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV042 . tel-03199222

HAL Id: tel-03199222

<https://theses.hal.science/tel-03199222>

Submitted on 15 Apr 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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Pauline Girard

Thèse dirigée par **Caroline ASPORD, PhD, Etablissement Français du Sang**, et
codirigée par **Julie CHARLES, PUPH, CHU Grenoble Alpes**

préparée au sein des **Laboratoires R&D de l'établissement Français du Sang et INSERM U1209-CNRS UMR5309, Institute for Advanced Biosciences**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Pathophysiologie des pDCs et des lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte de mélanome, et potentiel de leur interaction pour le développement de nouvelles thérapies

Thèse soutenue publiquement le **15 décembre 2020**,
devant le jury composé de :

Mme Sophie PARK

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU Grenoble,
Présidente

Mr Emmanuel SCOTET

Directeur de Recherche, INSERM UMR1232 Nantes, Rapporteur

Mr Jérémie DI DOMIZIO

Chargé de Recherche, Maître de conférences CHU de Lausanne,
Rapporteur

Mme Myriam CAPONE

Chargée de Recherche, UMR-CNRS5164 Bordeaux, Examinatrice

Mme Nathalie BENDRISS-VERMARE

Chargée de Recherche, UMR-INSERM 1052 CNRS 5286 Lyon, Invitée

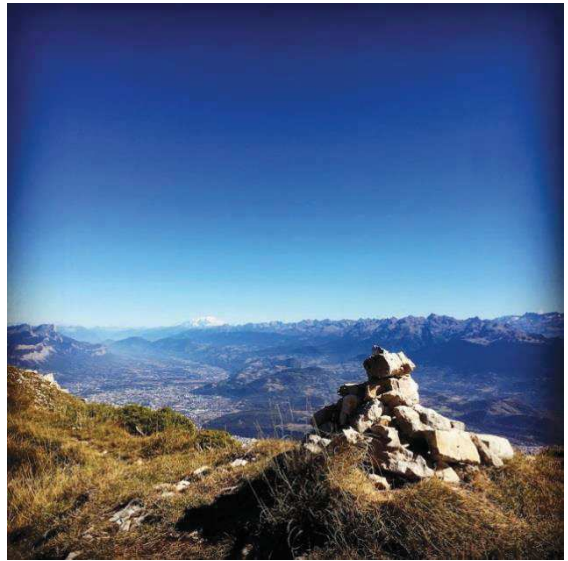
Mme Caroline ASPORD

Chargée de Recherche EFS-UGA-INSERM UMR 1209 - CNRS Grenoble,
Directrice de thèse

Mme Julie CHARLES

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Grenoble, Co-directrice





A Mamie

A ma famille

Remerciements

Je voudrais remercier en premier lieu le Dr Jérémy Di Domizio et le Dr Emmanuel Scotet de me faire l'honneur d'évaluer ce manuscrit, ainsi que Mme le Pr Sophie Park, Mme le Dr Myriam Capone et Mme le Dr Nathalie Bendriss Vermare, pour avoir accepté de suivre et évaluer mon travail, pour les riches discussions et vos précieux conseils, tout d'abord en tant que membres Comité de Suivi Individuel et maintenant en tant qu'examinatrices.

Je remercie également les patients du CHU Grenoble-Alpes, qui ont accepté de donner quelques précieux mL de leur sang et qui ont ainsi permis la réalisation de ce travail. Je remercie également l'Établissement Français du Sang, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, l'école doctorale EDCSV qui ont participé au financement de cette recherche.

Merci également à l'équipe du CHU de Grenoble, Corinne Lucas, Florence de Fraipont, Stéphane Mouret, pour leur collaboration active, et grâce à qui j'ai pu bénéficier des prélèvements et des données cliniques des patients.

Je souhaite également te remercier, Laurence, pour m'avoir accueillie dans ton labo, et merci pour tes précieux conseils !

Merci Julie pour ta gentillesse, et pour avoir partagé avec moi tes connaissances et les pratiques cliniques.

Caroline... Comment t'exprimer toute ma reconnaissance ! Merci pour tout ! Travailler à tes cotés a été un enrichissement professionnel et personnel. Merci pour ta grande disponibilité, ta patience, ton investissement sans faille, la transmission de ton savoir en toute humilité, ton soutien et tes conseils. Merci de m'avoir fait confiance, je partais d'un peu loin... !

Merci à tous les membres de l'équipe du labo, anciens, de passage ou fidèles au poste : JP et Oliver, la team de choc, le labo manquerait de quelque chose sans vous, (et mon bureau manquerait de biscuits aussi, merci Oliver !!!)

Merci à Françoise pour les discussions kinésio ! Theo, on n'oubliera pas ton répertoire musical varié (de Hatik à Richard Anthony), Céline (Dard !), merci pour ton soutien ces dernières semaines, Bastien et Elé, pour les moments sportifs (le lever de verre aussi ça compte !!), et les discussions scientifiques ou non... !

Merci aussi à la team du temps qui passe ! De nouveau réunies ! Bon on n'aura finalement pas fait beaucoup de randos, mais on peut encore se rattraper ! Merci Estelle pour toutes ces discussions #Polo, ou #potins c'est cool aussi ! Jamila pour les footings vidage de sac, je suis prête pour un marathon !

Merci aux stagiaires Béné, Léana, Guillaume ! Merci pour votre grande contribution au projet, vous avez assuré tous les 3 ! Cyrielle, bien le bonjour à kiki ! Merci pour ta bonne humeur !

Khemary merci pour ton soutien au Facs, j'attends le résumé de ton dernier roman ! Que tout se passe bien pour toi avec ta future petite famille !!

David, dis donc depuis le temps qu'on se suit d'un labo à l'autre !! Merci en tout cas pour ta présence et ton soutien, c'est toujours un plaisir d'échanger avec toi sur n'importe quel sujet.

Dalil, je me souviens du jour où tu m'as appelée depuis l'EFS pour me dire « j'ai une collègue qui cherche un doctorant... » et maintenant voilà.... Saha pour tout!

Merci aux copains <3 : Oriane et Doudou, Ben et Lulu, Yoyo, Mathiouuuuu, ma Didine, Erwann et Virginie, Laurent, Seb et Mathilde.

Ma Lucette ! Et son Mitch aussi bien sûr. Mon intuition ne m'a pas trompée le jour où on s'est retrouvée dans la même promo et que je me suis dit que t'avais l'air d'être une meuf trop cool !! On en a partagé des expériences, des moments de doute, des fous rires... ! Et c'est pas fini ! Et qui sait, peut-être à bientôt dans ton pays ?! Merci ma Lucette pour ton soutien et ta présence, ta pêche incessante, ces moments que l'on partage me sont chers !

Ma Pau, les années filent depuis les débuts de la fac ! Entre fous rires à la BU (merci Guillaume !), la coloc, Imbours, les cours de self défense à la casserole... et j'en passe... tu as toujours répondu présent dans les bons moments comme dans les mauvais, merci pour ton soutien sans faille. Tu te prépares à franchir une nouvelle étape de la vie, et je suis heureuse de pouvoir partager ces moments nouveaux avec toi <3

Merci aussi à toi ma Célou !! Team balance power forever !! Je suis heureuse de te compter parmi mes proches, merci pour ton entrain et ta joie de vivre, d'être là aussi pour les joies et les peines. A quand la coloc dans la Yaute ?! ;)

Merci à ma famille, vous m'êtes si chers !

Pascale, Agnès, Bastien, Agathe, Rémi, Margot, Lucie et Sofia. C'est toujours un bonheur de tous vous retrouver.

Papa, merci d'être là, de n'avoir jamais douté de moi. Merci pour ton soutien, de veiller même de loin ! Cette soutenance est aussi un peu pour toi.

Maman, merci d'être là aussi, pour ton soutien, tout ce que tu donnes.

Je vous aime

Grand-mère, nos petites soirées me manquent ! Je suis contente de bientôt de te retrouver. Toutes nos discussions m'ont aidée à grandir, merci pour ta présence et ton soutien. (Et j'espère que tu mets la pâtée à tes nouvelles adversaires bourguignonnes au Scrabble !)

A Tatie, tiens bon !

Les filles... ce dernier weekend a montré une fois de plus comme on pouvait être soudées, et ça n'a pas de prix. Merci d'être là par tous les temps, de m'avoir soutenue dans ce projet, d'être vous.

Dédicace à Thomsou et Nico aussi, merci infiniment aussi pour votre présence à toute épreuve !

Et câlin Louise !

Et enfin ma « belle rencontre » ;)

Merci à toi Justin, pour m'avoir soutenue (et supportée... !) ces derniers mois, pour ta patience, ta douceur et ta belle façon de voir la vie. Un immense merci pour le dernier coup de pouce. Un petit nombre de belles choses partagées avec toi déjà, et pas toujours des moindres, j'espère continuer à en partager davantage ! (pour les 6a, on va attendre encore un peu, hihi, mais trop hâte d'aller essayer ces nouveaux skiiiis !!).

Bon, c'est pas du disiz mais « I felt it from the first embrace I shared with you » : on ne rencontre pas les gens qu'on aime, on les reconnaît.

Clin d'œil à ta belle et grande famille aussi.

Sommaire

Résumé	10
Abstract	11
Liste des abréviations	12
Liste des figures	16
Chapitre 1 : Introduction	18
I. Les bases de l'onco-immunologie.....	18
A. Signatures moléculaires des cellules tumorales.....	18
1. Caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales	18
2. Signaux de danger associés aux tumeurs	20
B. De l'immuno-surveillance à l'échappement tumoral	22
1. Immuno-surveillance	22
a) Les acteurs immunitaires.....	22
b) La réponse anti-tumorale.....	23
c) Les points de contrôle immunitaire	23
2. La théorie des 3 E.....	25
C. Les mécanismes d'échappement des tumeurs à l'immuno-surveillance	26
a) Mécanismes inhérents aux cellules tumorales	26
b) Subversion de l'immunité.....	27
D. Le microenvironnement tumoral immun : à la jonction des interactions hôte- système immunitaire-tumeur	29
1. Micro-Environnement Tumoral Immun (TIME).....	29
2. Le façonnage du TIME par la tumeur.....	30
3. Classification des Micro-Environnements Tumoraux et impact pronostique	32
a) TNM.....	32
b) Tumeur « chaude » et tumeur « froide ».....	32
c) Immunoscore.....	34
d) Classification TIL/PDL1 et prise en charge associée.....	35
E. Immunothérapies.....	36

1.	Monothérapies	36
2.	Vers une combinaison d'approches	39
3.	Stratégie clinique en développement	40
II.	Le mélanome	41
A.	Caractéristiques	41
1.	Un peu d'histoire... ..	41
2.	Epidémiologie et incidence	42
3.	Développement malin	43
4.	Diagnostic	44
5.	Pronostic.....	44
6.	Pathogénie.....	45
7.	Mélanome et système immunitaire	47
B.	Traitements	48
1.	Thérapies conventionnelles historiques	48
2.	Prises en charge actuelles	48
3.	Critères d'évaluation et effets secondaires	51
4.	Immunothérapies actuelles et en développement.....	51
a)	Cytokines.....	51
b)	Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire	52
c)	Immunothérapie adjuvante	53
d)	Vaccins basés sur les cellules dendritiques.....	54
e)	Transfert adoptif de CAR-T cells	55
f)	Agoniste de TLR.....	55
g)	Agoniste de STING.....	56
h)	Modulation du microbiote.....	56
i)	Virus oncolytiques	57
5.	Bilan et perspectives	57

III. Deux acteurs majeurs du micro-environnement tumoral : les cellules dendritiques plasmocytoïdes et lymphocytes T $\gamma\delta$	59
A. Cellules dendritiques : le chef d'orchestre de la réponse immunitaire	59
1. Biologie et fonction des pDCs	59
2. Le double jeu des pDCs dans le cancer	63
3. pDCs dans le mélanome	65
4. pDCs en immunothérapie	67
B. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	69
1. Biologie et fonctions	69
2. Les sous-populations de T $\gamma\delta$	71
3. Activation et ligands des T $\gamma\delta$	72
4. La sous-population lymphocytaire TV γ 9V δ 2	75
5. BTN3A, molécule-clé dans l'activation des T δ 2+ par les PAgs	77
6. T $\gamma\delta$ dans le cancer	79
a) Rôle anti-tumoral	79
b) Rôle pro-tumoral	81
7. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le mélanome	82
8. T $\gamma\delta$ en immunothérapie	83
C. Cross talk bidirectionnel DCs – Lymphocytes T $\gamma\delta$	88
1. Interactions entre DCs et lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte sain	88
2. Interactions entre DCs et lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte pathologique ..	90
3. Cross-talk entre pDC et T $\gamma\delta$	91
Chapitre 2 : Objectif de la thèse	92
Chapitre 3 : Caractérisation des lymphocytes T $\gamma\delta$ circulant et infiltrant les tumeurs chez les patients atteints de mélanome	95
The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome	96
Chapitre 4 : Caractérisation des interactions entre pDCs et lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte sain	137

Potent bidirectional cross talk between plasmacytoid Dendritic Cells and $\gamma\delta$ T cells through BTN3A, type I/II IFNs and immune checkpoints.....	138
Chapitre 5 : Caractérisation des interactions entre pDCs et lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte mélanome	174
Dysfunctional BTN3A and deregulated immune checkpoints and cytokines dictate defective cross-talks between circulating or tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients that impact clinical outcomes	175
Chapitre 6 : Discussion et perspectives	260
Chapitre 7 : Conclusion	272
Bibliographie.....	273

Résumé

Mots-clés : pDCs, lymphocytes T $\gamma\delta$, T δ 2+, interaction, mélanome, immunothérapie, patients

Résumé

Les pDCs et T $\gamma\delta$ ont des rôles cruciaux dans l'initiation et l'orientation des réponses immunitaires. Leurs fonctions uniques, leur grande plasticité et leur capacité d'interagir avec de nombreux acteurs immunitaires leur permettent de créer un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles contribuent donc grandement aux réponses immunitaires protectrices et pathogéniques, et sont de ce fait très prometteuses pour le développement d'immunothérapies anti-tumorales, autant en tant que vecteurs que cibles. Cependant, les lymphocytes T $\gamma\delta$ n'ont pas été étudiés de manière approfondie en contexte de mélanome, et les interactions entre pDCs et T $\gamma\delta$ n'ont été explicitées ni en contexte sain, ni en contexte mélanome, où le contrôle immunitaire de la tumeur à long terme est encore un défi.

Nous avons réalisé une étude détaillée du phénotype et de la fonction des lymphocytes T $\gamma\delta$ circulant et infiltrant le mélanome, et analysé leur impact sur l'évolution clinique. Nous avons aussi caractérisé les interactions bidirectionnelles entre les pDCs et les T $\gamma\delta$ issus de sang de donneurs sains, et de sang ou de tumeur de patients. Nous avons mis en évidence que le mélanome détourne les fonctions effectrices des T $\gamma\delta$ dans le but d'échapper au contrôle immunitaire, et que les caractéristiques des T $\gamma\delta$ issus de sang ou de tumeurs de patients peuvent être des bio-marqueurs prometteurs d'évolution clinique. Nous avons également montré que les interactions entre pDCs et T $\gamma\delta$ sont médiées par les IFNs de type I et II et par le récepteur BTN3A, essentiel pour l'activation des T δ 2+, et sont dérégulées en contexte de mélanome. L'administration de cytokines et d'anticorps ciblant les points de contrôle immunitaire peut rétablir des interactions fonctionnelles entre les deux populations cellulaires. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation de l'expression de BTN3A sur les pDCs et T $\gamma\delta$ issus de sang de patients ou de tumeurs, tout en soulignant une potentielle dysfonction de cette molécule.

Notre étude révèle que le mélanome détourne les interactions entre pDCs et T $\gamma\delta$ notamment via la dérégulation de BTN3A. De tels résultats motivent l'exploitation de ces effecteurs immunitaires ainsi que de leur synergie, pour développer de nouvelles approches thérapeutiques exploitant leur potentiel anti-tumoral tout en évitant leur détournement par la tumeur pour améliorer l'évolution clinique des patients. Nos découvertes soutiennent l'exploitation de ces partenaires puissants et prometteurs pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques et restaurer des réponses immunes appropriées en contexte de cancer, infections et auto-immunité.

Abstract

Key words: pDCs, $\gamma\delta$ T cells, T δ 2+, cross-talk, melanoma, immunotherapy, patients

Abstract

Both pDCs and $\gamma\delta$ T cells harbor critical roles in immune responses induction and orientation. Their unique features, high functional plasticity and ability to interact with many immune cell types allow them to bridge innate and adaptive immunity. They actively contribute to protective and pathogenic immune responses, which render them very attractive both as targets and vectors for cancer immunotherapy. Yet, $\gamma\delta$ T cells have not been extensively explored in melanoma, and despite strategic and closed missions, cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells have not been deciphered yet, neither in healthy context nor in cancers, especially in melanoma where the long-term control of the tumor still remains a challenge.

We provided here a detailed investigation of the phenotypic and functional properties of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients, as well as their impact on clinical evolution. We also characterized the bidirectional cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells both from healthy donor's blood, patient's blood and tumor micro-environment. Our study highlighted that melanoma hijacked $\gamma\delta$ T cells to escape from immune control, and revealed that circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cell features are promising potential biomarkers of clinical evolution. We also demonstrated crucial bidirectional interactions between these key potent immune players through type I and II IFN and BTN3A that are dysfunctional in the context of melanoma. Reversion of the dysfunctional bidirectional cross-talks in melanoma context could be achieved by specific cytokine administration and immune checkpoint targeting. We also revealed an increased expression of BTN3A on circulating and tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients but stressed out its potential functional impairment.

Thus, our study uncovered that melanoma hijacked pDCs/ $\gamma\delta$ T cells bidirectional interplay to escape from immune control, and pointed out BTN3A dysfunction. Such understanding will help harnessing and synergizing the power of these potent immune cells to design new therapeutic approaches exploiting their antitumor potential while counteracting their skewing by tumors to improve patient outcomes. Our findings pave the way to manipulate these potent and promising cell partners to design novel immunotherapeutic strategies and restore appropriate immune responses in cancers, infections and autoimmune diseases.

Liste des abréviations

4-1BB:	CEA: Carcinoembryonic Antigen
ABP: aminobiphosphonates	cFLIP: Cellular FLICE-like inhibitory protein
aCTLA4: anti cytotoxic T lymphocyte antigen-4	CLR: C-type Lectin-Receptor
ADCC: antibody-dependent cell cytotoxicity	CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
AJCC: American Joint Committee on Cancer	COX2: CycloOXYgénase 2
AKT: Activation of Protein Kinase B	CRC: Colorectal cancer
AML: Acute Myeloid Leukemia	CRT: Calréticuline
APC: antigen-presenting cell	CSF-1: Colony stimulating factor 1
ARG1: Arginase 1	CTL: Cytotoxic T Lymphocytes
ARID2: AT-Rich Interaction Domain 2	CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
ARN: Acide Ribonucléique	DAMPs: Damage-associated molecular patterns
ATP: Adenosine Triphosphate	DC: Dendritic Cell
AVCs: cellules vasculaires angiogéniques	DMAPP: Dimethylallyl Diphosphate
BAGE: B melanoma antigens	DNA: Deoxyribonucleic Acid
BDCA2: blood dendritic cell antigen 2	DOT: Delta One T cells
BRAF: B-Raf Ser/Thr kinase	DOXP: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
BTN3A: Butyrophiline A 3	EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
CAFs: fibroblastes associés aux tumeurs	ERK: Extracellular signal-regulated
CAR: chimeric antigen receptor	FDA: Food and Drug Administration
CCL n: Chemokine (C-C motif) Ligands n	FGF: Fibroblast Growth Factor
CCRn: C-C chemokine receptor type n	FPPS: Farnesyl pyrophosphate synthase
CD95-L: Voir Fas L	GAGE: Generally Applicable Gene-set Enrichment
CDK4: Cyclin-dependent kinase 4	GITR: Glucocorticoid-induced TNFR family related gene
CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A	GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
CDs: Cellules Dendritiques	GMP: Good manufacturing process

GNA11: Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	irAE: Immune-related Adverse Effect
GNAQ: Guanine nucleotide-binding protein G (q)	IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase
GRZB: Granzyme B	IRF1: Interferon regulatory factor 1
GZM: Granzyme	irRC: immune-related Response Criteria
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activator motif
HLA: Human Leukocyte Antigen	ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif
HMBPP: (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate	KIT: C-kit Gene (C117)
HMGB1: High-mobility group box 1	KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma
HSP: Heat shock protein	LAG-3: Lymphocyte Activation Gene-3
ICAM1: InterCellular Adhesion Molecule 1	LDH: Lactate Déshydrogénase
ICD: Immunogenic cell death	LPS: Lipopolysaccharide
ICOS: inducible co-stimulator	Mab: Monoclonal antibody
ICP: Immune Check Point	MAGE: Melanoma-Associated Antigens
IDO: Indoleamine 2	MAP: Protéine Mitogène Activée
IFN: Interferon	MAPK: Protéines Kinase Mitogène-activée
Ig: Immunoglobulin	MCT1: Monocarboxylate transporter 1
IICs: Cellules immunitaires infiltrantes	mDCs: Myeloid dendritic cells
IL: Interleukine	MDSC: Myeloid-derived suppressor cells
ILC: Innate Lymphoïd Cell	MEK: MAPK/ERK activity Kinase
ILT: Innate Like T Cell	MEP: Methylerythritol 4-phosphate
IMiD: Immunomodulatory drug	MHC: Major histocompatibility complex
InCA: L'institut National du Cancer	MICA/B: MHC class I polypeptide-related sequence A/B
INOS: Inducible nitric oxide synthase	MMP: Matrix metalloproteinases
IP10=CXCL10: Interferon gamma-induced protein 10	MUC1: Mucin 1
IPP: Isopentenyl pyrophosphate	MyD88: myeloid differentiation primary response 88

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF1: Neurofibromatosis type I

NF-kB: Nuclear factor-kappa B

NKG2D: Natural Killer Group 2 Member D

NKT: Natural Killer T cells

NLR: Neutrophil to lymphocyte ratio

NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain

NOS: Nitric oxide synthetase

NRAS: Neuroblastoma RAS

NRF2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

NY-ESO-1: New York-esophageal squamous cell carcinoma

OS: Overall Survival

OX40:

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Pattern

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PD-1: Programmed cell death protein 1

pDC: Cellule dendritique plasmocytoïde

PDGF: Platelet-derived growth factor

PD-L1: Programmed death-ligand 1

PGE: Prostaglandin E

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

Poly I:C: Acide polyinosinique-polycytidylique

PRR: Pattern Recognition Receptor

PSA: Protate specific antigen

PTEN: Phosphatase and Tensin Homology Protein

PTX3: Pentraxin 3

RAF: Rapidly accelerated fibrosarcoma

RAG: Recombinaison-Activating Gene

RAS: Rat Sarcoma

RB: Retinoblastoma

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumor

RNA: Ribonucleic Acid

ROS: Reactive Oxygen Species

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

SCID: severe combined immunodeficiency

SEER: Surveillance Epidemiology and End Results

sMICA: Soluble MICA

SNDV: Syndicat national des Dermatologues Vénérologues

SSM: Superficial spreading melanoma

STAT: Signal transducer and activator of transcription

TAA: Target-associated antigen

TAM: Tumor associated macrophage

TAP: Transporteur associés au processing antigénique

Tbet: Transcription factor encoded by TBX21

TCR: T Cell Receptor

TGF: Transforming growth factor

TH: T Helper

TIGIT: T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TIL: Tumor-infiltrating lymphocytes

TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

TLR: Toll-like receptor

TLS: Tumour lysis syndrome

TNFRSF: Tumor necrosis factors receptor superfamily

TNFs: Tumor necrosis factors

TNM: Tumor node metastase

TRAIL: Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand

TREG: Regulatory T cells

TRM: Resident memory T

ULBP: UL16-binding Protein

UVA: Ultraviolet A

VCAM1: Vascular cell adhesion molecule 1

V-D-J: Variable, Diversité et Jonction

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VISTA: V-domain Ig-containing Suppressor of T cell Activation

Liste des figures

Figure 1: Caractéristiques des cellules tumorales (1).....	19
Figure 2 : Signaux de danger associés aux tumeurs.....	21
Figure 3: Réponse anti-tumorale (2).....	23
Figure 4 : Représentation de l'immunosurveillance et l'immunoédition	25
Figure 5: Mécanismes immunitaires menant à la perte des fonctions immuno-protectrices. Vesely Annu.Rev.Immunol 2011	27
Figure 6: Défaillance des T CD8+ au sein du micro-environnement tumoral. De Guillebon et al. IJC 2020	28
Figure 7: Interactions métaboliques au sein du microenvironnement tumoral (18)...	30
Figure 8: Façonnage du TIME par le génotype et le phénotype tumoral (19).....	31
Figure 9 : Différentes classes de TIME (19)	33
Figure 10 : Représentation graphique du profil immun, de l'Immunoscore et de la constante immunologique de rejection (20).....	34
Figure 11 : Classification des cancers en fonction de la présence de T infiltrants et de l'expression de PD-L1 (23).....	36
Figure 12 : Thérapies adaptées aux étapes du cycle cancer-immunité(24)	37
Figure 13 : Immunothérapies anti-tumorales (25).....	38
Figure 14: Combinaison idéale en immunothérapie anti-tumorales (28)	39
Figure 15: Stratégies thérapeutiques combinées (31)	41
Figure 16: Représentation des paramètres de Breslow et Clarck, Source : http://www.arcagy.org/infocancer	45
Figure 17: Fréquence de mutation en fonction du type de cancer (40)	46
Figure 18 : Voies de signalisation génétique dans le mélanome. (42).....	47
Figure 19 : Arbre décisionnel pour le mélanome cutané métastatique non résecable	50
Figure 20: Autres molécules ciblées dans les essais en développement.....	53
Figure 21 : Essais cliniques basés sur le microbiote en cours pour le mélanome métastatique. Clinical trial.gov	57
Figure 22: Comparaison des taux de réponses cliniques des différentes approches thérapeutiques pour le mélanome	58
Figure 23: Survie globale en fonction des 1ères lignes de traitements pour les mélanomes métastatiques (64)	58
Figure 24 : Phénotype de la pDC (67)	61
Figure 25: Fonctions moléculaires des pDCs (41).....	62

Figure 26 : Fonctions cellulaires des pDCs (68).....	62
Figure 27 : Double rôle des pDCs en contexte tumoral (87).....	65
Figure 28: Approches thérapeutiques ciblant ou utilisant les pDCs chez des patients atteints de mélanome (41).....	67
Figure 29 : Fonction des $T\gamma\delta$ (110).....	70
Figure 30: Diversité du $TCR\gamma\delta$ et de ces co-recepteurs (115).....	73
Figure 31: Différents ligands du $TCR\gamma\delta$ (120).....	74
Figure 32 : Récepteurs des $T\gamma\delta$ et leurs ligands. Adapté Sebestyen et al. 2019 (115).....	75
Figure 33: Voies mévalonate et isoprénoïde.....	76
Figure 34 : Phospho-antigènes (Adapté de Scotet 2015) (125).....	77
Figure 35 : Isoformes de BTN3A (114).....	78
Figure 36: Fonctions anti-tumorales des $T\gamma\delta$ (132).....	80
Figure 37 : Rôle pro-tumoral des $T\gamma\delta$. (126).....	82
Figure 38: Evolution des recherches et exploitation de $T\gamma\delta$ au cours du temps (126).....	83
Figure 39: Manipulation thérapeutique des $T\gamma\delta$ humains (115).....	85
Figure 40 : Stratégie moléculaire basée sur la population $T\delta 2+$ (147).....	87
Figure 41: Stratégies thérapeutiques basées sur les $T\gamma\delta$ en développement (150) .	88

Chapitre 1 : Introduction

I. Les bases de l'onco-immunologie

Le cancer tue des millions de personnes chaque année. Cependant, l'avancée des recherches et la compréhension des mécanismes donnent lieu à de nouvelles approches et stratégies pour combattre son développement. Nous suivons une dynamique darwienne et les tumeurs aussi, ce qui est leur redoutable force. De nombreux paramètres intrinsèques et extrinsèques servent cette capacité d'adaptation tumorale, et nous résumerons dans cette première partie les caractères inhérents à la tumeur, puis nous présenterons les mécanismes de défense mis en place par l'organisme, pour enfin décrire les interactions hôte-système immunitaire qui servent à une prise en charge des patients plus personnalisée, et ouvrent à de nouvelles approches thérapeutiques.

A. Signatures moléculaires des cellules tumorales

Les cellules tumorales présentent des propriétés fondamentales et des mécanismes de régulation qui leurs sont spécifiques. Connaître leur fonctionnement est une étape cruciale pour la compréhension et le contrôle de leur prolifération.

1. Caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales

Une des caractéristiques propres aux cellules tumorales est la modification de leur métabolisme soutenant leur viabilité et une prolifération cellulaire aberrante. Elles développent la capacité de capter dans leur environnement les nutriments nécessaires à leur survie, ou détournent leurs voies métaboliques pour être indépendantes et autosuffisantes même lorsque l'environnement s'appauvrit en nutriment. Les signatures tumorales impliquées dans la pathogénèse sont représentées par Hanahan et Weinberg(1) dans le schéma suivant (Figure 1):

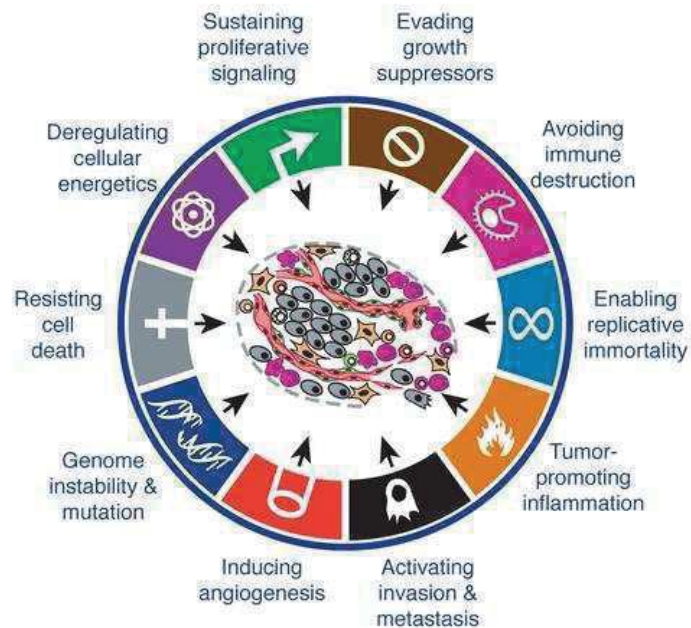


Figure 1: Caractéristiques des cellules tumorales (1)

- l'autosuffisance en facteurs de croissance. Cet avantage peut s'acquérir à plusieurs niveaux de la voie de signalisation : en produisant elles-mêmes les facteurs de croissance dont elles ont besoin, qui peuvent de plus subvertir l'immunité (IL4, IL6, IL10) ; en mutant les acteurs impliqués dans la voie de signalisation de ces facteurs solubles (STAT3 ou Ki-Ras) ou encore en sur-exprimant les récepteurs de ces facteurs de croissance comme EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) par exemple.
- l'insensibilité aux signaux inhibant la croissance, comme le $TGF\beta$, par mutation du récepteur ou de sa voie de signalisation. Cette caractéristique est doublement profitable pour la cellule tumorale car elle échappe au signal de quiescence induit par le $TGF\beta$, tout en cumulant dans son microenvironnement ce facteur de croissance immunosuppresseur.
- l'échappement au phénomène d'apoptose. Plusieurs voies de signalisation induisent l'apoptose et il a été montré que selon les cancers, différents intermédiaires peuvent être inhibés. Ce phénomène est crucial dans le processus d'oncogenèse mais est aussi lié à la résistance aux chimiothérapies.
- le développement d'un potentiel répliatif sans limite. Il s'acquiert par la maintenance des télomères. La plupart du temps, les cellules tumorales vont alors sur-exprimer une enzyme télomérase qui va ajouter sans cesse des nucléotides à l'ADN télomérique ou alors par recombinaison de séquences sur les télomères.

- Le maintien de l'angiogenèse via la surexpression de facteurs de croissance tels que VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) ou COX2 (CycloOXYgénase 2) pour promouvoir la croissance de vaisseaux sanguins autour de la tumeur.
- L'invasion tissulaire et la création de métastases : l'expression des gènes responsables de la cohésion ainsi que le pH du milieu extracellulaire sont modifiés en faveur d'une transition épithélio-mésenchymateuse donc de métastases.
- Modification et reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule,
- Instabilité génomique et accumulations de mutations génétiques conférant un avantage sélectif à la tumeur.
- La création d'un environnement pro-inflammatoire chronique permettant l'établissement d'un microenvironnement pro-tumoral.
- L'échappement à l'immuno-surveillance : la perte de l'expression des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ou des modifications dans le processus de présentation d'antigènes sont modifiés par les cellules tumorales afin d'éviter la mort induite par les lymphocytes T cytotoxiques. De plus, l'acidification du milieu extra-cellulaire par la présence de lactate inhibe l'action immuno-protectrice des effecteurs immunitaires. Cette étape sera détaillée dans la partie suivante.

Les signatures propres aux cellules tumorales s'établissent à différents niveaux : d'une part au niveau cellulaire, avec des dérégulations énergétiques et une instabilité génomique qui donnent lieu à de nombreuses mutations permettant la survie et à une reprogrammation génétique favorisant la prolifération néoplasique ; et d'autre part, les modifications phénotypiques et fonctionnelles qui permettent d'échapper à la destruction par le système immunitaire et d'instaurer d'un environnement favorable au développement et à la mobilité.

2. Signaux de danger associés aux tumeurs

L'identification d'antigènes associés aux tumeurs a été très bénéfique pour la compréhension de l'immunologie des tumeurs et pour le développement de thérapies. En pratique, toute cellule tumorale exprime de «nouvelles » protéines de surface, ou sur-exprime des protéines déjà existantes, ce qui constitue des messages antigéniques intéressants que peuvent cibler les mécanismes naturels de défense immunitaire ou les immunothérapies. Si l'anomalie se trouve au niveau des facteurs régulant l'expression de la protéine, elle peut être surexprimée ; si la protéine en elle-même contient une anomalie, due à une dysfonction des modifications post traductionnelles par exemple (glycosylation, phosphorylation..),

c'est une version modifiée de la protéine qui va être exprimée. Ces antigènes formés peuvent être classés en 2 grands groupes : d'une part les néo-antigènes, ou antigènes à haute spécificité tumorale et absents des cellules saines ; d'autre part à basse spécificité tumorale, ou encore antigènes du soi, pouvant être retrouvés également sur les tissus sains. Ces antigènes sont dégradés par la cellule et présentés sous forme de peptides par les molécules du CMH, permettant aux cellules de l'immunité de distinguer les cellules tumorales des cellules saines.

D'autres signaux de danger non pris en charge par le CMH démarquent une cellule tumorale: les DAMPS (Damage-associated molecular patterns) ou les facteurs nucléaires et cytosoliques membranaires ou solubles issus du métabolisme de la cellule tumorale (Figure 2).

Signaux de danger associés aux tumeurs		Caractéristiques
Antigènes tumoraux	Antigènes viraux	<ul style="list-style-type: none"> Dérivés de virus oncogènes (Epstein Barr virus ou Human Papilloma Virus 16 et 18), responsables de tumeurs viro-induites -> Reconnus comme « non-soi » par les lymphocytes T cytotoxiques
	Néo-antigènes	<ul style="list-style-type: none"> Induit par des mutations sur les oncogènes p53 ou KRAS impliqués dans des voies de proliférations, Protéines dont les modifications post-traductionnelles sont altérées. -> Typique des tumeurs à haut taux de mutation comme le mélanome.
	Antigènes du groupe « cancer testis »	<ul style="list-style-type: none"> Réactivation des gènes exprimés par les cellules germinales dans les premiers stades de développement d'un tissu (normalement éteints lorsque le tissu est développé) MAGE, NY-ESO-1 ..
	Antigènes de différenciation	<ul style="list-style-type: none"> Protéines du soi spécifiques du tissu d'origine: Mélanome: MelanA, gp100 Cancer du sein: HER2 Cancer de la prostate: PSA ... -> exprimés sur la cellule tumorale et le tissu adjacent sain
	Antigènes surexprimés	<ul style="list-style-type: none"> Facteur de croissance HER2 (cancer du sein) Protéines anti-apoptotiques (survivine) dont l'expression est exacerbée -> Spécificité tumorale faible
Facteurs solubles		<ul style="list-style-type: none"> IL10, TGFβ, gangliosides, chemokines
DAMPs		<ul style="list-style-type: none"> Molécules nucléaires ou cytosoliques exposées en surface des cellules ou relargées: HSP, Acide urique, ATP, calréticuline, HMGB1, ADN ou ARN tumoral

Figure 2 : Signaux de danger associés aux tumeurs

L'ensemble de ces facteurs anormaux vont être identifiés comme signal d'alerte par le système immunitaire, qui va initier une réponse pour éliminer ces cellules. Ces facteurs définissent alors l'immunogénicité tumorale.

B. De l'immuno-surveillance à l'échappement tumoral

1. Immuno-surveillance

a) *Les acteurs immunitaires*

Le système immunitaire est l'ensemble des effecteurs responsables des défenses de l'organisme. Il se compose d'acteurs cellulaires et moléculaires capables de reconnaître et d'éliminer des agents pathogènes ou des cellules du Soi transformées. Il se distingue en deux groupes : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Ses composants sont capables de reconnaître des signaux de danger et de réagir en quelques heures mais de manière non spécifique. Elle est formée de granulocytes, regroupant les basophiles, éosinophiles et neutrophiles, ainsi que de monocytes, macrophages, Cellules Dendritiques (DCs) et de Natural Killer.

L'immunité adaptative intervient ensuite, en quelques jours, mais agissant de manière très spécifique. Elle est capable également de mettre en place une mémoire immunitaire ciblée contre un pathogène défini, afin de déclencher une réaction plus rapide en cas de nouvelle infection. Elle est composée majoritairement de lymphocytes T et B.

Il existe un autre groupe d'acteurs immunitaires à l'interface de ces deux groupes, possédant des caractéristiques communes aux 2 types d'immunité, défini par l'immunité translationnelle. Sa capacité de reconnaissance et sa vitesse de réaction se rapprochent des caractéristiques de l'immunité innée alors que ses fonctions effectrices sont semblables aux caractéristiques de l'immunité adaptative. Elle se compose de NKT (Natural Killer T cells), de lymphocytes $T\gamma\delta$ et de lymphocytes T MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) et du sous type de lymphocytes B1.

b) La réponse anti-tumorale

La réponse anti tumorale classiquement décrite est schématisée par Banchereau et Palucka (2) selon le modèle suivant (Figure 3):

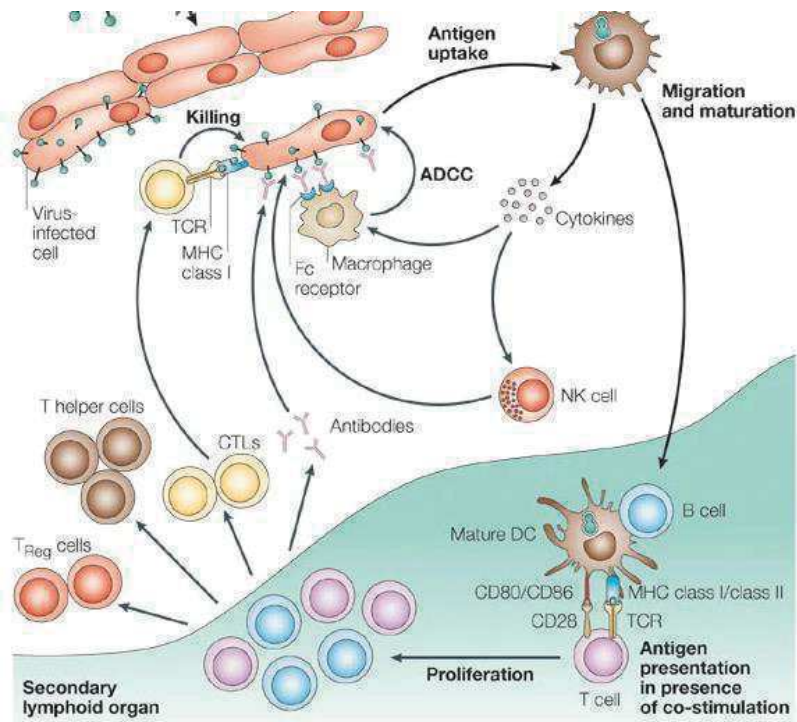


Figure 3: Réponse anti-tumorale (2)

Lors d'un développement cellulaire anormal, des signaux de danger apparaissent, comme le relargage de DAMPs (fragments de cellules mourantes ou tissus abîmés), l'expression d'antigènes tumoraux, ou encore la sur-expression de molécules de stress comme MICA/MICB. Une réponse immunitaire est alors mise en place : Grâce à un panel de bio senseurs moléculaires (PRRs, pour Pattern Recognition Receptors) les DCs sont capables de reconnaître ces motifs issus du Soi altéré (3, 4). Considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles », les DCs capturent ces antigènes, mûrent et migrent vers les ganglions drainants pour présenter ces antigènes peptidiques aux cellules de l'immunité adaptative, notamment aux lymphocytes T CD4⁺ helper, T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) et activent les lymphocytes B. Les cellules T vont alors migrer vers les tissus inflammés par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et éliminer les cellules tumorales. Pour contrôler la réponse immunitaire, les lymphocytes T régulateurs (CD4⁺ CD25⁺) sont aussi activés.

c) Les points de contrôle immunitaire

Le système immunitaire utilise différents points de contrôle pour réguler ses réponses et trouver un juste équilibre entre le maintien de l'homéostasie et la

prévention d'une sur-réactivité ou d'auto-immunité. La régulation des lymphocytes T effecteurs illustre cette balance parfaite entre ces signaux positifs et négatifs, qui induiront une activation ou une inhibition (Figure 4).

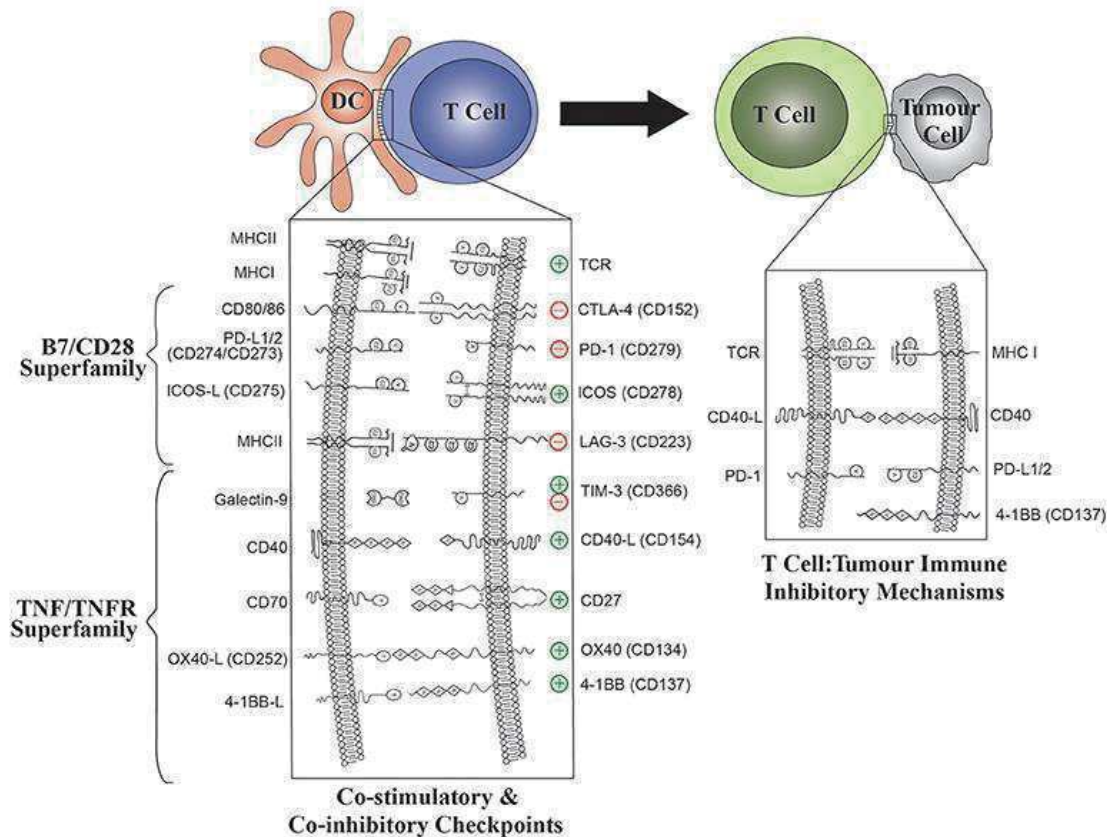


Figure 4 : Molécules co-inhibitrices ou co-stimulatrices dans les interactions DC/ lymphocyte T et lymphocyte T/tumeur (5)

Ces points de contrôle sont exprimés par les cellules immunitaires, et ceux des lymphocytes T sont bien caractérisés. Leurs ligands se trouvent sur les DCs ou directement sur les cellules tumorales. Ils complètent le message de stimulation ou d'inhibition des cellules T effectrices au moment de la présentation antigénique. Ce système est parfois manipulé par la tumeur pour atténuer ou même stopper la réponse anti-tumorale dirigée contre elle. Ces points de contrôle appartiennent aux super-familles des B7 ou des TNFs. La superfamille des B7/CD28 constitue des immunoglobulines dont l'expression inductible est régulée par des signaux co-stimulateurs suite à l'engagement du TCR, jusqu'à être atténuée par des molécules co-inhibitrices (5, 6). CD27, OX40, 41-BB, CD40 sont par exemple des récepteurs co-stimulateurs dont l'expression est induite quelques heures ou jours après l'interaction DC –lymphocyte T. Les TNFRSF complètent également le priming des DC et la maintenance de lymphocytes T helper ou mémoires. Un des mécanismes de résistance mis en place par la tumeur est d'inhiber leur rôle co-stimulateur. Un

grand nombre de molécules co-inhibitrices ou co-activatrices sont identifiées à ce jour.

2. La théorie des 3 E

Le système immunitaire protège l'hôte, comme décrit précédemment, mais forge aussi l'immunogénicité de la tumeur. Ce concept appelé Immunoediting est décrit en 2011 par Schreiber, Old et Smyth (7) (Figure 4):

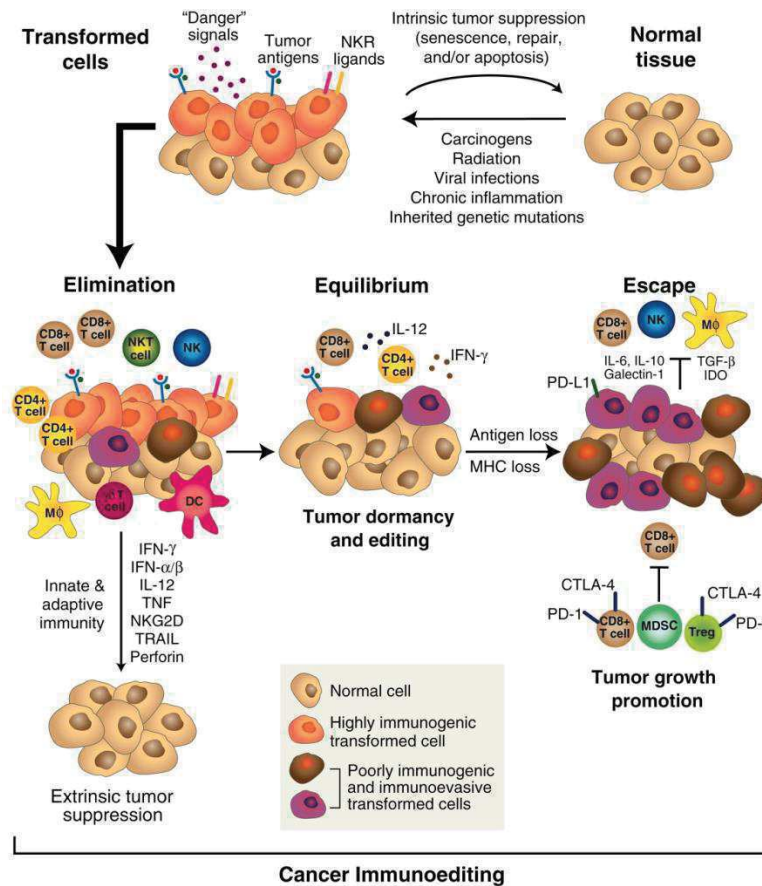


Figure 4 : Représentation de l'immunosurveillance et l'immunoédition

Élimination : Cette phase reprend la réponse immunitaire décrite précédemment. Elle représente donc la collaboration efficace entre l'immunité innée et l'immunité adaptative menant à l'élimination des cellules tumorales en développement. C'est l'aboutissement effectif de l'immuno-surveillance.

Équilibre : Dans cette phase, par défaut d'élimination correcte, ou à cause d'une pression immune continue appliquée aux cellules transformées naissantes, des clones résistants vont émerger. Il se crée un équilibre entre une élimination partielle des cellules tumorales et un contrôle de propagation des cellules résistantes. Cette phase est la plus longue et peut durer plusieurs années.

Échappement : La pression immunitaire appliquée en continu aux cellules tumorales quiescentes engendre l'apparition de modifications physiologiques et fonctionnelles des cellules tumorales (immunoediting). Ces clones résistants s'adaptent en développant une faible immunogénicité et contournent alors l'action protectrice du système immunitaire. Ils vont de plus établir un environnement immuno-suppresseur soutenant leur prolifération. La tumeur devient cliniquement apparente.

Cette théorie suggère que le rôle de l'immunité est double dans le développement des tumeurs. Il protège l'hôte mais sculpte aussi les tumeurs pour promouvoir leur développement. L'immunogénicité des tumeurs dépend de leur expression d'antigènes, des molécules du CMH mais aussi de l'expression de signaux de stress et de danger, et de molécules favorisant l'apoptose. Certains de ces antigènes sont communs, et présents dans plusieurs types de tumeurs ou sur des cellules saines et sont alors facilement tolérés par le système immunitaire. D'autres sont propres à chaque tumeur, et résultent des mutations géniques ayant lieu lors de l'oncogenèse.

C. Les mécanismes d'échappement des tumeurs à l'immuno-surveillance

a) Mécanismes inhérents aux cellules tumorales

En réponse aux attaques immunitaires, les cellules tumorales vont adapter leur phénotype et modifier leur fonctionnement.

Au niveau intrinsèque, les cellules tumorales vont parvenir à éviter la reconnaissance immune et échapper à l'apoptose en réduisant leur immunogénicité (8) :

- Perte d'expression de néo-antigènes ou du CMH-I
- Diminution de l'expression du récepteur de l'IFN γ
- Dérégulation de leur voie de signalisation (STAT1) engendrant un défaut de processing et présentation d'antigènes pour échappement à l'immunité adaptative
- Perte expression des ligands de NKG2D pour l'échappement de l'immunité innée
- Réduction des ligands de récepteurs induisant l'apoptose (CD95-L) ou sur-expression d'inhibiteurs d'apoptose (Bcl-XL , FLIP) (9)
- Résistance aux inhibiteurs de croissance comme le TGF β , par mutation du récepteur

- Réduction de l'activation de caspases.

Les cellules tumorales induisent alors une tolérance par les DCs et évitent la lyse par les lymphocytes T et les NK.

b) Subversion de l'immunité

Au niveau extrinsèque, d'une part l'immunité anti-tumorale effectrice sera éteinte, d'autre part une immunité tolérrogène va être induite :

L'atténuation ou l'élimination des cellules effectrices par les cellules tumorales est induite par :

- l'expression de gangliosides, galectine-1 ou platelet-derived growth factor (PDGF),
- un appauvrissement oxydatif et nutritionnel du milieu par la production de NOS (nitric oxide synthetase) et de l'enzyme IDO : hypoxie et privation d'arginine, de tryptophane ou de cystéine, essentiels pour le maintien des fonctions effectrices des lymphocytes T cytotoxiques
- la production de cytokines et autres facteurs immunosuppresseifs (TGF- β , l'IL-10, ARG1, VEGF).

Le micro-environnement tumoral corrompu par une inflammation pro-tumorale va engendrer une défaillance de la réponse anti-tumorale et une polarisation vers un environnement tolérrogène (Figure 5) :

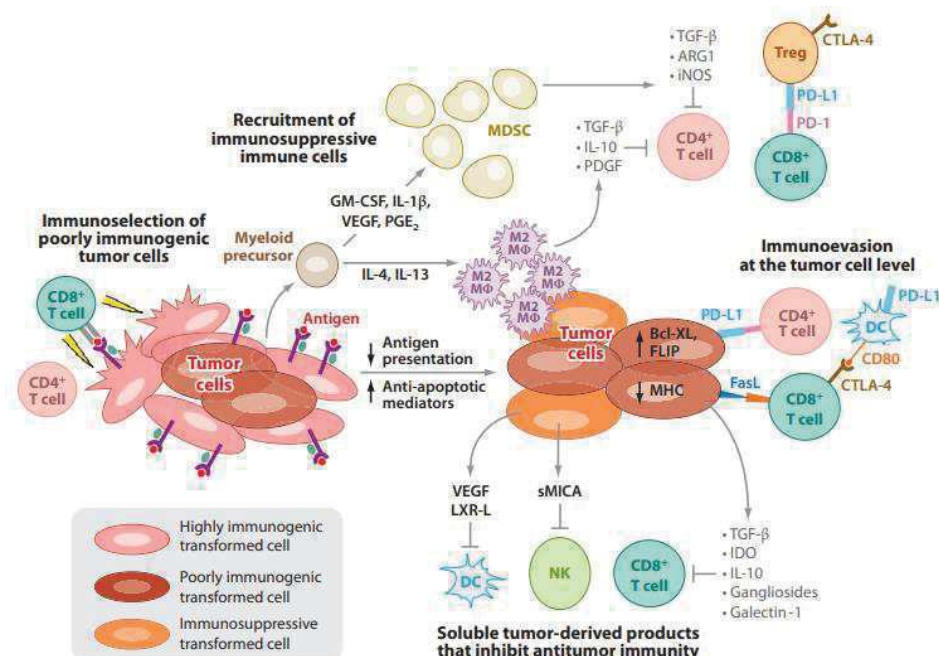


Figure 5: Mécanismes immunitaires menant à la perte des fonctions immuno-protectrices(9).

- Génération de Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs), Treg par sécrétion de GM-CSF, IL1- β , VEGF, PGE₂

- Sécrétion de facteurs régulateurs comme l'IL4 et l'IL13 promouvant la polarisation des macrophages M2 inhibiteurs de cellules T cytotoxiques
- Inactivation des récepteurs lymphocytes T (par nitrylation ou liaisons aux galectines)
- Inhibition des T cytotoxiques par expression de récepteurs inhibiteurs tels que CTLA4 ou PD1/PDL1
- Défaut de maturation et de différenciation des DCs
- Inhibition des DCs par la tumeur qui induit une défaillance en présentation croisée
- Sécrétion d'IFN α par les pDCs inhibée
- Induction d'une réponse Treg/TH2 par les pDCs

Les cellules tumorales anergisent alors les lymphocytes T et éteignent la réponse anti-tumorale.

Au cours de la progression tumorale, les effecteurs anti-tumoraux sont confrontés à différents obstacles.

- Certains ne parviennent pas à infiltrer et restent en marge de la tumeur ;
- D'autres infiltrent mais ont une mobilité réduite par la présence de fibronectine et de collagène (10);
- Leurs fonctions peuvent être modifiées par la co-expression de récepteurs inhibiteurs (Leurs propres régulateurs intrinsèques : comme PD1 ou CTLA4)
- Une exposition chronique des cellules T à des antigènes tumoraux, des interactions avec les DCs du micro-environnement tumoral non productives et une exposition prolongée aux cytokines immuno-modulatrices peut induire des changements dans la fonctionnalité des lymphocytes T: une tolérance, une inactivité ou même un épuisement, qui a un rôle majoritaire dans la défaite immunologique face à la tumeur (Figure 6).

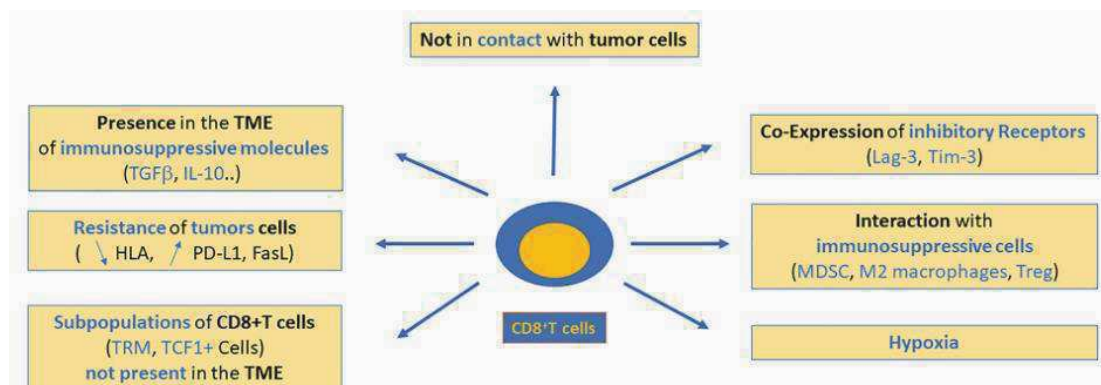


Figure 6: Défaillance des T CD8+ au sein du micro-environnement tumoral (11).

La création d'une inflammation est nécessaire pour déclencher une réponse anti-tumorale efficace mais elle doit être contrôlée et modérée pour ne pas finalement favoriser une progression tumorale. La grande plasticité des acteurs immunitaires est un atout, mais l'implication du Yin ou du Yang de chaque acteur immunitaire est fortement influencée par les interactions avec l'environnement, sur le site tumoral. Les cellules tumorales peuvent facilement faire pencher la balance et enclencher la mauvaise fonction des effecteurs de l'immunité. Ces communications font alors des cibles thérapeutiques intéressantes.

D. Le microenvironnement tumoral immun : à la jonction des interactions hôte-système immunitaire-tumeur

1. Micro-Environnement Tumoral Immun (TIME)

Les anomalies développées au niveau cellulaire détournent les mécanismes de réparation intrinsèques aux cellules, et ne pourraient pas conduire au développement de tumeur sans la coopération du milieu environnant. La physiopathologie d'une tumeur est orchestrée par les interactions entre trois composants : le cancer, le système immunitaire et l'hôte.

Les cellules vasculaires angiogéniques (AVCs), les cellules immunitaires infiltrantes (IICs) et les fibroblastes associés aux tumeurs (CAFs) coopèrent, et les nombreuses résultantes peuvent être radicalement opposées, rendant le pronostic d'évolution de la maladie, indépendamment du traitement, et la prédiction de réponse aux traitements difficiles.

Des résistances adaptatives ont été observées, comme par exemple le contournement du traitement par le recrutement d'autres facteurs proangiogéniques (12) ou d'autres sous-types de cellules stromales (IICs ou CAFs)(13) ou encore en détournant le réseau vasculaire des tissus sains plutôt que de développer une néovasculature(14). Des difficultés similaires ont été observées lors du ciblage d'IICs ou de CAFs, cependant des études ont montré un bénéfice potentiel en améliorant les problèmes de résistance adaptative lorsque les IICs sont ciblées (15, 16), donc la notion de thérapie co-dirigée a commencé à émerger. Une autre difficulté subsiste également : l'hétérogénéité des tumeurs, notamment au niveau la composition du microenvironnement.

L'infiltrat de cellules immunitaires est le sous-type cellulaire qui est le plus variable entre chaque type de tumeur mais également d'un patient à l'autre, et il se révèle

comme étant un bon outil diagnostique (17, 18). Friedman et ses collègues expliquent dans *cell rev cancer* 2012 que chaque sous-type de cellules immunes est trouvé au centre ou en périphérie des tumeurs. Les résultats cliniques sont une balance entre la force de la réponse immunitaire et les mécanismes d'évasion adoptée par la tumeur plutôt qu'un niveau d'activation défini du système immunitaire. Cibler les cellules immunitaires dans les thérapies est alors une bonne stratégie à exploiter.

2. Le façonnage du TIME par la tumeur

Les cellules tumorales altèrent la composition chimique du milieu extracellulaire, dont les conséquences se répercutent sur le phénotype des cellules normales et résidentes ainsi que sur la matrice extracellulaire, et à l'inverse, le microenvironnement peut affecter le métabolisme et les voies de signalisation des cellules tumorales (Figure 7).

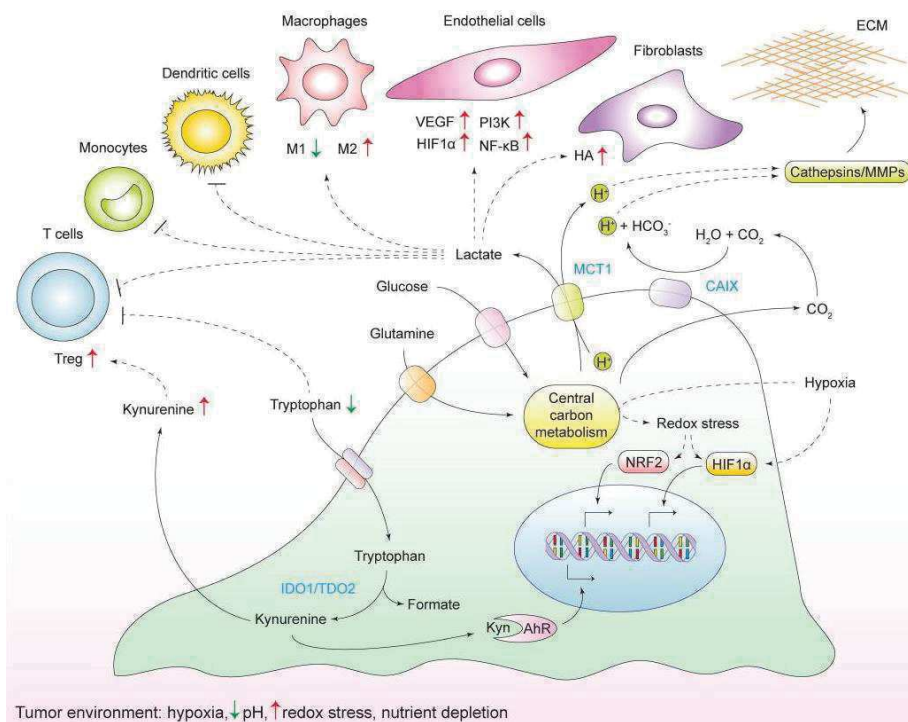


Figure 7: Interactions métaboliques au sein du microenvironnement tumoral (19)

Des recherches plus approfondies ont montré un lien entre le phénotype et génotype des cellules tumorales, leur charge mutationnelle et la mise en place de l'infiltrat (20) (Figure 8) :

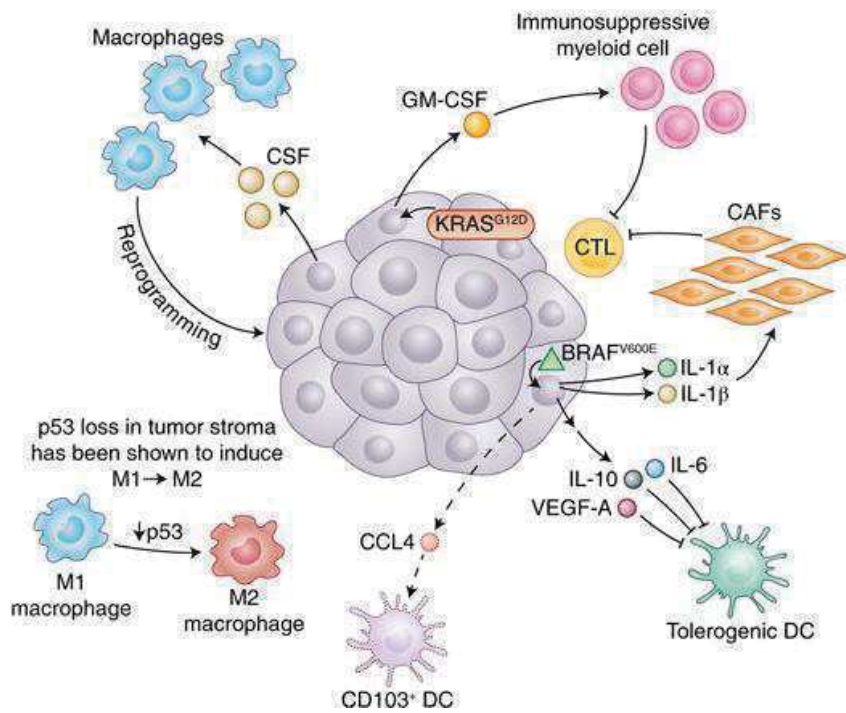


Figure 8: Façonnage du TIME par le génotype et le phénotype tumoral (20)

- le génotype tumoral contribue à la production de cytokine : dans le cas du mélanome par exemple, la mutation BRAF et le régulateur de transcription STAT3 induisent la sécrétion d'IL6, IL10 et de VEGF pour maintenir la tolérance
- les chimiokines dérivées des tumeurs : toujours dans le mélanome, la mutation BRAF induit une activation constitutive de la voie WNT/ β -caténine qui a pour conséquence de diminuer la production de la chimiokine CCL4 responsable du recrutement des DCs CD103+ (induisant le recrutement des T CD8+). Le CCL2 également sécrété par les tumeurs recrute les monocytes CCR2+ au sein de la tumeur et les différencie en TAM, population myéloïde pro-tumorale.
- les facteurs humoraux : de récentes études épigénétiques sur des tumeurs humaines ont montré que le promoteur du régulateur de complément PTX3 était hyper-méthylé, impactant donc le fonctionnement du TIME.
- la boucle de rétro-action paracrine : il a été montré que les cellules tumorales humaines secrètent de hauts niveaux de CSF-1, cytokine soutenant la différenciation et de survie des monocytes et macrophages, ainsi que du chimio-attractant CCL2, activant les monocytes, cellules T activées, DC immatures, basophiles et NK.
- la modulation du stroma : les cellules tumorales peuvent aussi impacter les cellules non immunitaires. Elles induisent en effet des modifications phénotypiques : la mutation BRAF conduit à la production d'IL1- α et IL β , augmentant ainsi la faculté des fibroblastes associés aux tumeurs à supprimer les lymphocytes T cytotoxiques

associés à la tumeur en secrétant COX2 et en régulant positivement l'expression des ligands PD-L1 et PD-L2.

- le panorama mutationnel des tumeurs : l'ensemble des mutations au sein des tumeurs peut d'une manière générale influencer l'étendue et le phénotype de l'infiltrat.

La tumeur façonne le TIME car un lien est observé entre l'instabilité génique, la densité et la nature de l'infiltrat.

3. Classification des Micro-Environnements Tumoraux et impact pronostique

a) *TNM*

Traditionnellement, la classification des tumeurs solides se fait selon les paramètres TNM, caractérisant la masse tumorale, l'invasion des ganglions drainants, et la présence de métastases. Cette classification définit le stade de la maladie et le choix du traitement post-opératoire dépend de ce stade d'évolution. Malheureusement, il est bien reconnu que les réponses aux traitements varient significativement d'un patient à l'autre même si le stade est identique, mettant en avant la grande hétérogénéité entre les tumeurs et la grande diversité entre patients et donc la limite de ce modèle de classification comme outil pronostique.

b) *Tumeur « chaude » et tumeur « froide »*

La quantité, la composition, la densité et la distribution spatiale des cellules de l'immunité adaptative définissent le contexte immunitaire (7), et sont prédictifs de la réponse aux immunothérapies. En effet, une signature génique a été associée à un groupement de tumeurs à bon pronostic. Cette signature est caractérisée par un faible nombre d'aberrations somatiques et par la sur-expression de gènes immunitaires comme CD3D, CD8A, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCR3, STAT1 et autres gènes stimulés par l'IFN. Une bonne réponse aux traitements a été corrélée à cette signature génique, indépendamment du type de cancer (origine tissulaire), ce qui renforce l'idée qu'une classification par infiltrat immunitaire est une source fiable de prédiction de réponse au traitement (21). Un certain nombre d'études s'intéressent aujourd'hui à la qualité de l'infiltrat immunitaire au sein des tumeurs. Des techniques basées sur l'immuno-histochimie, l'analyse tissulaire par microarray (CYBERSORT : approche informatique pour déduire la représentation leucocytaire dans un vrac de transcriptome tumoral, XCell), ou plus récemment une combinaison des deux définie

par l'Immunoscore (Jerome Galon) ont permis la classification à résolution modérée des tumeurs en fonction de critères immunitaires (figure 9) :

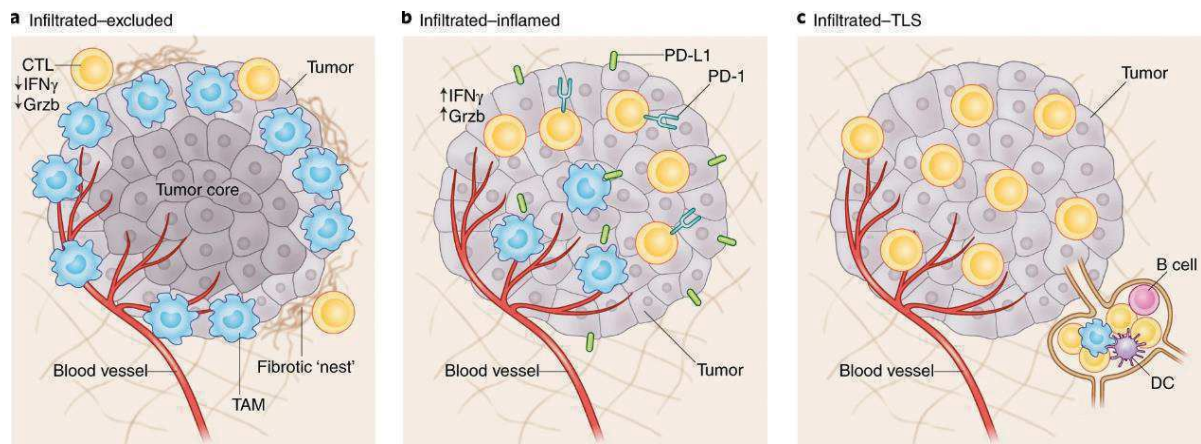


Figure 9 : Différentes classes de TIME (20)

- Les tumeurs non infiltrées, ou « froides », caractérisées par l'absence d'infiltrat immunitaire
- Les tumeurs infiltrées :
 - Les tumeurs exclues, se caractérisent par la présence de lymphocytes T cytotoxiques en périphérie de la masse tumorale et très peu au centre de la tumeur, dont l'activation évaluée par l'expression des gènes codant pour l' $\text{IFN}\gamma$ et le Granzyme B, est amoindrie. La présence de Macrophages Associés aux Tumeurs (TAM) également en marge de la tumeur est suspectée d'être à l'origine du blocage de l'infiltration, mais cela reste une hypothèse à ce jour.
 - Les tumeurs infiltrées - inflammées, ou « chaudes », sont caractérisées par une forte infiltration de lymphocytes T cytotoxiques exprimant PD-1 et les gènes codant pour l' $\text{IFN}\gamma$ et le granzyme , et par une abondance de cellules myéloïdes ou tumorales exprimant PD-L1. Dans cette catégorie, certaines cellules tumorales présentent un défaut de réparation de l'ADN résultant d'une augmentation du nombre de néo-épitopes.
 - Une sous-classe de micro-environnement tumoral immun se distingue dans cette partie : un microenvironnement associé à une structure lymphoïde tertiaire en périphérie de la masse tumorale, qui agit comme un ganglion lymphatique et qui est souvent associé à un bon pronostic (20).

Cette classification est une première étape dans la compréhension de la façon dont la composition immunologique et son état d'activation affectent la survie et dictent le potentiel de réponse aux immunothérapies. Cependant, ce modèle présente des

faiblesses à cause de la variation des techniques utilisées pour les étudier. Il ressort cependant que les tumeurs “chaudes”, donc bien infiltrées, sont plus réactives aux traitements que les tumeurs « froides » et cette observation oriente les recherches actuelles vers l’investigation de la façon de reprogrammer le microenvironnement tumoral pour le rendre attractif pour l’infiltrat.

c) *Immunoscore*

Jérôme Galon et ses collègues ont identifié un nouveau paramètre comme étant bon marqueur pronostique : l’infiltrat immunitaire. Une forte infiltration de lymphocytes T cytotoxiques (TCD8+) et mémoires (CD45RO+) a été corrélée avec une survie sans progression plus longue et une amélioration de la survie globale dans le mélanome, le cancer des ovaires, de la tête et du cou, de la vessie, du sein, urothélial, colorectal, du rein, de la prostate et des poumons (21). Ils ont alors corrélié un profil immunitaire à une bonne réponse clinique. Ce profil immunitaire est caractérisé par le type et la densité de lymphocytes cytotoxiques et/ou mémoires, leur localisation (dans la tumeur, en marge, ou dans une structure lymphoïde tertiaire), ainsi que par une signature génique révélant la fonctionnalité de l’infiltrat, comme les facteurs liés à une réponse orientée TH1 (IFNG, Tbet, IRF1, IL12), les chimiokines (CX3CL1, CXCL9, CXCL10, CCL5, CCL2), les molécules d’adhésion (MADCAM1, ICAM1, VCAM1) et les facteurs cytotoxiques (granzymes, perforine, granulysine) (Figure 10).

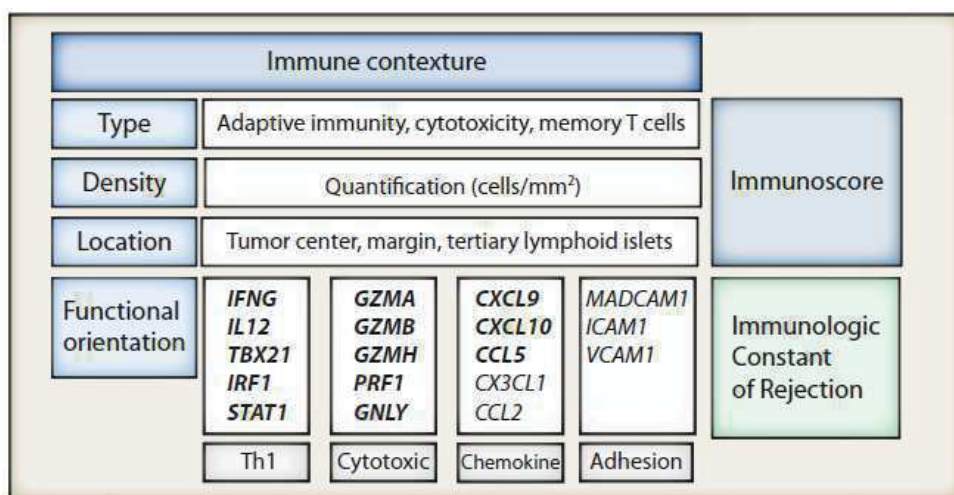


Figure 10 : Représentation graphique du profil immun, de l'Immunoscore et de la constante immunologique de rejet (21)

Ils ont alors fait évoluer la classification TNM vers une stratégie de classification basée sur la qualité de l’infiltrat en proposant l’Immunoscore. La valeur pronostique

de cette nouvelle classification a été démontrée dans le cancer colorectal aux stades I, II (22) et dans tous les stades (23).

L'Immunoscore améliore donc la recherche de bio marqueurs pronostiques (évaluant le risque pour chaque patient) et prédictifs (informant sur le bénéfice potentiel du traitement pour le patient).

d) Classification TIL/PDL1 et prise en charge associée

Plus récemment, la présence de Lymphocytes Infiltrant les Tumeurs (TIL) combinée à l'expression de PD-L1 par la tumeur ont été définies comme critères pouvant classer 4 types de microenvironnement tumoral (Figure 11) (24):

- Type I: PD-L1+ TIL+. Dans ce cas, les T infiltrant ont de grandes chances d'être éteints par l'expression de PD-L1 par les tumeurs. Sous réserve de la densité et la localisation des TIL, les patients présentant ces caractéristiques seront meilleurs répondeurs aux α PD1. Ils ont également l'avantage d'être potentiellement bons répondeurs à d'autres anticorps bloquants en cours d'essais clinique (LAG3, TIM3, TIGIT), et à d'autres approches telles que les agonistes de TLRs par exemple.
- Type II : PD-L1- TIL-. Les patients présentant ce type de microenvironnement ont le plus mauvais pronostic face aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire. Dans ce cas, une combinaison thérapeutique déclenchant la migration des T dans la tumeur et bloquant leur inhibition (α CTLA4+ α PD1) semble être prometteuse ; ou l'induction d'une réponse IFN de type I par injection péri-tumorale de poly:IC, vaccination ou transfert adoptif si la tumeur présente des antigènes spécifiques à cibler, ou encore par dé-densification de la tumeur causée par chimio ou radio thérapie, induisant de plus une mort cellulaire immunogène.
- Type III : PD-L1+ TIL-. Ce groupe montre que la seule positivité de PD-L1 dans la tumeur n'est pas un bio-marqueur suffisant pour prédire une réponse aux traitements. L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales peut être constitutive et induite par des signaux oncogéniques. De la même façon que pour les tumeurs de type II, la stratégie thérapeutique sera une combinaison permettant un recrutement lymphocytaire non sensible aux signaux d'inhibition de la tumeur. Une radiothérapie couplée à un traitement α PD1 provoquera une mort cellulaire libérant des néo-antigènes et une diminution de la densité tumorale, qui permettront le recrutement de lymphocytes T insensibles à PD-L1.

- Type IV : PD-L1-TIL+. Ce microenvironnement est immuno-tolérant. Des mécanismes de résistance autres que l'anergie des cellules T doivent être mis en place par la tumeur pour continuer à se développer. Les cibles thérapeutiques visent dans ce cas-là plutôt des métabolites comme IDO ou l'adénosine, mais pas les effecteurs de l'immunité.

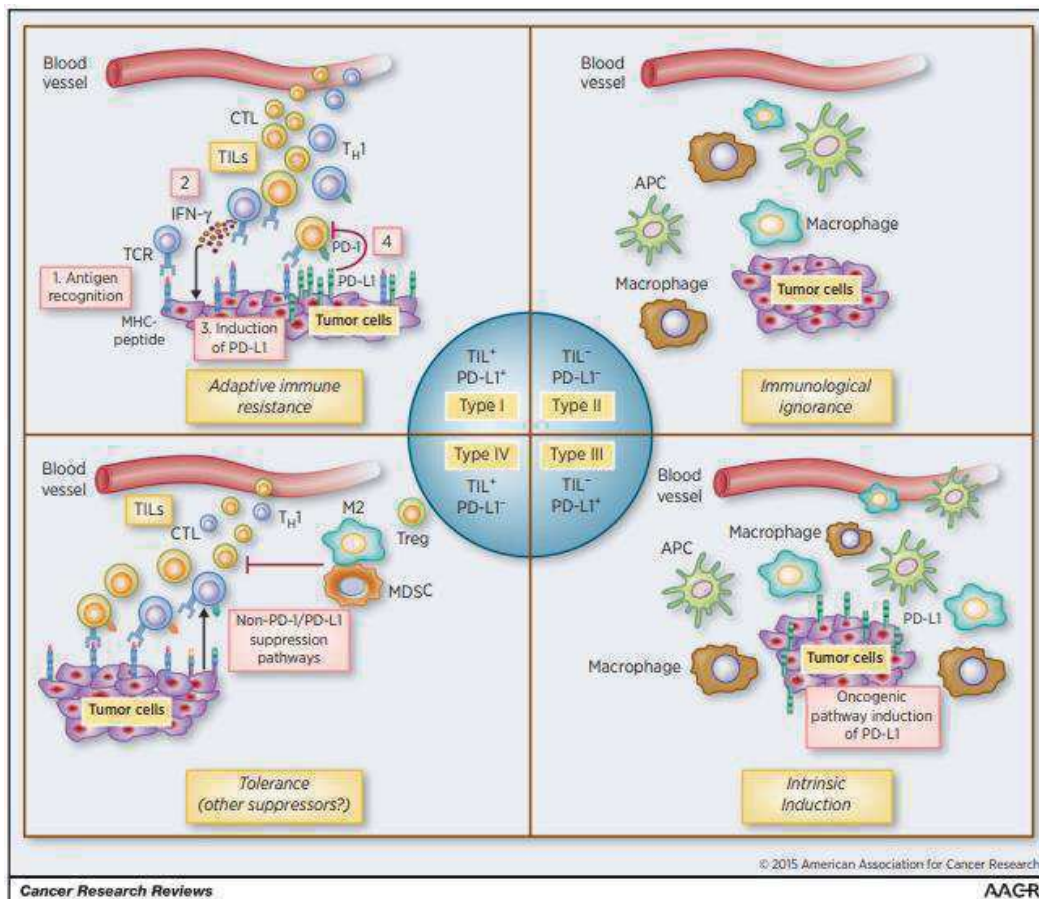


Figure 11 : Classification des cancers en fonction de la présence de T infiltrants et de l'expression de PD-L1 (24)

Cette classification introduit la notion de prise en charge personnalisée car elle met en évidence que les tumeurs ne présenteront pas les mêmes sensibilités aux différentes approches thérapeutiques.

E. Immunothérapies

1. Monothérapies

Le cycle cancer-immunité proposé par Chen et Mellman en 2013 est un concept décrivant une réponse T anti-tumorale efficace. La phase d'échappement se met en place lorsqu'une étape de ce cycle est altérée. L'immunothérapie consiste à rééduquer le système immunitaire défaillant ou détourné par les cellules tumorales par le biais de différentes techniques ciblant le système immunitaire (décrites ci-après) pour permettre à chaque individu de réactiver ou booster sa réponse anti-

tumorale. Chaque étape du cycle peut être ciblée par les immunothérapies pour tenter de le réinitialiser (Figure 12). Cette approche a révolutionné la gestion des cancers.

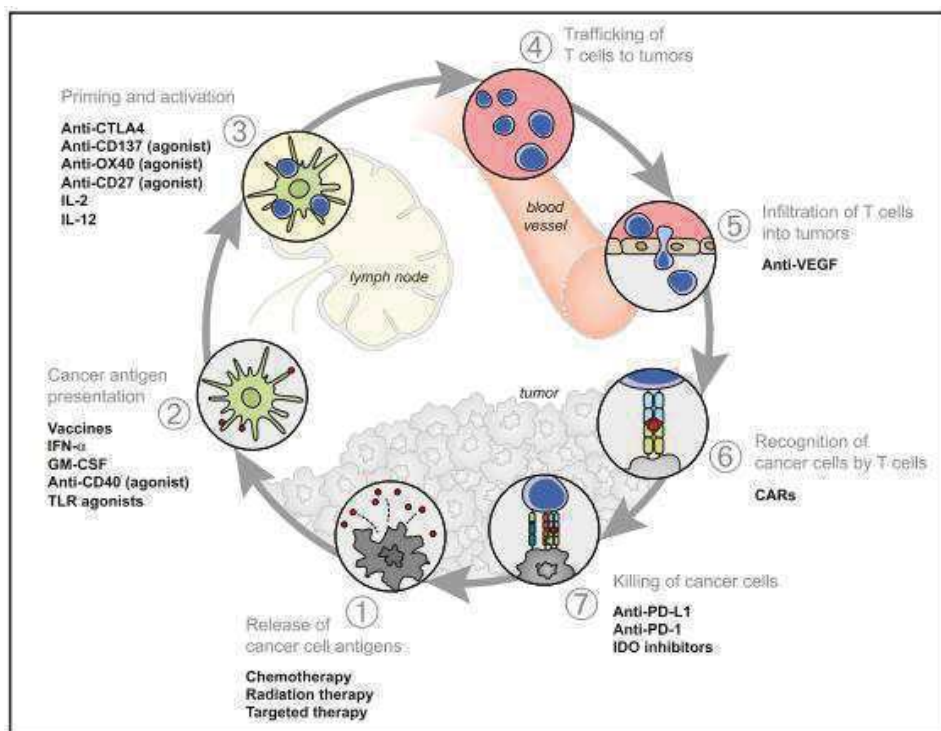


Figure 12 : Thérapies adaptées aux étapes du cycle cancer-immunité(25)

Différentes classes d'immunothérapies ont été développées et les approches peuvent être (tableau suivant) :

- actives, c'est-à-dire qu'elles boostent ou induisent la réponse anti-tumorale en place (principe de la vaccination),
- passives, par l'apport d'une activité anti-tumorale levant les inhibitions, ou par transfert d'effecteurs anti-tumoraux,
- indirectes, en déclenchant ou renforçant l'action immunitaire.

Immunothérapie	Techniques	Exemples
Active	<ul style="list-style-type: none"> Vaccination à base de: <ul style="list-style-type: none"> Vaccins peptidiques, d'ADN ou de lysats de cellules tumorales Vaccins à base de DCs Cytokines immunostimulantes Agoniste de TLR ou PRR Agoniste de STING Virus oncolytique 	<ul style="list-style-type: none"> Antigènes tumoraux IL2, IFNα Imiquimod (agoniste de TLR7) CDN synthétique T-vec
Passive	<ul style="list-style-type: none"> Inhibiteur de points de contrôle immunitaire Transfert adoptif de TILs Anticorps ciblant la tumeur, micro-environnement, métabolisme 	<ul style="list-style-type: none"> αPD1, αCTLA4 CAR-T cells, transfert allogénique Molécules chimiques ciblant IDO, αVEGF...
Indirecte	<ul style="list-style-type: none"> Induction d'une mort cellulaire immunogène: <ul style="list-style-type: none"> Déclencher relargage de signaux pré mortem (calréticuline, ATP, HMGB1) Influence du microbiote: <ul style="list-style-type: none"> Implémenter un microbiome anti tumoral guidé. 	<ul style="list-style-type: none"> Chimio ou radiothérapie Implémentation de pré ou probiotiques

Le développement d'immunothérapies ouvre une nouvelle voie d'actions possibles pour générer ou rétablir une réponse anti-tumorale effectrice et mémoire (figure 13). Elles agissent sur des mécanismes complexes mettant en jeu l'immunité innée, l'immunité adaptative, et aussi l'interaction entre ces deux modes de réponses qui est le facteur-clé pour le rétablissement d'une immuno-surveillance efficace et durable.

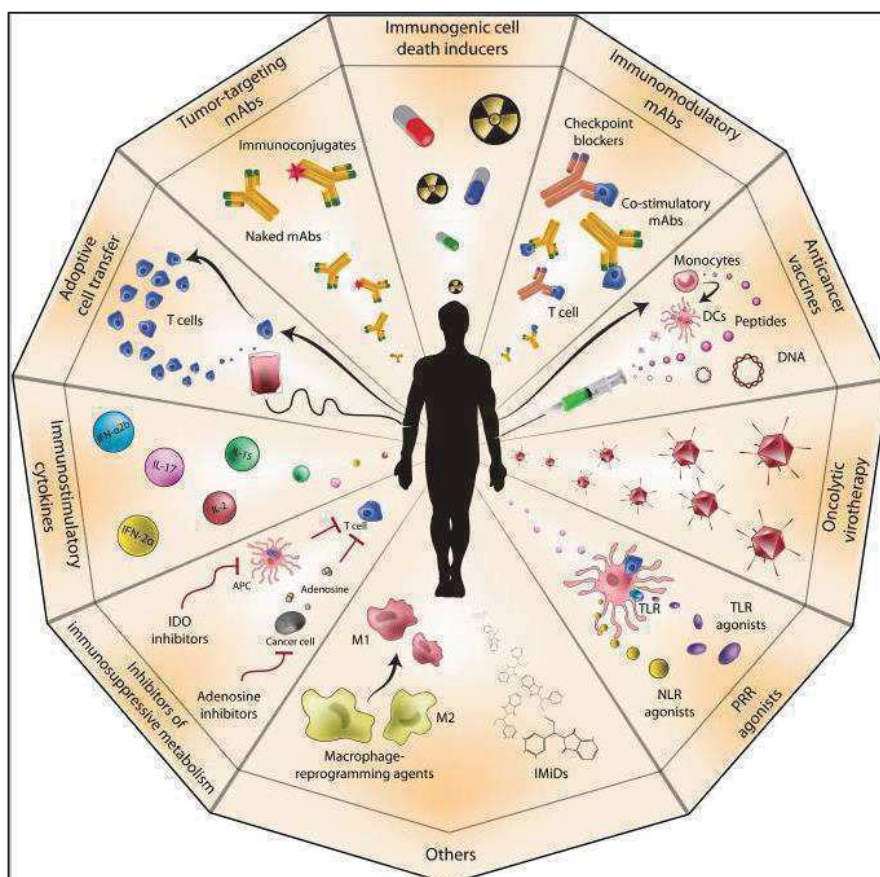


Figure 13 : Immunothérapies anti-tumorales (26)

Ces immunothérapies, et notamment les inhibitions de point de contrôle immunitaire, montrent des résultats très encourageants, cependant la toxicité et les mécanismes de résistance de certains patients à ces traitements restent des points à améliorer et élucider.

La prise en compte de la variabilité inter-individu et l'hétérogénéité des tumeurs font de plus évoluer les thérapies aspécifiques à des thérapies plus ciblées. Les efforts portent alors sur une meilleure caractérisation des cellules T infiltrantes pour tenter d'identifier les faiblesses des traitements responsables des variations de réponses.

2. Vers une combinaison d'approches

Le microenvironnement tumoral est un écosystème complexe contenant des populations hétérogènes de cellules tumorales, stromales et immunes. Les interactions entre toutes ces parties régulent la progression tumorale, c'est pourquoi les classements de microenvironnements tumoraux immuns guident le ciblage de différents points d'action simultanés par les traitements combinés (11, 27). L'administration de thérapies combinées est donc une seconde vague stratégique en cours de développement (Figure 14).

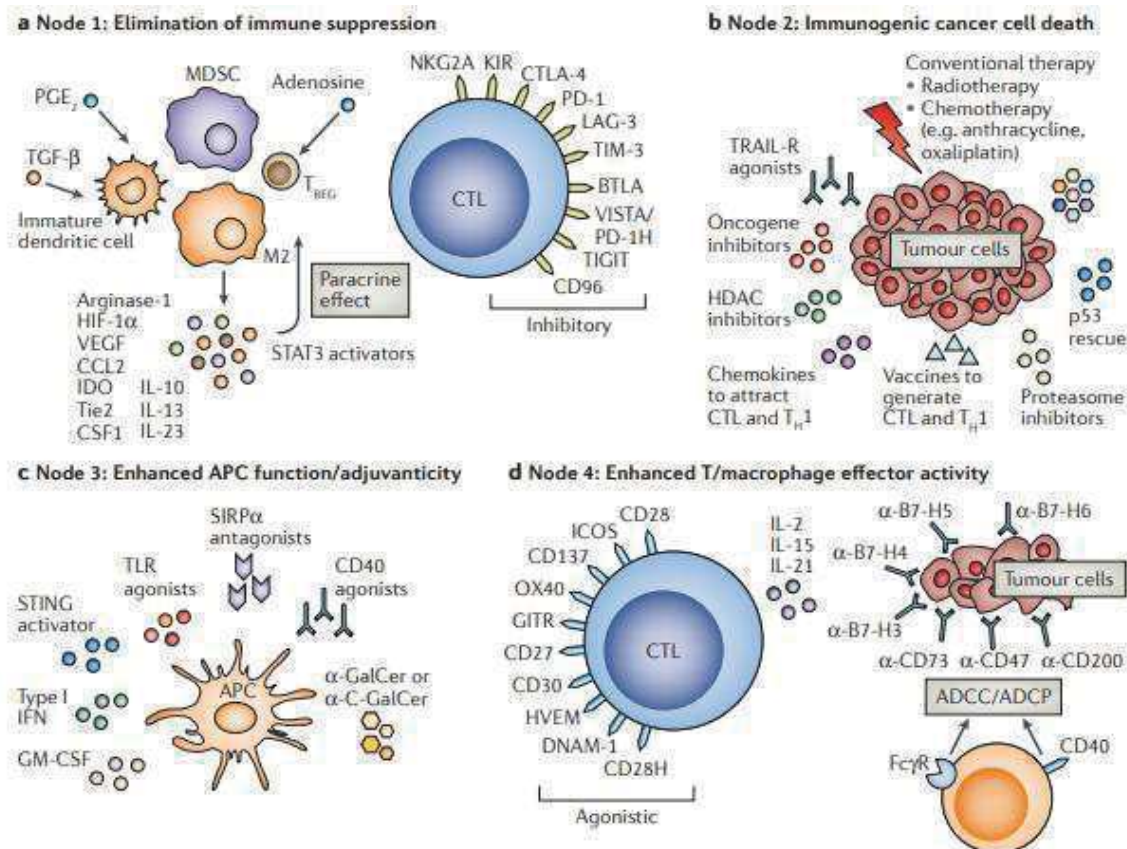


Figure 14: Combinaison idéale en immunothérapie anti-tumorales (28)

Le choix des traitements du cancer est vaste aujourd'hui, mais tous sont efficaces uniquement sur un nombre limité de patients. L'hétérogénéité des tumeurs et leurs dynamiques d'évolution sont des défis cliniques, et mettent en évidence la nécessité de mieux comprendre les mécanismes immunitaires afin d'optimiser leur utilisation et d'identifier de nouvelles cibles. Il y a donc un réel besoin de trouver des facteurs prédictifs de réponses aux traitements.

3. Stratégie clinique en développement

La compréhension des mécanismes de résistance aux immunothérapies aident à l'identification de nouveaux marqueurs de réponses. Les bio-marqueurs sont un élément-clé pour le choix des thérapies (29). Ils peuvent être :

- Tumoraux (charge mutationnelle),
- Relatifs à l'infiltrat : qualité/quantité/localisation, et notamment la co-expression de récepteurs inhibiteurs sur les lymphocytes T CD8+, les différentes sous-populations de lymphocytes et leurs phénotypes anergisés ou résidents mémoires.
- Relatifs à l'hôte : diversité du TCR, HLA, microbiome

La prise en charge s'effectue selon deux approches thérapeutiques : la première cible les cellules tumorales, afin de réduire la masse tumorale, par chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie, puis cherche à lever les inhibitions immunitaires mises en place par la tumeur. Le deuxième point d'action consiste alors à induire une forte réponse anti-tumorale par des immunothérapies actives seules ou en combinaison (30).

Les thérapies ciblées s'attaquent aux voies intrinsèques et extrinsèques des cellules tumorales au sein du micro-environnement tumoral et les immunothérapies sont dirigées vers le système immunitaire. Un patient dont la charge mutationnelle tumorale est élevée sera meilleur répondeur aux thérapies immuno-modulatrices, et un patient dont la tumeur a un faible taux de mutation sera meilleur répondeur aux transferts adoptifs par exemple. Dans le cas de tumeur non infiltrée, les thérapies combinées pourraient induire le recrutement d'un infiltrat, puis d'une manière plus globale peuvent agir en 2 étapes successives :

- 1) Permettre l'infiltration s'il n'y en a pas
- 2) Inhiber la suppression induite par la tumeur
- 3) Activer/entretenir l'immunité anti-tumorale

L'avancée des connaissances sur le fonctionnement des tumeurs et leur interaction avec le microenvironnement permettent de décomposer l'action thérapeutique en plusieurs étapes pour intervenir à chaque possibilité d'échappement avec différentes approches (Figure 15).

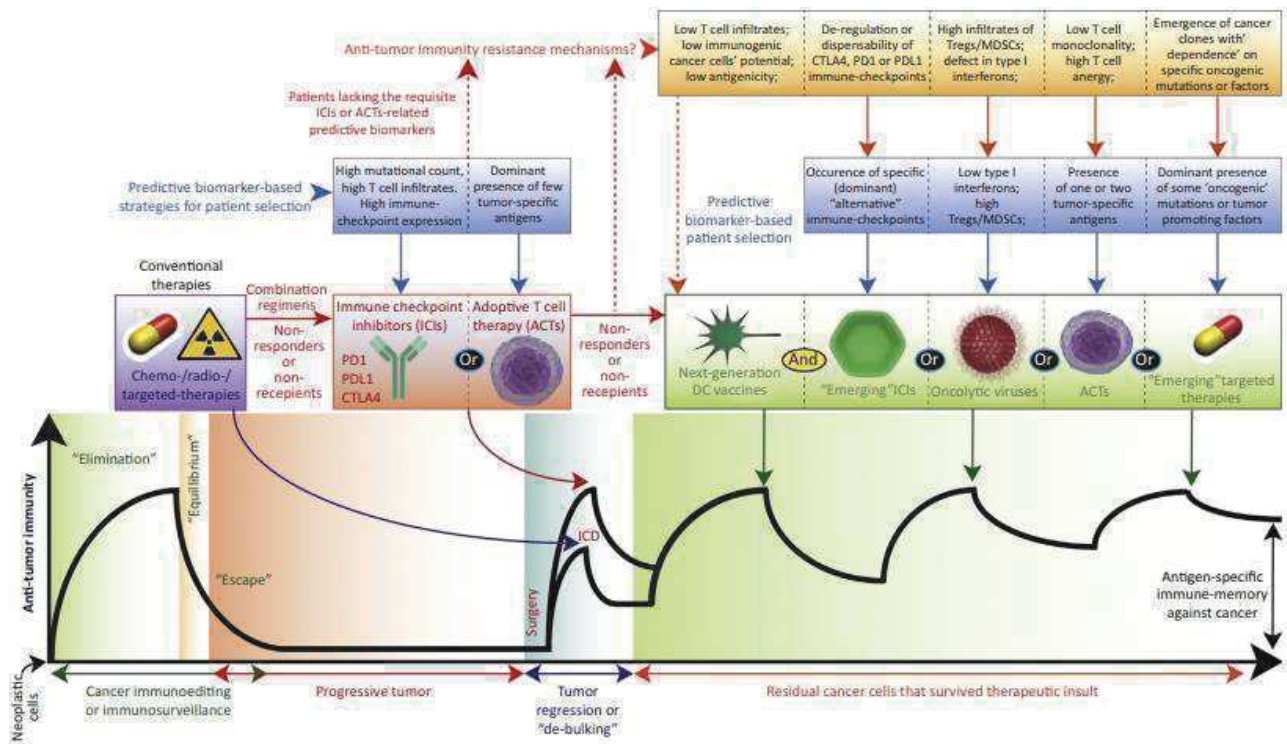


Figure 15: Stratégies thérapeutiques combinées (31)

L'identification non-invasive de bio-marqueurs diagnostiques permettrait de dicter le régime combinatoire à suivre. Leur caractérisation est essentielle pour identifier à des stades précoces de la maladie, les chances de réponses pour chaque traitement donné. Ils ont une valeur prédictive de réponses aux traitements (32). Le gain de temps est précieux pour les patients.

L'ensemble des critères classifiant les tumeurs contribuent à cette prise de décision thérapeutique : le but est d'élaborer le bon traitement pour le bon patient.

Les cellules néoplasiques subissent l'immuno-surveillance et sont alors immuno-éditées. L'approche multi-modale pour la prise en charge des patients fait ainsi partie des stratégies personnalisées à mettre en place à l'avenir.

II. Le mélanome

A. Caractéristiques

1. Un peu d'histoire...

« Jusqu'à la fin du XIX^e siècle, une peau blanche était graciée et représentait le mode de vie des classes les plus favorisées. A l'inverse le hâle ou le bronzage était associé au travail extérieur de la classe ouvrière donc marqueur de classes sociales défavorisées. Ce n'est qu'avec la révolution industrielle (déplaçant la classe ouvrière à l'intérieur des usines plutôt qu'aux champs et dans les centres villes) et le

développement des stations balnéaires que la peau pâle perd le synonyme de richesse, et devient plutôt indicateur de pauvreté et de mauvaise santé. En parallèle, l'exposition volontaire au soleil devient acceptée par la société. L'avènement des congés payés, en 1936, marque un renversement des comportements et des opinions vis-à-vis du hâle ou du bronzage. Sous le développement des loisirs, des sports de plein air, des vacances ou des voyages, le bronzage devient progressivement une norme esthétique, symbole de succès, d'une vie laissant place aux loisirs et d'aisance financière. Les années soixante-dix subliment les corps hâlés et incitent à s'exposer au soleil en parallèle du développement du marché des cosmétiques solaires pour obtenir un bronzage, gage de vacances réussies. Dans les années quatre-vingt, l'activité commerciale du bronzage à l'aide d'UV artificiels commence à se développer... » *Institut National du Cancer, Baromètre Cancer 2015*

2. Epidémiologie et incidence

L'impact des modes de vie se mesure aujourd'hui : l'incidence globale des cancers de la peau a plus que triplé entre 1980 et 2012 (Institut National du Cancer). Depuis, bien que la progression soit plus lente, son incidence reste en constante augmentation(33).

Les carcinomes cutanés représentent 90 % des cancers cutanés diagnostiqués en France. Moins fréquents mais plus agressifs par leur fort potentiel métastatique, les mélanomes cutanés représentent 10 % des cancers de la peau. Avec 15 404 nouveaux cas de mélanomes cutanés estimés en 2017 en France métropolitaine (8061 hommes et 7 343 femmes) et 1 783 décès (1 036 hommes et 747 femmes), ce cancer représente près de 4 % de l'ensemble des cancers incidents et 1,2 % des décès par cancer, tous sexes confondus. (Source: Les cancers en France, édition 2017). Il touche des sujets jeunes aussi bien que des sujets plus âgés. Le phénotype typique des patients atteints de mélanome est la peau claire avec une mauvaise aptitude au bronzage, les cheveux blonds ou roux, les yeux clairs (phototype I). Ils peuvent apparaître de *novo* (70 à 80 % des cas) ou résulter de la transformation maligne d'un *nævus*. On estime qu'environ 10 % de ces tumeurs correspondraient à des formes familiales, indiquant donc une composante génétique, bien que le facteur de risque principal soit l'exposition au soleil (34). Les patients à prédisposition génétique développent ce cancer assez jeunes (moins de 40 ans) mais ces tumeurs restent superficiellement invasives et le pronostic donc est assez bon (35).

Les UV artificiels peuvent également avoir un rôle dans le développement du mélanome car la quantité d'UVA reçus est significativement supérieure à celle d'UVA

reçus au cours d'une activité extérieure classique (International Agency for Research on Cancer). Certains traitements comme le psoralène pour le psoriasis par exemple, ou autre radiation photochimique peuvent également augmenter l'incidence de cette maladie (36).

3. Développement malin

Le mélanome est le résultat d'une prolifération anormale de mélanocytes, cellules productrices du pigment responsable de la coloration de la peau, la mélanine. Les UV agissent directement sur leur ADN en causant un enrichissement de bases pyrimidines, ou induisent un effet immuno-modulateur qui donne lieu à une accumulation d'anomalies dans le mécanisme cellulaire, dont la conséquence est une croissance démesurée (37). Ces cellules sont présentes dans le derme et l'épiderme, mais sont aussi extra-cutanées, et se retrouvent dans les yeux, les muqueuses buccales, digestives, urinaires, les voies respiratoires, le système nerveux central.

Au niveau cutané, il existe plusieurs sous-types de mélanome, dont les pronostics diffèrent :

- Le mélanome à extension superficielle (SSM, pour superficial spreading melanoma). Il représente 70% des mélanomes, c'est donc la forme la plus fréquente. La lésion se présente dans un premier temps sous la forme d'une lésion plane pigmentée hétérochrome aux contours irréguliers, puis va croître verticalement, acquérant alors un potentiel métastatique.
- Le mélanome de Dubreuilh. Il représente 5 à 10% des mélanomes. Les lésions apparaissent principalement chez les personnes âgées, le plus souvent chez les femmes, et la plupart du temps sur des zones cutanées découvertes, comme le visage, le cou, les mains. Sa pigmentation n'est pas homogène et la lésion évolue sous la forme d'une macule puis d'une nappe pigmentée et plus tardivement prend une forme tumorale nodulaire.
- Le mélanome nodulaire. Il représente 15 à 20% des mélanomes, et est le plus agressif des mélanomes cutanés, touchant majoritairement les hommes. Il se présente sous une forme hémisphérique allant des teintes rosées à noires bleutées.
- Le mélanome acro-lentigineux, représentant 5% de la totalité des mélanomes. Il est plutôt rare chez les sujets de type européen, mais plus fréquent pour les phénotypes foncés tels qu'asiatiques, hispaniques ou africains. Il touche principalement les paumes, les voutes plantaires, les doigts et les orteils. .

D'autres formes de mélanome à forme anatomo-clinique particulière existent aussi, comme le mélanome de l'enfant, le mélanome muqueux, le mélanome primitif multiple. Ceux-ci sont moins associés à une exposition aux UVs et leur forme est plus rare (38).

4. Diagnostic

La détection précoce reste le facteur-clé pour diminuer la mortalité. Par rapport à d'autres cancers, le mélanome a l'avantage d'être cutané, ce qui rend possible l'auto surveillance/dépistage. La règle ABCDE développée dans les années 80 a pour but d'aider à identifier des lésions qui ont une grande probabilité d'être un mélanome, et définit les critères suivants : A = Asymétrie ; B = Bords irréguliers ; C = Couleur hétérogène ; D = Diamètre supérieur à 6mm ; E = Evolution récente documentée (modification de la taille, forme, couleur, relief). Il y a donc suspicion de mélanome si 2 ou plus de ces critères se vérifient. Dans 80% des cas, le mélanome avait été détecté par le patient avant le diagnostic du médecin grâce à cette méthode, qui permet de plus d'aider au suivi du patient (35). Lorsqu'il y a une suspicion clinique, les lésions sont examinées par dermoscopie. Cet examen est suivi par une exérèse complète de la lésions suspecte et une analyse anatomopathologique, afin de confirmer le diagnostic et de donner les critères histopronostiques qui sont principalement l'épaisseur selon Breslow mesurée en millimètres, la présence ou non d'une ulcération, et le nombre de mitoses par mm².

5. Pronostic

Afin de permettre une prise en charge adaptée, la description du stade de la maladie doit être référencée par rapport à des paramètres-clés, que sont notamment les paramètres de Breslow et Clark, l'ulcération, ou encore l'indice mitotique (39) (Figure 16). L'indice de Breslow décrit l'épaisseur maximale de la lésion (en mm) et le paramètre histologique de Clark décrit le niveau d'invasion des couches de la peau par la tumeur : niveau I : mélanocyte malin dans l'épiderme uniquement, niveau II : invasion du derme papillaire, niveau III : derme papillaire comblé, niveau IV : infiltration du derme réticulaire et niveau V : atteinte de la graisse hypodermique.

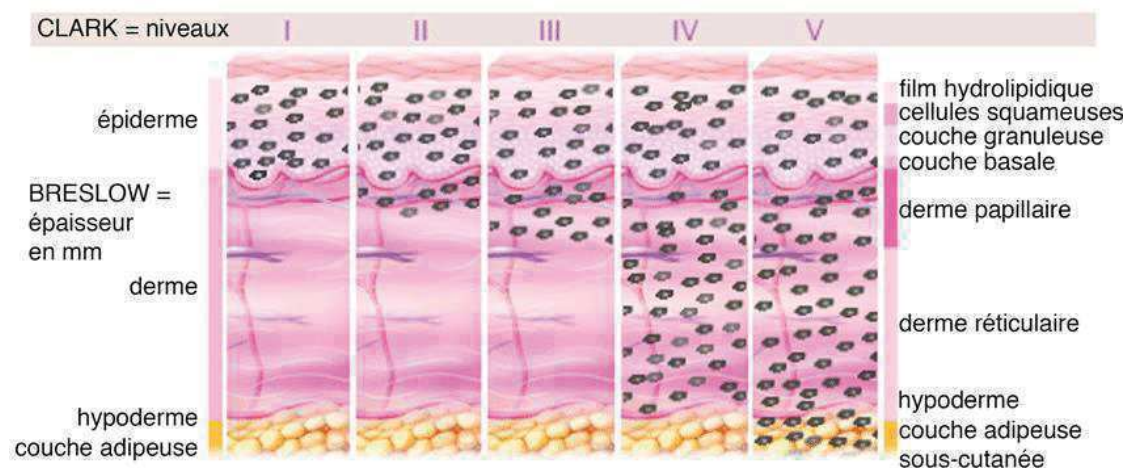


Figure 16: Représentation des paramètres de Breslow et Clarck, Source : <http://www.arcagy.org/infocancer>.

Les facteurs pronostiques à signification majeure sont classés par l'AJCC (pour American Joint Committee on Cancer) et l'UICC (pour Union for International Cancer Control) selon l'évaluation de la tumeur primaire (T), dont l'indice de Breslow et l'ulcération sont paramètres de référence, la présence ou non de métastases lymphatiques et leur nombre (N), et les métastases à distance (M), avec comme indicateur complémentaire la concentration de lactate déshydrogénase (LDH). Comme vu dans le chapitre précédent, l'infiltrat immunitaire est maintenant également pris en compte comme critères pronostiques des tumeurs.

Le mélanome cutané est de bon pronostic s'il est détecté assez tôt (indice de Breslow < 1 mm et pas de métastases), d'où l'importance du diagnostic précoce. Le traitement repose alors sur une exérèse chirurgicale. En revanche, un diagnostic tardif réduit considérablement les chances de guérison car ce cancer est à fort potentiel métastatique : il peut s'étendre rapidement aux relais ganglionnaires et à d'autres organes. Des traitements complémentaires (curage ganglionnaire, immunothérapie, radiothérapie, chimiothérapie, exérèse de métastases) peuvent alors être indiqués. La survie dépend ainsi du stade au moment du diagnostic : selon le programme américain SEER, la survie relative à 5 ans est de 98 % au stade localisé, 62 % avec une extension locorégionale et 15 % au stade métastatique. (Source : InCA, SNDV : syndicat national des Dermatologues Vénérologues). En règle générale, l'atteinte des ganglions et un indice de Breslow élevé sont des facteurs pronostiques négatifs.

6. Pathogénie

Le mélanome est le cancer portant le plus haut taux de mutations (40) (Figure 17).

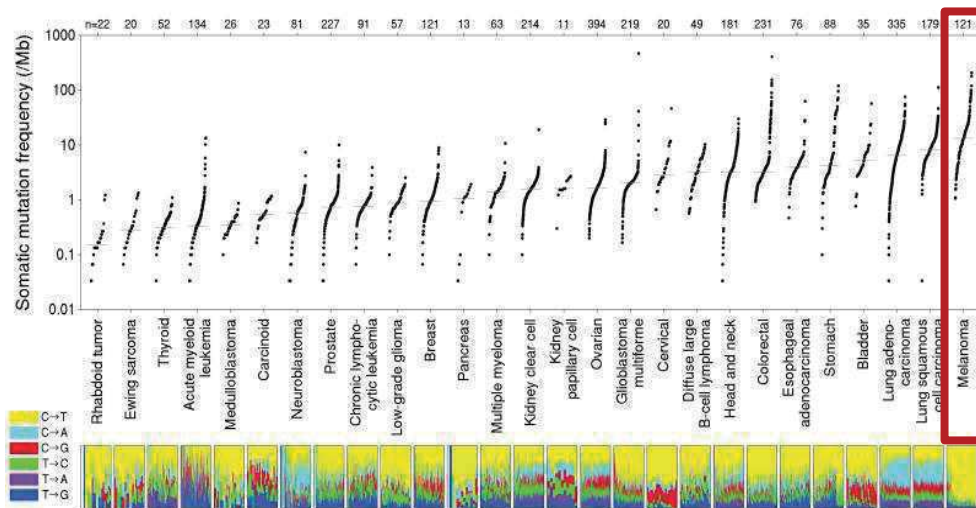


Figure 17: Fréquence de mutation en fonction du type de cancer (40)

Elles génèrent différentes dérégulations, dont la plus commune implique la voie de signalisation des protéines kinase mitogène-activée (MAPK/ERK) (41).

Les mutations du domaine kinase de BRAF sont présentes dans 40 à 60 % des mélanomes. Cette mutation est dans 80% des cas une substitution de la Valine en Leucine en position 600. Il en résulte une activation constitutive de la protéine kinase. Une autre mutation touchant NRAS est présente dans environ 15 à 20% des mélanomes. Les mutations de BRAF et NRAS sont mutuellement exclusives.

Pour le reste les mutations sont dues à de petites insertions/délétions (indel) ou à la variation d'un seul nucléotide. Les modifications génétiques significativement impliquées dans le développement du mélanome peuvent toucher principalement d'autres gènes induisant la croissance cellulaire comme KIT ou GNAQ/GNA11, et des gènes des voies de signalisation inhibant de croissance : CDKN2A, p16, et BAP1 (respectivement en vert et en rouge figure 18).

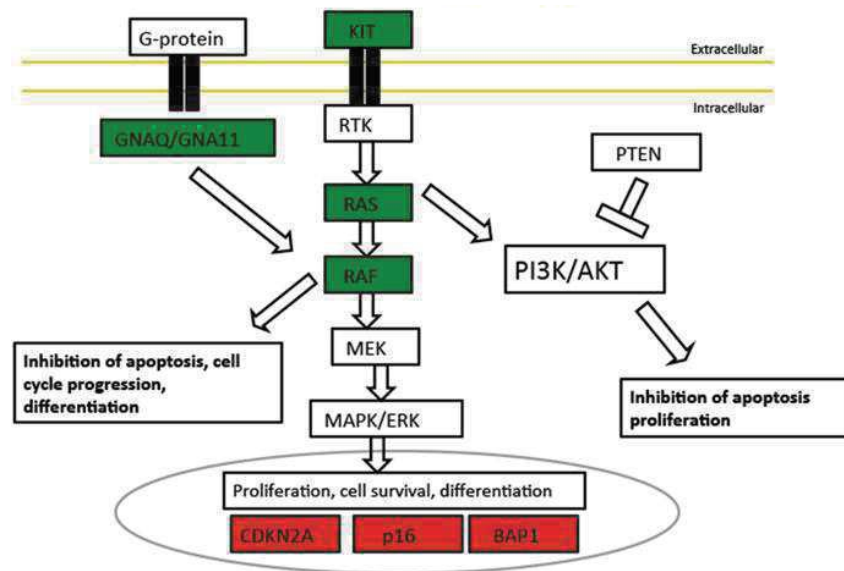


Figure 18 : Voies de signalisation génétique dans le mélanome. (42)

(D'autres semblent impliqués aussi mais moins fréquemment : *ARID2*, *CWH43*, *NF1*, *PTEN* et *RB*, *SF3B1*, *KIT*, *MAP2K2* (43). Grace au séquençage haut-débit, l'étude des mutations codantes et non codantes révèle des mutations caractéristiques : *BRAF*, *CDKN2A*, *NRAS* and *TP53* induisent plutôt des mélanomes cutanés, *BRAF*, *NRAS* and *NF1* sont souvent retrouvés mutés dans le mélanome acro-lentigineux, et *SF3B1* dans les mélanomes muqueux. *PTEN* est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans le mélanome, et certains oncogènes sont identifiés comme transmissibles sur plusieurs générations, comme *CDK4* le plus fréquemment (35).

7. Mélanome et système immunitaire

Le fort taux de mutation du mélanome est à l'origine de néo-antigènes et, de ce fait, de sa grande immunogénicité qui permet ainsi la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Le mélanome est en général une tumeur dans laquelle on peut trouver un important infiltrat de cellules immunitaires, et la régression spontanée partielle ou totale de la tumeur grâce aux réponses des lymphocytes T spécifiques peut avoir lieu. Malgré tout, il arrive que les cellules tumorales échappent aux réponses anti-tumorales par différents mécanismes, notamment l'augmentation de l'expression de point de contrôle immunitaire, ou par la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs. Le contexte immun évoqué au précédent chapitre, défini par la modulation de la réponse immunitaire adaptative par la tumeur, se relève être de bon pronostic Les interactions tumeur-hôte dans le

micro-environnement tumoral définissent la tendance des cellules tumorales à échapper à l'immunité et prédisent l'efficacité des traitements.

B. Traitements

1. Thérapies conventionnelles historiques

Historiquement, dans les stades avancés de mélanome, un protocole de chimiothérapie était proposé basé principalement sur le Dacarbazine. Malheureusement, les taux de réponses restent très faibles (44). Parallèlement, l'avancée des recherches en immunologie a permis une meilleure caractérisation des réponses immunitaires. Le potentiel de l'immunothérapie anti-tumorale a été démontré par William Coley en 1890 puis confirmée à la fin du 20^{ème} siècle par l'observation de régression spontanée de mélanome chimio-induit chez la souris. L'administration d'IL2 s'est avérée activatrice de lymphocytes T, induisant leur ciblage de cellules tumorales, initiant alors la production à grande échelle et le développement d'essais cliniques pour le mélanome métastatique. L'IFN α a également été la première cytokine exogène à montrer une activité anti-tumorale dans les stades avancés de mélanome, et est devenue en 1995 la première immunothérapie approuvée par la FDA pour le traitement adjuvant des mélanomes métastatiques. L'avancée des connaissances sur les acteurs immunitaires et la découverte des points de contrôle immunitaire récemment récompensée par le prix Nobel de physiologie de médecine ont alors engendré de nouveaux essais cliniques, ouvrant une nouvelle ère thérapeutique pour la lutte anti-tumorale (45).

2. Prises en charge actuelles

Bien qu'une majorité des mélanomes primaires soit soignés par simple exérèse avec reprise chirurgicale complémentaire avec marges de sécurité, le pronostic des patients atteints de mélanome métastatique était extrêmement défavorable il y a encore à peine 10 ans. Les taux de réponse aux traitements de référence, la chimiothérapie en monothérapie, étaient de 10 à 15%, et la médiane de survie de patients à des stades avancés était de 6 mois. Cependant, la recherche dans ce domaine a mené à une meilleure caractérisation des mélanomes, et de ce fait au développement de nouvelles thérapies. La mise en évidence des mutations caractéristiques du mélanome décrites précédemment a permis le développement de thérapies ciblées faisant partie aujourd'hui de l'arsenal thérapeutique standard, auxquelles s'ajoutent les immunothérapies. La prise en charge du mélanome métastatique débute donc par une recherche de mutation. En cas de mutation BRAF

(50% des cas environ), les thérapies ciblées, en première intention, ou les immunothérapies, sont indiquées, et en absence de mutation, les immunothérapies en monothérapie ou en combinaison sont recommandées. Le bénéfice de ces deux stratégies est difficile à comparer, cependant les thérapies ciblées semblent apporter une meilleure efficacité en un minimum de temps et les immunothérapies de meilleurs taux de survie à long terme. Les thérapies ciblées visant la voie des MAP kinases, essentiellement responsables du développement du mélanome, apportent un taux de réponse de 70%. Cependant, les résistances à ces thérapies surviennent par réactivation des voies MAP kinase et via d'autres mécanismes dans 80% des cas, et les patients traités par inhibiteurs de BRAF ou MEK peuvent également développer des lésions dermatologiques entre autres, dues à de la toxicité autour des 3 mois de traitements. L'association d'inhibiteurs de BRAF+MEK, qui est désormais le standard de prise en charge en termes de thérapie ciblée, améliore les taux de réponses aux traitements, et atténue les effets toxiques des traitements comparé aux monothérapies (46) (figure19).

ARBRE DE DÉCISION 1. TRAITEMENTS SYSTÉMIQUES DE 1^{RE} LIGNE, DE 2^E LIGNE ET DE 3^E LIGNE DES MÉLANOMES CUTANÉS MÉTASTATIQUES NON RÉSECABLES (STADE III INOPÉRABLE ET STADE IV) HORS MÉTASTASE CÉRÉBRALE

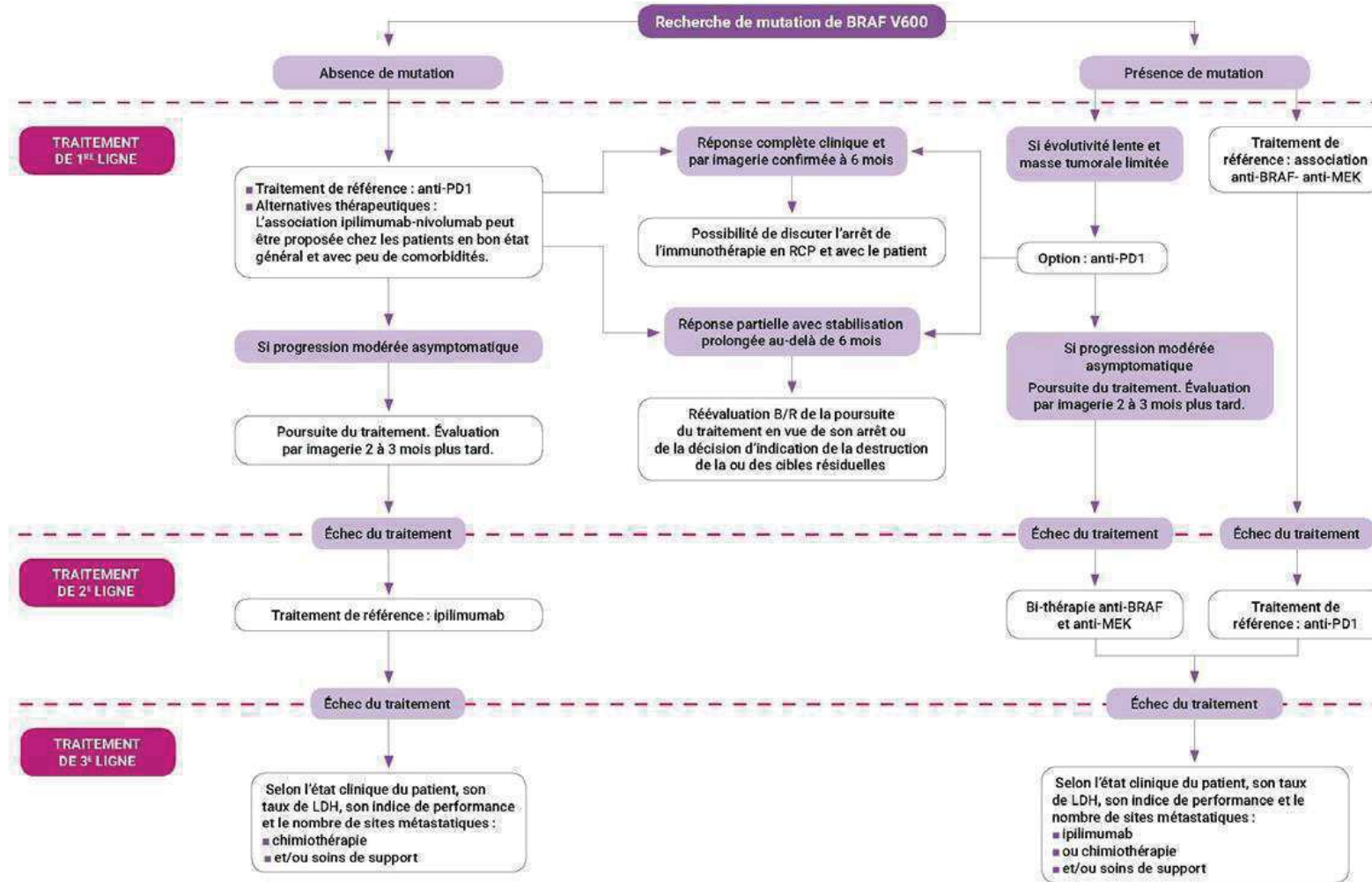


Figure 19 : Arbre décisionnel pour le mélanome cutané métastatique non résecable

3. Critères d'évaluation et effets secondaires

Les critères utilisés pour évaluer les réponses cliniques à la chimiothérapie sont traditionnellement nommés RECIST, pour Response Evaluation Criteria in Solid Tumor, mais ces critères ne sont plus adaptés à l'évaluation des réponses au traitement dans le cas des immunothérapies. Elles peuvent en effet induire de l'inflammation, induisant une augmentation transitoire de la taille de la tumeur avant une régression, ce qui n'est pas une conséquence négative. Wolchok et ses collègues ont proposé de nouveaux critères : irRC (immune-related Response Criteria) (47).

L'immunothérapie a pour but de réactiver le système immunitaire, et des effets peuvent atteindre les cellules normales de l'organisme. La sévérité des effets indésirables est cotée par grade. Un effet indésirable de grade 3 ou 4 nécessite en général l'arrêt de l'immunothérapie. Ces effets indésirables peuvent être spécifiques ou non de l'immunothérapie :

- Les effets aspécifiques comme notamment l'asthénie, les arthralgies, les nausées, la perte d'appétit sont fréquents par rapport aux effets spécifiques mais leur grade dépasse rarement le grade II.
- Les effets indésirables spécifiques sont nommés irAE (immune-related Adverse Effect) et sont d'ordre immunologique. Ils sont auto-immuns ou induisent des pathologies inflammatoires, et sont classés en grades selon les organes concernés. Les toxicités prédominantes sont gastro-intestinales, dermatologiques, hépatiques et endocriniennes. Ces effets peuvent être réversibles mais les dommages constatés peuvent être importants (48), et même parfois létaux, nécessitant donc un diagnostic précoce et d'une prise en charge spécifique.

4. Immunothérapies actuelles et en développement

a) Cytokines

IFN α

Malgré beaucoup de controverses, l'IFN α recombinant reste positionné comme thérapie adjuvante pour les patients à haut risque de rechute. Il a démontré une amélioration de la survie sans rechute bien que l'effet sur la survie globale ne soit

pas consistant. Le coût du traitement et sa grande toxicité motivent des recherches de bio-marqueurs afin d'identifier les patients qui peuvent en tirer un bénéfice.

IL2

L'administration d'IL2 est approuvée par la FDA (Food and Drugs Administration) pour les stades avancés de mélanome. Le taux de réponse globale est de 16%, et le taux de rémission à 5 ans ou plus est de 4% des répondeurs, mais sa grande toxicité limite son utilisation.

b) Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

Ipilimumab (α CTLA4) : L'efficacité et la sécurité de ce traitement a été prouvée en monothérapie dans plusieurs essais avec des taux de réponse relativement faibles (15%) mais des patients qui présentent des réponses prolongées. Un plateau est atteint à 3 ans jusqu'à 10 ans pour la survie globale. Les effets secondaires sont principalement dysimmunitaires de type irAEs (Immune-related adverse event), et sont notamment digestifs, hépatiques ou endocriniens. En France, l'Ipilimumab est actuellement accessible uniquement en combinaison avec le Nivolumab mais plus en monothérapie.

Nivolumab (α PD1) : Cet anti-PD1 a montré un taux de réponse en phase I de 31%, avec des réponses anti-tumorales rapides et durables à 3 ans. La tolérance au traitement est bonne, malgré quelques effets secondaires néanmoins contrôlables. La sécurité et l'efficacité de ce traitement en seconde ligne a été évaluée dans le CheckMate037. Il a ensuite mis en évidence une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale par rapport au Dacabazine, le traitement de référence, dans un essai de phase III. Des irAEs de grade 3 et 4 ont été notés chez 6% des patients (CheckMate066). Les données à 5 ans publiées (Robert et al JCO 2020) montrent un taux de réponse au nivolumab de 42% et de 39% pour la survie à 5 ans.

Le pembrolizumab est le 2ème α PD1 en AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en France pour le traitement du mélanome métastatique BRAF non muté ou muté 1ère ligne. Un essai clinique récent compare le Pembrolizumab à l'Ipilimumab, et présente le meilleur bénéfice du Pembrolizumab concernant la survie à 5 ans, bien que 17% des patients rencontrent des effets indésirables de grade 3 ou 4 (49).

Plus récemment, de nouveaux essais de prise en charge sont testés, comme par exemple le CheckMate 067, évaluant l'intérêt de la combinaison Ipilimumab + Nivolumab (α CTLA4+ α PD1) ou du Nivolumab seul face à l'Ipilimumab seul, pour des patients ciblés en 1ère ligne, non mutés BRAF, sans métastases cérébrales. Une tendance se dessine en faveur de la combinaison des deux, qui mène la survie des patients à 5 ans à 52%. Parmi ces 52%, 74% des patients n'ont reçu que la combinaison et ont donc répondu favorablement au traitement, 8% n'ont pas répondu et ont été inclus dans un autre essai clinique et 18% n'ont pas répondu et ont reçu des chimiothérapies (50). Cette association est admise en France aujourd'hui en première ligne, pour le traitement du mélanome à des stades avancés sans mutation BRAF et sans métastases cérébrales. Cependant, les effets secondaires peuvent être très importants, et l'administration doit donc se faire dans des centres disposant d'une réanimation médicale et d'équipes habituées à la prescription de cette combinaison. Devant ces résultats très prometteurs de thérapies ciblées et d'immunothérapie, la tendance actuelle est de combiner ces deux approches. Un essai est notamment en cours (phase III) pour évaluer la combinaison de Vémurafenib (inhibiteur de BRAF) + Cobimetinib (inhibiteur de MEK) en association avec de l'Atezolizumab (α PD-L1).

Le succès des résultats obtenus avec les anti-PD1 et les anti-CTLA4 ont motivé le développement des recherches autour d'autres points de contrôle immunitaire (figure 20) :

Dévrouillage de freins	Induction de stimulation	Facteurs solubles	Autres
CTLA4	41BB	α TNF α	α intégrine α 4 β 7
Axe PD1/PDL1/PDL2	GITR	inhibiteur de IDO	α RANKL
CTLA4+PD1	CD40	Axe A2AR/CD73	α VEGF
LAG3	OX40		ganglioside
TIM3			
TIGIT			
B7H3			

Figure 20: Autres molécules ciblées dans les essais en développement

c) Immunothérapie adjuvante

Des rechutes s'observent chez 60% des patients opérés pour un mélanome primaire. L'immunothérapie adjuvante est alors pratiquée comme un traitement préventif avant les premiers signes de rechute et ont amélioré la survie sans rechute :

Une première étude de phase III teste le Nivolumab versus Ipilimumab en traitement adjuvant pour le mélanome stade IIIB, IIIC et IV opéré (BMS 209- 238), et montre un taux de survie sans rechute de 70,5% pour le groupe traité au Nivolumab et de 60.8% pour le groupe traité à l'Ipilimumab. Des effets secondaires de grade 3 et 4 ont été rapportés chez 14.4% des patients dans le groupe Nivolumab et chez 45.9% des patients traités à l'Ipilimumab. La thérapie adjuvante par Nivolumab présente alors une survie sans rechute significativement plus longue, et avec des effets secondaires moins importants, en comparaison avec la thérapie adjuvante par Ipilimumab (51).

La seconde étude de phase III compare le pembrolizumab versus placebo en traitement adjuvant mélanome IIIA, IIIB, IIIC opéré (Keynote 054). Le traitement au pembrolizumab a été associé à une survie sans rechute significativement plus longue en comparaison avec le placebo (75.4% vs 61% à un an). Un sous-groupe présentant des tumeurs positives à PD-L1 présente une survie sans rechute de 77.1% à un an dans le groupe Pembrolizumab contre 62.6% dans le groupe placebo. Des effets secondaires de groupe 3 à 5 ont été rapportés dans le groupe Pembrolizumab dans 14.7% contre 3.4% dans le groupe placebo. Le Pembrolizumab en traitement adjuvant améliore significativement la survie sans rechute et ne présente pas d'effets secondaires toxiques (52).

d) Vaccins basés sur les cellules dendritiques

Une nouvelle génération de vaccin à base de DCs est en essai clinique pour le traitement du mélanome. Le taux de survie sans progression chez les patients traités par mDCs cCD1 autologues est de 28% des cas. Cependant la proportion de cCD1 parmi les DCs n'est pas maîtrisée, et ce point crucial est à améliorer. Les essais futurs auront à comparer l'efficacité des vaccins basés sur des DCs et sur les sous populations de DCs, pour mettre en évidence quelle sous-population induit une réponse T spécifique des antigènes associés aux tumeurs, qui prolonge la survie des patients. De plus, l'efficacité de la vaccination par des DCs est médiée en partie par le potentiel immunogénique des cellules mourantes. La combinaison de vaccins DCs et de facteur induisant une mort cellulaire (comme la chimiothérapie) peut être dans le mélanome mais n'a pas été encore testée dans cette pathologie, de la même façon que l'association vaccin DC et inhibition de point de contrôle immunitaire.

e) *Transfert adoptif de CAR-T cells*

Le transfert adoptif de cellules est une thérapie personnalisée qui utilise les lymphocytes du patient activés spécifiquement contre la tumeur. Ils sont collectés, modifiés génétiquement pour exprimer un TCR anti-tumoral spécifique ou un CAR (Chimeric Antigen Recepteur), amplifiés et activés, puis ré-administrés au patient. Les essais cliniques en cours pour le mélanome métastatique sont les suivants :

Etudes	Statut	Caractéristiques de l'essai
Gene Modified Immune Cells (IL13Ralpha2 CAR T Cells) After Conditioning Regimen for the Treatment of Stage III/IV Melanoma	En cours (Début : Novembre 2019)	Essai de phase I Etude des effets secondaires, du temps de persistance du CAR dans le corps et des doses optimales et de la fonctionnalité des IL13R α 2 CAR-T cells autologues après chimiothérapie pour des patients en stade III/IV
CAR T Cell Receptor Immunotherapy Targeting VEGFR2 for Patients With Metastatic Cancer	Terminé	Pas de réponses objectives observées

Des essais précliniques évaluent en modèle murin des CAR-T HER2 dans l'éradication du mélanome humain induit par UVs ou résistants aux thérapies par cellules T (53).

f) *Agoniste de TLR*

Les TLRs sont une famille de récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires conservés. Les TLR7 et TLR9 sont les récepteurs intracellulaires des pDCs spécialisés dans la reconnaissance de motifs bactériens et viraux. Les agonistes de ces TLRs (IMQ, CpGA, CpGB) activent et induisent la maturation de pDCs, et ont alors fait l'objet d'essais cliniques pour le mélanome métastatique, apportant des résultats prometteurs, sans effet secondaire trop sévères. Des agonistes du TLR9 (CMP-001 ou SD-101) semblent être efficace pour l'induction de l'infiltration immunitaire dans le cas de mélanome (54), et montrent des réponses durables en combinaison avec du Pembrolizumab chez les patients atteints de mélanome métastatique résistant aux α PD1, selon les résultats d'une étude présentée par Kirkwood au congrès annuel de la Société pour l'Immunothérapie des Cancer en 2019 (TLR9 Agent Triggers Durable Response in Metastatic Melanoma). Des essais se développent avec des agonistes de TLR9 seuls ou associés avec des ICPs et en thérapie adoptive (55-57).

g) *Agoniste de STING*

La voie de signalisation cGAS-STING (cGMP-AMP Synthetase - Stimulator of IFN genes) est impliquée dans la production d'IFN suite à la détection d'acides nucléiques cytosoliques. Cette voie a récemment été identifiée comme acteur moléculaire majeur dans les réponses anti-tumorales spontanées, et fait l'objet de plusieurs études cliniques en cours. En effet, il a été démontré dans des modèles murins de mélanome et de cancer du côlon qu'une injection intra-tumorale de cGAMP, un dinucléotide cyclique synthétisé par cGAS, active STING et induit une forte réponse T-CD8 et un contrôle de la croissance tumorale, de façon dépendante de l'IFN de type I secrété par les cellules endothéliales du microenvironnement tumoral (58).

La démonstration de l'efficacité clinique d'agonistes de STING seul ou en combinaison avec des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire est en cours pour le traitement de tumeurs solide et de lymphomes (59).

h) *Modulation du microbiote*

Les chimiothérapies, immunothérapies ou antibiotiques, peuvent causer des effets secondaires sur les intestins, induisant une migration des bactéries intestinales dans les ganglions drainants ou dans des sites distants comme des tumeurs ou des ganglions drainants la tumeur. L'Ipilimumab notamment, provoque des effets secondaires dont les caractéristiques sont comparables avec celles induites par les maladies inflammatoires de l'intestin dont la cause est une dysbiose du microbiote intestinal. De nombreuses études précliniques ont permis alors de mettre en évidence un lien entre la composition microbienne intestinale et les réponses anti-tumorales induites par un traitement d'immunothérapies (60). Par exemple, une présence importante de *Faecalibacterium* et autres Firmicutes s'est révélée être de bon pronostic pour la réponse à l'Ipilimumab chez des patients atteints de mélanome métastatique (61). De manière plus globale, l'impact bénéfique ou suppressif du microbiote intestinal sur les réponses aux immunothérapies par inhibiteurs de point de contrôle immunitaire a été clairement associé à la composition de celui-ci. De ce fait, un enrichissement spécifique de certaines espèces est associé à une amélioration de la réponse anti-tumorale et à un bon pronostic de réponse aux ICPs, alors que d'autres espèces bactériennes suppriment les réponses anti-tumorales et sont corrélées à une mauvaise réponse aux ICPs (62). La composition bactérienne

intestinale peut donc aider à la prédiction de réponses immunes anti-tumorales, et constitue alors un nouveau vecteur ou cible prometteur pour le développement de thérapies. Dans le mélanome, les études cliniques en cours tentent d'une part de mieux comprendre le rôle du microbiote intestinal dans la réponse aux traitements, et d'autre part d'améliorer les traitements d'immunothérapies existants. Quelques exemples d'essais en cours sont résumés dans le tableau suivant (Figure 21) :

	Etudes en cours ou sur le point de débiter	But et caractéristiques de l'essai	Numéro de l'étude
Recherche d'association	Prediction de réponse aux immunothérapies par le microbiote intestinal et la métabolomique	Etude de l'effet de la diversité microbienne sur les effets secondaires et la réponse aux immunothérapies Vérifier que la richesse du microbiome peut protéger contre les colites et d'autres effets secondaires et qu'une bonne diversité microbienne peut également améliorer les réponses aux immunothérapies.	NCT03643289
	Evaluation de la toxicité et des réponses de l'immunothérapie par le microbiome	Etude observationnelle pour investiguer sur la corrélation entre le microbiome et l'efficacité et la toxicité des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire	NCT04107168
Amélioration de traitements actuels	Transplantation de Microbiote Fécal aux patients non-répondeurs aux immunothérapies	Utilisation du microbiote issu de matière fécale de patients répondeurs aux immunothérapies et test de différents mode de retransmission	NCT03353402
	Combinaison de TMF avec Pembrolizumab ou Nivolumab dans le mélanome métastatique	Etudier la sécurité de la combinaison	NCT03772899

Figure 21 : Essais cliniques basés sur le microbiote en cours pour le mélanome métastatique. Clinical trial.gov

i) Virus oncolytiques

La découverte d'épisodes de régression tumorale coïncidant avec infection virale naturelle a donné naissance au projet d'utilisation de virus pour le traitement de tumeur. L'immuno-virothérapie oncolytique consiste à utiliser des virus réplicatifs pour cibler les cellules tumorales, provoquer leur lyse sélective, et activer ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale

L'utilisation de T-VEC pour la prise en charge du mélanome non résecable a été admise en 2015 pour les mélanomes avancés (63). L'infection directe des cellules tumorales par le virus de l'herpès modifié induit une mort des cellules tumorales. De plus la libération dans le micro-environnement tumoral de GM-CSF favorise le recrutement d'effecteurs immunitaires.

5. Bilan et perspectives

La diversification des moyens de prise en charge ont fait évoluer les taux de réponses d'environ 10% à environ 60% (Figure 22). Les thérapies approuvées aujourd'hui pour le mélanome ciblent CTLA4 ou PD1, BRAF ou MEK en monothérapie ou en combinaison, l'utilisation IFN α 2 recombinant, d'IL2 ou encore une approche par virus oncolytique.

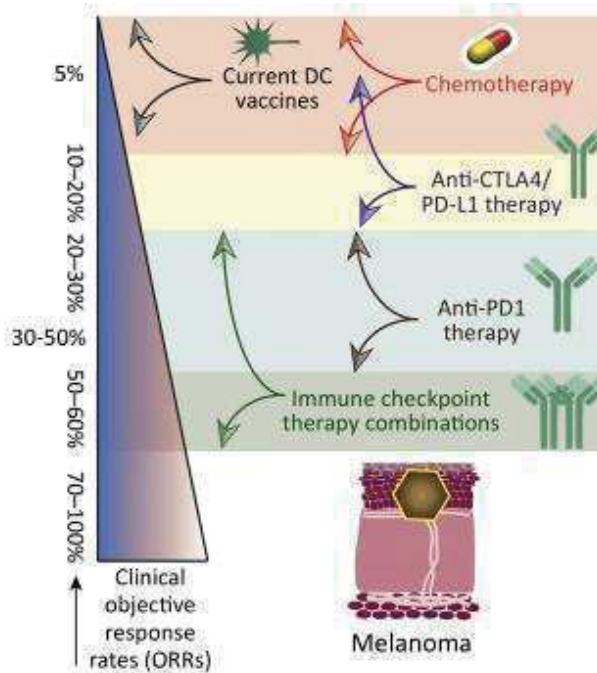


Figure 22: Comparaison des taux de réponses cliniques des différentes approches thérapeutiques pour le mélanome

Les deux stratégies thérapeutiques principales sont les inhibiteurs de tyrosine kinase et les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire α CTLA4 ou α PD1. Les deux en prolongent significativement la survie globale pour les patients atteints de mélanome métastatique avancé, et lorsqu'ils sont en combinaison le bénéfice clinique est encore meilleur (64) (figure 23):

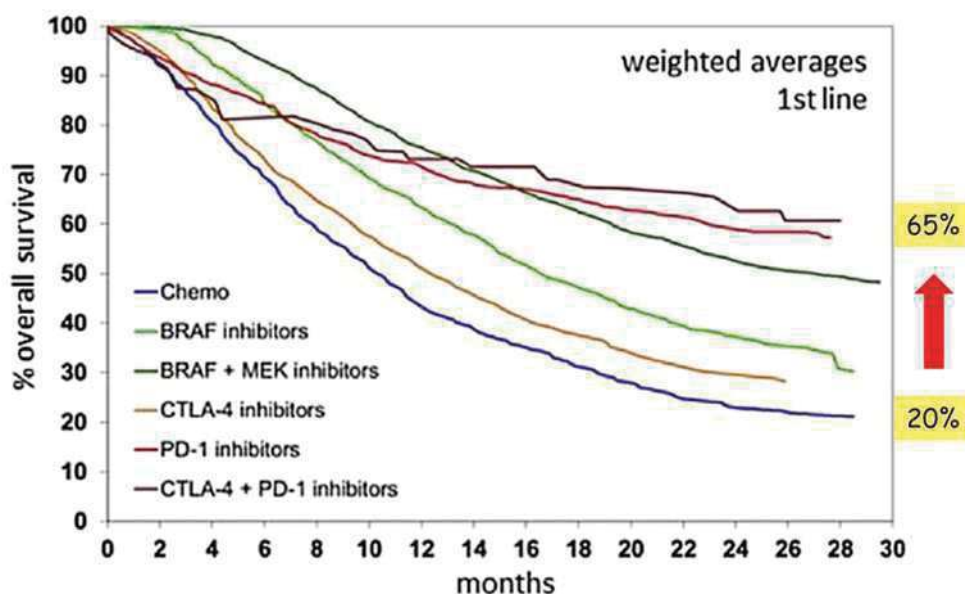


Figure 23: Survie globale en fonction des 1ères lignes de traitements pour les mélanomes métastatiques (64)

La durée optimale des traitements par inhibiteurs de points de contrôle immunitaire est une question actuelle critique. En effet des rémissions durables chez 85% des

patients à mélanome métastatique ont été observées lors d'arrêt de traitement par α PD1 après rémission complète. Malgré ces observations prometteuses, la durée de traitement permettant l'obtention de rémission durable est encore inconnue et nécessite des investigations à travers de nouveaux essais cliniques. A l'heure actuelle, pour le mélanome, les traitements par inhibiteurs de point de contrôle immunitaire sont arrêtés au moins 6 mois après rémission complète (65).

Les immunothérapies anti-tumorales notamment ont apporté une amélioration majeure pour la prise en charge du mélanome depuis 2010. Les recherches dynamiques en immuno-oncologie, les avancées scientifiques et les stratégies thérapeutiques innovantes ont apporté des effets durables de rémission pour les stades avancés de mélanome. Les essais de combinaison en cours apporteront de nouveaux éléments sur les facteurs d'efficacité et d'échappement. Le développement du transfert adoptif, l'ingénierie des cellules T et l'approfondissement des connaissances sur l'impact du microbiote ouvriront sans doute de nouvelles voies d'amélioration de taux de réponses. Le défi reste également dans l'identification de facteurs prédictifs de réponse aux traitements et dans la personnalisation des traitements.

III. Deux acteurs majeurs du micro-environnement tumoral : les cellules dendritiques plasmocytoïdes et lymphocytes $T\gamma\delta$

A. Cellules dendritiques : le chef d'orchestre de la réponse immunitaire

1. Biologie et fonction des pDCs

Les cellules dendritiques ont un rôle central et majeur dans l'initiation et la régulation de réponses immunes anti-virales ou anti-tumorale grâce à leur fonction de présentation d'antigène. Produites dans la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse lympho-myéloïde, ces cellules de l'immunité innée migrent en continu dans le sang, les tissus et les organes lymphoïdes, et détectent différents signaux de danger. Elles forment un lien avec l'immunité adaptative en modelant une réponse inflammatoire aiguë par leur capacité de « processer » des protéines intra- ou extracellulaires et de les présenter aux cellules T via les molécules du CMH. Des études d'expression génique ont permis de classer les DCs en 3 sous-types majeurs.

Il y a les DCs plasmocytoïdes (pDC) exprimant CD123 et CD303, les DCs myéloïdes conventionnelles 1 (cDC1/BDCA3) identifiables par les marqueurs CD141+ Lin- DR+ CD11+ et CLEC9A, et les DCs myéloïdes conventionnelles 2 (cDC2/BDCA1). Ces sous-types sont complémentaires par leur spécificité de reconnaissance de signaux de danger, leur localisation au sein des tissus et leur type de réponse.

Dans ce travail nous nous intéresserons exclusivement aux pDCs. En effet, leur rôle est encore énigmatique dans le mélanome, car leur présence s'est avérée facteur de mauvais pronostic. Toutes leurs interactions avec les cellules environnantes n'ont pas été décrites et les mécanismes conduisant à cet impact négatif sur le pronostic du patient n'ont pas été totalement élucidés, motivant d'autant plus ce travail.

Les pDCs ont été identifiées pour la première fois dans le sang et les ganglions et représentent 0,2 à 0,8% des PBMCs. Ces cellules sont produites en continu dans la moelle osseuse et mûrissent en périphérie par reconnaissance du ligand de Fms-like tyrosine kinase 3. Leur migration du sang vers les tissus périphériques en contexte pathogénique est régulée par l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines. Les pDCs expriment notamment la L-selectine (CD62-L) et de nombreux récepteurs à chimiokines (CXCR3 par exemple) leur permettant de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et vers les tissus inflammés (66). Le récepteur CCR7 leur permet un retour au ganglion lymphatique. Leur durée de vie est de quelques jours. Elles ont une morphologie bien ronde, et peuvent être phénotypiquement identifiées par exemple CD11c- CD123+ BDCA2+ BDCA4+ (CD11c : protéine d'adhésion type intégrine ; CD123=IL3R ; BDCA2=CLEC4C=CD303).

Elles exploitent différents PRR (Pattern Recognition Receptor) pour la détection de PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et sont particulièrement spécialisées dans la reconnaissance de motifs dérivés de virus et l'induction de la réponse anti-virale. Leur activation se fait principalement par le biais des Toll-Like Receptor 7 et 9 endosomaux (TLR). Ces récepteurs reconnaissent respectivement des ARNs simple brin et les motifs CpG non méthylés de l'ADN grâce à des motifs riches en leucine. Les pDCs sont également dotées de CLR comme BDCA2 (impliqué dans l'internalisation de ligand et l'inhibition de la synthèse des interférons α et β) et de RLR (impliquée dans la reconnaissance de l'ADN double brin)

renforçant leur capacité de senseur. D'autres marqueurs spécifiques permettant leur identification sont représentés sur le schéma suivant (67) (Figure 24).

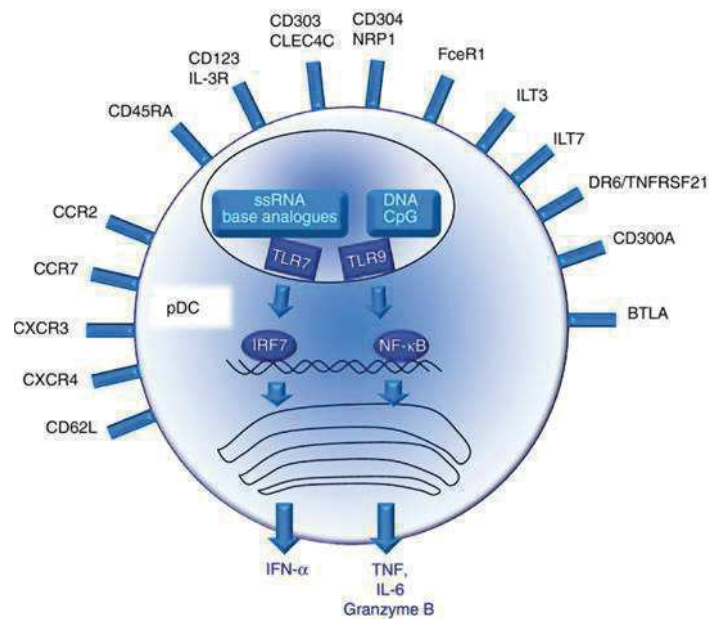


Figure 24 : Phénotype de la pDC (67)

Les pDCs ont une grande diversité de fonctions. Elles sont connues pour être grandes productrices d'interférons de type I, ainsi que d'autres cytokines comme l'IL6, le TNF α et des molécules pro-inflammatoires telles que CXCL10. La production d'IFN α particulièrement induite suite à une stimulation des TLR. La sécrétion rapide de grandes quantités d'interférons de type I et de cytokines est régulée différemment selon la nature des acides nucléiques détectés et l'engagement du TLR : lorsque le TLR7 interagit avec son ligand, une cascade de signalisation impliquant MyD88, puis la formation d'un complexe IRAK+ IRAK4 et TRAF6, qui active NF κ B et MAPK entraînant l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules de co-stimulation, et la translocation de IRF7 dans le noyau. La liaison de IRF7 à l'ADN est l'étape-clé pour l'induction de la transcription des gènes codant les interférons de type I. L'engagement du TLR9 induit, lui, plutôt une production de TNF α et d'IL6 via une voie de signalisation impliquant également MyD88 et NF κ B (figure 24). Pour aller plus loin, des différences de ligands du TLR9 peuvent orienter les modifications phénotypiques de la pDC : les CpG A promeuvent une cellule productrice d'IFN α alors que les CpG B augmentent l'expression des molécules de co-stimulation et de présentation antigénique (67).

Au niveau moléculaire, les pDCs ont des capacités de régulation autocrine et paracrine d'IFNs (Figure 25).

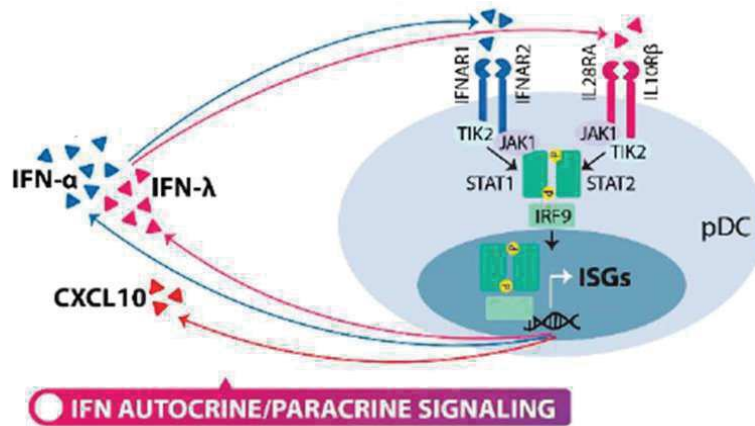


Figure 25: Fonctions moléculaires des pDCs (41)

Les signalisations via les récepteurs IFNARI et IFNAR2 induisent la transcription d'un grand nombre de gènes. Néanmoins, la production excessive d'IFN α pouvant mener au développement de maladies auto-immunes, la pDC peut réduire sa propre production grâce à des récepteurs couplés à des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif) et ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activator motif) lui permettant de limiter ou arrêter les réponses à l'IFN α (ILT-7 par exemple). Au-delà de la production d'IFN α , les pDCs présentent de multiples fonctions cellulaires (Figure 26) et font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

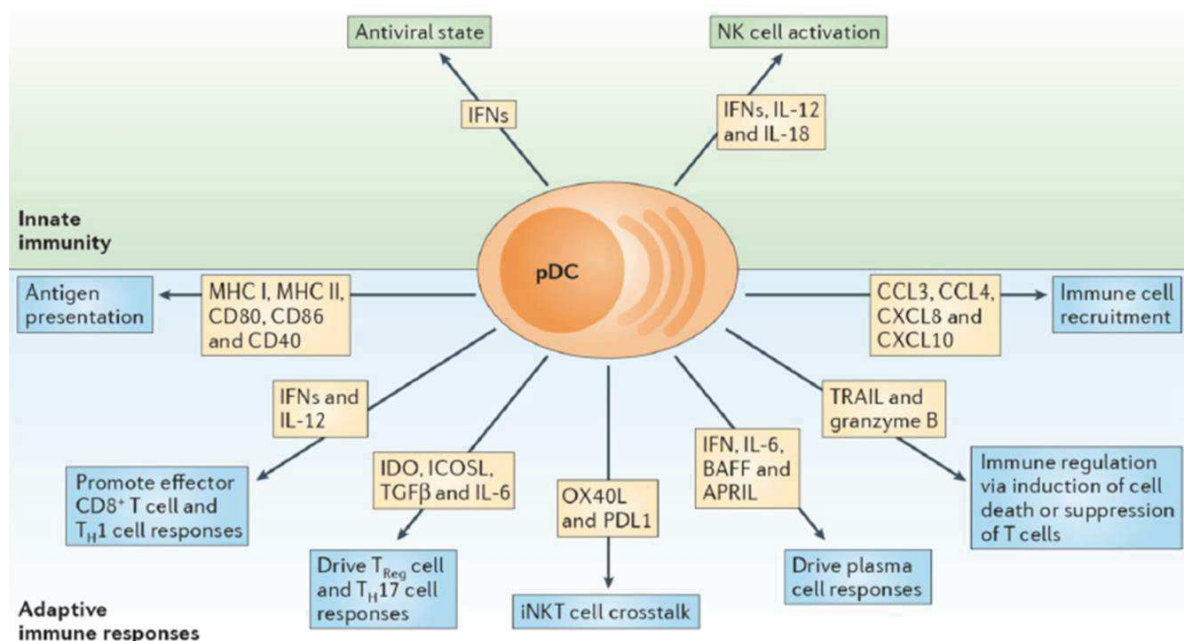


Figure 26 : Fonctions cellulaires des pDCs (68)

Le lien entre les deux types d'immunité se fait notamment via la fonction de présentation d'antigènes. L'augmentation de l'expression des molécules du complexe d'histocompatibilité I et II et des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 après activation leur confère la capacité à présenter les molécules antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ et de promouvoir une réponse TH1. De manière complémentaire aux DC conventionnelles, elles présentent plutôt des peptides endogènes et continuent la présentation de nouveaux peptides même lorsqu'elles sont matures(69).

En plus de l'IFN α , les pDCs possèdent la capacité de produire un ensemble de cytokines et chimiokines activant les NK, stimulant les propriétés phagocytaires des macrophages et induisant l'amplification d'autres effecteurs immunitaires. Les pDCs sécrètent notamment de l'interféron de type III et la chimiokine attractrice CXCL10 en réponse à l'IFN γ , soutenant l'adhésion des cellules T aux cellules endothéliales et jouant un rôle anti-tumoral via l'inhibition de l'angiogénèse (70). Schulz et al. ont également montré la présence de clusters cellulaires producteurs de CXCL10 et leur corrélation avec la présence de lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral (71).

Les pDCs possèdent également leurs propres fonctions effectrices. Leur expression de TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et la sécrétion de granzyme suite à une stimulation par leur TLR leur confèrent des propriétés cytotoxiques et induisent la mort cellulaire.

Les pDCs ont aussi un rôle de régulation de l'immunité possible grâce à l'expression de l'enzymeIDO et de ICOS-L ou par la production de facteurs immunosuppresseurs comme le TGF β ou l'IL6, induisant des réponses T régulatrices ou TH17. Elles communiquent avec d'autres effecteurs cellulaires via OX40/OX40-L ou PD1/PD-L1 ou des facteurs solubles tels que les interférons, l'IL6, BAFF (B cell-activating factor belonging to the TNF family) ou APRIL (Producing A Proliferation-inducing Ligand)(68).

2. Le double jeu des pDCs dans le cancer

Toutes ces caractéristiques dotent les pDCs d'une activité anti-tumorale efficace. Cependant, en fonction de l'environnement et du type de stimulation, les pDCs peuvent induire des réponses immunogènes ou tolérogènes (72, 73). En contexte tumoral, la plupart des études montrent que les pDCs infiltrantes sont

fonctionnellement défailtantes, et semblent même promouvoir le développement tumoral. En effet, il a été montré que dans le mélanome, les pDCs ont la capacité d'infiltrer les tumeurs (74-76) mais que leur présence est corrélée à un mauvais pronostic clinique. Elles présentent un phénotype inhibiteur et un état immature caractérisé par une diminution de l'expression de CD80 et CD86 dans les ganglions drainants ou dans les tumeurs primaires de mélanome ou des métastases, ainsi que dans le cancer du poumon non à petites cellules et l'hépatocarcinome (74, 77, 78). Dans le cancer du sein, des ovaires et le carcinome squameux, les pDCs infiltrantes présentent également un état non fonctionnel à travers une production d'IFN α , de CXCL10, d'IL6 et de TNF α réduite et une augmentation de leur capacité à induire la différenciation des Treg (79-82). L'augmentation de pDCs infiltrantes est d'ailleurs corrélée à une augmentation de T régulateurs et à une diminution de la survie globale (76). Elles ont été co-localisées avec les Treg notamment dans le cancer ovarien et du sein, et associées au recrutement de Treg dans le cancer colorectal (83) et leur densité est corrélée avec la clinique (84). Les dysfonctions de pDCs peuvent aussi être induites par les facteurs régulateurs de la pDCs elle-même, comme l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui est plus exprimée, modifiant la réponse immune locale et favorisant un échappement tumoral par exemple.

Dans le cancer du sein et des ovaires, les pDCs ont des capacités de réponse restreintes lors de stimulation par TLR-L.

L'expression de points de contrôle immunitaire inhibiteurs comme ICOS-L, OX40-L et PDL1 va également induire respectivement le recrutement de Treg, une polarisation TH2 et l'inhibition des lymphocytes T dans le cancer des ovaires et le mélanome (76, 80, 85). Les propriétés cytotoxiques sont également amoindries avec une diminution de sécrétion du granzyme B.

Ce comportement aberrant serait dû aux facteurs solubles produits par la tumeur, comme le TGF β (86), ou d'autres molécules immuno-modulatrices (IDO par exemple) et voies de signalisation régulatrices négatives (expression PD1/PD-L1 par exemple) mais les mécanismes menant à cette reprogrammation restent incomplètement élucidés.

Les données concernant les pDCs dans le cancer sont énigmatiques Leur rôle peut être double (figure 27) :

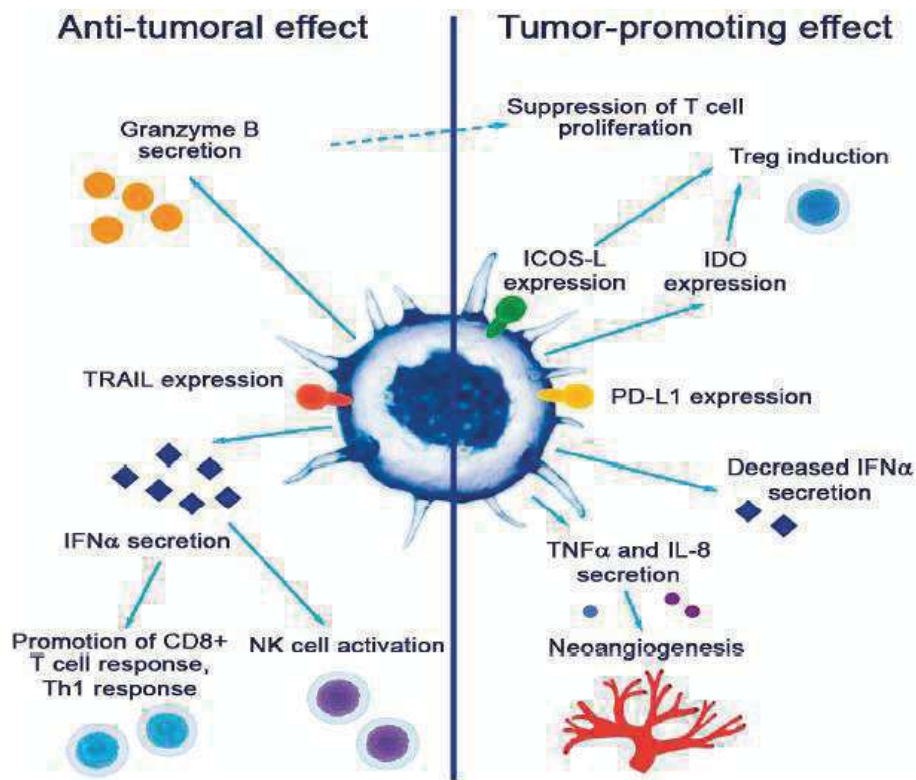


Figure 27 : Double rôle des pDCs en contexte tumoral (87)

Des études sur modèles murins ont montré qu'une restimulation des pDCs par TLR-L ou par IFN α recombinant rétablissait leur fonction cytolytique et réduisait la masse tumorale via l'expression de TRAIL et de Granzyme B (88-91). In vivo, la mobilisation et l'activation de pDCs par les TLR-L induit une activité anti-tumorale efficace (91-94). La plupart des études manquent cependant d'analyse fonctionnelle ou de corrélation avec des paramètres cliniques, mais laissent penser que les cellules tumorales exploitent la plasticité des pDCs pour établir un micro environnement immunosuppresseur favorable à leur croissance (76). Ces découvertes mettent en évidence que les pDCs peuvent retrouver leurs fonctions effectrices après stimulation TLR-L, et sont donc une cible thérapeutique intéressante pour l'immunothérapie anti tumorale.

3. pDCs dans le mélanome

Les données relatives aux pDCs dans le mélanome sont également toujours énigmatiques : les pDCs s'accumulent dans les lésions primaires, méta-cutanées et ganglionnaires potentiellement (95) par l'expression de CXCL12 (74) et CCL20 (96) mais sont liées à un mauvais pronostic clinique (94, 97, 98). Vescovi et al. ont

observé un recrutement précoce des pDCs dans les tumeurs primaires, mais leur densité réduit au cours de la progression tumorale jusqu'à une diminution importante de l'infiltrat dans les métastases à distance, combinée à une diminution drastique des pDCs circulantes dans les patients « chemo naïf ». *In vitro*, le sécrétome des cellules de mélanome inhibe la différenciation des pDCs à partir des précurseurs CD34 et induit l'apoptose des pDCs déjà différenciées (99).

Lorsque les pDCs sont modulées par la tumeur, elles médient une immunosuppression. Leur rôle pathogénique se décrit à travers une baisse d'expression du CD40, révélant un état immature. Il est pourtant rapporté que la production d'interféron α sous stimulation TLR est maintenue et les molécules de co-stimulation sont plus fortement exprimées. Sous l'influence des cellules tumorales, et notamment par la sécrétion de CCL17, CCL22 et MMP2, les pDCs infiltrantes expriment aussi d'avantage OX40-L et ICOS-L menant à la différenciation des cellules TCD4+ en TH2 et Treg. La sécrétion d'IL5, d'IL13 par les lymphocytes T et d'IL10 par Treg participe à l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppressif favorisant le développement tumoral, et les pDCs expriment alors de plus grandes quantités d'IDO contribuent donc à l'échappement tumoral (76, 94). Il a récemment été rapporté que l'infiltration de pDCs est corrélée positivement à la fréquence de la mutation BRAF(100).

A l'inverse, les pDCs sont malgré tout capables d'induire des réponses anti-tumorales sous conditions spécifiques : lorsqu'elles sont activées correctement (via TLR-L), les pDCs autologues chargées par des peptides spécifiques du mélanome induisent la cytotoxicité anti-tumorale des lymphocytes T (75, 101). Elles conservent également leurs propres propriétés cytotoxiques telles que l'expression de TRAIL ou de lysozyme (102, 103). La mobilisation et l'activation des pDCs *in vivo* par l'activation via leurs TLR-L déclenche une activité anti-tumorale efficace (91-94, 104), rendant leur étude intéressante pour un développement d'immunothérapies.

Les pDCs ont un rôle critique dans le maintien de l'équilibre entre réponse immune et tolérance, elles sont donc des vecteurs prometteurs d'immunothérapies. Mieux identifier les interactions avec l'environnement qui font basculer leurs fonctions en faveur du développement de la pathologie permettrait de maîtriser leur sensibilité et d'induire ou maintenir leur rôle protecteur par le biais de nouvelles immunothérapies.

4. pDCs en immunothérapie

Bien que les pDCs soient peu représentées dans le sang, elles infiltrent les tumeurs et ont une grande plasticité. Elles ont de ce fait un potentiel thérapeutique qui est en cours d'évaluation dans plusieurs approches cliniques (41) (figure 28).

Therapeutic Approach	Compounds	Type of Study
IFN- α therapy + CPi	IFN α -2b + pembrolizumab	Phase 1
IFN- α therapy + CPi	PegIFN-2b + pembrolizumab	Phase 1/2
TLR9-agonist + CPi	IMO-2125 + ipilimumab or pembrolizumab	Phase 1/2
TLR9-agonist + CPi	IMO-2125 + ipilimumab	Phase 3
TLR9-agonist	IMO-2125	Phase 1
TLR9-agonist + CPi	CMP-001 + pembrolizumab	Phase 1
TLR9-agonist + CPi	CMP-001 + nivolumab	Phase 2
TLR9-agonist + CPi	CMP-001 + pembrolizumab	Phase 1
TLR9-agonist + CPi	SD-101 + pembrolizumab	Phase 1/2
TLR9-agonist	PF-3512676	Phase 2
TLR9-agonist	PF-3512676	Phase 1
TLR7-agonist	IMQ + monobenzone	Phase 2
TLR7-agonist + peptide-base vaccination	IMQ + NY-ESO-1	Phase 1
pDC-based vaccination	HLA-A2.1 ⁺ pDC or mDC	Phase 1
pDC-based vaccination	HLA-A0201 ⁺ pDC	Pre-clinical
pDC-based vaccination	HLA-A0201 ⁺ pDC	Pre-clinical

CPi = checkpoint inhibitor; * Estimated enrollment; † the study includes also non-melanoma tumors.

Figure 28: Approches thérapeutiques ciblant ou utilisant les pDCs chez des patients atteints de mélanome (41)

- pDCs comme cible d'immunothérapies

- IFN α

Le défaut de production d'IFN α par les pDCs est comblé par des administrations seules ou en combinaison d'IFN α recombinant. La combinaison avec un α PD1 permet d'améliorer la réponse clinique et d'éviter les effets secondaires obtenus lors de l'administration de l'IFN α seul. Cependant, l'injection d'IFN α est associée à une augmentation de l'expression de IDO responsable de l'anergie des lymphocytes T, ouvrant une autre voie d'échappement à la tumeur malgré la présence du bloqueur de point de contrôle immunitaire.

- Agoniste des TLR

Malgré le détournement des pDCs par la tumeur, une réactivation de celles-ci est possible via l'administration de TLR7 et 9 ligands, malgré le défaut d'expression du

TLR9 observé chez certains patients. Les résultats montrent une augmentation de leur production d'IFN α et de leur capacité cytotoxique dans ces conditions. Des thérapies ciblant TLR9 sont en cours d'essai chez des patients à mélanome métastatique non résecable, et montrent une activation des pDCs par augmentation de CD86 et des molécules du CMH-II. Concernant le TLR7, l'administration d'un agoniste synthétique (Imiquimod) en combinaison avec du monobenzone (responsable de dépigmentation), ou du FLT3L, et d'un vaccin peptidique montre des résultats prometteurs respectivement à travers une régression locale de métastases cutanées (52% des patients), une bonne tolérance, et une augmentation de l'infiltration.

- pDCs comme vecteur d'immunothérapies
- Vaccins basés sur pDCs autologues pulsées : l'activation *ex vivo* de pDCs autologues par « pulses antigéniques » suivie de la réinjection de ces cellules dans les ganglions de patients atteints de mélanome métastatique a été testée en essai clinique en 2013. Les vaccinations ont montré une réponse fonctionnelle par la production d'IFN α , une activation des NK, ainsi qu'une migration vers les ganglions drainants et une activation des effecteurs T, menant à une augmentation de la survie globale des patients par rapport au traitement par chimiothérapie standard (105).

- GENiusVac

L'utilisation de vaccins basés sur la lignée de pDCs GEN2.2 est développée aujourd'hui en immunothérapie par notre équipe. La lignée chargée de peptides dérivés de mélanome et irradiée induit des réponses TCD8 spécifiques anti-tumorales avec un phénotype central et effecteur mémoire, et fonctionnel, mesurable par sécrétion d'IFN γ , l'expression membranaire de CD107 et de fortes réponses cytotoxiques contre les cellules tumorales semi-allogéniques et les cellules tumorales dérivées de patients (106). Les TCD8 spécifiques sont également capables d'induire des réponses anti-tumorales dans un modèle de souris humanisées (107). Les pDCs induisent des lymphocytes T spécifiques dans des proportions et avec des fonctions différentes en fonction du stade de la maladie, mais indépendamment des paramètres histologiques au moment du diagnostic. Ces études ont montré pour la première fois que l'avidité des lymphocytes T spécifiques de MelA induite par

GENiusVac permet de prédire les rechutes et la survie globale (108). Ce vaccin a été développé jusqu'à l'essai clinique de phase I pour le mélanome métastatique. Il ne présente pas de toxicité ou d'effets secondaires importants, et induit une augmentation de lymphocyte T spécifique des tumeurs chez certains patients, avec une modification phénotypique d'un statut naïf à un phénotype mémoire, démontrant alors l'induction d'une réponse anti-tumorale efficace par des pDCs. Des synergies avec l' α PD1 ont apporté une meilleure amplification des T anti-tumoraux spécifiques (109).

Ces résultats montrent que, en tant que bon chef d'orchestre de la réponse immunitaire, les pDCs réactivées peuvent apporter un réel bénéfice clinique et sont prometteuses en contexte de mélanome.

B. Les lymphocytes $T\gamma\delta$

1. Biologie et fonctions

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ constituent une partie de la lignée lymphocytaire tout comme les lymphocytes $\alpha\beta$ dits conventionnels et des lymphocytes B, et participent donc par définition à la défense immunitaire adaptative de l'organisme. Ils ne représentent qu'une sous-partie mineure des lymphocytes T (1 à 10% des lymphocytes circulants/matures).

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ se caractérisent par un marquage CD3 TCR $\gamma\delta$ et présentent comme phénotype d'activation des récepteurs de cellules présentatrices d'antigènes (CD40, CD86) et des récepteurs d'effecteurs (CD25, CD69).

Ces cellules contribuent à l'immunité de manière unique en se distinguant par des caractéristiques hybrides entre immunité innée et immunité adaptative (Figure 29). D'une part elles impactent les autres cellules immunitaires (DC, $T\alpha\beta$, NK, B) par leur potentiel cytokinique majeur (IFN γ , TNF α) ou par contact, via des récepteurs-clés de l'immuno-surveillance (TLR, NKR...), potentialisent leur efficacité et coordonnent une réponse immunitaire. Elles peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes afin d'augmenter la réponse T classique ou collaborer avec les cellules B pour mettre en place leur fonction cytotoxique dépendante d'anticorps (ADCC) par l'expression de CD16 (liaison aux fragments Fc d'anticorps monoclonaux). Elles peuvent également développer une mémoire immunologique (110) les rapprochant de l'immunité adaptative. D'autre part, les lymphocytes $T\gamma\delta$ ont un potentiel

cytotoxique unique, direct et très réactif : lors de l'engagement de leur TCR, ils produisent rapidement une grande quantité de facteurs cytotoxiques solubles (granzyme et de perforine), et expriment également des marqueurs cytotoxiques membranaires comme Fas-L et TRAIL.

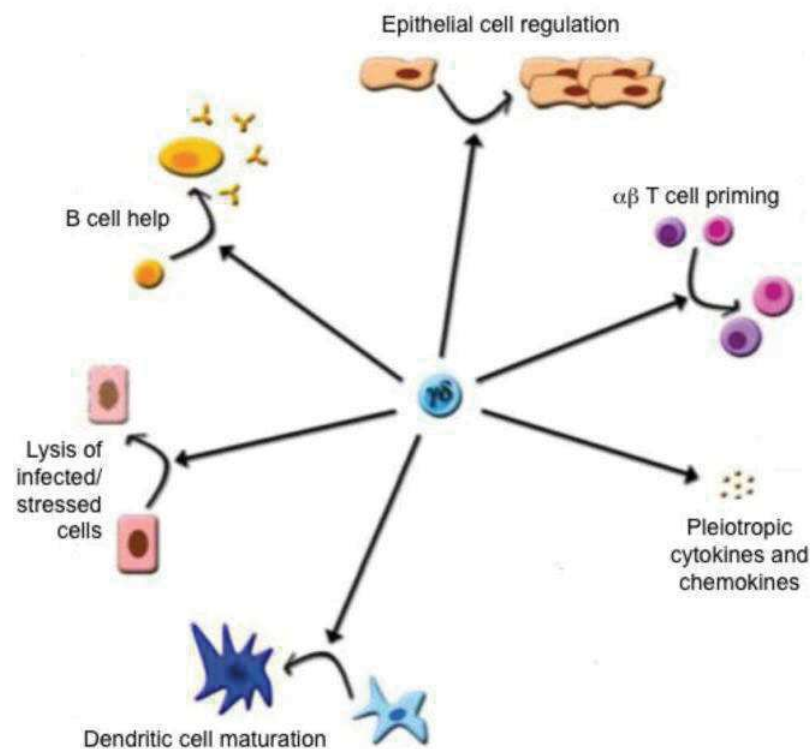


Figure 29 : Fonction des T $\gamma\delta$ (111)

Cette grande diversité de fonctions démontre le rôle central des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les mécanismes de défense et rend leur étude très attractive, aussi de par leur complémentarité avec les lymphocytes T $\alpha\beta$.

Caractéristiques communes aux $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$	Caractéristiques spécifiques des T $\gamma\delta$ par rapport aux T $\alpha\beta$
- Activité cytotoxique contre cellules infectées ou transformées	- Reconnaissance qualitative des antigènes: non dépendante du CMH et spécifiques pour les phosphoantigènes directement via leur TCR
- Produisent grande quantité d'IFN γ	- Cinétiques de réponses immunes distinctes et rapides
	- Potentiel fonctionnel unique
	- Fonction protectrice adaptée au site anatomique
	- Importance chez les jeunes sujets
	- Réponses cruciales dans la défense contre certains pathogènes

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont présents chez quasiment toutes les espèces/vertébrés, et sont même les T circulants majoritaires chez certaines espèces, mais dans ce travail nous n'évoquerons que les T $\gamma\delta$ humains.

2. Les sous-populations de $T\gamma\delta$

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ se développent dans le thymus à partir d'un précurseur commun avec lymphocytes $T\alpha\beta$ (111). Les stades de développement sont cependant encore mal connus. En effet, la plupart des études sur leur maturation sont faites sur des modèles murins, qui partagent peu d'équivalents structuraux et fonctionnels avec l'Homme (thèse N. Joalland). Tout comme les lymphocytes $T\alpha\beta$, ils constituent leur répertoire de récepteurs via un réarrangement des gènes V-D-J (pour Variable, Diversité et Jonction) médié par la protéine RAG (Recombinaison-Activating Gene). Ce répertoire est limité par rapport aux TCR des lymphocytes $T\alpha\beta$ car ils possèdent moins de gènes V, mais la variété de l'union entre les chaînes γ et δ est compensée par le CDR3 (complementary determining region 3). Leur diversité de TCR est moindre par rapport aux lymphocytes $T\alpha\beta$, bien que l'organisation de base des locus du TCR soit semblable.

Les $LT\gamma\delta$ peuvent être divisés en 4 sous-populations basées de la chaîne δ du TCR : $\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$, $\delta 5$. Chaque réarrangement est propre à une localisation tissulaire et à des rôles physiologiques différents(112) (cf tableau). Les $\delta 1+$ qui s'associent avec $V\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 5$, $\gamma 8$ et $\gamma 9$, se trouvent principalement dans l'intestin, le foie et les tissus épithéliaux. Ils s'impliquent dans les réponses immunes en cas d'infection virale, savent également reconnaître une cellule tumorale ou stressée via MICA/MICB (MHC class I - related chains A and B). Pour la chaîne $V\delta 2$, la recombinaison majoritaire est l'association $V\gamma 9\delta 2$. Cet hétéromère est présent majoritairement sur les lymphocytes circulants (Séquence fonctionnelle identique donc TCR invariant).

Les $\delta 3+$ s'associent fréquemment avec les chaînes $\gamma 2$ et $\gamma 3$, et sont souvent retrouvés dans le foie et l'épithélium intestinal, et sont connus pour s'amplifier lors d'infection au cytomégalovirus ou en cas de leucémie chronique (113). Les $\delta 3+$ et $\delta 5+$ sont également présents dans le sang périphérique mais ce sont les moins bien décrits. Ils seraient les plus « innate like » par leur amplification clonale, leur différenciation et leur réponse à l'infection au cytomégalovirus.

Sous population	Chaîne associée	Localisation majoritaire	Fonctions	Mécanisme spécifique majoritaire
V δ 1	V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9	Tissus épithéliaux, rate, thymus, foie	- Anti viral - Anti tumoral - Anti microbienne	Reconnaissance cellules stressées
V δ 2	V γ 9	Sang périphérique	- Anti tumoral - Anti microbienne	Propriété d'APC, Reconnaissance des Pags
V δ 3	V γ 2, V γ 3	Tissus épithéliaux, foie, sang périphérique	- Anti viral (cytomégalovirus) - Anti tumoral (leucémie chronique)	Amplification clonale
V δ 5	V γ 4	Sang périphérique séropositif au CytoMégaloVirus (Lalor 2016)	- Anti viral (cytomégalovirus)	Amplification clonale, différenciation

3. Activation et ligands des T $\gamma\delta$

Contrairement aux lymphocytes conventionnels, leur capacité de reconnaissance antigénique n'est pas limitée aux peptides présentés par le CMH, mais s'étend aux lipides présentés par CD1c, aux métabolites présentés par MR1(114), et sont surtout spécialisés dans la détection aux phosho-antigènes (PAGs).

L'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ est dépendante de l'engagement du TCR, cependant environ 70% des T $\gamma\delta$ sont CD4-CD8-, 30% sont CD4-CD8+ et à peine 1% sont CD4+CD8-. Ces données vont de pair avec leur reconnaissance antigénique non dépendante du CMH. Le TCR $\gamma\delta$ peut agir seul mais peut néanmoins s'associer à d'autres types de co-récepteurs inhibiteurs ou activateurs, tels que les NKR, NLR, dectines, lectines de type C, TLR et autres molécules de co-stimulation partagées avec les lymphocytes T $\alpha\beta$ (115, 116) (Figure 30).

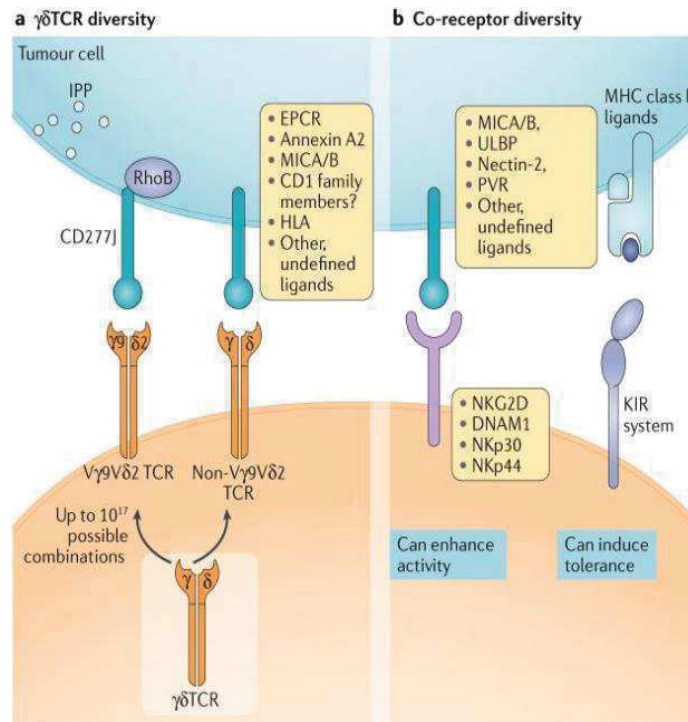


Figure 30: Diversité du TCR $\gamma\delta$ et de ces co-recepteurs (117)

Des analyses structurales ont montré des similitudes plus fortes entre un TCR $\gamma\delta$ et le fragment Fab d'une Immunoglobuline G qu'entre les TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ (118, 119), provenant d'un réarrangement semblable de la région V du TCR et de l'Ig (Janeway). Leur fonction de reconnaissance antigénique dépendante de la région CDR3 serait également plus proche d'une immunoglobuline que d'un T $\alpha\beta$ (120, 121).

De ce fait, les ligands des T $\gamma\delta$ semblent être nombreux et de nature très variée : endogènes et exogènes, protéiques et lipidiques, solubles et membranaires, nécessitant une présentation ou non. Les quelques ligands des TCR $\gamma\delta$ identifiés sont représentés sur le schéma suivant (Figure 31):

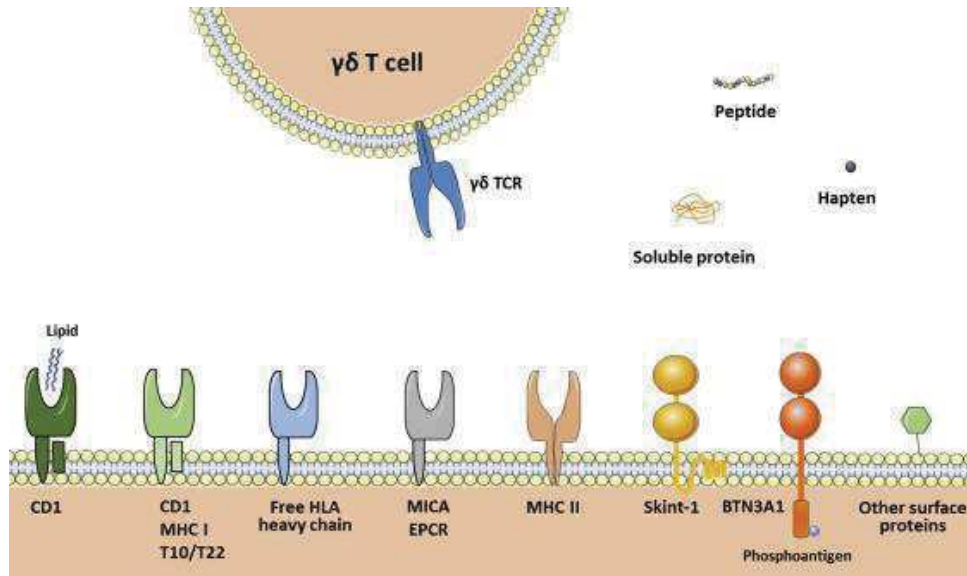


Figure 31: Différents ligands du TCR $\gamma\delta$ (122)

Ils comprennent des molécules présentées par le CMH de classe I ou II (HLA-B ou HLA dont la chaîne lourde est libre de la $\beta 2$ microglobuline), ou des molécules à structures équivalentes comme MICA, CD1 présentant ou non des lipides (qui impliquent les T $\gamma\delta$ dans des réponses à l'auto-immunité et aux infections), EPCR (Endothelial Protein C Receptor). Plus récemment, Le Nours et al. ont également montré l'implication de la molécule MR1 (MHC-related protein 1), présentant les précurseurs des vitamines B et ses dérivés, comme nouveau ligand du TCR $\gamma\delta$ humain, connu à l'origine pour activer les cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T) (123-125). Le TCR $\gamma\delta$ reconnaît aussi un certain nombre de molécules sans nécessiter la présence d'APC, du soi ou du non soi, comme des peptides dérivés de HSP (Heat Shock Protein), d'antigènes mycobactériens, de toxines tétaniques, de listeriolysine O, de chaîne légère d'immunoglobuline λ ou des haptènes. (Apolipoprotéine, phycoérythrine, F0-F1 ATP synthetase). Pour la majorité de ces ligands, le mécanisme de reconnaissance reste à élucider.

Il y a également des molécules solubles comme des protéines (HSV-gi, la phycoérythrine, produite par des cyanobactéries, l'histidyl-tRNA transferase), des protéines membranaires (hMSH2 sur les cellules tumorales, EphA2, l'annexine 2 exprimée par cellules tumorales sous stress oxydatif), des peptides (comme l'insuline).

La reconnaissance des phospho-antigènes par la sous- population T $\delta 2^+$ est la plus connue. Des expériences de blocage du CD3 ou du TCR induisent une inhibition de

la réactivité des T δ 2+, montrant que cette reconnaissance est uniquement liée au TCR, et non à d'autres récepteurs utilisés comme senseur par le T $\gamma\delta$.

Chaque sous-population de T $\gamma\delta$ est spécialisée dans la reconnaissance de ligands spécifiques (Figure 32) :

Recepteurs T $\gamma\delta$	TCR $\gamma\delta$				NKR
	V δ 1+	V γ 9 δ 2	V δ 3	V δ 5	NKG2D
Ligands	MICA	BTN3A+Phosphoantigenes	Annexine A2	EPCR	EPCR
	Annexine A2	Périplakine		CD1d+lipide?	MICA/MICB
	CMH-I	Apolipoprotéine A1+F1			ULBP
	ULBP	hMSH2			
	EPCR	HSP			
	CD1d+lipidique	Alkylamine primaire (produit par les plantes et le thé)			
	CD1c+glycolipide (en surface de DC immature)				

Figure 32 : Récepteurs des T $\gamma\delta$ et leurs ligands. Adapté Sebestyen et al. 2019 (117)

Les T δ 1+ et les T δ 2+ sont les sous-populations majoritaires, et les T δ 2+ sont les mieux caractérisés c'est pourquoi nous parlerons de T δ 2+ ou de T δ 2-, ou les T δ 2- regroupent toutes les autres sous-populations.

Le rôle des T $\gamma\delta$ dans la protection est donc complémentaire à celui des T $\alpha\beta$.

4. La sous-population lymphocytaire TV γ 9V δ 2

Les lymphocytes TV γ 9V δ 2, nommés aussi T γ 2 δ 2, sont présents quasiment exclusivement chez l'homme et le primate. Ils représentent 1 à 5% des CD3+ et sont la sous-population majoritaire de T $\gamma\delta$ dans le sang périphérique.

Comme décrit précédemment, les T δ 2+ sont capables de s'activer rapidement dans de nombreux contextes, notamment en réponse à une infection bactérienne ou parasitaire ou en présence de cellules tumorales. C'est en utilisant des extraits de *Mycobacterium tuberculosis* que les phosphoantigènes, notamment le (E)-4 hydroxy-3méthyl-but-2enyl pyrophosphate, ou HMB-PP, ont pu être identifiés comme ligands naturels des T δ 2+(126). Ces métabolites ont depuis été identifiés comme des intermédiaires de la biosynthèse des isoprénoïdes par la voie mévalonate dans les cellules humaines cancéreuses ou dans la voie du DOXP (ou non-mévalonate) des microorganismes, qui s'accumulent dans les cellules stressées ou transformées.

HMBPP est l'activateur le plus puissant des T δ 2+. L'IPP et les HMB-PP/DMAPP sont produits par plusieurs microorganismes et plantes et également par les cellules tumorales. Ces métabolites phosphorylés sont produits au cours de la biosynthèse du mévalonate isoprenoïde impliqué dans la voie de synthèse du cholestérol.

La voie mévalonate est une voie métabolique essentielle qui engendre 2 molécules à 5 carbones appelées isopentenyl pyrophosphate (IPP) et dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) qui sont ensuite converties en isoprénoides (Figures 33 et 34).

Les aminobiphosphonates (ABP) synthétiques, dont le zolédronate, participent également indirectement à l'activation des T γ δ car ils inhibent la voie de biosynthèse du mévalonate (inhibition de la FPPS, IPP metabolizing farnesyl diphosphate synthetase) et provoquent une accumulation d'IPP au sein des cellules qui est détectée par les T δ 2+.

La présentation de ces métabolites n'est encore pas toujours claire. Les IPP semblent être présentés par un complexe membranaire de F1-ATPase/apoA-1, une modification de structure membranaire ou par la production d'un conjugué.

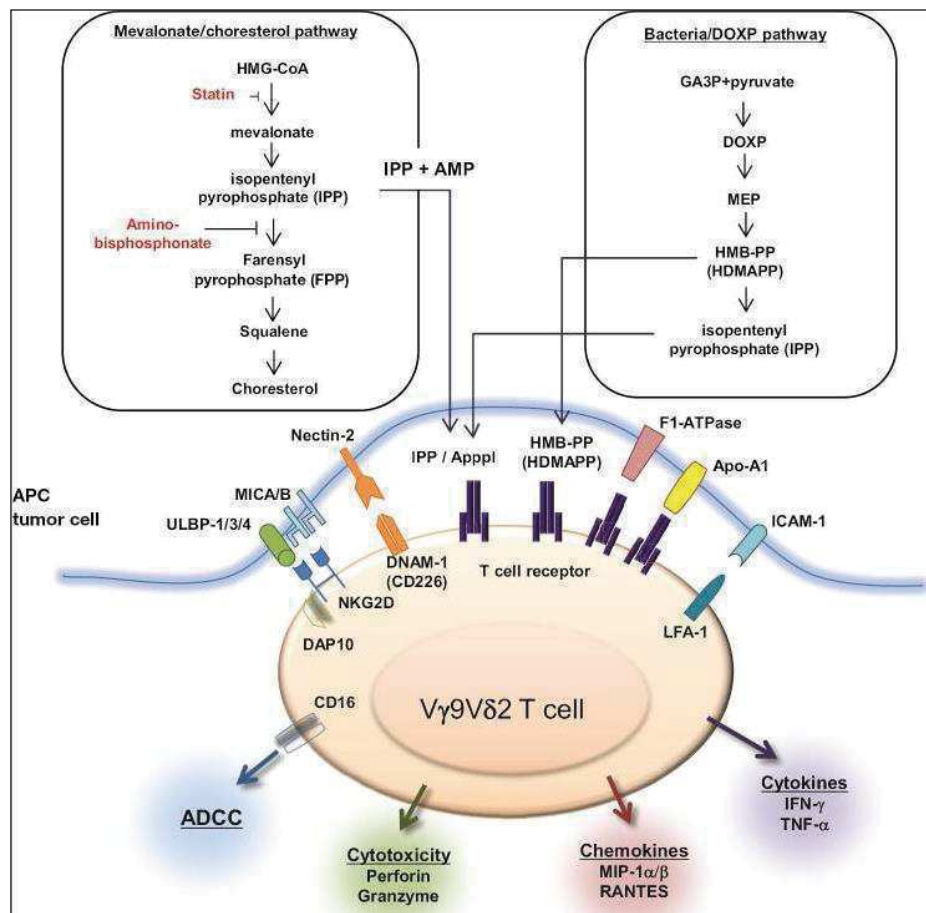


Figure 33: Voies mévalonate et isoprénoïde

La voie de gauche représente la voie mévalonate menant à la production de cholestérol chez les eucaryotes au cours de laquelle l'IPP (métabolite intermédiaire) est synthétisé. Cette voie métabolique peut être bloquée en amont de la synthèse d'IPP ou en aval, respectivement par les statines ou par les ABP, provoquant alors une diminution ou une accumulation d'IPP au sein de la cellule. L'accumulation d'IPP est observée naturellement dans les cellules tumorales.

La voie métabolique représentée à droite est la voie DOXP au cours de laquelle est produit le métabolite (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP). Il s'accumule dans les cellules infectées par des pathogènes.

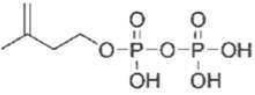
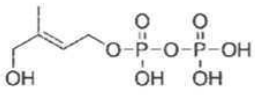
Phosphoantigènes	EC50	Molécule	Type
IPP Isopentenyl pyrophosphate	50-500µM		Natural (Vertebrate and microorganism)
HDMAPP / HMBPP (2E)-1-hydroxy-2-méthyl-but-2-enyl 4-diphosphate / (E)-4-hydroxy-3- méthyl-2-butenyl pyrophosphate	39-70pM		Natural (Microorganism)

Figure 34 : Phospho-antigènes (Adapté de Scotet 2015) (127)

Plus d'un T mémoire circulant sur 40 chez l'homme (CD45 RO) est un T δ 2+ capable de répondre à une stimulation par PAg, ce qui constitue la plus vaste réponse immunitaire chez l'homme (128)

5. BTN3A, molécule-clé dans l'activation des T δ 2+ par les PAg

L'implication de la butyrophiline 3A dans l'activation des V γ 9 δ 2+ a été une découverte clé dans la compréhension de l'activation antigénique des T γ δ .

Cette glycoprotéine de type I partage des ancêtres communs avec les membres de la famille des molécules de costimulation B7, suggérant leur rôle immuno-génique. Les gènes BTN se situent près de la région codant les molécules HLA de classe 1 sur le chromosome 6p. Ils se divisent en trois sous-familles (BTN1, BTN2, BTN3) et la famille BTN3 comprend elle-même 3 isoformes, BTN3A1, BTN3A2 et BTN3A3 appartenant à la famille des immunoglobulines (Figure 35). Leurs domaines extracellulaires composés des domaines IgV semblables à une Ig et IgC présentent de fortes homologues entre eux, et avec les immunoglobulines, mais sont cependant suffisamment différents pour ne pas se lier aux ligands des molécules B7(129).

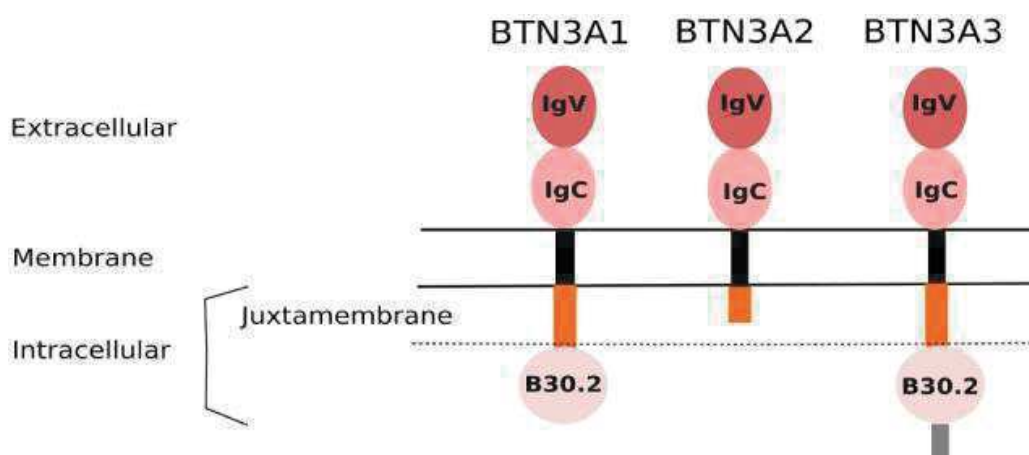


Figure 35 : Isoformes de BTN3A (116)

Les trois isoformes possèdent un domaine transmembranaire homologue (>95%), un domaine juxta-membranaire et seuls BTN3A1 et BTN3A3 possèdent un domaine intracellulaire PRY/SPRY peu conservé, nommé B30.2. Ce domaine médie les interactions protéine-protéine.

Harly et al. ont décrit le rôle indispensable de BTN3A1 dans la reconnaissance des phospho-antigènes par les $T\gamma 9\delta 2$ (130) mais le mécanisme d'activation reste cependant incomplètement décrit. Scotet et al ont proposé un mécanisme impliquant le domaine B30.2 intracellulaire de BNT3A1 spécifiquement, où les PAgS se fixent, induisant un changement de conformation du domaine extracellulaire reconnaissable par le $TCR\delta 2$. Plusieurs études confirment cette hypothèse : des déplétions, mutations ciblées, et des échanges du domaine B30.2 du BTN3A3 sur BTN3A1 démontrent le rôle critique de BTN3A1 et de son domaine intracellulaire pour l'activation de $T\gamma 9V\delta 2$ médiée par les PAgS, malgré une homologie supérieure à 87% entre les 2 domaines B30.2. De plus, l'isoforme BTN3A3 comprenant la partie B30.2 de BTN3A1 devient alors efficace dans l'activation du $T\gamma 9V\delta 2$ par les PAgS.

L'étude structurale du B30.2 de BTN3A1 montre une composition d'acides aminés basiques constituant une partie chargée très positivement, expliquant la haute affinité pour les phospho-antigènes chargés négativement. Un seul acide aminé diffère dans cette région par rapport au B30.2 de BTN3A3 (histidine en arginine). La modification de ce seul acide aminé rend effective ou non la sensibilité des $T\delta 2+$ pour les PAgS.

Par des études de spectrométrie de masse, Adams et ses collègues ont montré que la fixation de phospho-antigènes dans le sillon de B30.2 induit un changement de conformation du domaine juxta-membranaire. La provenance endogène (IPP) ou exogène (HMB-PP) du PAgS et sa nature (PAgS nucléotidiques ou autre petite

molécule chargée négativement comme malonate, citrate, adénoside diphosphate) n'induisent pas la même magnitude de changement de conformation, et seul un changement précis de conformation induit l'activation du T δ 2+. Yang et al. ont ensuite approfondi les connaissances sur la contribution des butyrophilines dans le sensing des PAgS en montrant la formation de dimères de BTN3A1 lors de la fixation de PAgS au domaine B30.2. La formation d'un hétérodimère avec BTN3A2 stabilise la présence de BTN3A1 à la membrane. BTN3A1 n'active pas T δ 2+ sans BNT3A2 ou BTN3A3 (131). Deux modèles de dimères sont proposés : une forme symétrique et une asymétrique. La forme asymétrique fixerait mieux les PAgS et serait alors plus efficace dans l'activation des T δ 2+, et HMB-PP renforcerait l'interaction de BTN3A1 avec le TCR des T γ 9V δ 2.

La périplakine semble également être importante dans le processus d'activation des T δ 2+ par sa forte interaction à BTN3A1(131).

6. T γ δ dans le cancer

a) *Rôle anti-tumoral*

La présence de T γ δ dans les tissus épithéliaux suggère une implication dans la défense contre les maladies épithéliales. Le rôle anti-tumoral des T γ δ a été décrit sur des souris seulement au cours des deux dernières décennies. Girardi et al. (Science 2001) ont montré à partir de souris dépourvues de chaîne δ de TCR leur rôle protecteur dans les carcinomes chimio-induits. Parmi les nombreuses fonctions des LT γ δ , leur implication dans la surveillance anti tumorale a été clairement décrite (Figure 35)(132).

Les T γ δ ont la capacité de cibler et éliminer les cellules tumorales par l'engagement de leur TCR et/ou d'un récepteur NKR, notamment par NKG2D, DNAM-1, NKp30 et NKp44. L'engagement de NKG2D induirait l'activation du T γ δ (augmentation de l'expression de CD69 et CD25), la production de TNFa (mais pas d'IFN γ), et le relargage de granules cytotoxiques (133). Les T γ δ , et particulièrement les T δ 1+ et T δ 2+ reconnaissent MICA et MICB ainsi que d'autres protéines à la surface des cellules tumorales, comme les ULBP1-6 (134). Cette reconnaissance induit la sécrétion de granzyme et de perforine. Il a été montré que les propriétés cytotoxiques des T δ 2+ sont également liées à l'expression de TRAIL ou du Fas-L,

ainsi que de CD16, qui, couplé à la sécrétion d'IFN γ et de granzyme B, permet une cytotoxicité cellulaire dépendant d'antigène.

Le rôle anti-tumoral des T $\gamma\delta$ est aussi indirect, car leurs influences sur d'autres effecteurs immunitaires sont nombreuses. Leur grande production d'IFN γ stimule l'activation et la prolifération des T $\alpha\beta$ en périphérie et amplifie leur réponse anti-tumorale au sein de la tumeur en stimulant leur propre sécrétion d'IFN γ et en augmentant l'expression des molécules du CMH-I sur les cellules tumorales (134, 135)

La sous-population de T $\delta 2^+$ induit notamment l'activation des cellules T $\alpha\beta$ par des propriétés de présentation antigénique semblables aux cellules dendritiques matures (136). Les T $\gamma\delta$ interagissent avec les NK via l'axe 41BB/41BB-L induisant leur cytotoxicité. Après stimulation *in vitro* par du HMB-PP et de l'IL2, les T $\delta 2^+$ augmentent leur production du chimio-attractant de lymphocyte B, le CXCL13. (Figure 36).

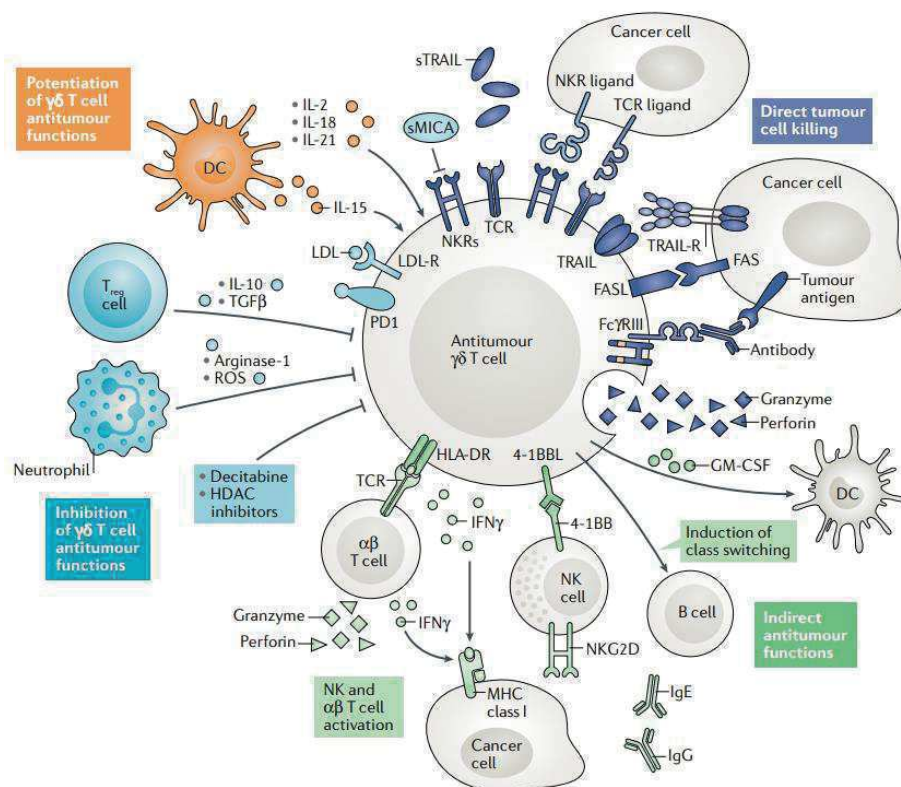


Figure 36: Fonctions anti-tumorales des T $\gamma\delta$ (134)

Chez l'homme, une caractérisation des T $\gamma\delta$ en fonction de la nature des cytokines produites, notamment IFN γ ou d'IL17, semble distinguer deux types de capacité effectrice, mais cette distinction n'est pas très claire.

b) Rôle pro-tumoral

De nombreuses études chez la souris ont montré une augmentation de la sécrétion d'IL17 par les $LT\gamma\delta$ après injection de lignées cellulaires tumorales, et ces mêmes tumeurs implémentées chez des souris déficientes en production d'IL17 montrent des développements tumoraux réduits. Wu et ses collègues montrent pour la 1ère fois en 2014 le rôle pro-tumoral des $T\gamma\delta$ produisant de l'IL17 dans le cancer colorectal. L'IL17 devient alors un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du côlon et de la vésicule biliaire. L'infiltration des $T\gamma\delta$ IL17+ s'avère positivement corrélée à la taille de la tumeur, l'invasion, les métastases donc négativement liée à l'état général (figure 37).

Le potentiel soutient du développement tumoral par $T\gamma\delta$ basé sur la production d'IL17 est alors mis en évidence (134). En effet, l'IL17 est une cytokine produite par une grande variété de cellules immunitaires, et induit la mobilisation et l'activation des neutrophiles, ainsi que la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par une large variété de cellules stromales. Sa production peut être stimulée par le microbiome via les cellules myéloïdes. Cette cytokine semble influencer directement sur les cellules tumorales en favorisant l'angiogenèse, augmentant leur expression de molécules d'adhésion et la perméabilité endothéliale bénéfique aux développements de métastases sur des sites secondaires. Les $T\gamma\delta$ produisant de l'IL17 influencent donc la population immunitaire environnante. A noter que chez la souris, le rôle des $T\gamma\delta$ produisant de l'IL17A montre des bénéfices anti-tumoraux, en contrôlant l'influx de $T\alpha\beta$ et l'activité des $TCD8+$ sécrétant de l' $IFN\gamma$.

Parallèlement à la production d'IL17, les $T\gamma\delta$ soutiennent le développement de la tumeur en inhibant la maturation de DC, en sécrétant de l'IL4 ou de la galectine et en exprimant PD-L1 pour inhiber les réponses T cytotoxiques. PDL1 et la galectine sont d'ailleurs d'avantage exprimés sur les $T\gamma\delta$ circulant et infiltrant dans le cancer du pancréas (137).

Les $T\gamma\delta$ favorisent la progression tumorale en exprimant des ligands de facteurs de croissance et de l'IL22, une cytokine régulatrice, l'IL8, du $TNF\alpha$ et du GM-CSF donc en ciblant les cellules épithéliales et en induisant le recrutement de MDSCs.

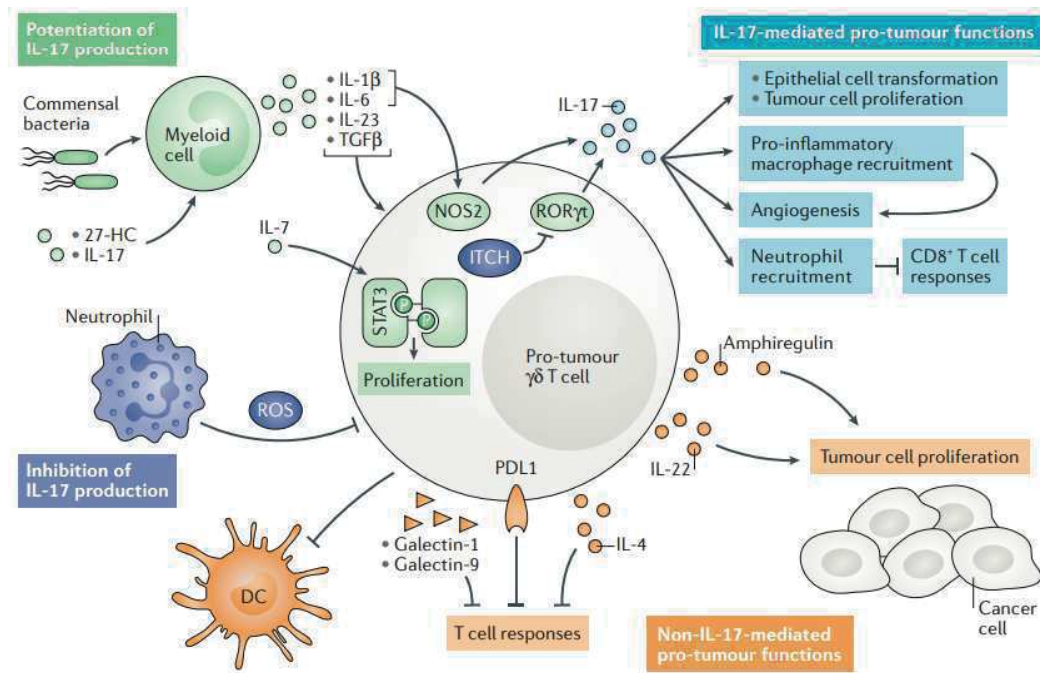


Figure 37 : Rôle pro-tumoral des T $\gamma\delta$ (134)

Ces différences sont à investiguer, mais peuvent être causées par des différences entre les cohortes de patients, relatives au microbiote par exemple.

Les T $\gamma\delta$ présentent donc des caractéristiques pro- et anti-tumorales. D'une part, l'émergence du rôle pathogénique des T $\gamma\delta$ et leur défaut de réponses semblent contribuer à l'échappement de la tumeur. D'autre part, les patients dont les tumeurs sont très infiltrées par les T $\gamma\delta$, notamment des T $\gamma\delta$ IFN γ +, ont une meilleure survie à 5 ans (PFS), mettant en évidence le rôle-clé du T $\gamma\delta$ malgré tout.

La différenciation des T $\gamma\delta$ producteurs d'IFN γ en T $\gamma\delta$ producteurs d'IL17 est possiblement induite par l'inflammation associée à la tumeur, c'est pourquoi il est primordial de mieux comprendre les modulations phénotypiques et fonctionnelles des T $\gamma\delta$ pour contrer ces dysfonctions et fournir une nouvelle fenêtre d'amélioration des connaissances et de nouvelles perspectives médicales.

Ces données révèlent les T $\gamma\delta$ comme très bonnes cibles à exploiter en immunothérapie.

7. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le mélanome

Dans le mélanome, les lymphocytes T $\gamma\delta$ présentent une activité anti-tumorale efficace à travers une capacité d'infiltrer les tumeurs primaires (138, 139), et la population T δ 2+ particulièrement présente un phénotype effecteur mémoire dans les

tumeurs (139). Une plus haute fréquence de cette sous-population dans le sang ou les tumeurs est associée à un bon pronostic de survie, et à l'inverse, une diminution de la fréquence au cours d'un traitement par Ipilimumab est associée à une moins bonne survie (140). De plus, leur stimulation indirecte par le biais d'ABP mène à des taux de réponses objectifs prometteurs (141). Peu d'études relatent les dérégulations fonctionnelles des T $\gamma\delta$ circulants par rapport aux donneurs sains, mais les données existantes montrent des capacités prolifératives similaires ou diminuées, des sécrétions altérées d'IFN γ ou TNF α suite à des stimulations par IPP, des propriétés cytotoxiques variantes avec les conditions expérimentales, apportant donc des conclusions controversées (142-147).

A l'inverse, leur rôle pathogénique a été décrit dans différents contextes tumoraux mais très peu de données sont présentées en ce qui concerne le mélanome. Quelques études montrent le détournement phénotypique des T $\gamma\delta$ circulants après résection tumorale vers un phénotype effecteur ou TEMRA (146). Le manque de données quant à la fonctionnalité des T $\gamma\delta$ circulants ou infiltrants motive d'autant plus ce travail de caractérisation pour tenter d'élucider les mécanismes d'échappement du mélanome au contrôle immunitaire.

8. T $\gamma\delta$ en immunothérapie

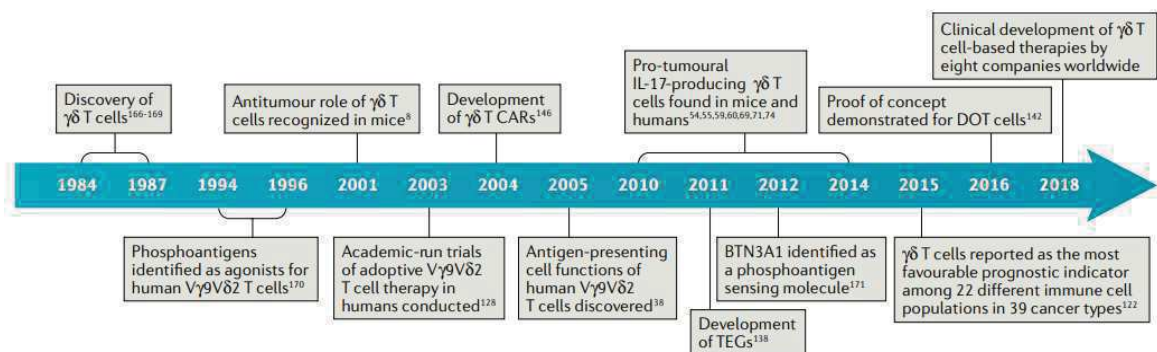


Figure 38: Evolution des recherches et exploitation de T $\gamma\delta$ au cours du temps (126)

Le phénotype et les fonctions des T $\gamma\delta$ sont uniques. Leur capacité à infiltrer les tumeurs et les premières études démontrant leur lien avec le pronostic clinique rendent ces cellules idéales pour le développement d'immunothérapies anti-tumorales. De plus, elles présentent une grande conservation inter-individus, sont simples à manipuler et à amplifier, elles ne présentent pas de risque d'allo-réactivité car ne sont pas restreintes par les molécules du CMH, elles sont réactives via des propriétés cytotoxiques directes et indirectes efficaces.

Les approches cliniques développées aujourd'hui visent à recruter les $T\gamma\delta$ sur le site tumoral, repolariser leur phénotype vers des fonctions anti-tumorales effectives ou transférer des $T\gamma\delta$ effecteurs amplifiés et activés au patient (148)

Plusieurs approches ont été développées :

- Activation *in vivo*
- Transfert adoptif après amplification et activation *ex vivo* (autologue) ou après ingénierie génétique (autologue et allogénique).

L'activation *in vivo* vise à stimuler particulièrement les $T\delta 2+$ par administration de PAg, ABP ou agoniste de BTN3A, couplés à des cytokines comme l'IL2 ou l'IL15 (essai thérapeutique NCT04243499,(148)). Les premiers retours cliniques montrent quelques stabilisations des tumeurs, et même quelques rémissions partielles (148). Les effets secondaires équivalents à des syndromes grippaux mettent en valeur une toxicité réduite et une stratégie prometteuse.

Les $T\delta 2+$ autologues peuvent également être rendus effectifs par amplification et activation *ex vivo*. Cette approche d'immunothérapie passive testée dans des cancers liquides et solides présente des effets cytotoxiques réduits et des apports thérapeutiques modestes. Des essais semblables dans le cancer du poumon utilisent des $T\gamma\delta$ allogéniques et ne présentent aucune alloréactivité (essai NCT03183232).

La technologie des CAR-T cells est également comptée dans le portefeuille des immunothérapies basées sur les $T\gamma\delta$. Avec l'avantage supplémentaire d'avoir un TCR largement réactif et une non-restriction au CMH, les $T\gamma\delta$ se prêtent tout à fait à la transduction de CAR, contournant même les problèmes d'échappement tumoraux observés en clinique avec des CAR-T conventionnels antigène-spécifiques. Nous ne savons cependant pas encore si des $T\gamma\delta$ transduits avec des CAR ont les mêmes inconvénients de minimiser des relargages cytokiniques et la neurotoxicité associés aux traitements par les CAR-T cells conventionnels, ni s'ils persistent *in vivo* et sont efficaces dans l'élimination des tumeurs.

Les essais de transferts adoptifs de $T\gamma\delta$ se développent par différentes approches : l'enrichissement et la stimulation des $T\delta 1+$, l'activation des $T\delta 2+$ et la génération de l'expression des $TCR\gamma\delta$ sur des lymphocytes $T\alpha\beta$ conventionnels (figure 39).

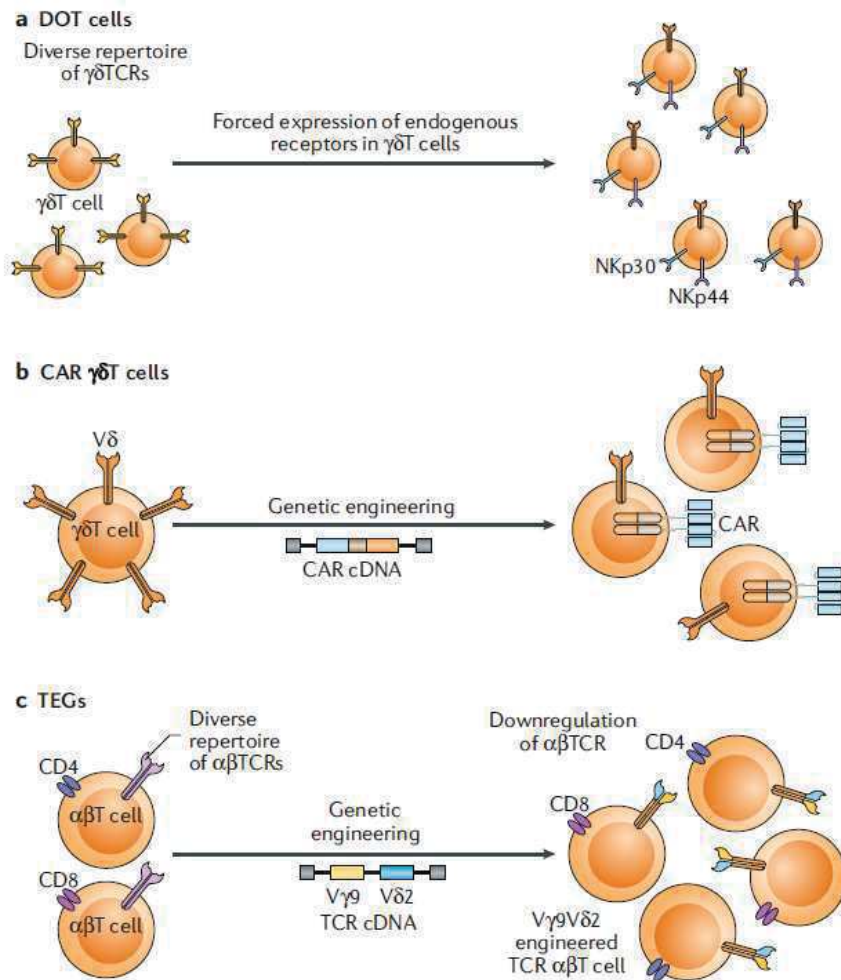


Figure 39: Manipulation thérapeutique des T $\gamma\delta$ humains (117)

Les T $\delta 1^+$ sont générés dans un essai suivant le protocole DOT, pour Delta One T cells, où ils sont isolés et amplifiés *in vitro* ou depuis du sang périphérique par stimulation TCR et cytokinique induisant une expression des récepteurs NKp30 et NKp44 pour cibler et lyser les cellules tumorales.

Les essais utilisant les T $\delta 2^+$ sont également basés sur une extraction du sang périphérique et une activation *in vitro* par stimulation avec PAg. De là l'expression de récepteurs antigéniques chimériques réactifs aux tumeurs est forcée par ingénierie génétique pour obtenir des CAR T $\gamma\delta$, ou alors, l'expression du TCR $\gamma\delta$ est induite sur des T conventionnels dont l'expression du TCR $\alpha\beta$ a été inhibée.

D'autres approches moins utilisées sont en cours d'étude:

- Co-incubation des T $\delta 2^+$ dérivés de patients avec des moDC autologues ou en ajoutant l'inhibiteur de tyrosines kinase, l'Ibrutinib (approuvé pour le traitement des leucémies lymphocytaires chroniques).

Cette molécule se lie à l'ITK (kinase des cellules T inductible à l'IL2) pour promouvoir la polarisation du phénotype des T $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ .

- Utilisation d'anticorps bispécifiques.

Le principe est de booster l'activation et la reconnaissance des cellules tumorales par les T $\delta 2^+$. Une technologie basée sur la structure d'un nanobody a été développée pour relier les V $\gamma 9V\delta 2$ et EGFR. Elle a montré une activation de T $\delta 2^+$ et une élimination des cellules tumorales *in vitro* et dans un modèle de xénogreffe de cancer du côlon(149)

- Ingénierie d'une structure triple-body.

Cette technologie, développée dans le cas de cancer du sein, des ovaires et l'adénocarcinome pancréatique ductal, a pour but de relier les T $\gamma\delta$ et les NK à l'antigène HER2 associé aux tumeurs. Cet essai montre une cytotoxicité supérieure en comparaison au Trastuzumab, anticorps thérapeutique ciblant HER2.

- Réversion de la tolérance : l'Ibrutinib, un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé aujourd'hui pour le traitement de leucémie chronique, semble avoir un effet positif sur les TV $\gamma 9V\delta 2$ de patient *in vitro*, mais l'essai reste à conclure *in vivo*.
- En perspective, la technologie CRISPR/Cas9 aidera probablement bientôt la génération de CAR-T $\gamma\delta$.

Les stratégies thérapeutiques basées sur des axes moléculaires de la population T $\delta 2^+$, sont décrites par le schéma suivant (figure 40) :

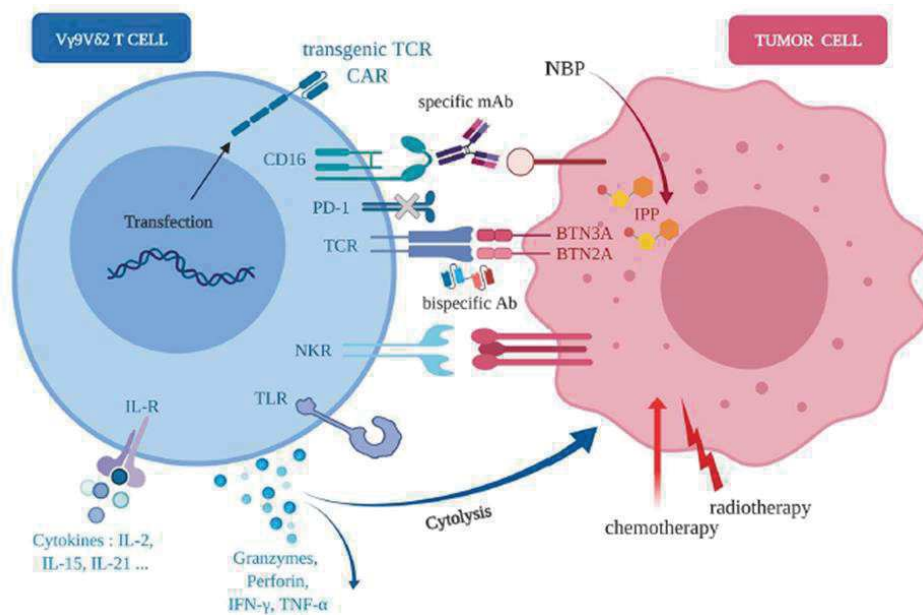


Figure 40 : Stratégie moléculaire basée sur la population Tδ2+ (150)

Les difficultés dans le développement de thérapies basées sur les T $\gamma\delta$ proviennent des divergences entre les gènes codant les TCR γ et les TCR δ entre homme et rongeurs. Le modèle murin est alors non-approprié pour les preuves de concept d'immunothérapies basées sur les T $\gamma\delta$, d'autant plus que les T δ 2+ et T δ 1+ n'ont pas d'équivalents chez la souris et la sensibilité des T δ 2+ envers les PAg n'est pas conservée chez les souris non plus (n'ayant pas d'homologue de BTN3A1) (151). Les modèles utilisés sont donc des xénogreffes de tumeurs humaines sur des souris immuno-déficientes, mettant en évidence le besoin de développer des modèles précliniques *in vivo* pour améliorer les études.

Les T $\gamma\delta$ exprimant également les récepteurs ciblés par les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire utilisés en clinique aujourd'hui sont de ce fait probablement impactés de la même façon que pour les T $\alpha\beta$, mais cette conséquence n'a pas été étudiée ou décrite chez l'homme. De récentes études chez la souris sur des sarcomes induits par MCA montrent des changements sur l'infiltration et le phénotype des T $\gamma\delta$ suite à des traitements par aPD1 ou aCTLA4, sous entendant l'impact de ces thérapies sur cette population immunitaire. De plus, dans le mélanome, les patients traités par Ipilimumab présentent d'ailleurs une plus grande proportion de TV γ 9V δ 2 mais pas des autres sous-populations, et ce paramètre est corrélé avec une meilleure survie (152). Les T $\gamma\delta$ semblent donc être influencés par

ces traitements et une meilleure caractérisation de cet impact paraît pertinente pour mieux comprendre le mécanisme de ce traitement et optimiser son application.

Stratégies thérapeutiques en développement basées sur les T $\gamma\delta$:

Stratégie	Transfert adoptif					Activation <i>in vivo</i>		
	DOT	T $\delta 2$	CAR-T $\gamma\delta$	TEG	T natif	nanobody	ABP	DC zol
Principe	Enrichissement des T $\delta 1+$ et stimulation de leur expression de NKR	Enrichissement et stimulation de T $\delta 2+$	CAR-T appliqué aux T $\gamma\delta$	Transduction de TCR $\gamma\delta$ à des LT $\alpha\beta$	Amplification et stimulation ex vivo de T $\gamma\delta$	Ciblant T $\delta 2+$ et EGFR	Stimulation indirecte des T $\gamma\delta$	Activation des T $\gamma\delta$ via DC
Essai	Modèle murin de cancer ovarien et de leucémie	Cancer du poumon et du foie	Modèle murin de leucémie	Lymphome, essai sur primate non			Glioblastome	Glioblastome
Efficacité clinique	Pas de toxicité chez la souris mais difficile de conclure quant à la sécurité du traitement car le modèle est trop éloigné de l'Homme	Prolongation de la survie globale sans toxicité (Xu et al 2020)	Réduction tumorale in vivo (Rozenbaum et al 2020)				10 à 33% de réponses objectives	

Figure 41: Stratégies thérapeutiques basées sur les T $\gamma\delta$ en développement (153)

Pour conclure, il est nécessaire aujourd'hui d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent l'activité et induisent la polarisation des T $\gamma\delta$ en périphérie et dans le microenvironnement tumoral, ainsi que d'identifier les antigènes tumoraux reconnus par les TCR $\gamma\delta$ et NKR pour clarifier le rôle non-redondant des T $\gamma\delta$ dans l'immuno-surveillance. Ces données permettront de mieux sélectionner les patients prédisposés à être bons répondeurs aux thérapies basées sur les T $\gamma\delta$ (134) et d'optimiser l'utilisation des T $\gamma\delta$ en clinique qui ouvre de nouvelles perspectives de prise en charge.

C. Cross talk bidirectionnel DCs – Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les DCs et les T $\gamma\delta$ sont deux acteurs majeurs de l'immuno-surveillance dont la grande plasticité et les capacités d'interactions avec l'environnement sont bien connues. Les interactions entre ces deux populations cellulaires sont caractérisées dans différents contextes.

1. Interactions entre DCs et lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte sain

La plupart des essais sont effectués *in vitro*, et montrent que ces deux populations peuvent s'influencer l'une l'autre. Les amino-biphosphonates utilisés en clinique pour le traitement de maladies osseuses sont bénéfiques pour l'étude de ces interactions car ils induisent des changements de production de phosphoantigènes qui

augmentent l'activité immunitaire et les fonctions cytotoxiques. Les données existantes sur ce cross talk sont les suivantes :

- Des moDCs pré-incubées avec du zolédronate sur des temps courts ont montré des capacités à faire proliférer des $T\gamma\delta$ autologues ainsi que l'induction d'un phénotype central et effecteur mémoire (augmentation l'expression de récepteur de « homing » et costimulant) (154, 155) ainsi qu'une sécrétion d' $IFN\gamma$ et de $TNF\alpha$ par les $T\gamma\delta$ sans induire d'activité cytotoxique (156-158).

- Les DCs immatures (moDCs allogéniques) potentialisent également la réponse aux phosphoantigènes des $T\delta 2+$ par contact cellulaire (158).

- Dunne et al. ont également tenté en 2009 d'utiliser les $T\delta 2+$ stimulés avec des phosphoantigènes comme adjuvant pour les vaccins à base de DCs (159). Les lignées de $T\delta 2+$ ont été générées *in vitro* par ajout de HMB-PP et d'IL2 dans des PBMCs totales, et la co-culture de ces $T\delta 2+$ obtenus avec des DCs a permis leur différenciation et la sécrétion d'IL12. La sécrétion d'IL10 a été en revanche inhibée, même en présence de LPS pour stimuler les DC, ce qui renforce la sécrétion d'IL12.

- La stimulation des DCs (mDC et pDC) par les ligands des TLR2, 3 et 4 induit la sécrétion rapide d' $IFN\gamma$ par $T\delta 2+$ humain. En retour les $T\delta 2+$ activés induisent une sécrétion d'IL12p70 par les DCs.

L'activation des $T\delta 2+$ dépend des interférons de type I mais pas d'IL12 en présence de DCs activées par LPS ou PolyI:C.

- Chez l'homme, des DCs circulantes (CD56+) stimulées par zolédronate et IL2 engendrent une réponse type Th1 chez $T\gamma\delta$ (160).

Devilder et al. ont alors démontré en 2009 qu'une stimulation des DCs via les TLR3 et 4 induisent une production d' $IFN\gamma$ par une lignée de $T\gamma\delta$ *in vitro* et que les DCs myéloïdes matures ne sont pas nécessaires pour induire une réponse $IFN\gamma$ (161).

Castella et al. approfondissent les connaissances sur le mécanisme d'interaction entre les deux types cellulaires en montrant la régulation du relâchement de phospho-antigènes des DCs par A1 en lien avec l'activation des $T\delta 2+$ (162).

A l'inverse, l'étude de l'impact des $T\gamma\delta$ sur les DCs a montré que les $T\delta 2+$ notamment, activés par des PAgS synthétiques ou bactériens, provoquent une forte

activation des DCs et induisent la sécrétion d'IL12 par les DCs (156, 159). Conti et al. démontrent également une hausse de l'expression des molécules de CMH-I et de CD86 sur les DCs(156).

Les $T\gamma\delta$ induisent une activation des DCs par l'implication de CD86 et de cytokines inflammatoires (156, 161) ainsi qu'une maturation(163) impliquant la molécule CD1c (164).

Ces résultats montrent une collaboration de ces 2 sous-populations cellulaires, et que les $T\gamma\delta$ précisent l'information que la DC reçoit des tissus, donc renforcent la réponse immunogène ou tolérogène qui s'ensuit.

L'ensemble de ces études relatent seulement des données issues de moDC générées *ex vivo* et décrivent une fonctionnalité basée sur un panel réduit de marqueurs.

2. Interactions entre DCs et lymphocytes $T\gamma\delta$ en contexte pathologique

Les données existantes sur le cross talk bidirectionnel entre les DCs et les lymphocytes $T\gamma\delta$ en contexte tumoral humain, sont peu nombreuses, et l'impact positif ou négatif sur le cross talk est variable en fonction du pathogène :

	Contexte pathologique	Modèle		Caractéristiques techniques	Observations	Ref
DC sur Tgd	Infectieux	Humain	VIH	moDCs infectées au VIH	n'induisent plus de sécrétion cytokiniques et de fonctions cytotoxiques chez les $T\delta 2+$	Sacchi et al. 2014
	Tumoral	Humain	Hépatocarcinome Cancer colorectal	DCs autologues stimulées avec ABP ajoutées en PBMC	Amplification de $T\delta 2+$	Cabillic et al 2010; Condere et al. 2015
			Myelome	moDCs stimulées au zolédronate	prolifération des $T\gamma\delta$ autologues et de TCD8 spécifiques, diminution de Treg et de PDL2	Castella et al. 2011
		Humain	AML	DCs + IL15	Booste les fonctions des Tgd	Van Acker et al 2018
$T\gamma\delta$ sur DC	Infectieux	Murin	West Nile Virus	DC+Tgd infectés par le WNV	maturation des DCs et promotion du priming TCD4	Fang et al. 2010
			Bactérien	moDCs +BCG	Activation et amplification des $T\gamma\delta$ par les DCs	Marline et al. 2017
		DCs+microbiote		Production d'IL17 par les $T\gamma\delta$	Fleming et al. 2017	
	Tumoral	Murin	Cancer du sein	coculture $T\gamma\delta$ +moDCs 48h	$T\delta 1+$ bloque la maturation et la fonction des DCs. TLR8 impliqué dans la réponse et peut reverser cette inhibition	Peng et al. 2007

(165-172)

Toutes ces études mettent en évidence l'existence d'une interaction entre les DCs et les $T\gamma\delta$. Les stimulations de DCs sont majoritairement faites par aminobiphosphonate

et peu investiguent les modifications fonctionnelles induites via stimulations par TLR-L. De plus, les études ne relatent que des modifications d'activité et non de cytotoxicité. Toutefois, les résultats observés mettent en évidence que les DCs stimulées au zolédronate sont efficaces pour amplifier les T $\gamma\delta$.

Des études utilisant le BCG pour traiter des DCs infectées ont montré un impact positif sur leur capacité à activer et amplifier des T $\gamma\delta$ (170). En modèle murin également, Fleming et ses collègues (171) ont montré une influence positive du microbiote sur la capacité des DCs CD103+ à induire une production d'IL17 par les T $\gamma\delta$. Les modifications fonctionnelles des DCs sont donc variables en fonction du pathogène utilisé et peuvent se montrer bénéfiques. Ces données sont intéressantes et seraient à exploiter en thérapie.

3. Cross-talk entre pDC et T $\gamma\delta$

Contexte	Caractéristiques techniques	Observations	Références
Sain	pDCs purifiées et stimulées CpG2216 en coculture 24h avec T $\gamma\delta$ 2 activés	Production d'IFN γ par les T δ 2+	Delvider et al 2009
	pDCs activées par CpG2216 et IL3 et coculture avec T $\gamma\delta$ pendant 6jours	Activation et induction de réponse TH17 par les T δ 2+, amplification du phénotype effecteur et central mémoire	Lo Presti et al 2016
Tumoral (Mélanome)	Vaccination par pDCs	Recrutement préférentiel des T $\gamma\delta$	Van Beek et al. 2020
Viral (HCV)	Administration d'IFN α	Rétablit la sécrétion d'IFN γ perturbée par HCV	Cimini et al 2012

(161, 173-175)

Une étude récente (174) montre pour la première fois une attraction *in vivo* des T $\gamma\delta$ par des vaccins à base de pDCs chez des patients mélanome, préférentiellement aux cDCs. Même si l'interaction entre les deux sous-populations n'est pas explicitement décrite, l'observation de ces comportements est une première.

Aujourd'hui, les études réalisées sur les interactions entre pDCs et T $\gamma\delta$ se fondent sur la fonctionnalité, définie par la sécrétion d'IFN γ . Cependant, comme nous l'avons vu, les interactions au sein du microenvironnement sont multiples et complexes, c'est pourquoi les analyses de ce cross-talk bidirectionnel nécessitent d'être plus approfondies pour permettre la compréhension du détournement fonctionnel des cellules immunitaires.

Chapitre 2 : Objectif de la thèse

Le mélanome cutané est considéré comme une des tumeurs les plus immunogènes, mais la difficulté à contrôler son développement démontre cependant sa capacité à échapper aux réponses immunes anti-tumorales des patients, et les bases d'une telle subversion n'ont pas été encore élucidées. Il est donc crucial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer la prise en charge clinique de ce cancer et d'identifier les mécanismes conduisant à l'inefficacité des traitements actuels, afin de les optimiser.

Les pDCs sont énigmatiques en contexte tumoral. Elles initient les réponses immunitaires et infiltrent les tumeurs, mais sont de mauvais pronostic. Nous pouvons alors penser qu'elles sont impliquées dans l'échappement du mélanome au contrôle immunitaire. Des résultats prometteurs obtenus au laboratoire montrent que les pDCs sont capables d'infiltrer les tumeurs et conduisent à la subversion des réponses T anti-tumorales conventionnelles. Les lymphocytes $T\gamma\delta$ participent eux aussi à l'immuno-surveillance des cancers grâce à de puissantes capacités cytolytiques. Cependant, de même que pour les pDCs, leur rôle est controversé en contexte tumoral et il est peu connu dans le mélanome. La compréhension de leur comportement et de leur régulation est de ce fait nécessaire pour recalibrer leurs fonctions en adaptant les thérapies existantes, ou même exploiter leur potentiel au moyen de nouvelles thérapies. Notre projet consiste alors à :

1) Caractériser en contexte de mélanome, d'autres effecteurs non conventionnels, les lymphocytes $T\gamma\delta$, et d'identifier les mécanismes pathogéniques conduisant à leur détournement. Nous caractériserons leur statut d'activation, un large panel de points de contrôle immunitaires, et leurs fonctions en circulation et dans les tumeurs, ce qui n'a jamais été réalisé à notre connaissance, de façon à cerner au mieux leur comportement.

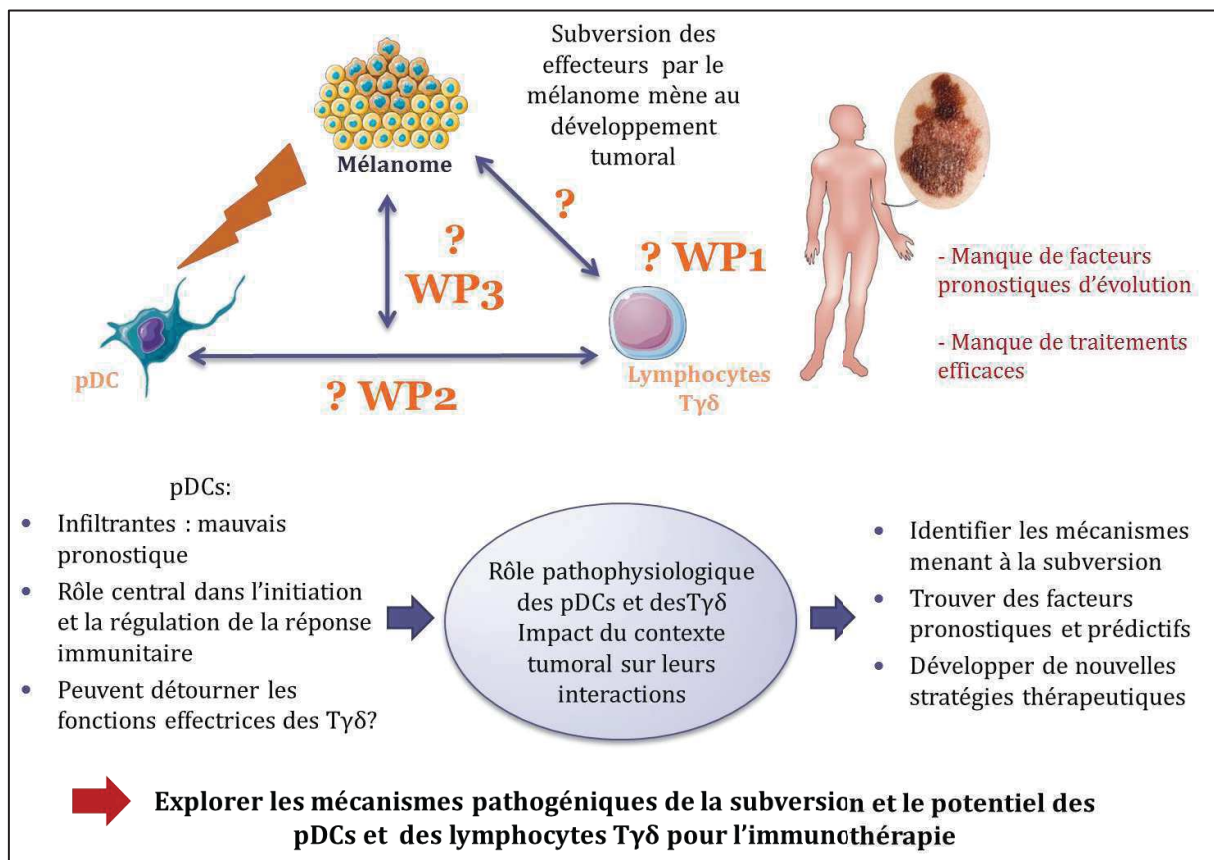
2) Caractériser l'interaction bidirectionnelle potentielle entre pDCs et $T\gamma\delta$ en contexte sain.

Les pDCs et les $T\gamma\delta$ présentent de grandes capacités d'interactions avec leur environnement, il est donc légitime de penser qu'elles interagissent l'une avec l'autre, bien que cette interaction n'ait été que peu décrite. Nous souhaitons alors comprendre le mécanisme cellulaire et moléculaire qui régule ces cellules. De plus,

la sous-population circulante majoritaire des $T\gamma\delta$, les $TV\gamma9\delta2$, semble être particulièrement impliquée dans la défense anti-tumorale. De ce fait, nous caractériserons également le cross-talk en distinguant les sous-populations $T\delta2+$ et $T\delta2-$.

3) Caractériser cette interaction bidirectionnelle en contexte mélanome.

Pour mieux identifier les mécanismes de subversion par la tumeur, nous étudierons dans un premier temps l'impact de pDCs issues de sang de patients ou de tumeurs sur des lymphocytes $T\gamma\delta/T\delta2+/T\delta2-$ de donneurs sains, puis dans un deuxième temps l'impact des lymphocytes $T\gamma\delta$ circulants ou infiltrants les tumeurs sur des pDCs issues d'un contexte sain. Afin d'effectuer des analyses aussi complètes que possible, nous étudierons le phénotype détaillé des deux populations, puis nous évaluerons leur fonctionnalité à travers l'analyse des cytokines sécrétées et l'étude de leurs capacités cytotoxiques. Pour finir, nous réaliserons des corrélations entre les données immunologiques et les données cliniques, dans l'optique de mettre en évidence des facteurs pronostiques.



Ces études ont pour but d'approfondir les connaissances sur les effecteurs immunitaires et les mécanismes de défense mis en jeu, ainsi que sur les subversions pathogéniques conduisant à l'échappement du mélanome au contrôle immunitaire. Le décryptage de ces défaillances de l'immunité est crucial pour le développement de thérapies innovantes et pour l'amélioration de la prise en charge des patients.

Chapitre 3 : Caractérisation des lymphocytes $T\gamma\delta$ circulant et infiltrant les tumeurs chez les patients atteints de mélanome

The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome

Pauline Girard^{1,2}, Julie Charles^{2,3}, Camille Cluzel^{1,2}, Emmanuelle Degeorges^{1,2}, Olivier Manches^{1,2}, Joel Plumas^{1,2,4}, Florence De Fraipont^{2,5}, Marie-Thérèse Leccia^{2,3}, Stephane Mouret^{2,3}, Laurence Chaperot^{1,2}, Caroline Aspod^{1,2}

¹ Etablissement Français du Sang Auvergne Rhône-Alpes, R&D-Laboratory, Grenoble, F-38701 France

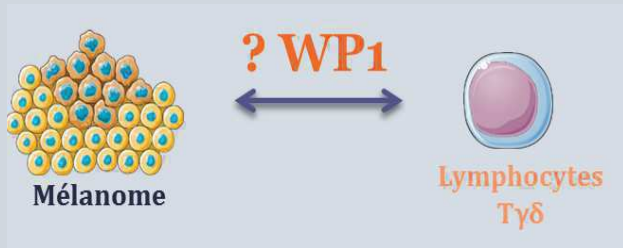
² University Grenoble Alpes, EMR EFS-UGA-INSERM U1209- CNRS, Immunobiology & Immunotherapy of Chronic Diseases, Grenoble, F-38706 France

³ Dermatology clinic, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

⁴ pDC*line Pharma, Grenoble, F-38000 France

⁵ Department of Biochemistry of Cancers and Biotherapies, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

★★★★★★★★★★



Les lymphocytes $T\gamma\delta$ jouent un rôle crucial dans la réponse anti-tumorale. Leurs propriétés uniques de combiner les caractéristiques de l'immunité innée et adaptative, permettent une activation rapide, une sécrétion de cytokines spécifiques et une élimination des cellules tumorales sans restriction au CMH. Cette plasticité fonctionnelle les rend très attractives tant en cible qu'en vecteur pour l'immunothérapie du cancer. Néanmoins, ces effecteurs anti-tumoraux puissants n'ont pas été explorés dans le mélanome de manière exhaustive.

Nous apportons ici une description détaillée du phénotype et des propriétés fonctionnelles des $T\gamma\delta$ circulant et infiltrant les tumeurs en contexte de mélanome ainsi que leur impact sur l'évolution clinique. De grandes proportions de $T\gamma\delta$ et/ou $T\delta 2+$ circulant et infiltrant les tumeurs ont été associées à de meilleurs pronostics cliniques. Nous avons notamment observé une expression modifiée de certains NCR, KIR, et autres points de contrôle immunitaires, et identifié NKp44, PD1, 41BB/41BBL, TIM3, et LAG3 comme des points de contrôle immunitaire corrélés à la progression tumorale. En particulier, le mélanome altère drastiquement l'activation, la sécrétion de cytokines et les fonctions cytotoxiques des $T\gamma\delta$ en condition de stimulation par phospho-antigènes, et favorise la polarisation vers un profil régulateur et TH17 associé à un mauvais pronostic clinique.

Notre étude met en évidence un détournement des $T\gamma\delta$ par le mélanome pour échapper au contrôle immunitaire, et montre que les caractéristiques des $T\gamma\delta$ circulant et infiltrant les tumeurs ont un rôle de biomarqueurs prometteur pour prédire l'évolution clinique. Cette meilleure compréhension de la pathophysiologie des $T\gamma\delta$ peut contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques exploitant le potentiel anti-tumoral et les caractéristiques uniques de ces cellules, en contournant l'effet dérégulateur induit par la tumeur, et ainsi améliorer le devenir clinique des patients

★★★★★★★★★★




The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome

Pauline Girard, Julie Charles, Camille Cluzel, Emmanuelle Degeorges, Olivier Manches, Joel Plumas, Florence De Fraipont, Marie-Therese Leccia, Stephane Mouret, Laurence Chaperot & Caroline Aspod

To cite this article: Pauline Girard, Julie Charles, Camille Cluzel, Emmanuelle Degeorges, Olivier Manches, Joel Plumas, Florence De Fraipont, Marie-Therese Leccia, Stephane Mouret, Laurence Chaperot & Caroline Aspod (2019) The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome, *Oncoimmunology*, 8:8, 1601483, DOI: [10.1080/2162402X.2019.1601483](https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1601483)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1601483>

 View supplementary material 

 Published online: 17 Apr 2019.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 25

 View Crossmark data 

ORIGINAL RESEARCH



The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome

Pauline Girard^{a,b}, Julie Charles^{b,c}, Camille Cluzel^{a,b}, Emmanuelle Degeorges^{a,b}, Olivier Manches^{a,b}, Joel Plumas^{a,b,d}, Florence De Fraipont^{b,e}, Marie-Therese Leccia^{b,c}, Stephane Mourt^{b,c}, Laurence Chaperot^{a,b}, and Caroline Aspod^{a,b}

^aEtablissement Français du Sang Auvergne Rhone-Alpes, R&D-Laboratory, Grenoble, France; ^bUniversity Grenoble Alpes, EMR EFS-UGA-INSERM U1209- CNRS, Immunobiology & Immunotherapy of Chronic Diseases, Grenoble, France; ^cDermatology clinic, Grenoble University Hospital, Grenoble, France; ^dpDC*line Pharma, Grenoble, France; ^eDepartment of Biochemistry of Cancers and Biotherapies, Grenoble University Hospital, Grenoble, France

ABSTRACT

$\gamma\delta$ T cells hold a pivotal role in tumor immunosurveillance through their prompt activation and cytokine secretion, their ability to kill tumor cells in an Human Leukocyte Antigen (HLA)-unrestricted manner, and their combination of features of both innate and adaptive immunity. These unique properties and functional plasticity render them very attractive both as targets and vectors for cancer immunotherapy. Yet, these potent and fascinating antitumor effectors have not been extensively explored in melanoma. We provided here a detailed investigation of the phenotypic and functional properties of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients, and their impact on clinical evolution. High proportions of circulating- and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T and $\delta 2+$ subset were associated with better clinical outcome. We reported however that circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients displayed an altered expression of NCR, KIR, and immune checkpoints, and identified NKp44, PD1, 41BB/41BBL, TIM3, and LAG3 as crucial checkpoints allowing immune escape and tumor progression. Notably, melanoma drastically impaired the ability of $\gamma\delta$ T cells to exhibit activation molecules, secrete cytokines, and display cytotoxicity toward melanoma in response to stimulation with phosphoantigens. It drove them toward regulatory and Th17 profiles associated with poor clinical outcomes. Our study highlights that melanoma hijacked $\gamma\delta$ T cells to escape from immune control, and revealed that circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cell features are promising potential biomarkers of clinical evolution. Such understanding of the physiopathology of $\gamma\delta$ T cells may help designing new therapeutic approaches exploiting the antitumor potential of $\gamma\delta$ T cells while counteracting their skewing by tumors to improve patient outcomes.

ARTICLE HISTORY

Received 3 January 2019
Revised 18 March 2019
Accepted 22 March 2019

KEYWORDS

$\gamma\delta$ T cells; melanoma; immune escape; tumor microenvironment; predictive factor; immune checkpoint

Introduction

Despite recent improvements in melanoma treatment using targeted therapies or immunomodulatory strategies, the long-term control of the tumor in a majority of patients still remains a challenge. A better understanding of the tumor immune escape mechanisms is crucial to design new therapeutic strategies and potentiate existing immunomodulatory therapies to achieve immune control of the tumor and a better clinical success.

Tumor microenvironment comprises many immune cell types, including $\gamma\delta$ T cells that could participate in the pathophysiology of the disease, but are still not fully explored despite their fascinating properties. Among cytotoxic effectors, $\gamma\delta$ T cells represent 1–10% of all T cells, but display potent properties and unique contributions to many types of immune responses.^{1,2} $\gamma\delta$ T cells combine features of both innate and adaptive immunity, display antigen-presenting capacities, and exhibit regulatory and cytotoxic functions in a non-MHC restricted manner.³ Different $\gamma\delta$ T-cell subsets

are defined based on particular V γ or V δ chains and harbor a particular localization. V $\delta 1+$ and V $\delta 2+$ cells are predominant subsets, respectively mostly localized in mucosal tissues/epithelium for V $\delta 1+$ cells, and peripheral blood and lymphoid tissues for V $\delta 2+$ cells. V $\delta 1+$ cells are associated with viral infections, whereas V $\delta 2+$ cells are mostly involved in immunity against bacteria and tumors. V $\delta 1+$ cells recognize stress-induced ligands such as EPCR, MICA, and MICB, whereas V $\delta 2+$ cells recognize phosphoantigens (pAg) derived from the mevalonate or isoprenoid pathways (such as isopentenyl-pyrophosphate (IPP) from malignant cells or hydroxymethylbutenyl-pyrophosphate (HMB-PP) from bacteria), alkylamines, and synthetic aminobiphosphonates independently of MHC molecules. Upon activation, $\gamma\delta$ T cells exhibit cytotoxic activity and secrete cytokines, in particular IFN γ and TNF α which allow them to modulate other cells from acquired immunity, especially dendritic cells and classical $\alpha\beta$ T cells.

$\gamma\delta$ T cells are crucial effectors in tumor immunosurveillance^{4,5} due to their rapid activation, their capacity to recognize tumor-

associated ligands neglected by conventional $\alpha\beta$ T cells in an MHC-unrestricted manner, their ability to kill tumor cells, and their potential to interact with and regulate many other cells leading to coordinated antitumor responses. However, $\gamma\delta$ T cells can be subverted by tumors to exhibit tumor-promoting functions^{3,5,6} through polarization toward Th2, Th17, or regulatory profile,⁷ recruitment of immunosuppressive myeloid cells,⁸ inhibition of antitumor immune responses,⁹ all converging to favor tumor progression.¹⁰

All these unique and crucial properties together with their functional plasticity render $\gamma\delta$ T cells attractive both as targets or vectors for cancer immunotherapy.⁴ Indeed, anticancer therapies based on the exploitation of the power of $\gamma\delta$ T cells are emerging.^{4,11} Indirect stimulation of V δ 2+ cells through administration of aminobisphosphonates (zoledronate, pamidronate) can lead to objective tumor responses in prostate cancer¹² and melanoma.¹³ The adoptive transfer of ex-vivo expanded $\gamma\delta$ T cells is feasible in patients¹⁴ and can inhibit melanoma tumor progression in SCID mice,¹⁵ and infusion of preactivated V δ 2+ cells has shown antitumor effects in renal cell carcinoma.¹⁶ $\gamma\delta$ T cells may also contribute to the efficacy of chemotherapies.⁴ Comprehensive and detailed overviews of all clinical studies performed with $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapies in cancer specifying clinical outcomes have recently been reviewed by others.^{4,11,17,18} The *in vivo* expansion of $\gamma\delta$ T cells (with synthetic phosphoantigens or aminobisphosphonates) can lead up to 25% of partial remission (PR) and 42% of stable disease (SD), the adoptive transfer of $\gamma\delta$ T cells up to 66% of SD, and the combination of both up to 9% complete remission (CR) and 45% of SD. These promising results on $\gamma\delta$ T-cell-based immunotherapies sustain further investigations of these cells.

$\gamma\delta$ T cells have been identified within tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in multiple cancers¹⁹ but their clinical relevance remained mostly unknown. Regarding melanoma, it has been shown that $\gamma\delta$ T cells infiltrate primary tumors,^{20,21} but little information regarding their features and clinical significance has been reported. Lower proportions of circulating $\gamma\delta$ T cells especially V δ 2+ cells and higher proportions of V δ 1+ cells have been reported in melanoma patients.^{22–25} Lower frequencies of V δ 1+ and higher frequencies of V δ 2+ cells in blood were associated with better overall survival,²⁴ and decreased frequency of circulating V δ 2+ cells was observed in patients who progress to advanced stage,^{26,27} sustaining their contribution in the control of melanoma.²¹ Few studies reported functional impairments of peripheral $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients compared to healthy controls, but with controversial results,^{22,23,25,26,28} including either similar or lower proliferative capacity, impaired IFN γ /TNF α secretion upon IPP stimulation, and increased, similar or lower cytotoxicity. A skewed differentiation of circulating $\gamma\delta$ T cells has been pointed out in melanoma patients, with an increased in $\gamma\delta$ T cells displaying effector²³ or terminally differentiated phenotype after tumor removal.^{26,27}

The extensive phenotypic and functional features of $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients have not been explored, especially within tumor microenvironment. Previous investigations were limited to analysis of proportions, differentiation stage and functionality, and restricted to peripheral $\gamma\delta$ T cells. Yet, a

better understanding of these effectors with a promising potential in the context of melanoma and in relation with disease outcome could allow their exploitation for cancer immunotherapy. Here we investigated the detailed phenotypic and functional characterization of $\gamma\delta$ T cells in blood and tumor of melanoma patients in comparison with healthy controls, and assessed their clinical relevance. Our study highlights crucial $\gamma\delta$ T-cell features and promising potential biomarkers of clinical evolution in melanoma. Such understanding may help harnessing the power of $\gamma\delta$ T cells against cancer and allow improving cancer immunotherapies and patient outcomes.

Results

High proportions of circulating- and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T and δ 2+ subset are associated with better clinical outcome

We first evaluated the proportion of $\gamma\delta$ T cells as well as δ 2+ and δ 2- subsets in blood and tumor samples of melanoma patients compared to blood and tonsils of healthy donors (HD) (Figure 1(a)). As most of tumor samples from patients were metastatic lymph nodes (LN), we used tonsils from healthy donors as control for lymph node tissues of patients, which were the closest available control tissue. Whereas proportions of circulating $\gamma\delta$ T cells were similar between HD (mean = 2.1%, range 0.4–7.17%) and patients (mean = 2.62%, range 0.51–11.63%), we observed that $\gamma\delta$ T accumulated within melanoma tumors (mean = 1.6%, range 0.18–13.09%) compared to control tonsils (mean = 0.29%, range 0.15–0.51%) (Figure 1(b), Supplementary Figure 1A). Interestingly, for the case of primary tumor (patient #62), the percentage of $\gamma\delta$ T cells was the highest of the cohort (13.09% within CD45+). In addition, the T δ 2+/T δ 2- ratio may be altered in melanoma patients, with a tendency to increase in both blood and tumor compared to their respective control, even though not significantly (Figure 1(c)). Moreover, when classified according to disease stage, patients with advanced stage III–IV melanoma displayed a lower frequency of circulating $\gamma\delta$ T cells (Figure 1(d)) and a lower T δ 2+/T δ 2- ratio in blood (Supplementary Figure 1B) compared to patients at early stage I–II, suggesting a preferential recruitment of $\gamma\delta$ T cells to the tumor site. Strikingly we found that higher proportion of circulating T δ 2+ subset was significantly associated with longer time to progress (PFS) (Figure 1e, f, Supplementary Table 3), and higher proportion of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells (Figure 1g) predicted better clinical outcome as it was linked with longer PFS and longer overall survival (OS) (Supplementary Table 4). Altogether these data enlightened that $\gamma\delta$ T cells infiltrated melanoma tumors and are associated with better clinical outcome.

High proportions of $\gamma\delta$ T cells displaying a naïve differentiation stage or a regulatory phenotype are associated with a poor clinical outcome

We further examined the detailed properties of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells. We assessed their differentiation

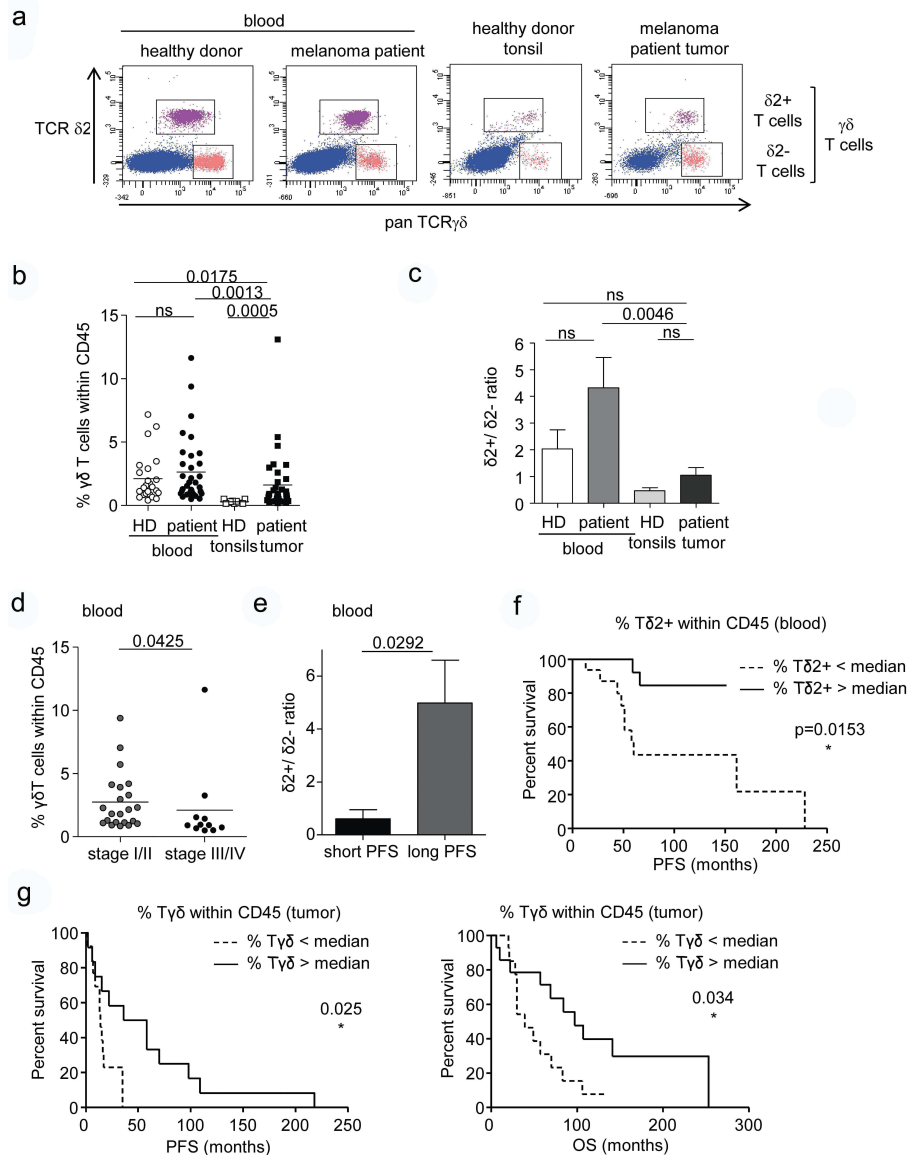


Figure 1. High proportions of circulating- and tumor-infiltrating $\gamma \delta$ T and T $\delta 2+$ subset are associated with better clinical outcome.

The proportion of $\gamma \delta$ T including T $\delta 2+$ subset was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients, and blood and tonsils samples from healthy donors (HD). $\gamma \delta$ T cells were identified as CD45+ CD3+ TCR $\gamma \delta$ + and subdivided into T $\delta 2+$ and T $\delta 2-$ subset using TCR $\delta 2$ labeling. All percentages shown are taken within CD45+ cells. (a) Representative dotplots of $\gamma \delta$ T cells in each sample type (gated on CD3+ CD45+ cells). (b) Percentages of $\gamma \delta$ T found within CD45+ cells in blood ($n = 24$) and tonsils ($n = 9$) of HD (white symbols), and blood ($n = 34$) and tumor ($n = 35$) of melanoma patients (black symbols). (c) T $\delta 2+$ /T $\delta 2-$ ratio in blood and tonsils of HD (white symbols), and blood and tumor of melanoma patients (black symbols). (d) Comparative proportions of $\gamma \delta$ T in blood of melanoma patients according to disease staging at sampling time. (e) T $\delta 2+$ /T $\delta 2-$ ratio in blood of melanoma patients according to their time to progress from sampling time (short PFS: ≤ 6 months, long PFS: > 6 months). (f) Comparative PFS (from diagnosis time) of patients with low ($< 0.65\%$) or high ($> 0.65\%$) circulating T $\delta 2+$ cells. Groups were separated using the median percentage of circulating T $\delta 2+$ cells 0.65% ($n = 17$ patients/group). (g) Comparative PFS (left panels) and OS (right panels) (from diagnosis time) of patients with low or high tumor-infiltrating whole $\gamma \delta$ T cells. Groups were separated using the median percentage of tumor-infiltrating whole $\gamma \delta$ T 0.81% ($n = 17$ – 18 patients/group). (B–E) P values calculated using the Mann-Whitney test. (f–g) Comparison using Log-rank test.

stage based on CD45RA and CD27 expression, allowing to distinguish naïve (CD45RA+CD27+) and central memory (CD45RA-CD27+) that are not yet differentiated, from effector memory (CD45RA-CD27-) and terminally differentiated (CD45RA+CD27-) phenotypes that display effector functions (Supplementary Figure 2A). Even though no significant difference was observed between controls and patients for both blood and lymph node tissue, $\gamma \delta$ T cells infiltrating tonsils and tumors have a tendency to accumulate in a central memory (CM) stage (CD45RA-CD27+) (mean = 62.5% and 59.98%

respectively) with a reduced terminally differentiated effector memory phenotype (EMRA) mean = 3.46% and 6.6% respectively) compared to blood (Figure 2a). Notably, a high proportion of circulating $\gamma \delta$ T cells in a naïve stage (ranging from 2.9% to 51.6% in patients) was associated with an early relapse (Figure 2b), suggesting that the lack of differentiated $\gamma \delta$ T cells is predictive of a poorer outcome. Interestingly, the proportion of $\delta 2+$ cells in the EMRA stage at the tumor site was negatively linked with PFS and OS parameters (Supplementary Table 6). Besides, when evaluating the regulatory phenotype of $\gamma \delta$ T cells

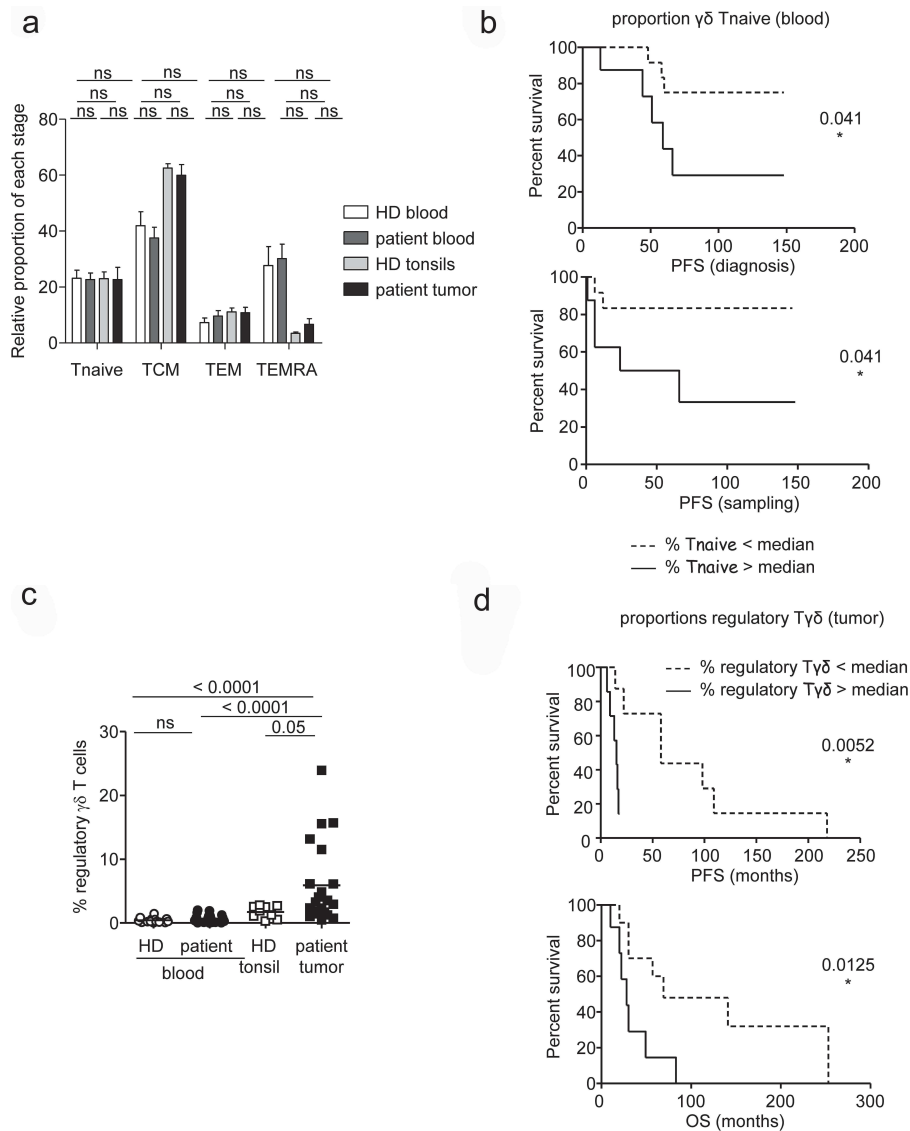


Figure 2. High proportions of $\gamma\delta$ T displaying a naïve differentiation stage or a regulatory phenotype are associated with a poor clinical outcome. (a,b) The differentiation stage of $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry using CD45RA and CD27 markers: naïve (CD45RA+ CD27+), CM (CD45RA- CD27+), EM (CD45RA- CD27-), and EMRA (CD45RA+ CD27-). (a) Comparative proportions of $\gamma\delta$ T cells in each differentiation stage in blood and tumor samples from melanoma patients, and blood and tonsils samples from healthy donors. *P* values calculated using the Kruskal-Wallis test. (b) Comparative PFS of patients with low or high circulating naïve $T\gamma\delta$ cells (CD45RA+ CD27+) from diagnosis (upper panel) or sampling (lower panel) time. Groups were separated using the median percentage of circulating naïve $T\gamma\delta$ cells 24.6% ($n = 10-12$ patients/group). Comparison using Log-rank test. (c,d) The regulatory status of $T\gamma\delta$ cells was evaluated by flow cytometry using CD25 and FoxP3 markers. (c) Comparative proportions of CD25+ FoxP3+ regulatory $T\gamma\delta$ cells in blood and tumor samples from melanoma patients, and blood and tonsils samples from healthy donors. *P* values calculated using the Mann-Whitney test. (d) Comparative PFS and OS (from diagnosis time) of patients with low or high tumor-infiltrating regulatory $T\gamma\delta$ cells. Groups were separated using the median percentage of tumor-infiltrating regulatory $T\gamma\delta$ cells 3.14% ($n = 10-12$ patients/group). Comparison using Log-rank test.

using CD25 marker and FoxP3 transcription factor, we observed an accumulation of CD25^{hi}FoxP3+ $\gamma\delta$ T cells specifically in tumor from melanoma patients (mean = 5.66%, range 0–23.93%) compared to control tonsils or blood (Figure 2c, Supplementary Figure 2B). Notably, a high proportion of tumor-infiltrating regulatory $\gamma\delta$ T cells was associated with a shorter PFS and OS (Figure 2d, Supplementary Tables 4 and 6). When separating patients according to the stage of disease at sampling time, we also observed a tendency toward an increase in the proportions of circulating regulatory $\gamma\delta$ T cells in advanced compared to early stage (Supplementary Figure 1C). Altogether these observations suggest that $\gamma\delta$ T cells are

progressively skewed in both blood and tumor of melanoma patients toward an undifferentiated and regulatory phenotype associated with a poorer clinical outcome.

$\gamma\delta$ T cells displayed a more activated phenotype in melanoma patients compared to healthy donors

We next investigated basal activation status of $\gamma\delta$ T cells by analyzing markers of both APC (CD40, CD86) and T cells (CD25, CD69). We observed that tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells displayed higher levels of all activation markers compared to circulating $\gamma\delta$ T cells of patients or HD, but only

CD40 was significantly higher in tumors (mean = 49.85%, range 14.75–73.23%) compared to tonsils (mean = 35.59%, range 24.1–61.9%) (Figure 3a). Interestingly, high proportions of CD86-expressing tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells were associated with shorter survival, whereas high proportions of CD69-expressing tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells were linked to better outcome (Figure 3b, Supplementary Tables 4 and 6). These results indicate that $\gamma\delta$ T cells display a higher basal activation status in melanoma microenvironment, with APC/T-cell characteristics of $\gamma\delta$ T cells being differentially linked with clinical outcome.

Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients displayed an altered expression of NCR, KIR, and immune checkpoints, with nkp44, PD1, and 41BBL being negative prognosis factors of clinical evolution

To further gain insight into the mechanism of modulation of $\gamma\delta$ T cells by melanoma, we examined their expression of NCR, KIR as well as immune checkpoints (ICP) (Supplementary Figure 3), as these molecules will determine

the fate of $\gamma\delta$ T cells and orientate their potentialities to interact with target cells and subsequently modulate other immune cells. We observed that circulating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients exhibited higher levels of NKG2A (mean = 10.89%, range 3.12–31.42%), NKG2D (mean = 75.79%, range 50.15–96.2%) and NKp46 (mean = 3.8%, range 0.31–14.98%) compared to HD, and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells expressed more NKG2A (mean = 18.56%, range 2.01–36.74%), NKp30 (mean = 40.29%, range 11.88–74.39%), and NKp44 (mean = 20.55%, range 1.5–58.08%) compared to tonsils and blood of HD (Figure 4a, b, Supplementary Figure 3A and 3B). The expression of inhibitory NKG2A and NKp30 receptors on tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells tended to positively correlate between them (Supplementary Figure 4A). Notably, NKp44 tended to be more expressed by circulating $\gamma\delta$ T cells in advanced stage patients compared to early stages (Supplementary Figure 4B), and high proportion of NKp44 + circulating $\gamma\delta$ T cells was highly predictive of shorter PFS and OS (Figure 4(c), Supplementary Tables 3 and 5). Moreover, when separating patients according to short or long progression-free survival either from diagnosis or sampling time, higher expression of NKp30 and NKp44 by

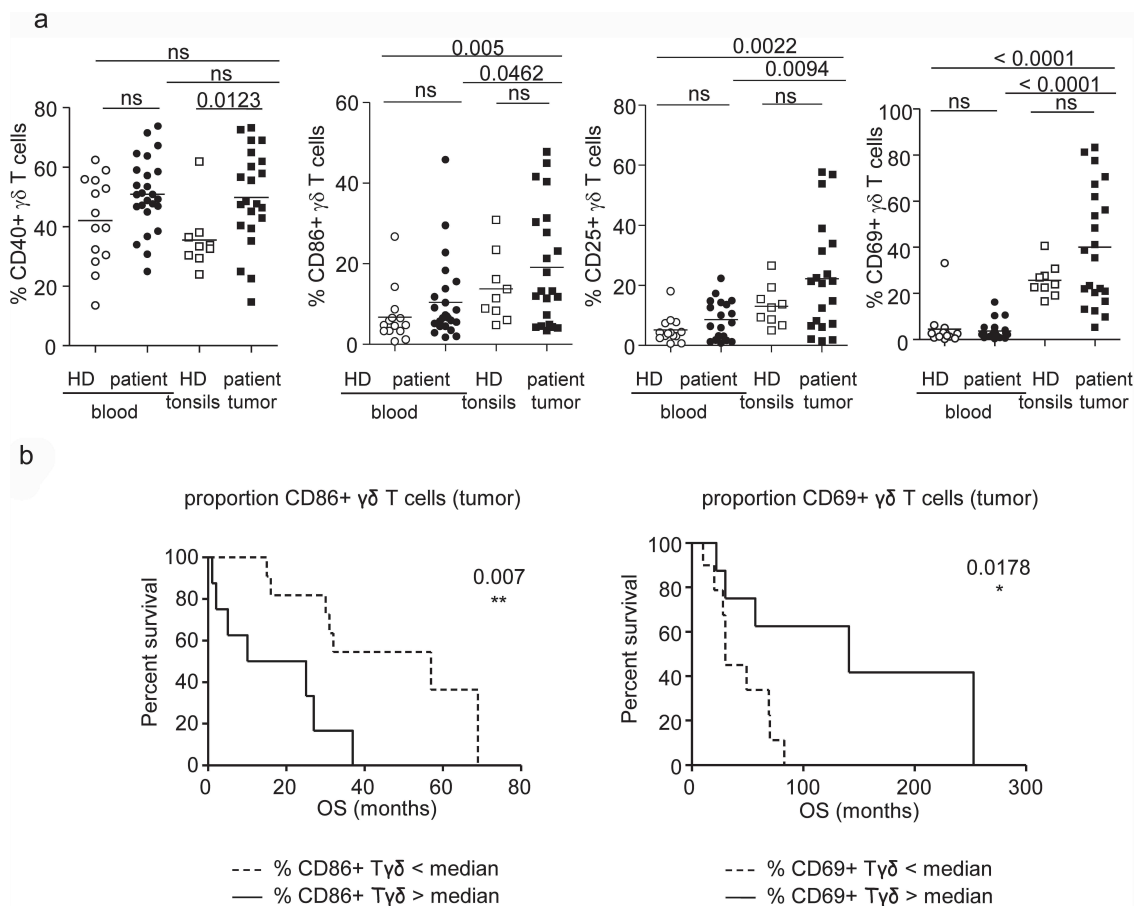


Figure 3. $\gamma\delta$ T cells displayed a more activated phenotype in melanoma patients compared to healthy donors.

Basal activation status of $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients, and blood and tonsils samples from healthy donors. (a) Comparative proportions of T $\gamma\delta$ cells expressing CD40, CD86, CD25, and CD69 (within $\gamma\delta$ T cells). P values calculated using the Mann-Whitney test. (b) Comparative OS of patients with low or high CD86+ (left panel) or CD69+ (right panel) tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from sampling and diagnosis time respectively. Groups were separated using the median percentage of CD86+ (13.24%) and CD69+ (37.2%) tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells ($n = 10$ –11 patients/group). Comparison using Log-rank test.

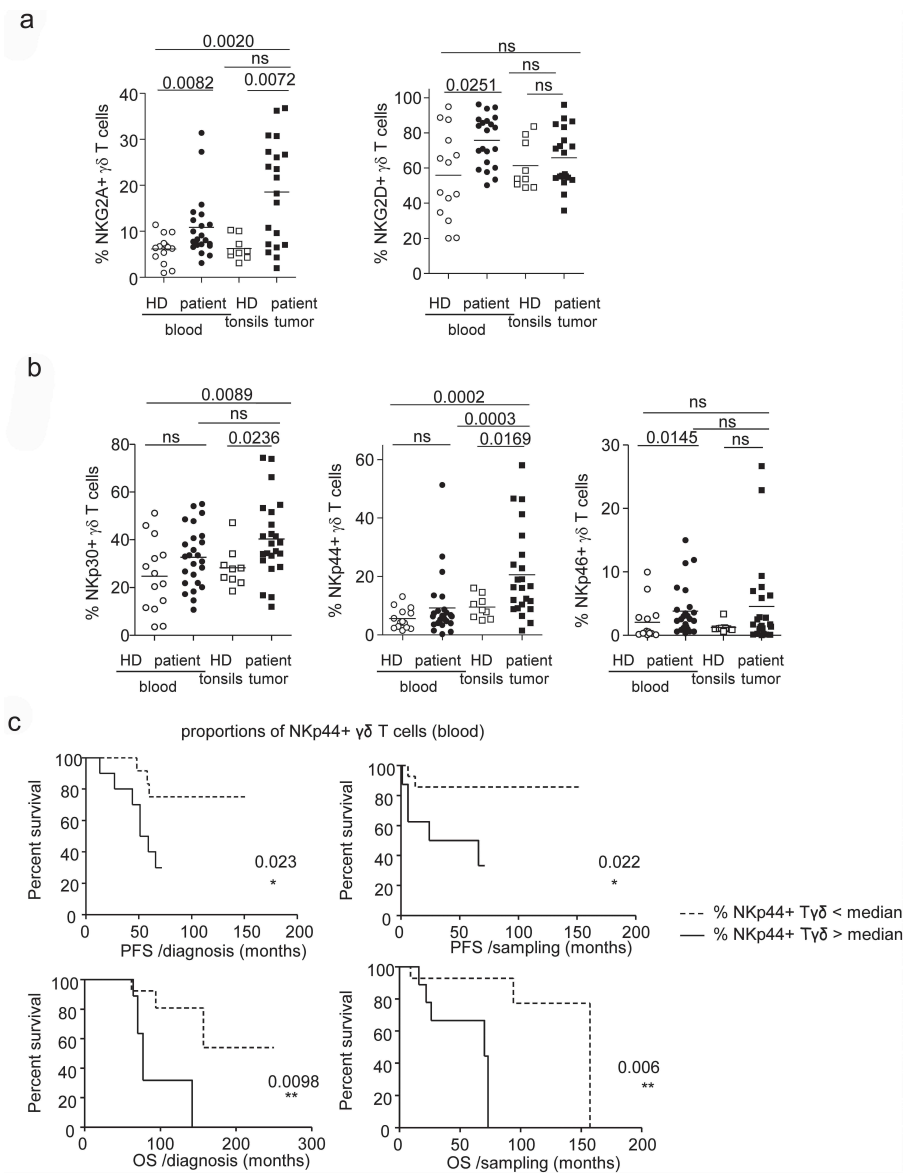


Figure 4. Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients displayed an altered expression of NKR and KIR, with Nkp44 being a negative prognosis factor of clinical evolution.

The expression of KIR and NKR by $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients (black symbols), and blood and tonsils samples from healthy donors (white symbols). (a) Comparative proportions of $\gamma\delta$ T cells expressing NKG2A and NKG2D. (b) Comparative proportions of $\gamma\delta$ T cells expressing Nkp30, Nkp44, and Nkp46. *P* values calculated using the Mann-Whitney test. (c) Comparative PFS (upper panels) and OS (lower panels) from diagnosis and sampling time of patients with low or high Nkp44+ circulating $\gamma\delta$ T cells. Groups were separated using the median percentage of Nkp44+ circulating $\gamma\delta$ T cells 6.3% (*n* = 12–14 patients/group). Comparison using Log-rank test.

circulating $\gamma\delta$ T cells identified patients with a shorter PFS (Supplementary Figure 4C). Interestingly, NKG2D expression appeared to be a good prognosis factor of clinical evolution (Supplementary Tables 3–6).

The expression of immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells in patients was highly heterogeneous, especially for tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells. We observed higher proportions of circulating $\gamma\delta$ T cells expressing 4-1BB (mean = 9.81%, range 0.79–43.33%), TIM3 (mean = 2.44%, range 0.42–16.49%), LAG3 (mean = 3.39%, range 0–13.76%), and ICOSL (mean = 8.7%, range 1.97–35.71%) in melanoma patients compared to HD, whereas only proportions

of TIM3+ (mean = 11.12%, range 1.54–31.36%) and LAG3+ (mean = 15.9%, range 0.71–50%) tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells were higher compared to tonsils (Figure 5(a), Supplementary Figure 3C and 3D). The other immune checkpoints analyzed were similarly expressed between the groups (Supplementary Figure 5A). Interestingly, on tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells, TIM3 and LAG3 expressions highly positively correlated between them, as well as PD1 and TIM3 or LAG3 (Supplementary Figure 5B). When assessing the clinical relevance of the immune checkpoint expression on $\gamma\delta$ T cells, we found that PD1 on circulating $\gamma\delta$ T cells and 4-1BBL, TIM3 and LAG3 on tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells

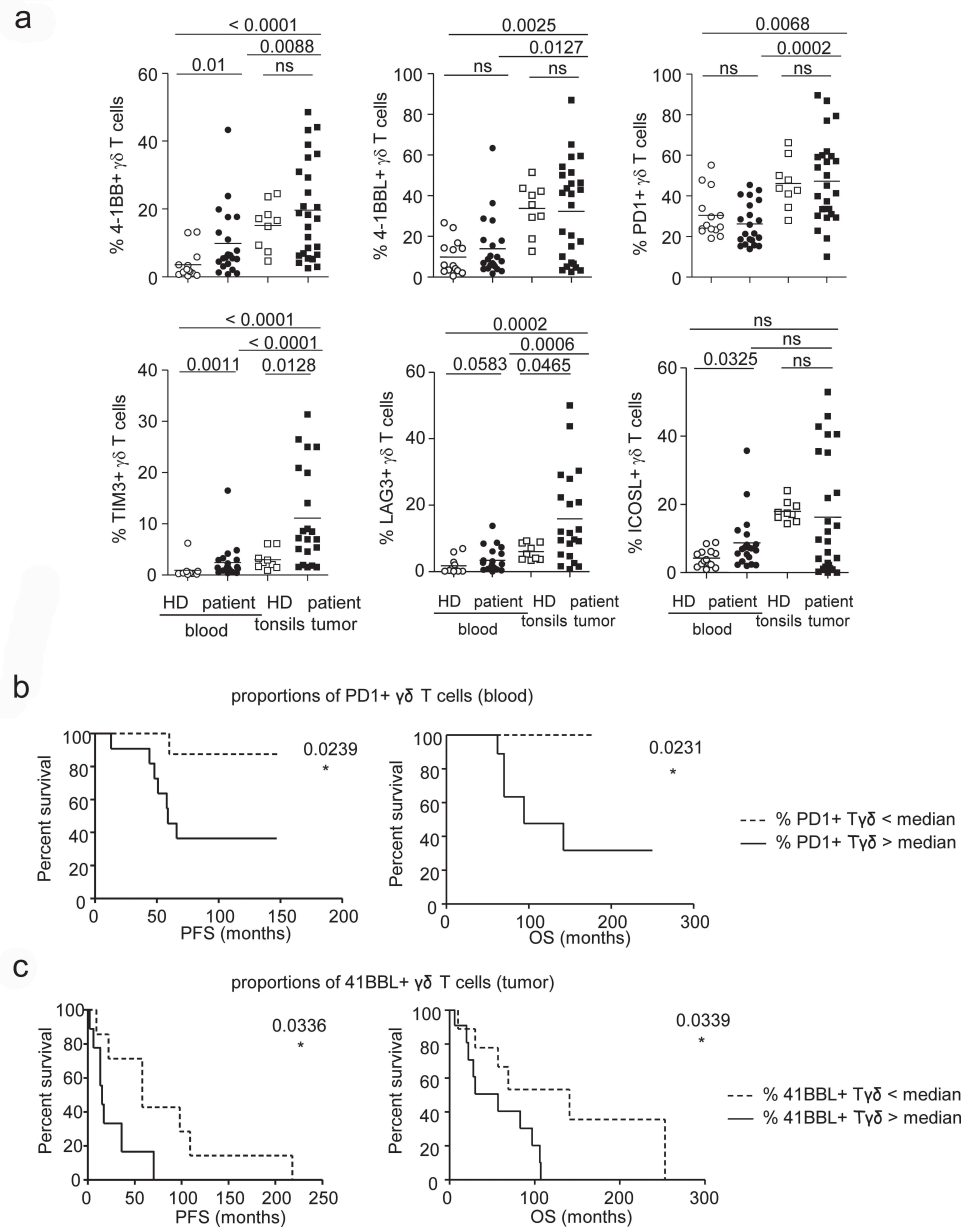


Figure 5. Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients displayed an altered expression of immune checkpoints, with PD1 and 41BBL associated with a poor clinical outcome.

The expression of immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients (black symbols), and blood and tonsils samples from healthy donors (white symbols). (a) Comparative proportions of $\gamma\delta$ T cells expressing 4-1BB, 4-1BBL, PD1, TIM3, LAG3, and ICOSL. *P* values calculated using the Mann-Whitney test. (b,c) Comparative PFS and OS from diagnosis time of patients with (b) low or high PD1+ circulating $\gamma\delta$ T cells ($n = 10$ – 12 patients/group) and (c) low or high 4-1BBL+ tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells ($n = 11$ – 13 patients/group). Groups were separated using the median percentage of PD1+ circulating $\gamma\delta$ T cells 21.5% and 4-1BBL+ tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells 38.1%. Comparison using Log-rank test.

were associated with earlier relapse and shorter overall survival (Figure 5(b,c), Supplementary Tables 3–6), even if these molecules were similarly expressed on the corresponding $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients compared to controls. Altogether these data enlightened that $\gamma\delta$ T cells are skewed in their expression of NKR, KIR, and immune checkpoints in melanoma microenvironment, and we identified modulations both in blood and tumor as critical negative prognosis factors of clinical evolution.

The heatmap representation of all phenotypic features of $\gamma\delta$ T cells highlighted differences between the groups analyzed (Supplementary Figure 6A), and multidimensional analysis revealed clear specific features for each group (Supplementary Figure 6B). Notably, principal component analysis of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells of melanoma patients also allowed segregating patients with short and long PFS (Supplementary Figure 6C and 6D).

Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients have an impaired ability to respond to specific and global stimulation

We further investigated whether melanoma could impact the ability of $\gamma\delta$ T cells to respond to stimulation. To this end, we purified $\gamma\delta$ T cells from blood samples of HD or blood and tumor samples of melanoma patients and stimulated them with phosphoantigens (IPP, HMB-PP) that specifically activate T δ 2+ cells and PMA/ionomycin that globally stimulate all $\gamma\delta$ T cells. As expected, for the HD group, expression of

CD69 and CD25 were drastically increased on T δ 2+ cells upon triggering with phosphoantigens and PMA/ionomycin, whereas T δ 2- cells responded only to PMA/ionomycin stimulation (Supplementary Figures 7 and 8, white symbols). We observed that circulating- and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients have an impaired ability to upregulate CD69 and CD25 in response to phosphoantigens and PMA/ionomycin compared to HD (Figure 6(a), and this failure affected both T δ 2+ and T δ 2- cells (Supplementary Figures 7 and 8). In addition, stimulated $\gamma\delta$ T cells from HD

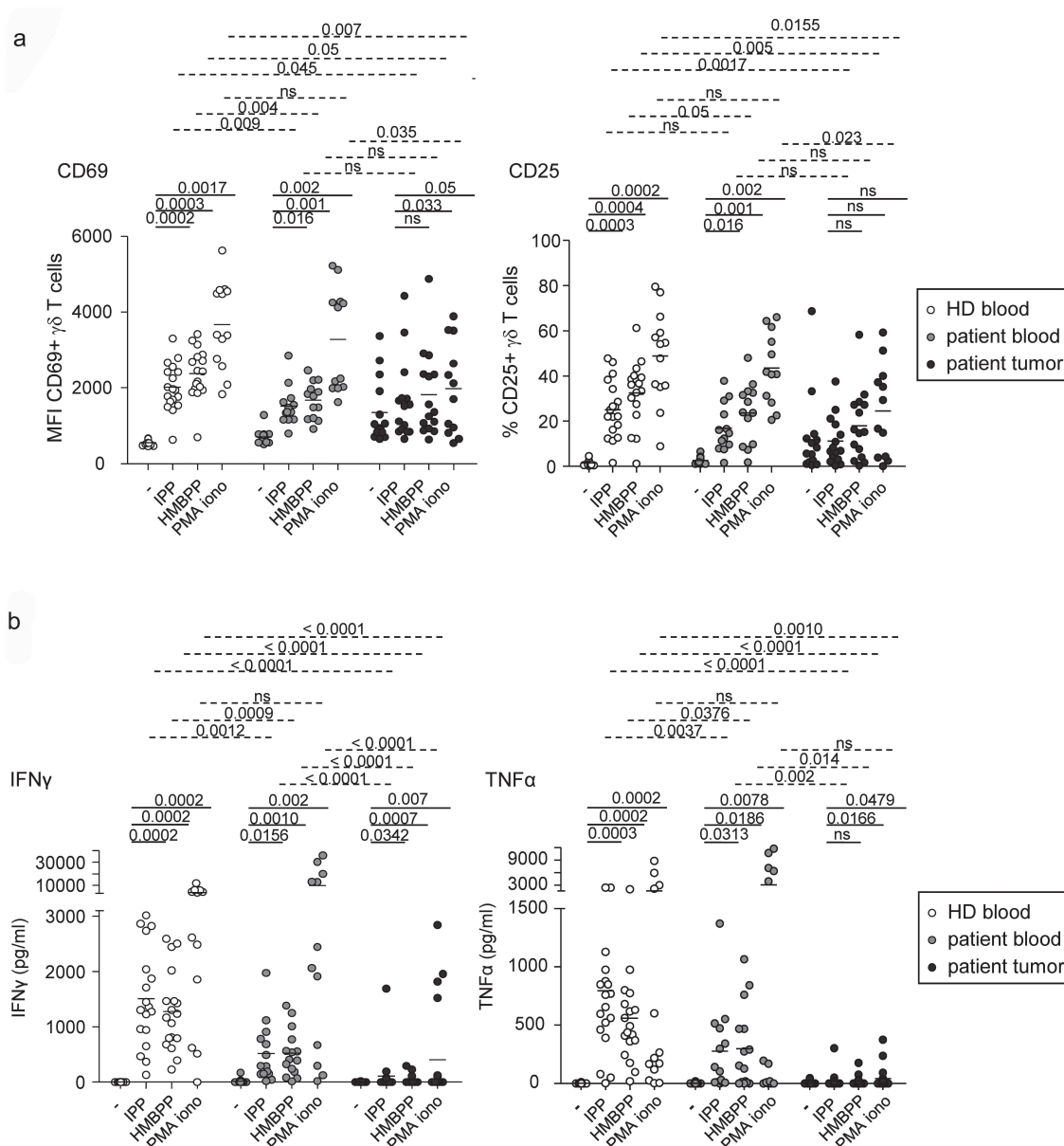


Figure 6. Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients have an impaired ability to respond to phosphoantigens. $\gamma\delta$ T cells purified from blood of healthy donors (white symbols), or blood (gray symbols) and tumor samples (black symbols) from melanoma patients were activated or not by phosphoantigens (IPP, HMB-PP) or PMA/ionomycin for 20 h. (a) Activation status was evaluated by flow cytometry on whole $\gamma\delta$ T cells. MFI of CD69 on CD69 + cells (left panel) and percentage of CD25 (right panel) expression on whole T $\gamma\delta$ cells (within $\gamma\delta$ T cells). (b,c) Cytokine secretion was evaluated in the culture supernatants. (b) IFN γ and TNF α , (c) IL17A. *P* values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (straight line) or the Mann-Whitney test (dotted lines). (d) Comparative OS from diagnosis and sampling time of patients with low or high IL17A production by unstimulated tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells (condition -). Groups were separated using the positivity of IL17A concentration found in the supernatants of unstimulated tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells (*n* = 5–7 patients/group). Comparison using Log-rank test.

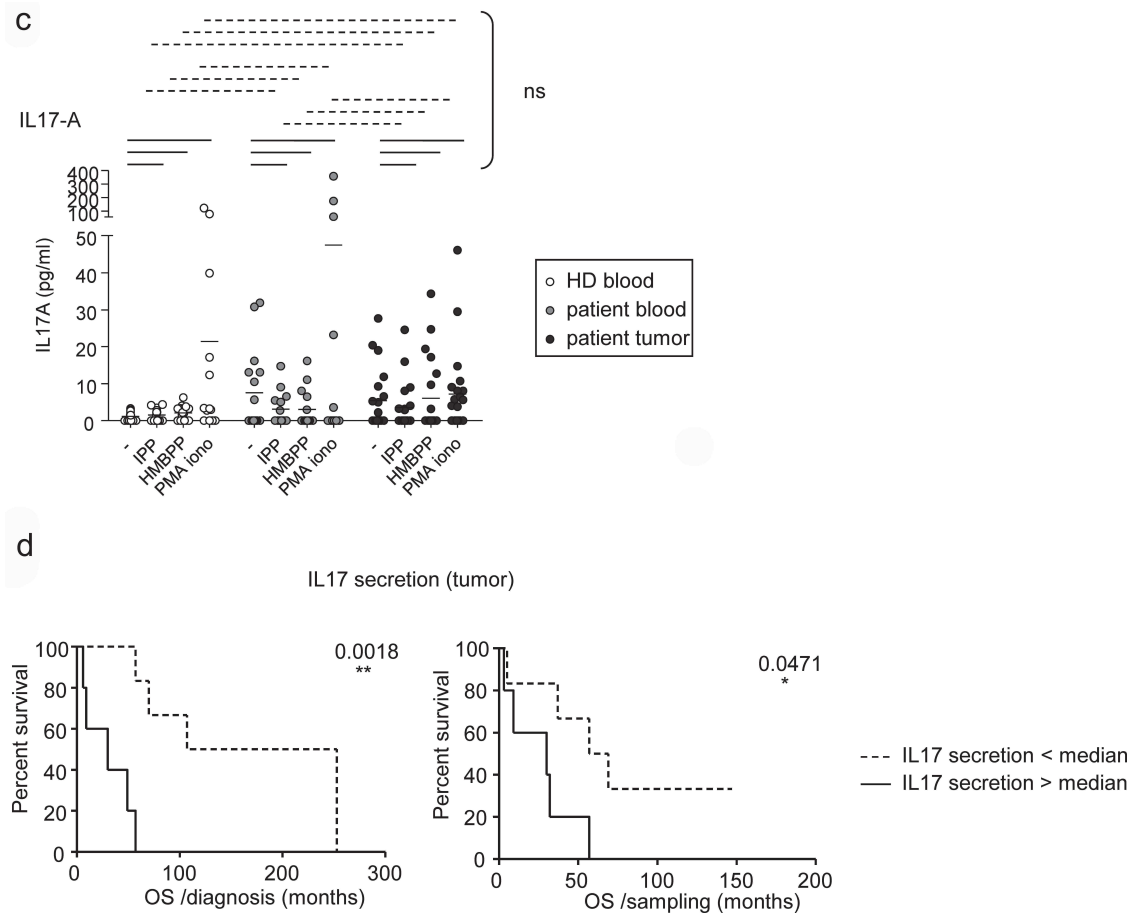


Figure 6. (Continued).

secreted high levels of IFN γ and TNF α , which were dramatically altered with circulating- and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients (Figure 6(b)). Stimulated $\gamma\delta$ T cells secreted also IL17-A, which level was not significantly different between HD and patients (Figure 6(c)). However, $\gamma\delta$ T cells from both blood and tumor of melanoma patients secreted IL17-A already at baseline in absence of external stimulation, and notably, basal IL17-A levels from tumor-derived $\gamma\delta$ T cells were linked with worse clinical outcome (Figure 6(d), Supplementary Table 7). The other cytokine analyzed (IL4, IL10, and TGF β) were found not to be differentially secreted between melanoma patients and controls (Supplementary Figure 9), but high IL10 levels upon stimulation were associated with shorter PFS and OS (Supplementary Table 7). Therefore, melanoma drastically impaired the ability of $\gamma\delta$ T cells to exhibit activation molecules and secrete cytokines in response to stimulation, and drove them toward a Th17 profile associated with a poor clinical outcome.

Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients have an impaired cytotoxic potential toward melanoma tumor cells

We then explored how melanoma affects the cytotoxic capacities of $\gamma\delta$ T cells. We noticed an increased proportion of CD56+ circulating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients

(mean = 43.79%, range 22.4–83.34%) compared to HD (Figure 7(a)), that was associated with better PFS (Figure 7(b)). We then evaluated the cytotoxic potential of $\gamma\delta$ T cells toward melanoma tumor cells by assessing the degranulation of their intracellular cytotoxic vesicles that are covered with membrane-bound CD107a/b and containing perforine and granzyme B. $\gamma\delta$ T cells purified from HD and stimulated with phosphoantigens or PMA/ionomycin secreted granzyme B and upregulated CD107a/b at their surface while secreting high levels of perforine when facing their target melanoma tumor cells (Figure 7(c–e), white symbols). Even though circulating- and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients displayed higher levels of CD107a/b at their surface compared to HD in these conditions (Figure 7(c)), that was negatively link to OS (Supplementary Table 8), their ability to secrete perforine and/or granzyme B was impaired especially within tumor microenvironment (Figure 7(d–e)), revealing a failure in their cytotoxic capacities toward melanoma tumor cells.

Melanoma tumor cells directly impaired the capacity of $\gamma\delta$ T cells to mature and exhibit their functionalities in response to stimulation

We next wondered if melanoma tumor cells could directly impact the features of $\gamma\delta$ T cells. We submitted $\gamma\delta$ T cells

purified from HD to melanoma-derived supernatants before assessing their ability to respond to stimulation with phosphoantigens and PMA/ionomycin. We observed that $\gamma\delta$ T cells preincubated with melanoma-derived supernatants had an impaired capacity to upregulate CD25 and/or CD69 and to secrete IFN γ in response to phosphoantigens and PMA/ionomycin (Supplementary Figure 10A and 10B). Furthermore, they displayed lower level of granzyme B (Supplementary Figure 10C) despite similar CD107a/b surface expression when facing the tumor target cells (Supplementary Figure 10D). Therefore, melanoma tumor cells directly impaired the capacity of $\gamma\delta$ T cells to exhibit their functionalities in response to stimulation.

Discussion

$\gamma\delta$ T cells are fascinating cells due to their unique properties and functional plasticity that render them very attractive for immunotherapy. Yet, these potent antitumor effectors have not been extensively explored in melanoma, limited to the identification of $\gamma\delta$ T cells within primary tumors and the report of alterations in frequencies and functions of circulating $\gamma\delta$ T cells. Little and controversial information is available on their functional features and clinical significance. There is a total lack of information regarding immune checkpoint expression by $\gamma\delta$ T cells in the context of cancer. We provided here a detailed investigation of

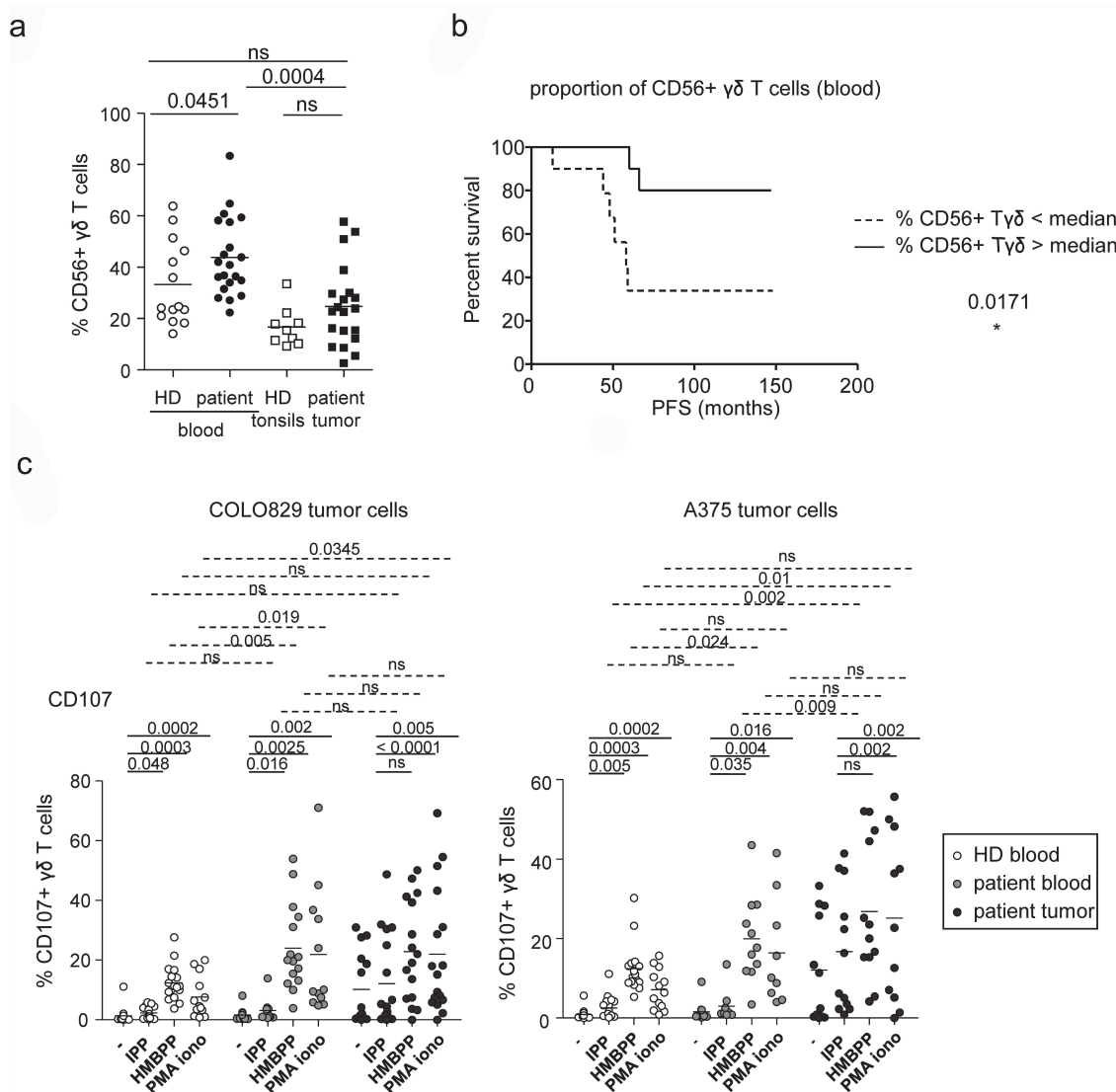


Figure 7. Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients have an impaired cytotoxic potential toward melanoma tumor cells. (a,b) The expression of CD56 by $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients (black symbols), and blood and tonsils samples from healthy donors (white symbols). (a) Comparative proportions of $\gamma\delta$ T cells expressing CD56. *P* values calculated using the Mann-Whitney test. (b) Comparative PFS from diagnosis time of patients with low or high CD56+ circulating $\gamma\delta$ T cells. Groups were separated using the median percentage of CD56 + circulating $\gamma\delta$ T cells 40.9% (*n* = 10–11 patients/group). Comparison using Log-rank test. (c–e) $\gamma\delta$ T cells were purified from blood of healthy donors (white symbols), or blood (gray symbols) and tumor samples (black symbols) from melanoma patients and activated or not with phosphoantigens (IPP, HMB-PP) or PMA/ionomycin for 20 h. Cells were further cocultured with melanoma tumor cells (A375, COLO829) in a 20:1 ratio for 5 h with GolgiSTOP for the last 4 h. (c) Degranulation of $\gamma\delta$ T cells was assessed by adding CD107a/b Abs during the culture of $\gamma\delta$ T cells with target cells and revealed by flow cytometry. (d) Perforin production was monitored in the coculture supernatants. (e) Granzyme B secretion was evaluated in the culture supernatants of stimulated $\gamma\delta$ T cells. *P* values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (straight line) or the Mann-Whitney test (dotted lines).

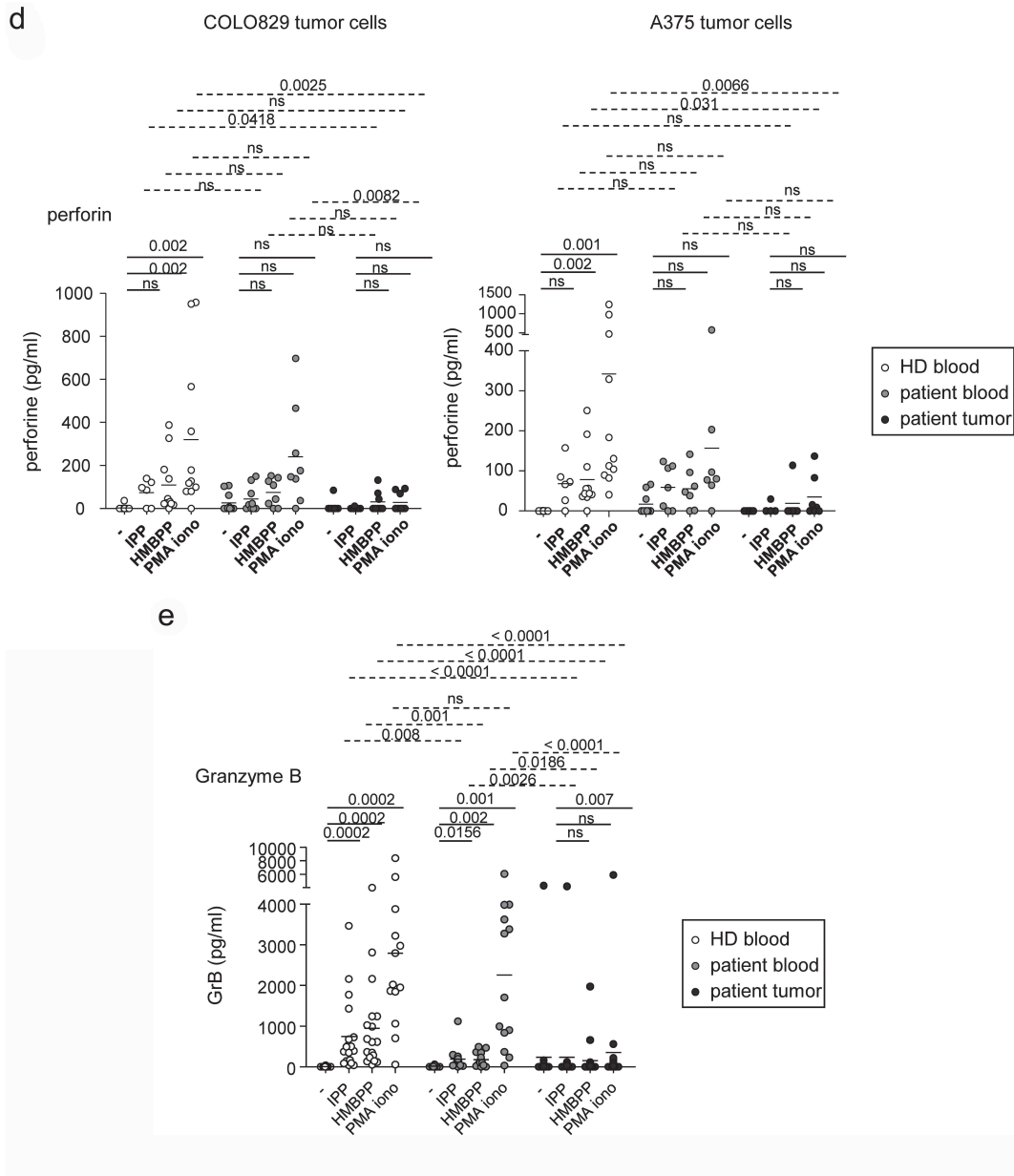


Figure 7. (Continued).

circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta T$ cells in term of frequency, phenotype, functional properties, and relationship with clinical stage and clinical evolution in melanoma compared to control. Our study highlights that $\gamma\delta T$ -cell^c features are promising potential biomarkers of clinical evolution in melanoma, and brings better understanding of the physiopathology of $\gamma\delta T$ cells in melanoma (summarized in Figure 8) that may help designing new therapeutic approaches exploiting the potential of $\gamma\delta T$ cells to improve patient outcomes.

We highlighted that despite similar proportions of circulating $\gamma\delta T$ cells between melanoma patients and HD, their rate decreased in advanced stage melanoma, but $\delta 2+$ cells were positively associated with longer PFS, which is concordant with another study revealing longer survival of patients

with higher circulating $\delta 2+$ cell proportions.²⁴ In previous studies, total circulating $\gamma\delta T$ cells were found to be either similar²³ or reduced²² in melanoma patients compared to HD, whereas lower frequencies of circulating $\delta 2+$ cells have been reported both in early²² and late^{23,26,29} stage melanoma. Interestingly, the characterization of $\gamma\delta T$ cells in the context of immunomodulatory therapies highlighted that decreasing proportions of circulating V $\delta 2$ cells during ipilimumab treatment was associated with lower clinical benefit.²⁴

We found an increased frequency of $\gamma\delta T$ cells in tumors compared to control tonsils revealing an active migration of $\gamma\delta T$ cells toward melanoma, which was associated with better clinical outcome. Within $\gamma\delta T$ cells, higher proportions of tumor-infiltrating $\delta 2+$ cells showed a trend toward longer PFS and OS. This is in line with other studies describing

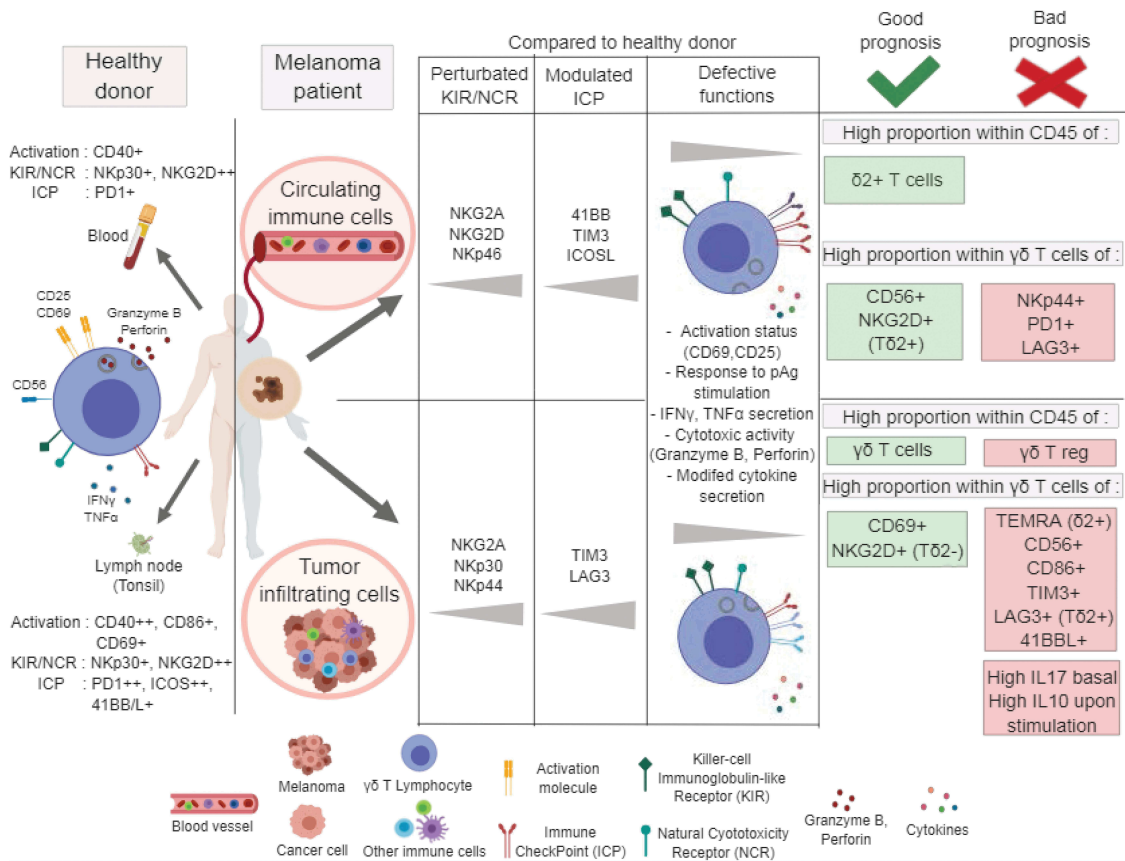


Figure 8. Graphical summary of the main perturbations of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients and their impact on clinical outcome. The left part of the figure displayed the properties of $\gamma\delta$ T cells in a healthy context. The middle part depicted perturbations observed in both blood and tumor of melanoma patients. The right part highlighted $\gamma\delta$ T cells-based prognosis factors of clinical evolution. This figure has been created using BioRender science illustration tool.

that $\gamma\delta$ T cells including $\delta 2+$ infiltrate primary melanoma tumor, representing 15–25% of TIL,^{20,30} and their proportion correlated negatively with disease stage²¹ and positively with progression-free and overall survival.^{26,31} Furthermore TCR γ -/- mice lacking $\gamma\delta$ T cells are highly sensitive to tumor development upon exposure to chemical carcinogens or tumor inoculation.^{32,33} All these observations proved that $\gamma\delta$ T cells participate in the immunosurveillance of melanoma, and their proportion may be a promising candidate biomarker of clinical outcome and/or response to immunotherapies.

The differentiation stage of $\gamma\delta$ T cells has also been examined, as it brings information regarding their migratory pathway and functional potential. We observed that circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells harbored predominantly a T_{CM}/T_{EMRA} or T_{CM} status respectively, even though no difference was noticed between patients and controls. Notably, we highlighted that higher proportions of circulating naïve $\gamma\delta$ T cells were associated with early relapse. In line with these data, it has been shown that circulating $\gamma\delta$ T cells in late stages²⁶ and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T²¹ are skewed toward T_{EMRA} status, and early differentiated V $\delta 1+$ cells in blood were associated with a poorer survival.²⁹ Melanoma may therefore either block the differentiation of $\gamma\delta$ T cells keeping them in a non-functional naïve status or favor their differentiation toward an exhausted phenotype by chronically

stimulating them with phosphoantigens that accumulate in tumor cells in order to escape from $\gamma\delta$ T cells' antitumor action.

$\gamma\delta$ T cells are known to exert both tumor-preventing and tumor-promoting activity (23). Our work allows depicting protumor activity of $\gamma\delta$ T cells in the context of melanoma. Indeed, we reported an accumulation of FoxP3+ regulatory $\gamma\delta$ T cells within melanoma tumors, which was dramatically associated with early relapse and shorter survival. However, their presence was not associated with increased levels of immunoregulatory cytokines TGF β or IL10. It is known that FoxP3 expression by $\gamma\delta$ T cells does not necessarily correlate with suppressive functions.³ The precise characterization of regulatory $\gamma\delta$ T cells would require investigating their ability to inhibit the proliferation of stimulated CD4+ $\alpha\beta$ T cells. An indirect regulatory role of $\gamma\delta$ T cells can be anticipated anyway through their IL17 secretion. Indeed, we found that $\gamma\delta$ T cells were skewed toward Th17 profile in melanoma, independently of external stimulation, and such polarization was associated with worse clinical outcome. Very interestingly, Th17-skewed $\gamma\delta$ T cells were reported to favor tumor escape by promoting breast cancer metastasis,³⁴ supporting accumulation of immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in colorectal cancer⁸ and angiogenesis.³⁵

Analysis of $\gamma\delta$ T cells' functionality in melanoma is controversial, revealing in blood either impaired cytokine secretion, altered cytotoxic activity and poor proliferative capacity,^{22,23} or preserved cytotoxic potential associated with limited cytokine secretion upon stimulation.^{22,26} In tumors one study reported a strong production of pro-inflammatory cytokines (IFN γ and TNF α) together with potent cytotoxic activity.²¹ We demonstrated that melanoma severely impaired the ability of $\gamma\delta$ T cells to exhibit activation molecules and secrete cytokines in response to stimulation, and altered their cytotoxic potential toward melanoma tumor cells. Discrepancies between studies may reflect the nature of the samples (melanoma staging, purified untouched $\gamma\delta$ T cells or $\gamma\delta$ T-cell lines generated upon 10days culture with IPP and IL2), the comparison group (HD or not), the type of stimulation performed (phosphoantigens or PMA/ionomycin), the way to measure cytotoxic activity (CD107 exposure by $\gamma\delta$ T cells, perforin secretion, or annexinV/iodure propidium-based viability of target cells), and the target cell used. Most of the functional evaluations in previous studies were performed on $\gamma\delta$ T cell lines which may not be representative of the state of the $\gamma\delta$ T cells *in situ*. We used $\gamma\delta$ T cells directly upon their purification which is more likely to represent their status within melanoma microenvironment. Our observation of a higher proportion of cytotoxic CD56+ $\gamma\delta$ T cells in blood of melanoma patients is in line with a previous study showing elevated numbers of circulating cytotoxic $\gamma\delta$ T cells defined as being CD28 negative and harboring a high perforin content.²⁸ It has been shown that CD56-expressing cells display strong effector functions including Th1 cytokine production and cytotoxic capacity,³⁶ especially CD56+ V γ 9 δ 2 T cells harbor superior cytotoxic activity compared to their CD56-counterparts.^{37,38}

For the first time, we investigated the expression of a large panel of NCR, KIR, and immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells in the context of melanoma, and highlighted crucial clinical correlations. Circulating- and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients exhibited higher levels of inhibitory receptors NKG2A and/or NKp30, but also expressed more of activating NCR NKp44 and/or NKp46 compared to control groups. We also surprisingly identified that high proportions of NKp44+ circulating $\gamma\delta$ T cells were predictive of poor clinical outcomes. Such modulated NCR and KIR expression will affect their capacity to recognize and kill target tumor cells. Notably, splice variants of human NCR encoding receptor isoforms with inhibitory functions have been recently discovered,³⁹ influencing outcomes in many immunopathological contexts.⁴⁰ Such differential splicing arises in some tissue microenvironments where inhibitory NCR are triggered by specific ligands, as this is the case for the inhibitory isoform of NKp44 that cross-link Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) on tumor cells, a ligand expressed by many cancer types. Interestingly, the inhibitory form of NKp44 has been found on tumor-infiltrating NK cells,⁴⁰ and blocking the interaction NKp44-PCNA results in inhibition of tumor growth including melanoma in mouse models.⁴¹ Hence, NCR can be considered as novel innate immune checkpoints, which, based on our results, offer an exciting potential therapeutic target to manipulate in cancer.

We also observed higher proportions of circulating $\gamma\delta$ T cells expressing 4-1BB, TIM3, LAG3 and ICOSL, and higher proportions of TIM3+ and LAG3+ tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients compared to control groups. We clearly identified that high proportions of PD1+ and 4-1BBL + circulating- or tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells were predictive of poor clinical outcomes. Such correlates were known for PD1-expressing classical $\alpha\beta$ T cells, but have never been reported for $\gamma\delta$ T cells before. Of note, one study reported that the expression of 41BBL could predict patient outcome in acute myeloid leukemia.⁴² Our work revealed that PD1, 41BB/41BBL, TIM3, and LAG3 are crucial checkpoints on $\gamma\delta$ T cells allowing immune escape and tumor progression. These observations thus pointed out that $\gamma\delta$ T cells may be interesting cells to look at in the context of current immunotherapies with immune checkpoint blockers, as they displayed a perturbed immune checkpoint panel expression and could be targeted by these therapies. Our data also validate a combinatorial therapeutic approach as three major inhibitory immune checkpoints that currently undergo clinical developments are expressed by tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells.⁴³

Such phenotypic and functional alterations of $\gamma\delta$ T cells driven by melanoma may contribute to an inefficient antitumor immune response, by directly impairing killing of tumor cells and by altering subsequent interactions of $\gamma\delta$ T cells with other immune effectors. Melanoma disables $\gamma\delta$ T cells by altering their antitumor potentialities, by actively driving them toward a Th17 profile, or by skewing their immune checkpoint expression. Despite their hijacking by melanoma, positive correlates of some $\gamma\delta$ T features with clinical outcome revealed them as crucial antitumor effectors, which prompt their use as vectors or targets for cancer immunotherapy.¹⁸ $\gamma\delta$ T cells recognize stress-induced molecules and endogenous mevalonate metabolites in HLA-unrestricted manners, which accumulate in tumor cells and whose expression can be enhanced by bisphosphonates such as zoledronate.⁴⁴ By inhibiting the farnesyl pyrophosphate synthase, zoledronate blocks the mevalonate pathway, leading to accumulation of phosphoantigens favoring recognition and killing of tumor cells by $\gamma\delta$ T cells.⁴⁵ Such observations may foster the development of new therapeutic approaches using or targeting $\gamma\delta$ T cells. Successful clinical trials aiming at stimulating $\gamma\delta$ T cells with zoledronate such as in lymphoid malignancies,⁴⁶ prostate cancer,¹² breast cancer,⁴⁷ or at adoptively transferring ex-vivo expanded $\gamma\delta$ T cells^{14,48} proved that $\gamma\delta$ T cell-based therapeutic approaches are promising to fight tumors and improve patient outcome.

Thus $\gamma\delta$ T cells have a pivotal role in antitumor immune responses, but impairment of their potentialities may contribute to tumor escape from immunity. Altogether, our study demonstrates that melanoma hijacked $\gamma\delta$ T cells to escape from immune control. Yet $\gamma\delta$ T cells have the potential to exhibit potent antitumor activity to successfully drive favorable clinical outcome. A better understanding of the functional plasticity of $\gamma\delta$ T cells may help designing new therapeutic approaches exploiting the potential of $\gamma\delta$ T cells while counteracting their skewing by tumor cells.

Patients and methods

Melanoma patients and healthy donor (HD)' samples

Blood and tumor (primary tumor, cutaneous metastases and lymph node metastases) samples not needed for pathological investigations were obtained from 46 and 44 melanoma patients respectively, stage I–IV. Patients were staged according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for melanoma 2009 (V7). Clinical features are shown in Supplementary Tables S1 and S2. Progression free survival (PFS) and overall survival (OS) were calculated both from diagnosis and sampling time. Patients who underwent more than one relapse between diagnosis date and date of death/last news were removed when analyzing survival based on PFS calculated from diagnosis time ($n = 3$ patients) because PFS from diagnosis time could relate to the first or second relapse, and the PFS calculated from sampling time will be higher than the PFS calculated from diagnosis time. Blood samples were also obtained from 25 healthy volunteers (HD), and lymph nodes tissues (tonsils) obtained from 9 volunteers who underwent tonsillectomy due to repeating angina. PBMCs were purified by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation (Eurobio). Tumor samples were mechanically dilacerated and digested with 2 mg/ml collagenase-D (Roche) 20U/ml DNase (Sigma). The resulting tumor-infiltrating cell suspensions were filtered and washed. Small whole tumor fragments (10 mm³) were incubated 24 h in complete RPMI1640 10% FCS (Invitrogen) to generate tumor supernatants. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the Ethics committee of Grenoble University Hospital and the French Blood Agency's Institutional Review Board and declared under the reference #DC-2008–787. All participants signed informed consent forms.

Tumor cell lines

Human melanoma lines COLO829 and A375 were purchased from ATCC (LGC-Standards). Cultures were performed in RPMI1640-Glutamax (Invitrogen) supplemented with 1% nonessential amino-acids, 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 100 µg/ml gentamycin, and 10% FCS (Invitrogen).

Phenotypic analysis

Phenotypic analyses were performed on both cutaneous tumors (primary tumor and metastases) and lymph node metastases. Cell suspensions were stained with anti-human antibodies in PBS 2% FCS. Total $\gamma\delta$ T cells were identified as CD45⁺ CD3⁺ panTCR $\gamma\delta$ ⁺, and further divided into δ 2⁺ and δ 2⁻ subsets using the corresponding antibodies (Abs). The features of $\gamma\delta$ T cells were analyzed using anti-human antibodies and their isotype-matched controls: the basal activation status was determined using anti-CD40 (Beckman), -CD86, -CD69, -CD25 (BD) Abs; immune checkpoints were analyzed using anti-OX40, -OX40L, -ICOS, -41BB, -41BBL, -PD1, -PDL1, -PDL2 (BD), -ICOSL, -TIM3, -CTLA4, -LAG3 (eBiosciences) Abs; activating and inhibitory NKR were

depicted using anti-NKG2A, -NKG2C (BioTechne), NKG2D (BD), NKp30, NKp44, NKp46 (Beckman) Abs; differentiation stage was assessed by labelling with anti-CD27 and -CD45RA Abs (BD); regulatory $\gamma\delta$ T cells were evaluated using FoxP3 intranuclear labelling (eBiosciences) and cytotoxic $\gamma\delta$ T cells using CD56 labelling (BD). Suspensions were subjected to flow cytometry analysis using a FACS CantoII and DIVA software (BD). To ensure quality control during the study, we performed a systematic standardization of the fluorescence intensities using cytometer setup and tracking beads (CST) (BD).

Functional assays

Functional studies were performed only from lymph node metastases. To perform functional assays, $\gamma\delta$ T cells were purified using EasySep human $\gamma\delta$ T-cell enrichment kit (StemCell) according to manufacturer's instructions. The purity obtained was routinely above 95%. In some experiments, purified $\gamma\delta$ T cells from HD were pre-incubated with supernatants derived from melanoma tumors (50% in volume) for 24 h before performing functional assays.

Response to stimulation

Purified $\gamma\delta$ T cells were resuspended at 1.10⁶/ml in complete RPMI1640 10% FCS and cultured for 24 h alone or with phosphoantigens, isopentyl pyrophosphate (IPP, 80 µM) (Sigma) or 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-pyrophosphate (HMB-PP, 200 nM) (Sigma) together with IL2 (0.1 UI/ml) (Peprotech), or PMA (20 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) (Sigma). The activation phenotype of $\gamma\delta$ T cells was analyzed using anti-CD40 (Beckman), -CD69, -CD25 (BD) antibodies. Human soluble IL4, IL10, IL17-A, IFN γ , TNF α , TGF β , and granzyme B production were measured in culture supernatants by a Cytometric Bead Array assay (CBA, BD).

Cytotoxic activity

$\gamma\delta$ T cells cytotoxic activity was evaluated by a CD107 degranulation assay and perforin measurement upon coculture with target cells. Upon stimulation of purified $\gamma\delta$ T cells as previously described, the cells were washed and cocultured with melanoma tumor cells (A375, COLO829) in a 20:1 ratio for 5 h. Anti-human CD107a/b Abs (BD) were added at the start of the coculture together with GolgiSTOP (BD) for the last 4h. The cells were then labeled with CD45, CD3, panTCR $\gamma\delta$ Abs (BD) before flow cytometry analysis. Perforin production was evaluated in the coculture supernatants using Human PRF1 ELISA kit (AbCam).

Statistical analysis

The statistical analyses were performed by Prism software using the Mann-Whitney test, the nonparametric U test, the Wilcoxon matched *t*-test, the one-way ANOVA, the Kruskal-Wallis nonparametric test, the Spearman correlation and the Log-rank test. Cox regressions, principal components analyses (PCA) and heatmap were done in Rstudio using the packages FactoMineR and p heatmap.

Acknowledgments

We are grateful to the surgeons of CHU Grenoble Alpes for providing tumor samples. We thank Pr Righini and his team for providing tonsil samples, and Pr Nicole Pinel and Corinne Lucas from the Institute of Biology and Pathology for their active participation in this study. We thank Dr D. Legrand and her staff at EFS Auvergne Rhone-Alpes for providing healthy volunteers' blood samples. We thank the patients and healthy donors who consented to participate in this study.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors report no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the Etablissement Français du Sang [2016-2018]; Ligue Contre le Cancer [AO 2015]; Société française de Dermatologie [AO 2015].

References

- Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:88–100. doi:10.1038/nri3384.
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:467–478. doi:10.1038/nri2781.
- Wesch D, Peters C, Siegers GM. Human gamma delta T regulatory cells in cancer: fact or fiction? *Front Immunol.* 2014;5:598. doi:10.3389/fimmu.2014.00598.
- Hannani D, Ma Y, Yamazaki T, Dechanet-Merville J, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 2012;33:199–206. doi:10.1016/j.it.2012.01.006.
- Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, Michaud HA, Gros L, Eliaou JF, Bonnefoy N. Plasticity of gammadelta T Cells: impact on the Anti-Tumor Response. *Front Immunol.* 2014;5:622. doi:10.3389/fimmu.2014.00622.
- Rei M, Pennington DJ, Silva-Santos B. The emerging Protumor role of gammadelta T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 2015;75:798–802. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3228.
- Ma S, Cheng Q, Cai Y, Gong H, Wu Y, Yu X, Shi L, Wu D, Dong C, Liu H. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2014;74:1969–1982. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2534.
- Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, Wang Z, Wang C, Zhang Z, Xia W, et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity.* 2014;40:785–800. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.013.
- Peng G, Wang HY, Peng W, Kiniwa Y, Seo KH, Wang RF. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity.* 2007;27:334–348. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.020.
- Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Wevers E, Schwartz T, Hunborg P, Varvaes MA, Hofst DF, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol.* 2012;189:5029–5036. doi:10.4049/jimmunol.1201892.
- Kobayashi H, Tanaka Y. gammadelta T cell immunotherapy-a review. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015;8:40–61. doi:10.3390/ph8010040.
- Dieli F, Vermijlen D, Fulfarò F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, et al. Targeting human {gamma}delta} T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67:7450–7457. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0199.
- Laggner U, Lopez JS, Perera G, Warbey VS, Sita-Lumsden A, O'Doherty MJ, Hayday A, Harries M, Nestle FO. Regression of melanoma metastases following treatment with the n-bisphosphonate zoledronate and localised radiotherapy. *Clin Immunol.* 2009;131:367–373. doi:10.1016/j.clim.2009.01.008.
- Donia M, Ellebaek E, Andersen MH, Straten PT, Svane IM. Analysis of Vdelta1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2012;1:1297–1304. doi:10.4161/onci.21659.
- Lozupone F, Pende D, Burgio VL, Castelli C, Spada M, Venditti M, Luciani F, Lugini L, Federici C, Ramoni C, et al. Effect of human natural killer and gammadelta T cells on the growth of human autologous melanoma xenografts in SCID mice. *Cancer Res.* 2004;64:378–385.
- Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, Minato N, Toma H. 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.* 2007;56:469–476. doi:10.1007/s00262-006-0199-6.
- Hoeres T, Smetak M, Pretscher D, Wilhelm M. Improving the efficiency of Vgamma9Vdelta2 T-cell immunotherapy in cancer. *Front Immunol.* 2018;9:800. doi:10.3389/fimmu.2018.00800.
- Fisher JP, Heuveljans J, Yan M, Gustafsson K, Anderson J. gammadelta T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology.* 2014;3:e27572. doi:10.4161/onci.27572.
- Kabelitz D, Glatzel A, Wesch D. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;122:1–7. doi:10.1159/000024353.
- Yazdi AS, Morstedt K, Puchta U, Ghoreschi K, Flaig MJ, Rocken M, Sander CA. Heterogeneity of T-cell clones infiltrating primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol.* 2006;126:393–398. doi:10.1038/sj.jid.5700082.
- Cordova A, Toia F, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Rinaldi G, Todaro M, Cicero G, Zichichi L, Donni PL, et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One.* 2012;7:e49878. doi:10.1371/journal.pone.0049878.
- Argentati K, Re F, Serresi S, Tucci MG, Bartozzi B, Bernardini G, Provinciali M. Reduced number and impaired function of circulating gamma delta T cells in patients with cutaneous primary melanoma. *J Invest Dermatol.* 2003;120:829–834. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12141.x.
- Petrini I, Pacini S, Galimberti S, Taddei MR, Romanini A, Petrini M. Impaired function of gamma-delta lymphocytes in melanoma patients. *Eur J Clin Invest.* 2011;41:1186–1194. doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02524.x.
- Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Haehnel K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, Wong P, Romano E, Khammari A, Dreno B, et al. Proportions of blood-borne Vdelta1+ and Vdelta2+ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer.* 2016;64:116–126. doi:10.1016/j.ejca.2016.06.001.
- Re F, Donnini A, Bartozzi B, Bernardini G, Provinciali M. Circulating gammadelta T cells in young/adult and old patients with cutaneous primary melanoma. *Immun ageing: I & A.* 2005;2:2. doi:10.1186/1742-4933-2-2.
- Toia F, Buccheri S, Anfosso A, Moschella F, Dieli F, Meraviglia S, Cordova A, Shiku H. Skewed differentiation of circulating Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes in melanoma and impact on clinical outcome. *PLoS One.* 2016;11:e0149570. doi:10.1371/journal.pone.0149570.
- Dieli F, Stassi G, Todaro M, Meraviglia S, Caccamo N, Cordova A. Distribution, function and predictive value of tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2013;2:e23434. doi:10.4161/onci.23434.

28. Campillo JA, Martinez-Escribano JA, Minguela A, Lopez-Alvarez R, Marin LA, Garcia-Alonso AM, Bensussan A, Alvarez-López MR. Increased number of cytotoxic CD3+ CD28- gammadelta T cells in peripheral blood of patients with cutaneous malignant melanoma. *Dermatology*. 2007;214:283–288. doi:10.1159/000100878.
29. Wistuba-Hamprecht K, Di Benedetto S, Schilling B, Sucker A, Schadendorf D, Garbe C, Weide B, Pawelec G. Phenotypic characterization and prognostic impact of circulating gammadelta and alphabeta T-cells in metastatic malignant melanoma. *Int J Cancer Suppl*. 2016;138:698–704. doi:10.1002/ijc.29818.
30. Bachelez H, Flageul B, Degos L, Boumsell L, Bensussan A. TCR gamma delta bearing T lymphocytes infiltrating human primary cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol*. 1992;98:369–374.
31. Bialasiewicz AA, Ma JX, Richard G. Alpha/beta- and gamma/delta TCR(+) lymphocyte infiltration in necrotising choroidal melanomas. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:1069–1073.
32. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. 2001;294:605–609. doi:10.1126/science.1063916.
33. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med*. 2003;198:433–442. doi:10.1084/jem.20030584.
34. Coffelt SB, Kersten K, Dornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, Verstegen NJM, Ciampricotti M, Hawinkels LJAC, Jonkers J, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;522:345–348. doi:10.1038/nature14282.
35. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Nishimura T. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur J Immunol*. 2010;40:1927–1937. doi:10.1002/eji.200940157.
36. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol*. 2017;8:892. doi:10.3389/fimmu.2017.00892.
37. Qin G, Liu Y, Zheng J, Xiang Z, Ng IH, Malik Peiris JS, Lau Y-L, Tu W. Phenotypic and functional characterization of human gammadelta T-cell subsets in response to influenza A viruses. *J Infect Dis*. 2012;205:1646–1653. doi:10.1093/infdis/jis253.
38. Alexander AA, Maniar A, Cummings JS, Hebbeler AM, Schulze DH, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, Chapoval AI. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ {gamma}{delta} T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4232–4240. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4912.
39. Shemesh A, Brusilovsky M, Kundu K, Ottolenghi A, Campbell KS, Porgador A. Splice variants of human natural cytotoxicity receptors: novel innate immune checkpoints. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67:1871–1883. doi: 10.1007/s00262-017-2104-x.
40. Pazina T, Shemesh A, Brusilovsky M, Porgador A, Campbell KS. Regulation of the functions of natural cytotoxicity receptors by interactions with diverse ligands and alterations in splice variant expression. *Front Immunol*. 2017;8:369. doi:10.3389/fimmu.2017.00369.
41. Shemesh A, Kundu K, Peleg R, Yossef R, Kaplanov I, Ghosh S, Khrapunsky Y, Gershoni-Yahalom O, Rabinski T, Cerwenka A, et al. NKP44-derived peptide binds proliferating cell nuclear antigen and mediates tumor cell death. *Front Immunol*. 2018;9:1114. doi:10.3389/fimmu.2018.01114.
42. Schmohl JU, Nuebling T, Wild J, Kroell T, Kanz L, Salih HR, Schmetzer H. Expression of 4-1BB and its ligand on blasts correlates with prognosis of patients with AML. *J Investig Med*. 2016;64:1252–1260. doi:10.1136/jim-2016-000081.
43. Antonia SJ, Vansteenkiste JF, Moon E. Immunotherapy: beyond Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:e450–8. doi:10.1200/EDBK_158712.
44. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 2003;197:163–168.
45. Benzaid I, Monkkonen H, Stresing V, Bonnelye E, Green J, Monkkonen J, Touraine J-L, Clézardin P. High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer Res*. 2011;71:4562–4572. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3862.
46. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T, Tony H-P. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*. 2003;102:200–206. doi:10.1182/blood-2002-12-3665.
47. Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G, La Mendola C, Guggino G, D'Asaro M, Orlando V, et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*. 2010;161:290–297. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04167.x.
48. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Galea C, Salot S, Saiagh S, Audrain M, Rimbart M, et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57:1599–1609. doi:10.1007/s00262-008-0491-8.

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1: Relationship between circulating/tumor-infiltrating T δ 2+ subset or regulatory $\gamma\delta$ T cells and stage of disease or clinical evolution

The proportion of $\gamma\delta$ T including T δ 2+ subset as well as their regulatory status was evaluated by flow cytometry in blood and tumor of melanoma patients. $\gamma\delta$ T cells were identified as CD45+ CD3+ TCR $\gamma\delta$ + and subdivided into T δ 2+ and T δ 2- subset using TCR δ 2 labeling. The regulatory status was assessed using CD25 and FoxP3 markers. (A) Comparative proportions of $\gamma\delta$ T cells in cutaneous or lymph node metastasis of melanoma patients and tonsils (% within CD45+ cells). (B) Comparative T δ 2+/T δ 2- ratio in blood of melanoma patients according to stage of disease at sampling time. (C) Comparative proportions of CD25+ FoxP3+ regulatory $\gamma\delta$ T cells in blood of melanoma patients according to disease staging at sampling time. P values calculated using the Mann-Whitney test.

Supplementary Figure 2: Evaluation of the differentiation stage and regulatory phenotype of $\gamma\delta$ T cells in blood and tumor samples

(A) The differentiation stage of $\gamma\delta$ T cells in blood and tumor samples from melanoma patients was evaluated by flow cytometry using CD45RA and CD27 markers: naïve (CD45RA+ CD27+), CM (CD45RA- CD27+), EM (CD45RA- CD27-) and EMRA (CD45RA+ CD27-). Dotplots are pre-gated on CD45+ CD3+ TCR $\gamma\delta$ + cells. (B) The regulatory status of $\gamma\delta$ T cells in blood and tumor samples from melanoma patients was evaluated by flow cytometry using CD25 and FoxP3 markers. Dotplots are pre-gated on CD45+ CD3+ TCR $\gamma\delta$ + cells.

Supplementary Figure 3: Evaluation of the expression of NCR, KIR and immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells

The expression of NCR, KIR and immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients, and blood and tonsils samples from healthy donors (HD). Dotplots are pre-gated on CD45⁺ CD3⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells. (A) NKG2A expression, (B) NKp44 expression, (C) TIM3 expression and (D) LAG3 expression.

Supplementary Figure 4: Cross-correlations between of NCR and KIR expression by $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients and relations with clinical outcome

The expression of KIR and NCR by $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients. (A) Correlation between NKG2A- and NKp30-expressing tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells. Spearman correlation. (B) Comparative proportions of circulating $\gamma\delta$ T cells expressing NKp44 according to disease staging at sampling time. P values calculated using the Mann-Whitney test. (C) Comparative proportions of NKp30- and NKp44-expressing $\gamma\delta$ T cells in blood according to the time to progress from diagnosis time (short PFS: ≤ 5 years, long PFS: > 5 years) (upper panels) and sampling time (short PFS: ≤ 6 months, long PFS: > 6 months) (lower panels).

Supplementary Figure 5: Expression of immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients

The expression of immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells was evaluated by flow cytometry in blood and tumor samples from melanoma patients (black symbols), and blood and tonsils samples from healthy donors (white symbols). (A) Comparative proportions of $\gamma\delta$ T cells expressing OX40, OX40L, ICOS, PDL1 and PDL2. P-values calculated using the Mann-Whitney test. (B) Correlation between TIM3-, LAG3- and PD1-expressing tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells. Spearman correlation.

Supplementary Figure 6: Multidimensional analysis of $\gamma\delta$ T cell features in healthy donors and melanoma patients

(A) Heatmap representation of markers expressed by $\gamma\delta$ T cells in each group (light blue: blood of HD; yellow: blood of melanoma patients; red: tonsils; dark blue: tumor of melanoma patients). (B) Principal component analysis (PCA) performed on 19 parameters expressed by 59 samples from the four groups studied: light blue (HB)= blood of HD; yellow (MB): blood of melanoma patients; red (HT): tonsils; dark blue (MT): tumor of melanoma patients. Left panel: PCA score was displayed in the 2D scatter plot (PC1 versus PC2). Numbers referred to patient number listed in Supplementary Table S1 and S2. Right panel: relative contribution of variables accounting for the variability in the PC1 and PC2. (C) PCA performed on 19 parameters expressed by circulating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients (17 samples). Patients were separated according to the 75 percentile of PFS (calculated from the sampling date): blue = long PFS (>86.5 months), red = short PFS (<86.5 months). Left panel: PCA score was displayed in the 2D scatter plot (PC1 versus PC2). Right panel: relative contribution of variables accounting for the variability in the PC1 and PC2. (D) PCA performed on 19 parameters expressed by tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients (14 samples). Patients were separated according to the 75 percentile of PFS (calculated from the sampling date): blue = long PFS (>20 months), red = short PFS (<20 months). Left panel: PCA score was displayed in the 2D scatter plot (PC1 versus PC2). Right panel: relative contribution of variables accounting for the variability in the PC1 and PC2.

Supplementary Figure 7: Circulating and tumor-infiltrating T δ 2+ and T δ 2- cells from melanoma patients have an impaired ability to upregulate CD69 expression in response to phosphoantigens

$\gamma\delta$ T cells purified from blood of healthy donors (white symbols), or blood (grey symbols) and tumor samples (black symbols) from melanoma patients were activated or not by phosphoantigens (IPP, HMB-PP) or PMA/ionomycin for 20h. Percentage and MFI of CD69 were evaluated by flow cytometry on (A) T δ 2+ cells and (B) T δ 2- cells.

Supplementary Figure 8: Circulating and tumor-infiltrating T δ 2+ and T δ 2- cells from melanoma patients have an impaired ability to upregulate CD25 expression in response to activation

$\gamma\delta$ T cells purified from blood of healthy donors (white symbols), or blood (grey symbols) and tumor samples (black symbols) from melanoma patients were activated or not by phosphoantigens (IPP, HMB-PP) or PMA/ionomycin for 20h. Percentage and MFI of CD25 expression were evaluated by flow cytometry on (A) T δ 2+ cells and (B) T δ 2- cells.

Supplementary Figure 9: Cytokine secretion by circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients in response to stimulation

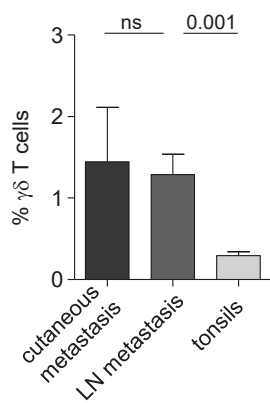
$\gamma\delta$ T cells purified from blood of healthy donors (white symbols), or blood (grey symbols) and tumor samples (black symbols) from melanoma patients were activated or not by phosphoantigens (IPP, HMB-PP) or PMA/ionomycin for 20h. Cytokine secretion was evaluated in the culture supernatants. Comparative cytokine secretion (IL4, IL10, TGF β) by $\gamma\delta$ T cells from healthy donors or melanoma patients. P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (straight line) or the Mann-Whitney test (dotted lines).

Supplementary Figure 10: Melanoma tumor cells impaired the capacity of $\gamma\delta$ T cells to mature and secrete cytokines in response to stimulation

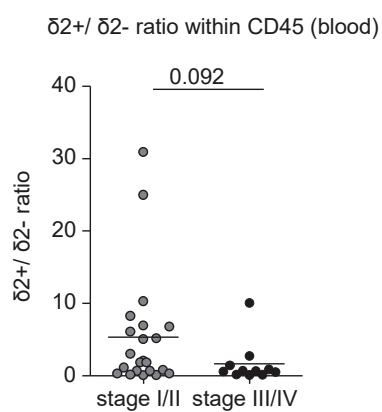
$\gamma\delta$ T cells purified from blood of healthy donors were pre-incubated or not for 24h with supernatants derived from melanoma tumors before being activated or not by phosphoantigens (IPP, HMB-PP) or PMA/ionomycin for 20h. Their capacity to mature, secrete cytokines and display a cytotoxic activity was then evaluated by flow cytometry. (A) Comparative expression of CD25 and CD69 (MFI of positive cells) on $\gamma\delta$ T cells upon activation following pre-incubation or not with melanoma tumors. (B,C) Comparative secretion of (B) IFN γ and (C) granzyme B by $\gamma\delta$ T cells upon activation following pre-incubation or not with melanoma tumors. (D) $\gamma\delta$ T cells were further cocultured with melanoma tumor cells (COLO829, A375 cell lines) in a 20:1 ratio for 5h with GolgiSTOP for the last 4h. Degranulation of $\gamma\delta$ T cells was assessed by adding CD107a/b Abs during the coculture and revealed by flow cytometry. P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test. n= 4 experiments performed with 9 melanoma supernatants.

Supplementary Figure 1

A

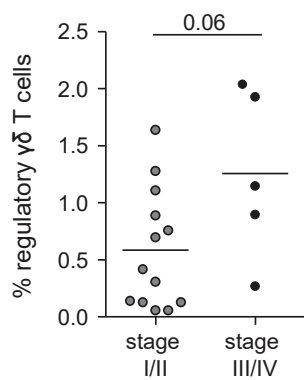


B



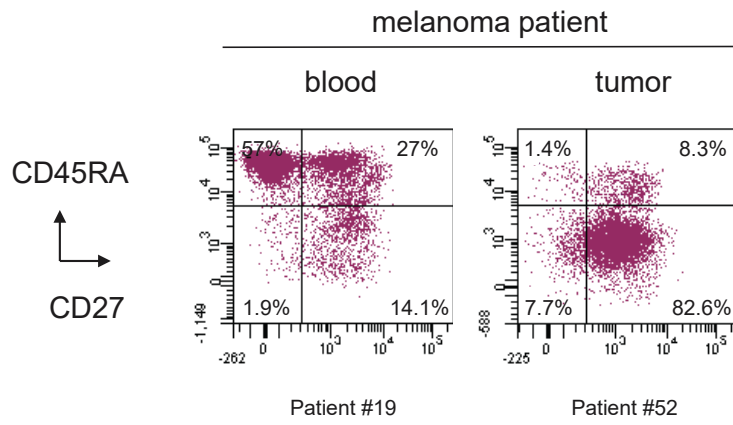
C

proportion regulatory $\gamma\delta$ T cells (blood)

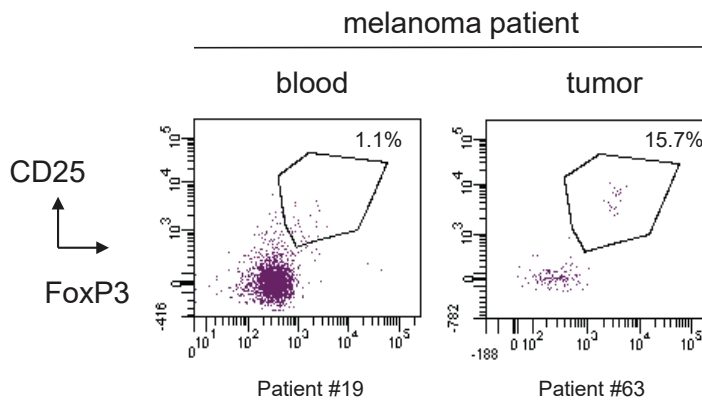


Supplementary Figure 2

A

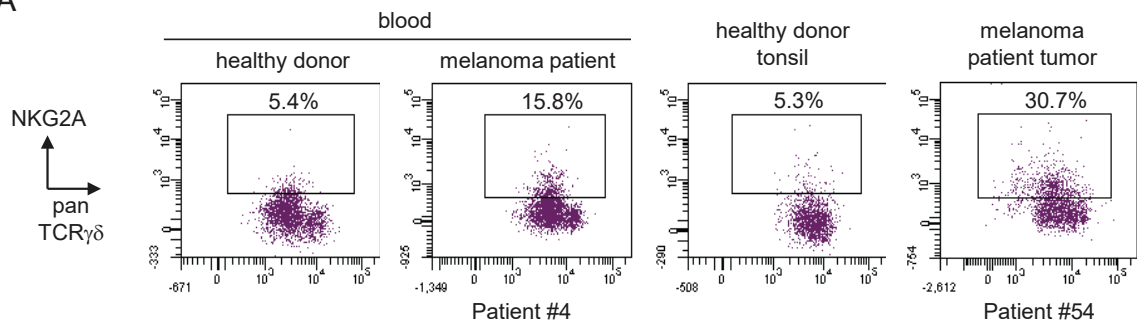


B

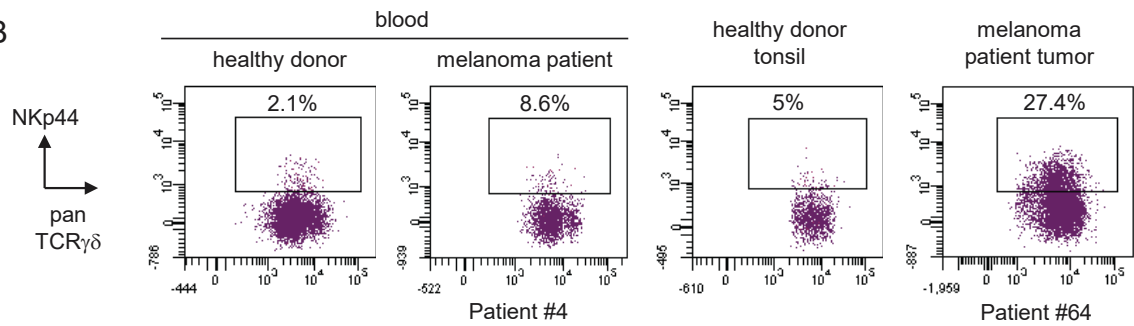


Supplementary Figure 3

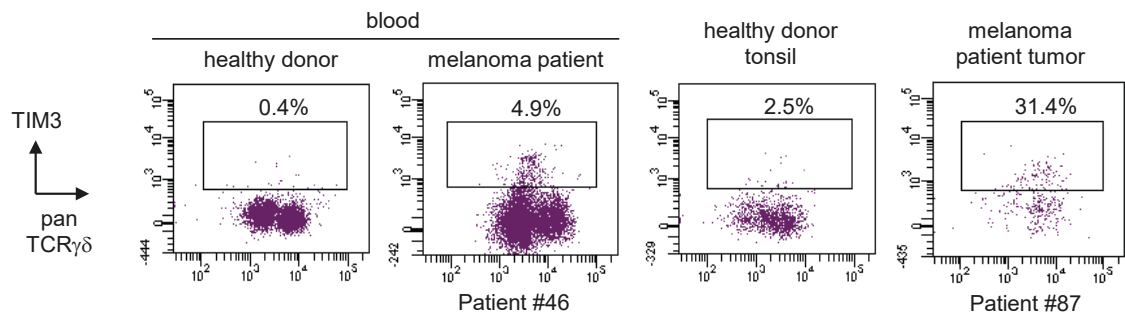
A



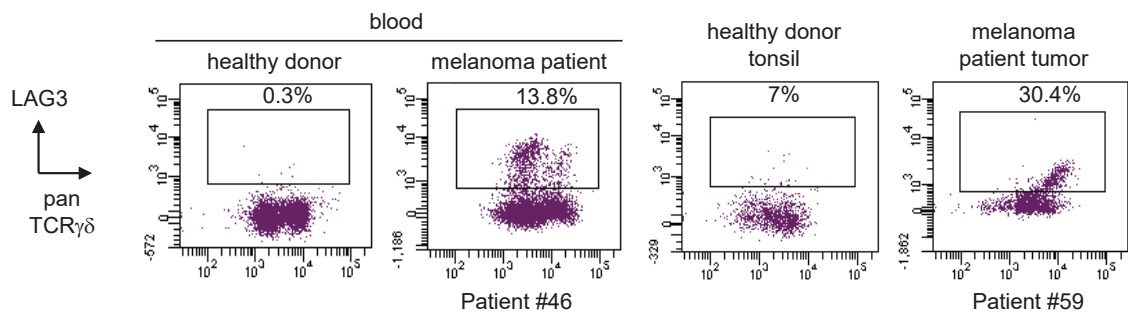
B



C

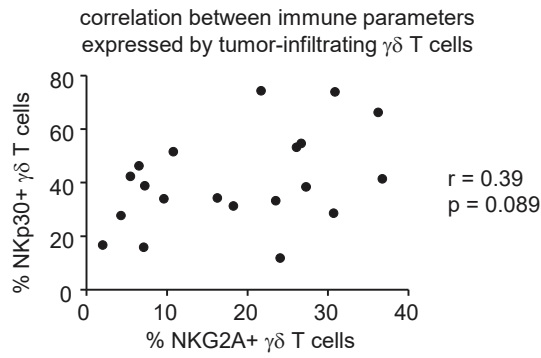


D

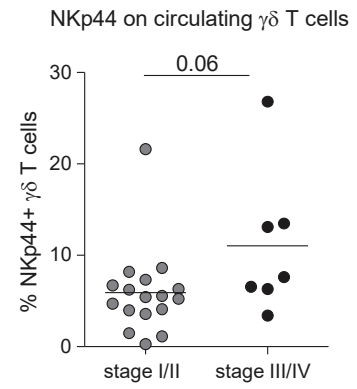


Supplementary Figure 4

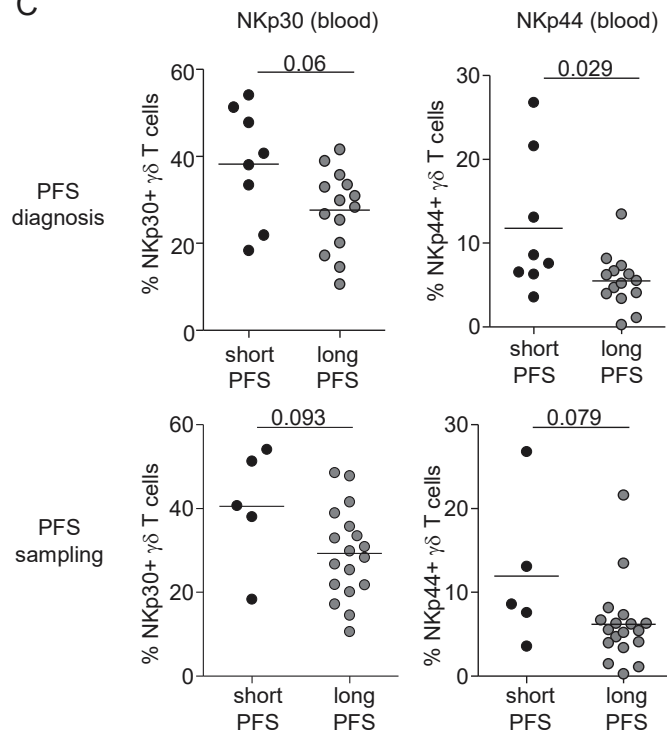
A



B

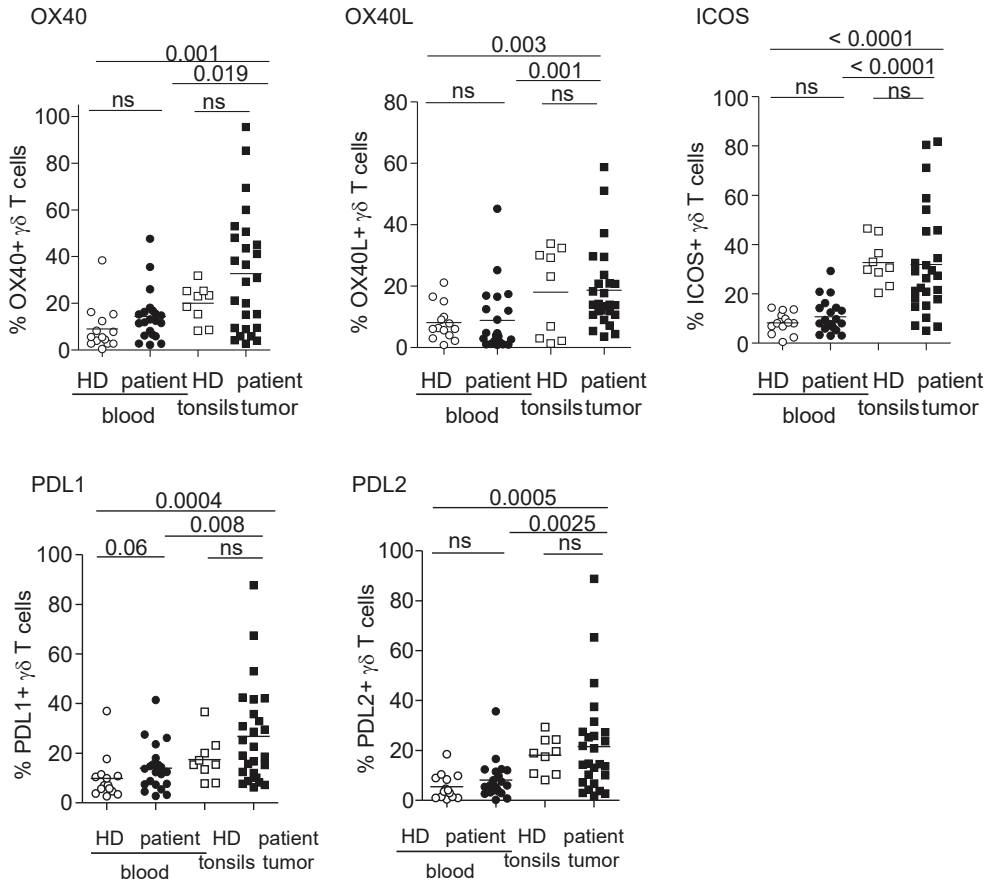


C



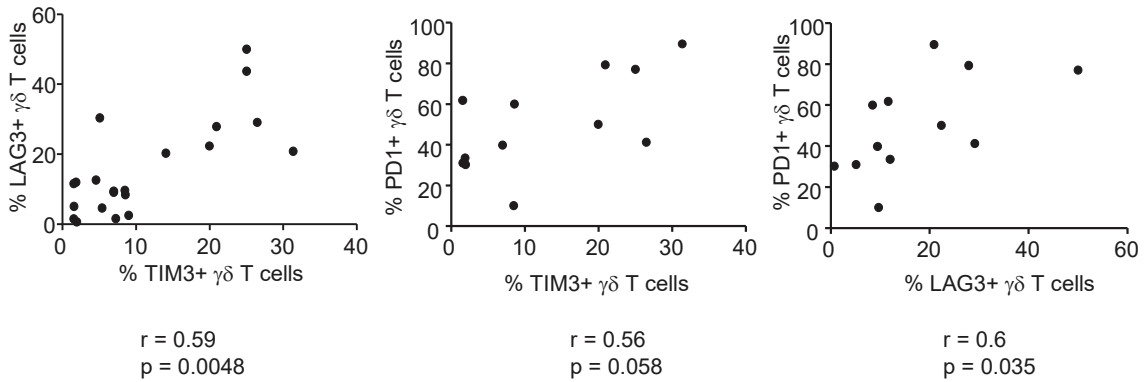
Supplementary Figure 5

A



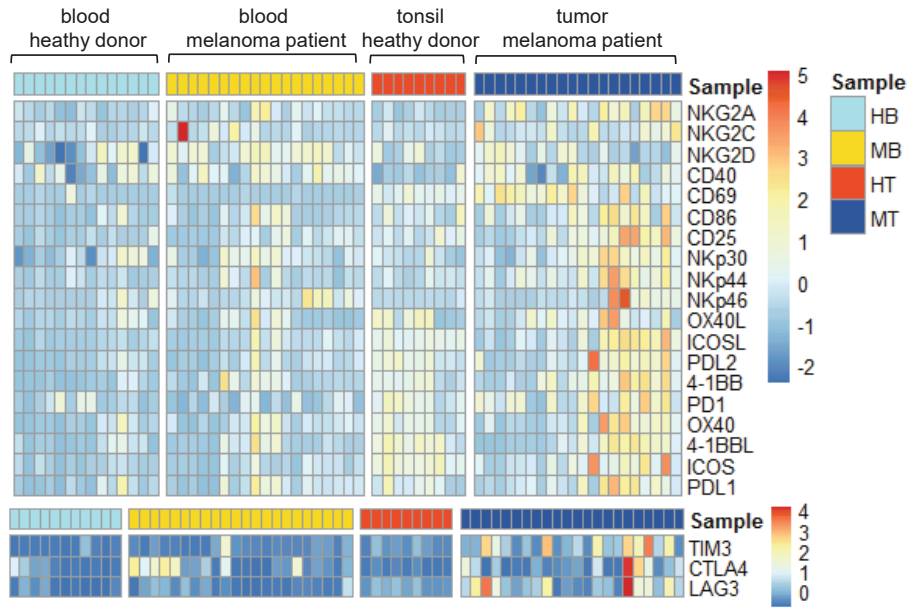
B

correlation within immune parameters expressed by tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells

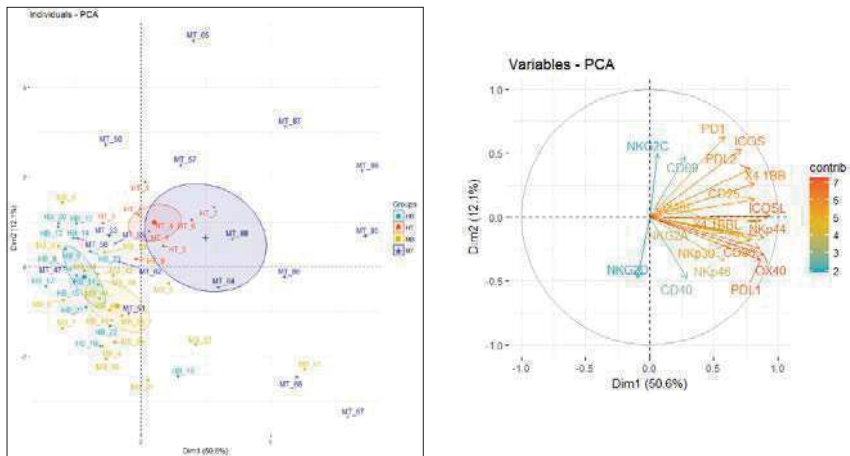


Supplementary Figure 6

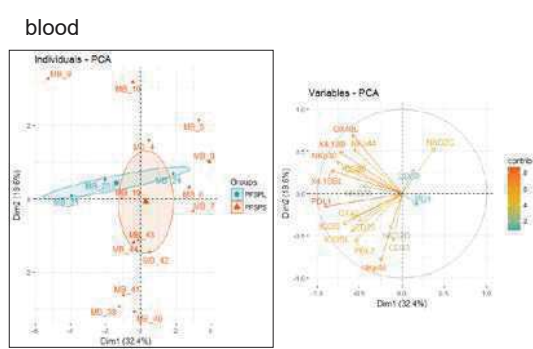
A



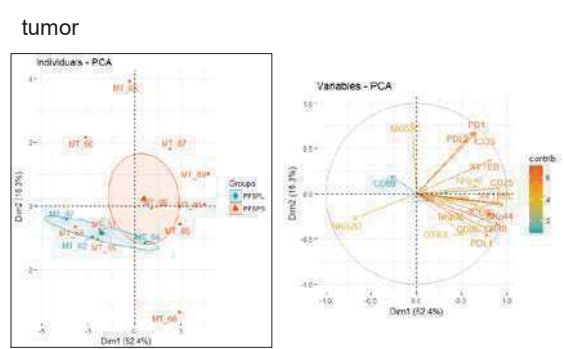
B



C



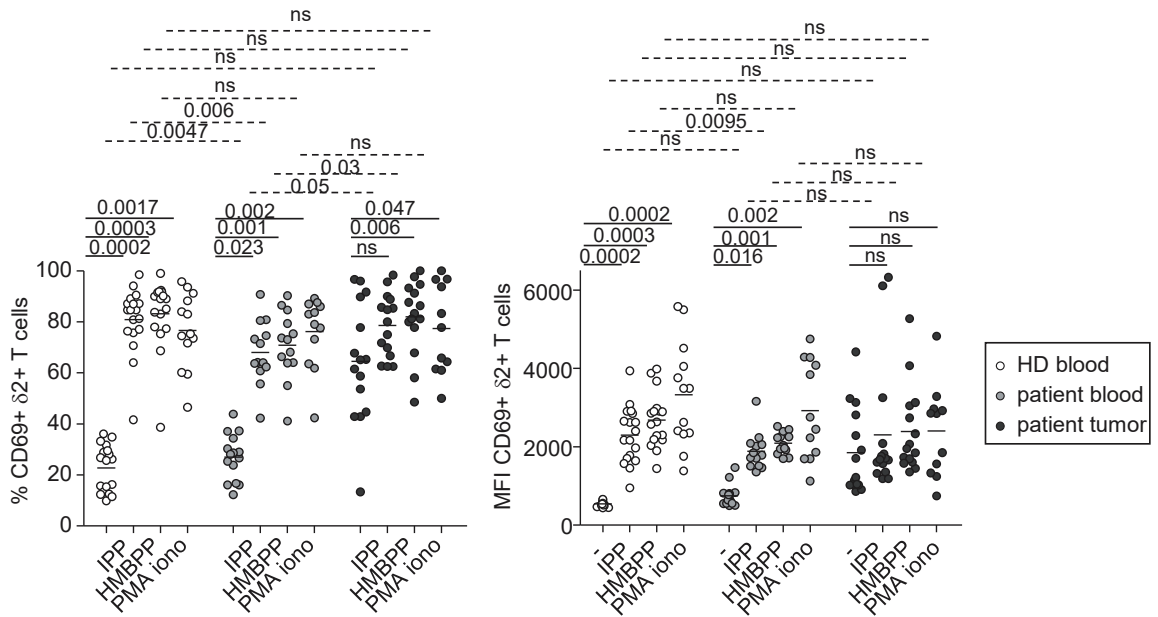
D



Supplementary Figure 7

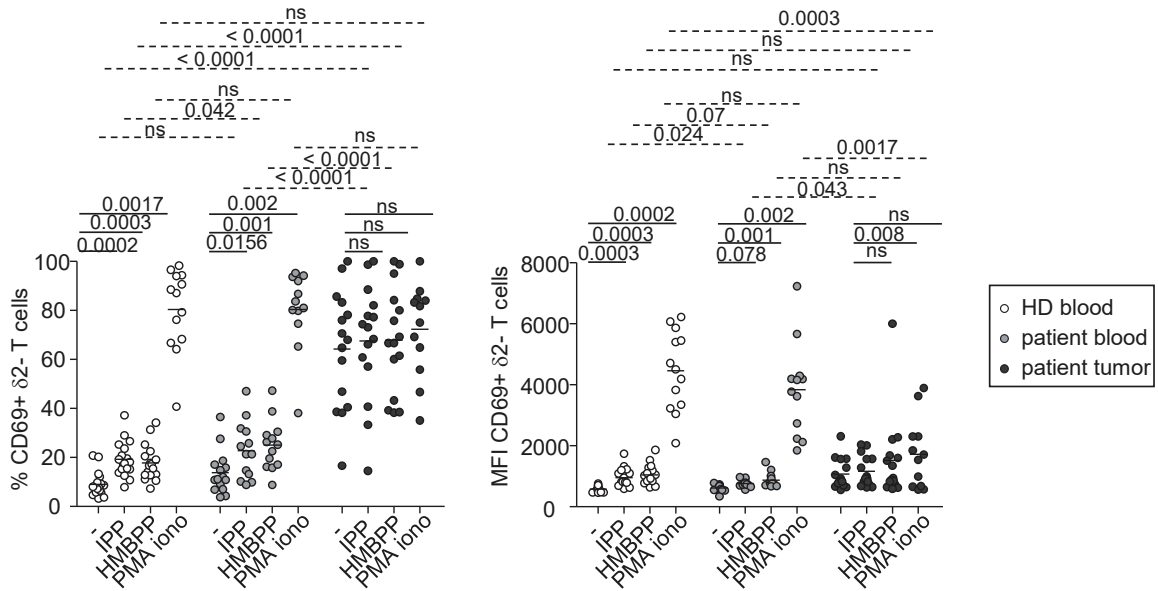
A

CD69 on $\delta 2^+$ T cells



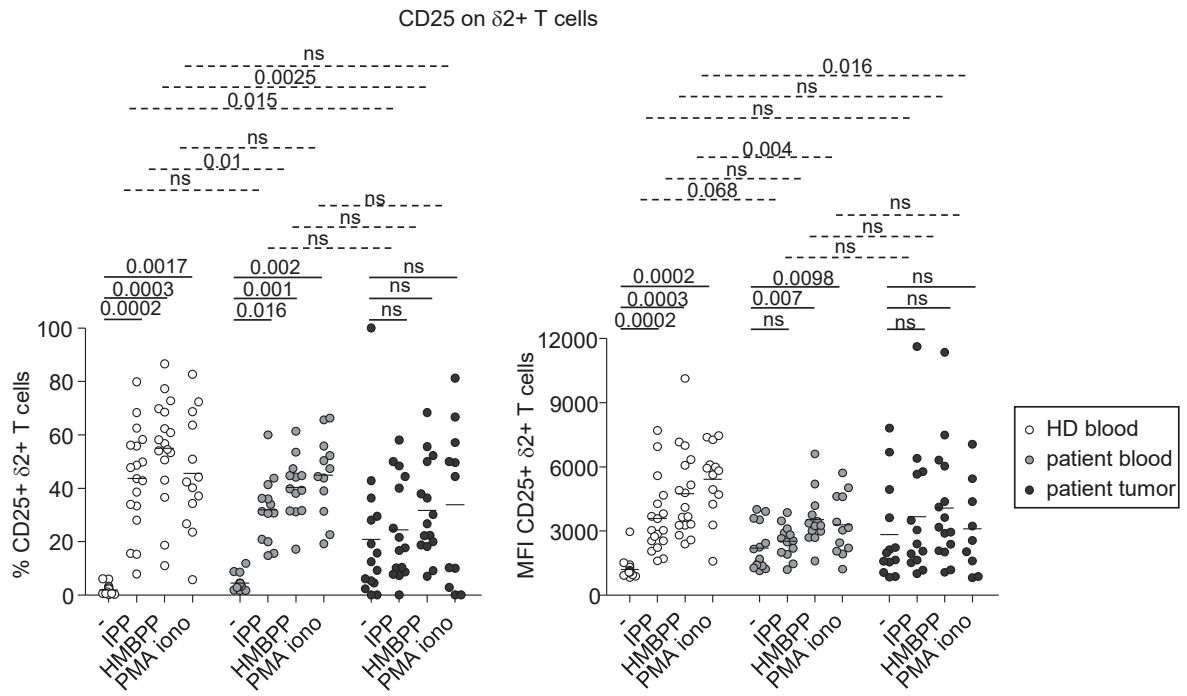
B

CD69 on $\delta 2^-$ T cells

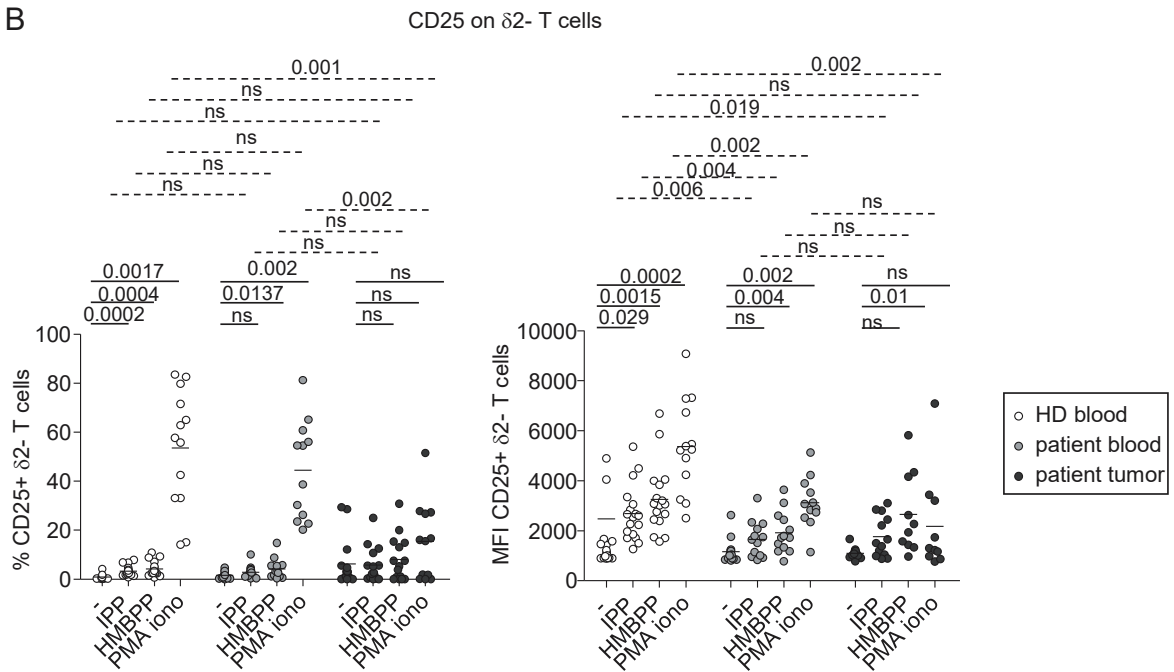


Supplementary Figure 8

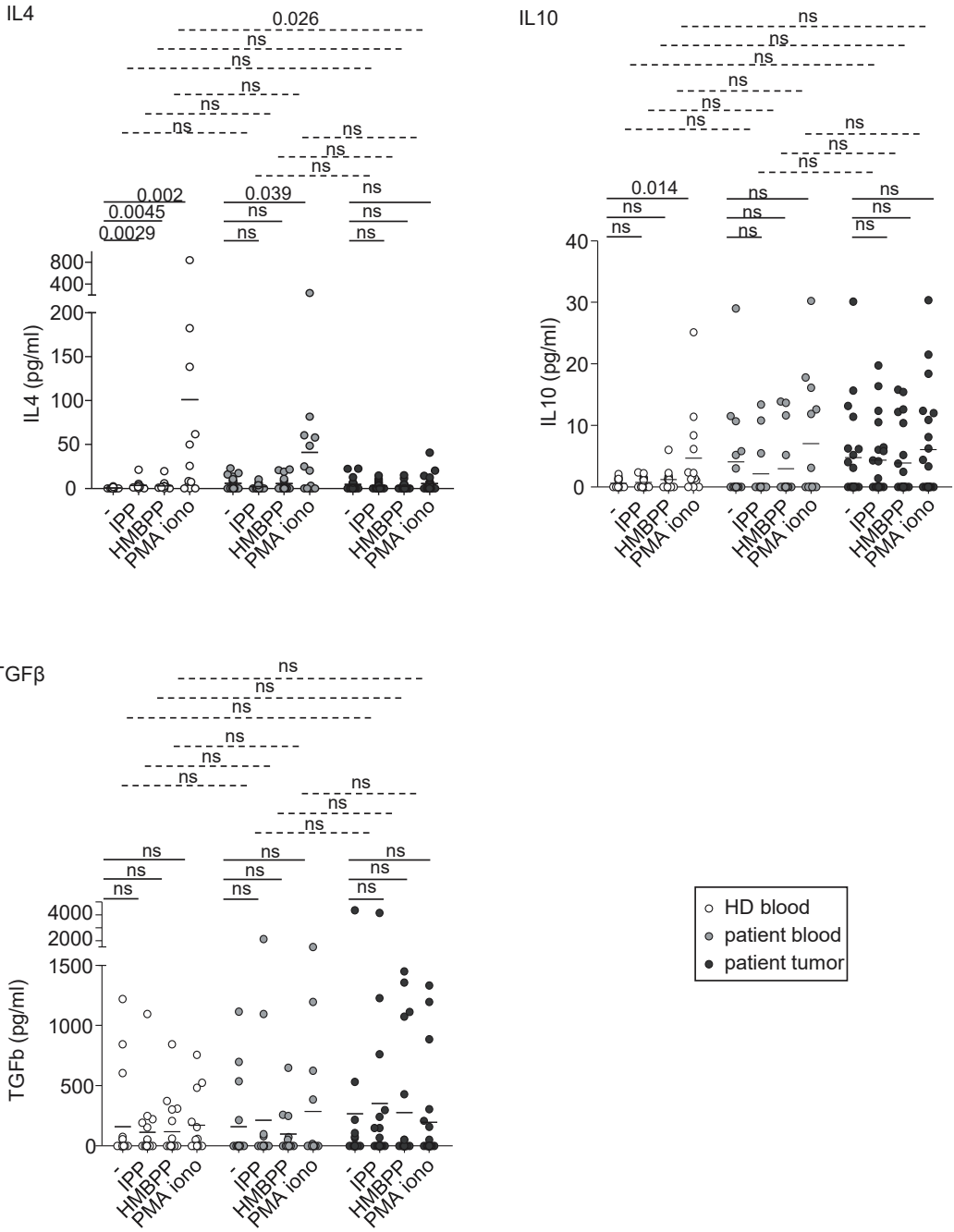
A



B

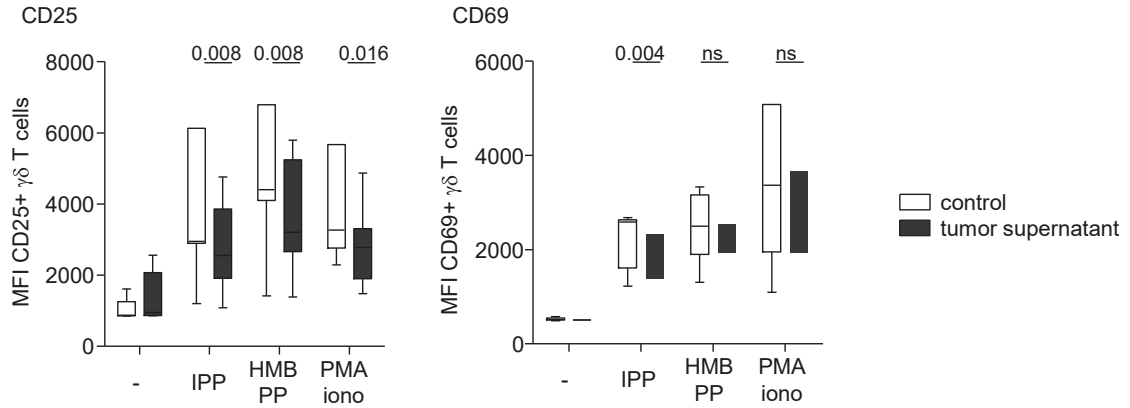


Supplementary Figure 9

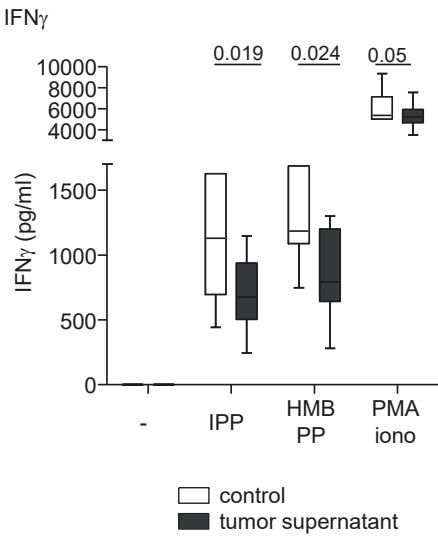


Supplementary Figure 10

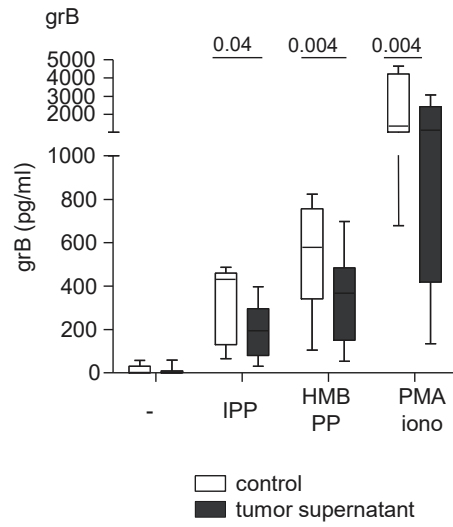
A



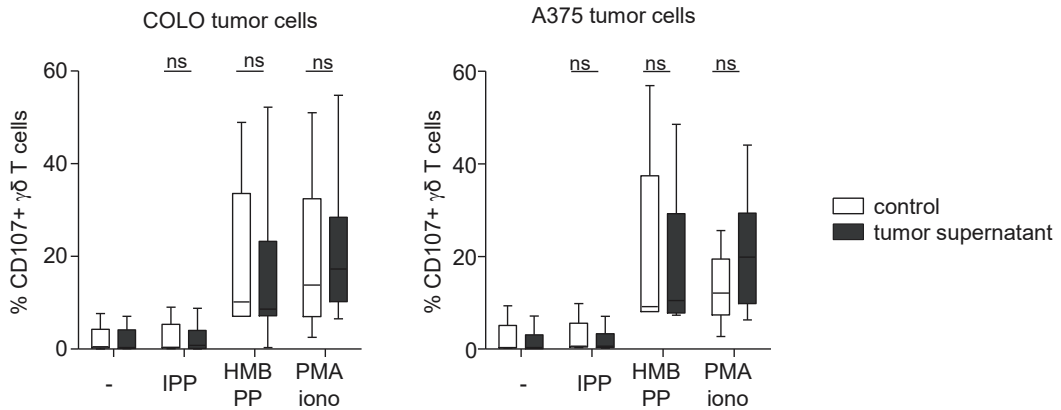
B



C



D



Supplementary Table 1:

Clinical features of patients from whom blood samples were used

patient #	type	gender	age (years)	breslow	clark	ulceration ^a	treatment before sampling	stage at sampling time ^b	from diagnosis time		from sampling time	
									PFS (months)	OS (months)	PFS (months)	OS (months)
1	PBMC	M	60	1.6	III	-	surgery	IB	>115	>115	>43	>43
2	PBMC	F	56	5	IV	-	surgery	Ib	>63	>63	>43	>43
3	PBMC	M	45	1.15	III	-	surgery	IB				
4	PBMC	F	49	0.3	II	-	surgery, chemotherapy ^c	IA	59	70	6	16
5	PBMC	M	80	13	IV	+	-	IIC	>70	>70	>42	>42
6	PBMC	M	67	0.96	III	-	-	IIIA	48	>250	>42	>42
7	PBMC	M	58	1.1	III	-	-	IB	>69	>69	>42	>42
8	PBMC	M	58	4	V	+	surgery	IIC	58	62	6	9
9	PBMC	M	57	14	V	-	surgery	IV	13	>52	1	>40
10	PBMC	M	43	1.5	III	-	surgery	IIIA	>70	>70	>40	>40
11	PBMC	F	80		unknown primitive		-	III or IV				44
12	PBMC	M	32	1.4	IV	-	-	IIIA	>120	>120	>120	>120
13	PBMC	M	45	1.3	III	-	-	IIIA	>30	>30	>30	>30
14	PBMC	M	73	2.6	IV	+	-	IIB		132		132
15	PBMC	F	70	3	III	+	-	IIB	>97	>97	>97	>97
16	PBMC	M	54	1	III	+	surgery	IV	228	275	0	45
17	PBMC	F	26	1.02	III	-	-	IB	>76	>76	>76	>76
18	PBMC	M	72	1.39	IV	-	-	IB		104		104
19	PBMC	F	52	1.2	III	-	chemotherapy	IIIA	44	142	6	73
20	PBMC	F	79		unknown primitive		-					
21	PBMC	F	20	1.34	III	-	-	IB	>148	>148	>148	>148
22	PBMC	F	51	0.8	III	-	-	IA	51	>74	24	
23	PBMC	F	64	1.2	IV	-	-	IB	>148	>148	>146	>146
24	PBMC	F	77	2.28	IV	+	-	IIA	>147	>147	>142	>142
25	PBMC	M	62	0.85	IV	-	-	IA	>151	>151	>151	>151
26	PBMC	M	79	2.8	IV	+	-	IIB	>45	157	>45	157
27	PBMC	M	62	2.1	IV / II	nd	surgery, radiotherapy	IV	51	77		22
28	PBMC	M	59	5	IV	+	-	IV	27	64	0	26
29	PBMC	F	49	1.01	III	-	-	IB	>161	>161	>161	>161
30	PBMC	F	58	0.4	III	-	-	IV	24	>199	0	>162
31	PBMC	F	80	2.5	III	-	-	IIA	>164	>164	>162	>162
32	PBMC	F	48	1.8	IV	-	-	IIIA	0	89	19	89
33	PBMC	M	45	1	IV	-	-	IV	58	62	1	2
34	PBMC	M	59	0.8	III	-	-	IA	38	40	0	1
35	PBMC	F	54	1	IV	+	-	IB	303	>462	0	>157
36	PBMC	M	81	1.65	III	-	-	IB			>154	>154
37	PBMC	F	57	1.8	III	-	-	IB	>133	>133	>132	>132
38	PBMC	M	57	0.55	III	-	-	IA		108		109
39	PBMC	F	53	1.21	IV	-	-	IB	>72	>72	>71	>71
40	PBMC	M	59	3	III	-	-	IIA	>74	>74	>73	>73
41	PBMC	M	23	1.8	III	-	-	IB	66	70	66	70
42	PBMC	M	69	2.25	IV	+	-	IIB	>71	94	>71	94
43	PBMC	M	60	3.2	III	+	-	IIB	>67	>67	>66	>66
44	PBMC	M	76	2.2	IV	-	-	IIA	>74	>74	>74	>74
45	PBMC	F	75	1.05	IV	-	chemotherapy, targeted therapy	IV	60	>180	12	>36
46	PBMC	F	63	1.68	III	+	-	IIA	>24	>24	>24	>24

^a nd : not determined

^b according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification (2009) within melanoma patients' samples

^c [chemotherapy was administrated to treat an ovarian carcinoma and ended up 3 years before the sampling following melanoma diagnosis](#)

Supplementary Table 2: Clinical features of patients from whom tumor samples were used

patient #	type	gender	age (years)	breslow	clark	ulceration ^a	treatment before sampling ^b	stage at sampling time ^c	from diagnosis time		from sampling time	
									PFS (months)	OS (months)	PFS (months)	OS (months)
47	lymph node metastasis	M	53	3.5	IV	-	surgery, interferon α	IIA	58	>158	>35	>35
48	pleural effusion	M	45	9	IV	+	surgery	IIIB	30	58	0	1
49	lymph node metastasis	M	84	4	V	nd	surgery	IIIB or IIIC	37	>159		>113
50	lymph node, hepatic and pulmonary metastasis	M	65	1.5	IV	-	surgery	IB	98	>120	14	>36
51	lymph node and pulmonary metastasis	M	78	2	IV	+	surgery	IV	9	10	0	1
52	lymph node metastasis	M	53	3.5	IV	-	surgery, interferon α	IIA	58	>158	>35	>35
53	lymph node metastasis	M	61	1.7	IV	+	surgery	IV	109	141		31
54	cutaneous metastasis	M	90	6	IV	+	surgery	IV				
55	hepatic metastasis	F	49	0.3	III	-	surgery	IV	58	69	4	15
56	lymph node metastasis	F	31	2	III	-	surgery	IV	14	30	1	16
57	lymph node metastasis	F	82	2.8	IV	+	surgery	IV	18	>60	>34	>34
58	lymph node metastasis	M	46	6.25	IV	+	-	IV	7	>182	>174	>174
59	lymph node metastasis	F	44	11	V	+	-	IIIB	7	>134	6	>133
60	cutaneous metastasis	F	76	5	IV	+	chemotherapy	IV	6	21	0	3
61	lymph node metastasis	M	70	7	IV	+	-	IV	9	>141	0	>125
62	primary tumor	M	39	9	IV	+	-	IIIB	22	57	22	57
63	lymph node metastasis	F	96			nd	-	IIIB				
64	lymph node metastasis	M	73	3	III	-	-	IIIB	218	253	27	37
65	lymph node metastasis	M	25			nd	-	IIIB	0	30	0	30
66	lymph node metastasis	M	47			nd	-	IIIC	15	20	0	5
67	lymph node metastasis	M	50	1.5	III	-	-	IIIA	3	30	17	27
68	cutaneous metastasis	F	59	2.5	IV	nd	interferon α	IV	70	97	12	26
69	cutaneous metastasis	F	72	3.09	IV	+	surgery	IIIC	2	6	0	3
70	cutaneous metastasis	M	46	1.4	III	+	surgery	IIIC	0	57	0	57
71	lymph node metastasis	M	79	1.58	III	+	surgery		13	106	12	105
72	cutaneous metastasis	F	70	0.78	III	nd	surgery, chemotherapy, DC vaccine		36	107	0	5
73	lymph node metastasis	M	31	1.66	IV	nd	surgery		>159	>159	>157	>157
74	lymph node metastasis	F	50	2.2	III	+	-	IIIC	16	49	17	32
75	lymph node metastasis	F	35	2.75	IV	+	-	IIIC	1	70	0	69
76	lymph node metastasis	F	59	1.15	III	nd	-	IIIB or IIIC	35	39	0	4
77	cutaneous metastasis	M	27	2.64	IV	nd	surgery, radiotherapy, interferon α	IV	15	84		22
78	lymph node metastasis	F	56	12	V	nd	-	IIIA	>20	>20	>18	>18
79	cutaneous metastasis	M	46			nd	-	IV	0	9	0	9
80	lymph node metastasis	M	68	0.6	III	-	interferon α	IIIB	10	16	1	2
81	lymph node metastasis	F	51	0.8	III	-	-	IIIA	50	>197	0	>147
82	lymph node metastasis	F	68	6	V	-	-	IIIC	99	>235	0	>146
83	lymph node metastasis	F	56	4.6	V	nd	interferon α	IV	23	>55	0	>18
84	lymph node metastasis	M	44	1	III	nd	-	IIIC	17	26	0	8
85	lymph node metastasis	F	40			unknown primitive	-	IV	3	3	2	2
86	lymph node metastasis	M	51	4	IV	nd	-	IIIC	17	28	14	25
87	lymph node metastasis	M	86	10	IV	nd	surgery	IV	6	22	0	10
88	lymph node metastasis	M	23	2.64	IV	nd	-	IIIC	13	83	0	69
89	lymph node metastasis	F	65	1.2	IV	nd	-	IV	>18	>18	>16	>16
90	metastasis	M	74			nd	-					

^a nd : not determined

^b for patients receiving IFN α , treatment stopped at least 6 months before the tumor sampling

^c according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification (2009) within melanoma patients' samples

Supplementary Table 3: Impact of the basal phenotype of circulating $\gamma\delta$ T cells on clinical outcome (Log-rank test analysis)

	log-rank p-value (green = significant positive link; red = significant negative link)											
	T $\gamma\delta$ all				T δ 2+				T δ 2-			
	/ diagnosis		/ sampling		/ diagnosis		/ sampling		/ diagnosis		/ sampling	
	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS
% T $\gamma\delta$ among CD45	0.276	0.2323	0.8071	0.6426	0.0153	0.783	0.0249	0.1922	0.7367	0.2154	0.3171	0.6369
% NKG2A	0.5805	0.5955	0.4313	0.2646	0.0915	0.278	0.1713	0.6885	0.5773	0.7419	0.3852	0.9893
% NKG2C	0.2376	0.4479	0.0286	0.1986	0.4248	0.5614	0.5681	0.9862	0.1655	0.8685	0.1485	0.5829
% NKG2D	0.8796	0.8573	0.797	0.7938	0.1444	0.0723	0.2036	0.0461	0.7414	0.2209	0.6657	0.3516
% CD40	0.654	0.3003	0.3874	0.654	0.4572	0.4307	0.4202	0.1281	0.9691	0.2256	0.7347	0.2463
% CD69	0.1745	0.3568	0.8623	0.3014	0.0803	0.0604	0.1317	0.1131	0.8505	0.3766	0.9044	0.3573
% CD86	0.9787	0.5916	0.6114	0.2113	0.4085	0.987	0.8594	0.9807	0.1745	0.1109	0.24	0.0091
% CD25	0.3494	0.4108	0.2544	0.5478	0.8436	0.4454	0.5972	0.6953	0.577	0.5657	0.4321	0.7917
% Nkp30	0.1318	0.3128	0.2387	0.4662	0.2732	0.533	0.3004	0.7629	0.989	0.6533	0.454	0.6595
% Nkp44	0.0232	0.0098	0.0217	0.006	0.0881	0.5275	0.2639	0.1795	0.9135	0.1941	0.5057	0.55
% Nkp46	0.1649	0.4899	0.1731	0.8373	0.2327	0.3515	0.5905	0.6469	0.9135	0.8345	0.5499	0.6413
% OX40L	0.6535	0.4897	0.3506	0.5594	0.2963	0.2209	0.598	0.4957	0.3426	0.8573	0.1206	0.7707
% ICOSL	0.4984	0.5955	0.6756	0.145	0.2713	0.7957	0.2748	0.1682	0.2894	0.324	0.4923	0.1207
% PDL2	0.4687	0.9559	0.5731	0.817	0.9666	0.3843	0.9422	0.123	0.7668	0.5027	0.767	0.9743
% 41BB	0.6535	0.5273	0.8266	0.9859	0.9429	0.9608	0.6621	0.8027	0.7207	0.4479	0.9322	0.3739
% PD1	0.0239	0.0231	0.0608	0.0254	0.453	0.2338	0.9089	0.151	0.1221	0.1895	0.2365	0.1508
% OX40	0.8163	0.4276	0.9263	0.6476	0.9196	0.3495	0.8245	0.4041	0.9666	0.278	0.7037	0.4656
% 41BBL	0.7395	0.5791	0.5183	0.8118	0.9666	0.9608	0.874	0.7124	0.9666	0.8341	0.767	0.8343
% ICOS	0.5536	0.3965	0.7522	0.6221	0.3312	0.9391	0.4055	0.1246	0.5303	0.7036	0.6273	0.7531
% PDL1	0.3063	0.3754	0.2237	0.1275	0.8301	0.1552	0.5317	0.0711	0.4765	0.8012	0.556	0.3706
% TIM3	0.5784	0.1721	0.2309	0.4676	0.9601	0.9378	0.9352	0.9791	0.2724	0.75	0.9076	0.7009
% CTLA4	0.5589	0.3754	0.8066	0.8645	0.5589	0.8279	0.7308	0.4899	0.3876	0.4842	0.2989	0.8311
% LAG3	0.1075	0.6477	0.2309	0.9665	0.9928	0.4202	0.9631	0.5859	0.2724	0.9378	0.8885	0.955
naive	0.0408	0.233	0.0413	0.2964	0.8434	0.5273	0.527	0.8702	0.4566	0.3745	0.3194	0.5281
CM	0.9116	0.7509	0.7037	0.9655	0.6535	0.7801	0.4718	0.5606	0.4765	0.3495	0.6186	0.1907
EM	0.3331	0.6479	0.095	0.4322	0.5536	0.9608	0.2452	0.9239	0.5768	0.8379	0.9738	0.8104
EMRA	0.7933	0.7944	0.9051	0.9536	0.4685	0.6522	0.2452	0.8482	0.4984	0.5706	0.8137	0.4261
% CD56	0.0171	0.4515	0.2365	0.2248	0.8453	0.7419	0.8304	0.5952	0.5735	0.4764	0.7569	0.4333
% Treg (CD25+FoxP3+)	0.7168	0.7882	0.8284	0.6519	0.0721	0.3741	0.208	0.2816	0.9871	0.3741	0.7566	0.6812

Supplementary Table 4: Impact of the basal phenotype of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells on clinical outcome (Log-rank test analysis)

	log-rank p-value (green = significant positive link; red = significant negative link)											
	T $\gamma\delta$ all				T δ 2+				T δ 2-			
	/ diagnosis		/ sampling		/ diagnosis		/ sampling		/ diagnosis		/ sampling	
	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS	PFS	OS
% T $\gamma\delta$ among CD45	0.0246	0.0339	0.1883	0.615	0.1174	0.1186	0.7959	0.6347	0.4964	0.8765	0.5438	0.4364
% NKG2A	0.226	0.092	0.3013	0.303	0.3451	0.3397	0.918	0.3539	0.4263	0.3875	0.9913	0.9307
% NKG2C	0.5553	0.778	0.5684	0.4279	0.1165	0.3453	0.7869	0.4936	0.2116	0.7115	0.2011	0.838
% NKG2D	0.987	0.8515	0.8245	0.9556	0.5493	0.7582	0.6112	0.7055	0.6757	0.1264	0.3617	0.02
% CD40	0.716	0.5746	0.7946	0.6122	0.699	0.8721	0.9175	0.4522	0.6774	0.808	0.3973	0.9532
% CD69	0.0606	0.0178	0.2168	0.7017	0.1439	0.1118	0.0819	0.6316	0.0767	0.0499	0.0877	0.7017
%CD86	0.9521	0.1013	0.4308	0.007	0.1721	0.7787	0.1622	0.524	0.1219	0.003	0.9645	0.022
% CD25	0.6211	0.7075	0.7894	0.9993	0.4817	0.392	0.9112	0.9609	0.7564	0.2566	0.4995	0.5918
% NKp30	0.7514	0.2453	0.3535	0.4053	0.7553	0.3436	0.5614	0.3621	0.4526	0.2109	0.0743	0.1729
% NKp44	0.8272	0.6119	0.5949	0.7483	0.8798	0.4735	0.8744	0.9383	0.7226	0.2321	0.5161	0.4284
% NKp46	0.2454	0.4599	0.3014	0.2191	0.8397	0.8014	0.8691	0.7356	0.6926	0.5402	0.7594	0.5287
% OX40L	0.5756	0.7771	0.3816	0.9245	0.6696	0.3907	0.8201	0.367	0.6626	0.8748	0.5252	0.2703
% ICOSL	0.9016	0.5907	0.6483	0.7396	0.5922	0.5886	0.9978	0.5833	0.6953	0.5201	0.7492	0.9993
% PDL2	0.2189	0.3306	0.1472	0.5965	0.9209	0.5423	0.4839	0.3669	0.0799	0.1074	0.0834	0.7804
% 41BB	0.555	0.926	0.8134	0.7161	0.802	0.899	0.7957	0.6402	0.7145	0.9903	0.9978	0.6255
% PD1	0.3204	0.263	0.908	0.2559	0.7149	0.2785	0.1894	0.9694	0.296	0.2307	0.7809	0.1859
% OX40	0.8742	0.5646	0.2963	0.8546	0.73	0.2466	0.6768	0.668	0.6953	0.5201	0.7492	0.9993
% 41BBL	0.0336	0.0339	0.0355	0.5124	0.8752	0.4657	0.6282	0.7975	0.7672	0.2113	0.6282	0.9163
% ICOS	0.161	0.0816	0.1016	0.7909	0.539	0.7747	0.4995	0.8015	0.204	0.4748	0.7916	0.7504
% PDL1	0.8742	0.5646	0.2963	0.9416	0.2793	0.8359	0.9446	0.7281	0.6953	0.5201	0.7492	0.9993
% TIM3	0.5788	0.333	0.1448	0.1483	0.6431	0.2941	0.4755	0.8764	0.3549	0.7188	0.8207	0.9597
% CTLA4	0.145	0.1774	0.3673	0.0631	0.1524	0.2752	0.4755	0.4014	0.5037	0.2899	0.681	0.2199
% LAG3	0.6009	0.2002	0.6071	0.7966	0.7366	0.1175	0.7849	0.2089	0.5037	0.3209	0.681	0.2677
naive	0.8657	0.5007	0.3159	0.8423	0.709	0.3558	0.4269	0.7421	0.7873	0.7517	0.7809	0.8275
CM	0.0937	0.2968	0.9975	0.5449	0.9177	0.6971	0.179	0.7178	0.513	0.8311	0.6751	0.5449
EM	0.7841	0.9236	0.73	0.2599	0.1302	0.2469	0.2773	0.3043	0.2508	0.1585	0.1491	0.0881
EMRA	0.2954	0.3665	0.9287	0.8221	0.5173	0.3887	0.4841	0.1251	0.1396	0.0564	0.0962	0.6058
% CD56	0.0514	0.0267	0.0789	0.4513	0.0325	0.0178	0.0725	0.4852	0.0499	0.1375	0.9871	0.9052
% Treg (CD25+FoxP3+)	0.0052	0.0125	0.1105	0.1678	0.1818	0.2636	0.8429	0.5079	0.3571	0.1461	0.1581	0.3653

Supplementary Table 5: Impact of the basal phenotype of circulating $\gamma\delta$ T cells on clinical outcome (Cox regression analysis)

	Cox regression (green = significant positive link; red = significant negative link)																							
	Tgd all								Td2+								Td2-							
	/ diagnosis				/ sampling				/ diagnosis				/ sampling				/ diagnosis				/ sampling			
	PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS	
	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value
% $\text{Ty}\delta$ among CD45	0.8137	0.3242	0.9828	0.9107	0.8686	0.4915	1.0326	0.7687	0.6638	0.2264	1.0612	0.8041	0.6929	0.2968	1.0934	0.5007	0.9788	0.9128	0.9442	0.776	1.0059	0.9753	0.9603	0.8117
% NKG2A	0.9809	0.7652	0.9481	0.5348	0.9932	0.9153	0.9307	0.4238	1.0523	0.2048	0.9318	0.2685	1.018	0.663	0.9643	0.5352	0.9413	0.6426	1.0207	0.8834	0.9662	0.7973	0.9553	0.7417
% NKG2C	0.9597	0.5959	0.9768	0.8286	0.9888	0.8773	1.02	0.8413	1.4804	0.1692	0.9099	0.8623	1.3754	0.3444	1.0513	0.9177	0.9584	0.5194	0.9758	0.7784	0.98	0.7398	1.0109	0.8885
% NKG2D	0.9852	0.5596	0.9844	0.6165	0.9676	0.2551	0.9805	0.5368	0.9848	0.8363	0.9673	0.7114	0.9722	0.7166	0.9516	0.6114	1.0098	0.6537	0.9779	0.3987	0.9877	0.6089	0.983	0.5474
% CD40	0.9958	0.8667	1.0123	0.6764	0.9909	0.7501	0.9934	0.8269	0.9973	0.9204	1.0171	0.5701	1.0007	0.9827	0.991	0.7915	1.0074	0.775	1.032	0.4033	0.9988	0.967	1.0311	0.3908
% CD69	1.0285	0.7624	1.0371	0.5971	1.0168	0.8508	0.9897	0.9096	0.9732	0.8168	1.0261	0.6807	0.9569	0.6899	0.9588	0.6612	1.026	0.4786	1.0639	0.1095	1.0552	0.1619	1.0989	0.0403
% CD86	1.0173	0.7074	0.9578	0.513	1.0334	0.4572	0.9031	0.3061	1.0196	0.5671	0.9971	0.9334	1.0288	0.3929	1.0026	0.9475	1.0098	0.8303	0.949	0.3955	1.0241	0.5951	0.8503	0.073
% CD25	0.9889	0.8517	0.9833	0.799	0.9972	0.9649	0.9657	0.6305	1.0049	0.9746	0.9979	0.9926	1.0141	0.9354	0.9229	0.7449	0.9946	0.8436	1.0093	0.7962	1.0022	0.9395	0.9919	0.8323
% Nkp30	1.0606	0.096	1.0278	0.3959	1.0619	0.097	1.0037	0.9187	1.0469	0.1055	1.0366	0.2	1.0473	0.1274	1.0292	0.3462	1.0055	0.8803	1.0025	0.9617	1.0224	0.5965	0.953	0.3833
% Nkp44	1.1575	0.0035	1.0472	0.5778	1.1327	0.008	1.0438	0.5266	1.1257	0.0151	1.0283	0.7294	1.1019	0.0454	1.1916	0.1389	1.0211	0.5455	1.042	0.4144	1.0334	0.3573	1.0053	0.911
% Nkp46	0.8948	0.3	1.0654	0.5331	0.9328	0.5173	0.9878	0.9088	0.9051	0.2649	1.0217	0.8179	0.9385	0.5056	0.9862	0.8876	1.001	0.9834	0.9953	0.9416	1.0181	0.7455	0.9629	0.5898
% OX40L	1.0648	0.178	0.9529	0.5581	1.0665	0.1504	0.9669	0.6912	1.0391	0.275	0.9592	0.4817	1.0375	0.306	0.9705	0.6019	1.0851	0.1239	0.9543	0.6447	1.082	0.1299	0.979	0.8417
% ICOSL	1.0237	0.7609	0.9422	0.6297	1.0324	0.6544	0.7765	0.2677	0.9823	0.848	0.9758	0.8421	0.9777	0.8195	0.8898	0.5057	0.9933	0.8684	1.0036	0.9505	1.0002	0.9955	0.9785	0.7585
% PDL2	1.0601	0.4775	0.9932	0.952	1.0617	0.4846	0.9541	0.7453	1.0559	0.4545	0.9757	0.7809	1.0473	0.5377	0.9373	0.5893	1.0534	0.4416	1.0321	0.7585	1.0533	0.4736	1.0162	0.8888
% 41BB	1.0642	0.1545	0.9166	0.3905	1.0814	0.069	0.8728	0.2911	1.0147	0.456	0.9643	0.3543	1.0176	0.3817	0.9459	0.3017	1.1317	0.1157	0.7498	0.3462	1.1509	0.0783	0.7335	0.3604
% PD1	1.0339	0.2936	1.0572	0.1749	1.0302	0.3994	1.0491	0.2366	1.0249	0.3702	1.0404	0.2534	1.0103	0.7432	1.036	0.2929	1.0092	0.6924	1.0594	0.1045	1.0131	0.5972	1.0466	0.1697
% OX40	0.9831	0.7461	0.9901	0.8634	1.0015	0.976	0.9667	0.668	1.008	0.8217	1.0163	0.6405	1.0116	0.7363	1.0205	0.6429	0.9999	0.9976	0.9638	0.5608	1.0086	0.8267	0.9147	0.355
% 41BBL	1.0472	0.1873	0.9806	0.7264	1.0442	0.2012	0.9696	0.6531	1.0472	0.1371	0.9949	0.8911	1.0385	0.208	0.9962	0.9335	1.0266	0.4312	1.0233	0.6369	1.0239	0.4904	1.0317	0.5819
% ICOS	0.9973	0.9696	1.0377	0.7151	1.0099	0.8993	0.9728	0.774	1.0056	0.9266	1.0322	0.7082	1.0203	0.7586	0.9539	0.608	0.9464	0.4556	0.9878	0.8973	0.942	0.4548	0.9584	0.6405
% PDL1	1.0175	0.7529	0.9323	0.4181	1.0156	0.7925	0.8512	0.1395	1.036	0.3633	0.9638	0.404	1.0061	0.8823	0.9261	0.2416	0.9829	0.7287	0.9452	0.4204	0.9939	0.8967	0.795	0.1059
% TIM3	0.8818	0.751	1.0124	0.8635	0.4802	0.2844	0.9637	0.6285	0.8098	0.5745	1.016	0.8221	0.8398	0.5655	0.9826	0.8023	0.859	0.55	0.9678	0.6539	0.6767	0.4166	0.9076	0.287
% CTLA4	0.9752	0.7622	1.0364	0.4153	0.9757	0.7518	1.0241	0.5368	0.9425	0.5598	1.0316	0.4924	0.9639	0.6512	1.0219	0.5852	0.935	0.6515	1.0025	0.9326	0.9396	0.5946	0.9795	0.5782
% LAG3	0.3589	0.1871	0.9585	0.7616	0.9938	0.9693	1.0552	0.6654	0.4494	0.448	1.1358	0.708	0.6675	0.6207	0.9764	0.9194	0.7943	0.1465	1.0016	0.951	0.9183	0.4164	0.9896	0.6783
naive	1.0275	0.3105	1.0314	0.4413	1.0307	0.305	1.018	0.6167	1.0121	0.6055	1.0199	0.5163	1.0176	0.4797	1.0103	0.7355	0.9984	0.9329	1.0003	0.9899	1.0004	0.985	0.994	0.8039
CM	0.9867	0.4902	0.9971	0.906	0.9878	0.5493	0.9927	0.743	1.0021	0.889	1.0176	0.4576	0.9971	0.8557	1.0193	0.3697	0.9984	0.9603	0.9597	0.3686	0.9991	0.979	0.959	0.3219
EM	1.0067	0.8592	1.0493	0.4605	1.0295	0.4653	1.0537	0.3749	0.9994	0.9804	0.9604	0.418	1.0023	0.9255	0.9695	0.4826	1.0152	0.7309	1.0946	0.0921	1.0394	0.3942	1.1245	0.0627
EMRA	0.9998	0.9878	0.9924	0.6824	0.996	0.7994	0.9973	0.8692	0.9704	0.4342	0.9071	0.3132	0.9806	0.5972	0.923	0.3384	0.9998	0.9887	0.9999	0.9946	0.9972	0.84	1.0033	0.829
% CD56	0.9488	0.1302	0.966	0.4519	0.9807	0.4975	0.9657	0.4592	0.9773	0.3321	0.9912	0.7652	0.9933	0.7652	0.9799	0.4984	0.9901	0.6902	0.9912	0.7721	1.0012	0.9653	1.0122	0.7419
% Treg (CD25+FoxP3+)	2.5809	0.1338	1.5198	0.5896	3.148	0.1006	1.1652	0.835	3.3995	0.0435	1.6097	0.5547	2.8383	0.0797	1.4293	0.6544	1.0922	0.7608	1.6424	0.1619	1.2355	0.4928	1.3336	0.4202

Supplementary Table 6: Impact of the basal phenotype of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells on clinical outcome (Cox regression analysis)

	Cox regression (green = significant positive link; red = significant negative link)																							
	Tgd all								Td2+								Td2-							
	/diagnosis				/sampling				/diagnosis				/sampling				/diagnosis				/sampling			
	PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS		PFS		OS	
HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	
% $\gamma\delta$ among CD45	0.9628	0.6713	0.9767	0.813	0.9552	0.5707	1.0151	0.8253	0.9495	0.8395	0.7645	0.392	0.7029	0.1992	0.8331	0.4895	0.971	0.8058	1.0467	0.6828	0.9754	0.8092	1.0207	0.8263
% NKG2A	1.01	0.717	1.026	0.3336	1.019	0.4903	0.9971	0.9091	0.986	0.3615	1.0037	0.7791	1.0009	0.9689	1.0106	0.4396	1.0127	0.607	1.0072	0.7285	1.007	0.7507	0.981	0.3907
% NKG2C	1.0274	0.6058	0.9767	0.7325	1.0235	0.6967	0.9261	0.3406	1.0343	0.3644	1.0314	0.4671	0.987	0.7163	0.9894	0.8045	1.0029	0.9527	0.9161	0.3217	1.0122	0.8219	0.8752	0.2097
% NKG2D	1.001	0.9505	0.9868	0.4963	0.994	0.7122	0.9934	0.7195	1.0037	0.8844	1.0024	0.9204	1.0043	0.8622	1.0221	0.35	0.9862	0.3475	0.9618	0.0479	0.9765	0.131	0.959	0.0295
% CD40	0.9823	0.2715	0.9816	0.3148	0.987	0.3797	0.9949	0.7745	0.9876	0.4208	0.9831	0.3379	0.9874	0.4571	0.9885	0.5827	0.9793	0.2289	0.9889	0.5627	0.9948	0.7123	1.0057	0.7344
% CD69	0.9759	0.1051	0.9634	0.0168	0.9766	0.0694	0.9935	0.6082	0.9698	0.0249	0.9676	0.0153	0.9747	0.0488	0.9944	0.6298	0.978	0.1384	0.9626	0.0227	0.9738	0.0582	0.9905	0.4822
%CD86	0.9919	0.7092	1.0523	0.0204	0.9997	0.988	1.0453	0.0287	0.9843	0.4481	1.0112	0.5769	0.9804	0.3034	1.011	0.5531	1.0012	0.9316	1.0473	0.008	1.0046	0.6956	1.0366	0.0182
% CD25	1.0068	0.6941	1.0321	0.1252	1.0038	0.8004	1.0153	0.3844	0.9996	0.9761	1.02	0.2819	0.9944	0.6754	1.0007	0.9632	1.0086	0.6277	1.0321	0.1159	1.0079	0.5845	1.0226	0.1962
% Nkp30	1.0036	0.8251	1.0326	0.0661	1.0151	0.3454	1.023	0.1909	0.9971	0.8555	1.016	0.3553	1.007	0.6294	1.0287	0.0945	1.0109	0.4963	1.0397	0.0269	1.0183	0.2178	1.0192	0.2499
% Nkp44	0.9902	0.6815	1.0304	0.1097	1.0111	0.4825	1.023	0.1918	0.9845	0.4934	1.0221	0.3517	1.0037	0.8309	1.0193	0.3432	0.9956	0.8511	1.0353	0.0482	1.013	0.4086	1.0266	0.1106
% Nkp46	1.143	0.2049	1.0725	0.1041	1.0285	0.374	1.0586	0.1199	1.0042	0.8854	1.0617	0.1142	1.0064	0.7583	1.039	0.1076	1.0052	0.8217	1.0289	0.0615	1.0126	0.3243	1.0221	0.1221
% OX40L	0.9925	0.7422	1.0252	0.1942	0.9918	0.6358	1.0177	0.3167	0.9912	0.7369	1.0179	0.4032	1.0049	0.804	1.0241	0.2309	0.992	0.7152	1.0181	0.335	0.992	0.6295	1.0161	0.3527
% ICOSL	0.9975	0.8818	1.0261	0.1419	0.9946	0.6985	1.011	0.4622	1.0108	0.6631	1.0308	0.1894	1.016	0.4702	1.013	0.594	1.0031	0.8329	1.0233	0.1374	1.0033	0.7857	1.0104	0.4414
% PDL2	1.0174	0.1516	1.004	0.6994	1.0072	0.5106	0.9796	0.1417	1.0409	0.0912	1.0193	0.2415	1.0282	0.1372	1.0025	0.8855	1.014	0.4407	1.0132	0.48	1.0136	0.3827	0.9997	0.9867
% 41BB	1.015	0.4495	1.0178	0.389	1.0036	0.8252	1.0066	0.7403	1.0101	0.5401	1.0375	0.0856	0.9997	0.9812	1.0085	0.6334	1.0426	0.2262	1.0288	0.3457	1.0143	0.4529	1.0218	0.3893
% PD1	1.001	0.9408	0.9937	0.6539	0.9995	0.9701	0.9876	0.3588	1.0081	0.6126	1.0067	0.6895	0.9981	0.9099	1.0003	0.9849	0.9995	0.9777	0.9959	0.8102	1.0087	0.5313	0.9994	0.9675
% OX40	1.0048	0.5904	1.0045	0.5663	1.0145	0.1328	1.0015	0.8745	0.9961	0.8464	1.0163	0.3665	0.989	0.478	1.0013	0.9413	1.0002	0.989	1.0183	0.2259	1.0082	0.531	1.0159	0.2985
% 41BBL	1.0117	0.274	1.0097	0.2883	1.0125	0.2079	0.9972	0.7796	1.004	0.8062	1.0175	0.2965	1.0069	0.6639	1.0023	0.9001	1.0055	0.67	1.0222	0.0942	1.0077	0.4615	1.0136	0.2714
% ICOS	1.0144	0.219	1.0103	0.3703	1.0085	0.4131	0.9955	0.6901	1.0189	0.4038	1.0177	0.2659	1.0198	0.2468	1.01	0.5017	1.0056	0.6521	1.0133	0.3755	1.0007	0.9518	1.0032	0.7954
% PDL1	1.0055	0.6573	1.0028	0.7866	1.0089	0.4146	0.9934	0.5581	0.9726	0.3191	1.0131	0.5901	1.0018	0.9301	1.0084	0.7316	0.9935	0.7118	1.0171	0.3095	1.0082	0.5139	1.0182	0.2368
% TIM3	0.9909	0.7673	1.0289	0.3343	1.0241	0.4277	1.0941	0.0161	1.0154	0.6593	1.0331	0.3239	1.0018	0.9577	1.0202	0.5509	1.0097	0.6312	1.0395	0.1732	1.0093	0.6547	1.029	0.218
% CTLA4	1.0168	0.6026	0.964	0.4574	0.9857	0.5913	1.0000	0.999	1.0421	0.18	1.0361	0.4358	1.0272	0.3931	1.0313	0.3797	0.996	0.8702	0.9951	0.8956	0.9904	0.6788	1.0106	0.6881
% LAG3	1.0057	0.81	0.9748	0.4336	1.0113	0.5622	1.0249	0.3293	1.0342	0.3106	1.0894	0.0314	1.0244	0.4051	1.0701	0.0574	1.008	0.5479	0.9903	0.5919	0.9982	0.8816	1.0000	0.9988
naive	1.0103	0.5297	1.0208	0.1858	1.0081	0.5391	0.9916	0.6011	0.9817	0.5518	1.0103	0.6673	1.0087	0.6798	0.9982	0.9416	1.0111	0.4089	1.011	0.4229	0.9997	0.9791	0.9895	0.4126
CM	0.9815	0.3073	0.9672	0.094	0.9839	0.2877	0.9968	0.8572	0.9895	0.5532	0.9681	0.127	0.9704	0.1179	0.9627	0.1035	0.9776	0.2152	0.9822	0.3368	0.9973	0.8487	1.0063	0.689
EM	1.0005	0.9875	0.9851	0.6969	1.0296	0.3493	1.03	0.358	1.0114	0.6135	1.0022	0.9334	1.0124	0.6213	1.0131	0.6161	1.0019	0.9482	0.9972	0.9365	1.0303	0.2683	1.033	0.2374
EMRA	1.0342	0.3767	1.0344	0.421	0.9973	0.9415	1.039	0.3265	1.0462	0.1581	1.2274	0.0184	1.0593	0.0466	1.1877	0.0113	1.0221	0.6244	0.9929	0.88	0.9722	0.4905	1.0135	0.7527
% CD56	1.0296	0.1744	1.1025	0.0079	1.0159	0.4058	1.0432	0.0736	1.0328	0.0849	1.048	0.0111	1.0242	0.1456	1.0271	0.123	1.0151	0.4645	1.0485	0.0403	1.0039	0.8331	1.0261	0.1899
% Treg (CD25+FoxP3+)	1.0176	0.6982	1.1493	0.0351	1.0146	0.7325	1.0424	0.3951	0.9956	0.8048	1.0233	0.3514	0.9904	0.6166	0.9992	0.9685	1.0485	0.4564	1.1732	0.026	1.0567	0.3406	1.0942	0.165

Supplementary Table 7: Impact of the cytokine profile of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells upon activation on clinical outcome (Cox regression analysis)

		Cox regression (green = significant positive link; red = significant negative link)							
		PFS diagnosis		OS diagnosis		PFS sampling		OS sampling	
		HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value
IL4 (pg/ml)	neg	0.9723	0.4434	0.9496	0.3256	1.0317	0.41	0.9062	0.1183
	IPP	1.036	0.6189	0.9539	0.6192	1.1244	0.3046	0.9663	0.7037
	HMBPP	1.0445	0.4782	1.1034	0.1543	1.0533	0.4197	1.089	0.1815
	PMA iono	1.0018	0.9429	1.0283	0.2695	1.0032	0.8838	1.019	0.4695
IL10 (pg/ml)	neg	1.0217	0.5459	1.0833	0.0931	1.017	0.5312	1.0752	0.1023
	IPP	1.1009	0.0404	1.1893	0.0053	1.0317	0.4479	1.1678	0.0086
	HMBPP	1.0448	0.3195	1.1137	0.0278	1.0311	0.4523	1.2431	0.0014
	PMA iono	1.0254	0.4162	1.0826	0.0308	1.0128	0.6184	1.0888	0.0154
IL17A (pg/ml)	neg	1.0349	0.2493	1.0679	0.0467	0.9773	0.5155	1.0481	0.1452
	IPP	0.9964	0.9081	1.0012	0.977	1.0465	0.2539	0.9843	0.6953
	HMBPP	0.9979	0.9344	1.0041	0.8857	1.0168	0.5278	0.9922	0.7849
	PMA iono	1.0105	0.5868	1.0345	0.1284	1.0209	0.3022	1.0296	0.2277
IFN γ (pg/ml)	neg	1.0455	0.4146	1.0452	0.5114	1.0568	0.3509	1.0953	0.1982
	IPP	0.9996	0.6001	0.9797	0.3906	0.9935	0.3036	0.9978	0.429
	HMBPP	0.9972	0.4866	0.9971	0.4607	0.9959	0.3327	0.9999	0.972
	PMA iono	0.9997	0.3988	1.0000	0.9137	0.9998	0.4631	1.0001	0.6873
TNF α (pg/ml)	neg	0.9842	0.4516	0.9823	0.4668	0.9955	0.8346	0.9985	0.9621
	IPP	0.9971	0.5051	0.9455	0.2545	0.9747	0.2544	0.9894	0.3591
	HMBPP	0.9927	0.2888	0.9943	0.4024	0.996	0.6244	1.0087	0.1971
	PMA iono	0.9994	0.8465	1.0027	0.3239	0.9993	0.7938	1.0025	0.3437
TGF β (pg/ml)	neg	1.0000	0.9117	1.0003	0.3267	1.0002	0.4201	1.0004	0.1873
	IPP	0.9999	0.5596	0.9996	0.4155	0.9994	0.1947	0.9997	0.5265
	HMBPP	0.9996	0.5247	0.9998	0.6922	1.0004	0.5381	1.0005	0.3863
	PMA iono	1.0001	0.9103	1.0001	0.8393	1.0009	0.1302	1.0003	0.5772

Supplementary Table 8: Impact of the cytotoxic capacity of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells upon activation on clinical outcome (Cox regression analysis)

Cox regression (green = significant positive link; red = significant negative link)								
/ diagnosis					/ sampling			
PFS			OS		PFS		OS	
	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value	HR	p_value
neg	1.0036	0.8909	1.004	0.8857	1.0472	0.0939	1.0331	0.3266
IPP	1.0206	0.3101	1.0163	0.4786	1.0294	0.1128	1.0277	0.2502
HMB-PP	1.0051	0.735	1.0063	0.7054	1.0223	0.1791	1.0241	0.227
PMA iono	1.0035	0.782	1.014	0.3194	1.0105	0.3572	1.0387	0.0278

Chapitre 4 : Caractérisation des interactions entre pDCs et lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte sain

Potent bidirectional cross talk between plasmacytoid Dendritic Cells and $\gamma\delta$ T cells through BTN3A, type I/II IFNs and immune checkpoints

Pauline Girard^{1,2}, Benedicte Ponsard^{1,2}, Julie Charles^{2,3}, Laurence Chaperot^{1,2} and Caroline Aspod^{1,2*}

¹Etablissement Français du Sang Auvergne Rhone-Alpes, Research and Development Laboratory, Grenoble, France

²Université Grenoble Alpes, INSERM, CNRS, Team Immunobiology and Immunotherapy in Chronic Diseases, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France

³Dermatology Department, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

★★★★★★★★★★



Les pDCs et les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle critique dans l'immuno-surveillance contre des pathogènes et cancers grâce à leur capacité à détecter des microbes et des cellules stressées par la reconnaissance de PAMPs ou de métabolisme altéré (PAGs). Leurs caractéristiques uniques, leur haute plasticité fonctionnelle et leur capacité d'interagir avec de nombreux types de cellules immunitaires, leur permettent de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, d'initier et orienter très largement des réponses immunitaires et donc de contribuer aux réponses immunitaires protectrices et pathogéniques. Néanmoins, malgré des rôles stratégiques et proches, les interactions potentielles entre les pDCs et T $\gamma\delta$ restent inconnues.

Nous avons étudié l'interaction potentielle entre ces populations cellulaires ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents. Nous avons alors co-cultivé des pDCs et T $\gamma\delta$ isolés de patients en présence de TLR-L, Pag ou Zoledronate pour imiter les contextes infectieux et tumoraux. Nous avons montré que les pDCs stimulées par TLR7/9L ou Zol induisent une activation puissante des T $\gamma\delta$, une sécrétion de cytokines Th1 et une activité cytotoxique. Réciproquement, les T $\gamma\delta$ activés par PAGs déclenchent des modifications phénotypiques et fonctionnelles chez les pDCs. Nous avons aussi mis en évidence que les pDCs et les T $\gamma\delta$ se régulent entre eux via des facteurs solubles et par contact membranaire, et notamment par la sécrétion d'IFN de type I/II et via BTN3A. De telles interactions pourraient être modulées en bloquant des points de contrôle immunitaire spécifiques.

Notre étude met alors en évidence les interactions bidirectionnelles cruciales entre ces acteurs immunitaires puissants. L'exploitation des interactions pDCs-T $\gamma\delta$ représente une stratégie prometteuse pour concevoir de nouvelles approches immuno-thérapeutiques et restaurer des réponses immunitaires efficaces en contexte tumoral, infectieux, ou lors de maladies auto-immunes.

★★★★★★★★★★



Potent Bidirectional Cross-Talk Between Plasmacytoid Dendritic Cells and $\gamma\delta$ T Cells Through BTN3A, Type I/II IFNs and Immune Checkpoints

Pauline Girard^{1,2}, Benedicte Ponsard^{1,2}, Julie Charles^{2,3}, Laurence Chaperot^{1,2} and Caroline Aspod^{1,2*}

¹ Etablissement Français du Sang Auvergne Rhone-Alpes, Research and Development Laboratory, Grenoble, France, ² Université Grenoble Alpes, INSERM, CNRS, Team Immunobiology and Immunotherapy in Chronic Diseases, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France, ³ Dermatologie Department, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Manfred B. Lutz,
Julius Maximilian University of
Würzburg, Germany

Reviewed by:

Thomas Herrmann,
Julius Maximilian University of
Würzburg, Germany
Vanja Sisirak,
UMR5164 Immunologie Conceptuelle,
Expérimentale et Translationnelle
(Immuno ConcEpT), France

*Correspondence:

Caroline Aspod
caroline.aspod@efs.sante.fr

Specialty section:

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

Received: 23 January 2020

Accepted: 15 April 2020

Published: 06 May 2020

Citation:

Girard P, Ponsard B, Charles J,
Chaperot L and Aspod C (2020)
Potent Bidirectional Cross-Talk
Between Plasmacytoid Dendritic Cells
and $\gamma\delta$ T Cells Through BTN3A, Type
I/II IFNs and Immune Checkpoints.
Front. Immunol. 11:861.
doi: 10.3389/fimmu.2020.00861

Plasmacytoid DCs (pDCs) and $\gamma\delta$ T cells are both critical players in immunosurveillance against pathogens and cancer due to their ability to sense microbes and cell stress through recognition of pathogen-associated molecular patterns or altered metabolism [phosphoantigens (PAGs)]. Their unique features, high functional plasticity and ability to interact with many immune cell types allow them to bridge innate and adaptive immunity, initiating and orientating widely immune responses, hence contributing to protective and pathogenic immune responses. Yet, despite strategic and closed missions, potential interactions between pDCs and $\gamma\delta$ T cells are still unknown. Here we investigated whether there is interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells and the underlying molecular mechanisms. Purified human pDCs and $\gamma\delta$ T cells were cocultured in presence of TLR-L, PAG, and zoledronate (Zol) to mimic both infectious and tumor settings. We demonstrated that TLR7/9L- or Zol-stimulated pDCs drive potent $\gamma\delta$ T-cell activation, Th1 cytokine secretion and cytotoxic activity. Conversely PAG-activated $\gamma\delta$ T cells trigger pDC phenotypic changes and functional activities. We provided evidence that pDCs and $\gamma\delta$ T cells cross-regulate each other through soluble factors and cell-cell contacts, especially type I/II IFNs and BTN3A. Such interplay could be modulated by blocking selective immune checkpoints. Our study highlighted crucial bidirectional interactions between these key potent immune players. The exploitation of pDC- $\gamma\delta$ T cells interplay represents a promising opportunity to design novel immunotherapeutic strategies and restore appropriate immune responses in cancers, infections and autoimmune diseases.

Keywords: pDCs, $\gamma\delta$ T cells, cross-talk, immune checkpoint, BTN3A

INTRODUCTION

Plasmacytoid DCs (pDCs) and $\gamma\delta$ T cells are both critical players in immunosurveillance against pathogens and cancer and orchestrate immune responses (1, 2). These potent sentinels sense microbes and cell stress through recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or altered metabolism in a complementary manner: pDCs can directly recognize pathogenic

motifs through Toll-like receptors (TLR), while $\gamma\delta$ T cells sense stress-induced antigens such as phosphoantigens (PAGs) on transformed or infected cells via their T-cell receptor (TCR). They exhibit a rapid response through, respectively, massive type I or type II IFN secretion and subsequently initiate immune responses. Their unique features, high functional plasticity and ability to interact with many other immune cell types allow them to bridge innate and adaptive immunity, triggering efficient immune responses against pathogens and cancer. pDCs and $\gamma\delta$ T cells owe essential contribution to many types of protective immune responses but also in immunopathology (3, 4). Notably, pDCs (4, 5) and $\gamma\delta$ T cells (6–9) have been both involved positively or negatively in cancer, infections and autoimmunity: they have been shown to display pro- and anti-tumor effects, to be potent effectors against pathogens (especially viruses and bacteria), and to undergo hyperactivation in autoimmune and chronic inflammatory diseases. Both pDCs and $\gamma\delta$ T cells are exploited as vector or target for immunotherapy of cancers and infectious diseases (10, 11). Yet, despite strategic and closed missions, potential interactions between pDCs and $\gamma\delta$ T cells are still unknown.

pDCs play a crucial role in the initiation and orientation of anti-viral and anti-tumor immune responses and are major players in the regulation of immunity (1, 4, 5, 12, 13). The expression of TLR7 and 9 confers on them the ability to recognize pathogenic motifs (single stranded RNA, unmethylated CpG-containing DNA). Upon activation, pDCs exhibit robust IFN- α production and promote innate and adaptive immune responses. The functional plasticity of pDCs as well as their ability to interact with different immune cells allows them to direct immunity toward multiple profiles (immunity or tolerance) according to the microenvironment (5). pDCs promote antiviral responses and have been implicated in the pathogenesis of autoimmune diseases (12). pDCs also elicit anti-tumor responses by their ability to induce antigen-specific adaptive responses (14, 15) or by exerting a direct cytotoxic activity toward the tumor cells via TRAIL (16, 17), but are found to be subverted in many cancers and to contribute to the establishment of an immunosuppressive tumor microenvironment (18, 19).

$\gamma\delta$ T cells are unconventional T cells playing a major role in immune responses against various microbes (parasites, bacteria, viruses), stressed cells and tumor cells (3, 8, 20). $\gamma\delta$ T cells are crucial effectors in immunosurveillance of tumor (10, 21) and infections (2, 3, 8) due to their prompt activation, their capacity to recognize tumor- and stress-associated ligands neglected by conventional $\alpha\beta$ T cells in an MHC-unrestricted manner, their potential to kill transformed and infected cells through secretion of cytotoxic pro-apoptotic protease granzymes and pore-forming molecules perforin, and their ability to secrete immunostimulatory cytokines in particular IFN γ and TNF α regulating and potentiating the effectiveness of other immune cells leading to coordinated immune responses (20). $\gamma\delta$ T cells can be subdivided based on their δ TCR chain. Tissue-associated $\gamma\delta$ T cells harbor mainly the V δ 1 TCR and recognize stress-related antigens, whereas the majority of circulating $\gamma\delta$ T cells bears the V δ 2 TCR. $\gamma\delta$ T cells bearing the TCR V γ 9V δ 2 recognize unprocessed non-peptide molecules, PAG, derived

from the isoprenoid/mevalonate or non-mevalonate pathways such as (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) produced by many pathogens, and isopentenyl pyrophosphate (IPP), which accumulate intracellularly during dysregulated metabolism in many tumors. Cells treated with aminobiphosphonates (ABP) such as Zol are potent activators of V γ 9V δ 2 T cells due to the accumulation of IPP upon inhibition of the IPP metabolizing farnesyl diphosphate synthase (FPPS). The activation of V γ 9V δ 2 T cells by PAG requires the contact with cells expressing CD277/butyrophilin-3 A1 (BTN3A1) molecule. Two major hypotheses explain PAG-mediated activation of V γ 9V δ 2 T cells (22). The “allosteric model,” which is supported by recent literature, suggests that PAG-binding to the intracellular domain of BTN3A1 provokes conformational changes in its extracellular domain, allowing the binding of BTN3A1 to V γ 9V δ 2 TCR and subsequent activation (23–27). The “antigen-presenting model” proposes that upon export in the extracellular microenvironment, PAG presented by BTN3A1 form BTN3A1-PAG complexes that directly bind the V γ 9V δ 2 TCR (28). Beside sensing the dysregulation of intracellular PAG levels, $\gamma\delta$ T cells also recognize induced self-ligands such as stress-inducible MICA/MICB molecules, upregulated at the surface of stressed or tumor cells (29) through NKG2D (30). $\gamma\delta$ T cells hence display a broad reactivity against tumors and pathogens by sensing microbial infections and metabolic changes found in transformed, infected, or drug-treated cells.

Cross-talks between DCs and $\gamma\delta$ T cells are still not fully characterized. Bidirectional interactions between monocyte-derived DCs (moDCs) and $\gamma\delta$ T cells have been described but with contradictory results (31). It has been shown that Zol-treated moDCs triggered the expansion of $\gamma\delta$ T cells with effector and costimulatory activities (32). Besides, moDCs pre-incubated with different ABP were able to stimulate the proliferation, activation, and secretion of IFN γ by $\gamma\delta$ T cells (33) but with no impact on their cytotoxic activity (34, 35). Conversely, V γ 9V δ 2 T cell lines stimulated with HMB-PP strongly promote moDC maturation and IL12 secretion (33, 36). One study highlighted that TLR-L stimulated moDCs or pDCs trigger IFN γ secretion by V γ 9V δ 2 T cell subset (37), that in turn promote DC polarization into IL12p70-producing cells, and another one highlighted that polyI:C-stimulated CD11c+ DCs activate $\gamma\delta$ T cells via type I interferons (38), underlying the potential cross-talk between $\gamma\delta$ T cells and PAMP-activated DCs. Most studies relied on the use of *ex-vivo* generated moDCs, and almost no data are available for pDCs.

pDCs and $\gamma\delta$ T cells represent critical players in immunology to tumors and pathogens due to their unique properties and functional plasticity. Yet, interactions between these potent players have never been deeply studied. A better understanding of the interactions between pDCs and $\gamma\delta$ T cells could allow their exploitation for immunotherapy. Here we investigated whether there is interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells, the nature of the response induced on pDCs or $\gamma\delta$ T cells by the other partner, and the underlying molecular mechanisms. Co-culture of purified human pDCs and $\gamma\delta$ T cells were performed in presence of TLR-L, PAG, and Zol (that will induce PAG accumulation) to mimic both tumor and infectious settings. Our study highlights crucial

bidirectional pDC- $\gamma\delta$ T cell interplay. Such understanding may help harnessing and synergize the power of pDCs and $\gamma\delta$ T cells to fight against cancer and infections. These findings will pave the way to manipulate these potent and promising cell partners to design novel immunotherapeutic strategies.

MATERIALS AND METHODS

Healthy Donor (HD)' Samples

Blood samples were obtained from 286 healthy volunteers. PBMCs were purified by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation (Eurobio) and stored frozen in liquid nitrogen until use. All procedures were approved by the Ethics committee of the French Blood Agency's Institutional Review Board and declared under the reference #DC-2008-787. All participants gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Purification of pDCs and $\gamma\delta$ T Cells

pDCs and $\gamma\delta$ T cells were purified using, respectively, EasySep Human pDC enrichment kit and EasySep Human $\gamma\delta$ T-cell enrichment kit (StemCell) according to manufacturer' instructions. The purity obtained was routinely above 90.5% for pDCs and 95% for $\gamma\delta$ T cells.

Tumor Cell Lines

Human melanoma lines COLO829 and A375 were purchased from ATCC (LGC-Standards). Cultures were performed in RPMI1640-Glutamax (Invitrogen) supplemented with 1% non-essential amino-acids, 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 100 μ g/ml gentamycin and 10% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen).

pDCs- $\gamma\delta$ T Cells Coculture Experiments

Purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells were resuspended at 2×10^6 /ml in complete RPMI 1640 10% FCS and cocultured in a 1:1 ratio 20 h at 37°C, 5% CO₂ (1×10^6 /ml final for each cell subset). Cocultures were performed as indicated in absence or presence of TLR7L (CL097, 1 μ g/ml), TLR9L (CpG_A, 1.5 μ M) (Invivogen) and/or zoledronate (38.1 μ M) (Novartis) to activate pDCs, IPP (80 μ M) or HMB-PP (200 nM) (Sigma) together with IL2 (0.1 UI/ml) (Peprotech) and/or zoledronate (38.1 μ M) to activate $\gamma\delta$ T cells. Controls with only one partner (pDCs or $\gamma\delta$ T cells alone) were performed in the same conditions. In some experiments, pDCs and $\gamma\delta$ T cells were physically separated in different chambers by performing cocultures in the HTS Transwell-96 plates displaying a 0.4 μ m polycarbonate membrane (Corning). To assess the impact of pDCs on $\gamma\delta$ T cells, pDCs together with the activators were put in the upper compartment and $\gamma\delta$ T cells in the lower chamber. To analyze the effect of $\gamma\delta$ T cells on pDCs, $\gamma\delta$ T cells together with the activators were put in the upper compartment and pDCs in the lower chamber. In some experiments, pDCs or $\gamma\delta$ T cells were first pre-incubated 20 min with the following blocking antibodies [functional grade quality, no azide/low endotoxin (NA/LE)] alone or in different mixtures before adding the other cell partner: anti-IFNAR2 (pbl assay), -TNFR1, -GITR, -IFNGR1

(Thermofischer), -OX40L, -PD1, -TNFR2 (R&D Systems), -LAG3 (Adipogen), -ICOSL (Invitrogen), -TIM3, -NKG2D, -NKp30 (Biolegend) (all at 10 μ g/ml), anti-41BB (antibodies online) (at 1 μ g/ml), or mouse IgG and/or Goat IgG control isotypes (10–40 μ g/ml depending on the corresponding amount of specific antibodies mixed together) (Thermofisher). When indicated, pDCs or $\gamma\delta$ T cells were first pre-incubated 2 h with anti-BTN3A blocking antibody (clone 103.2, Creative Biolabs) at 10 μ g/ml or mouse IgG control isotype (10 μ g/ml).

pDC Restimulation

When assessing the impact of $\gamma\delta$ T cells on pDCs, the ability of pDCs to respond to a subsequent TLR stimulation was assessed following the first coculture. In this case, the $\gamma\delta$ T cells-pDCs cocultures were harvested after 20 h, washed, counted and pDCs were resuspended at 1×10^6 /ml and further cultured 24 h in absence or presence of TLR7L (CL097, 1 μ g/ml) or TLR9L (CpG_A, 1.5 μ M) (Invivogen).

Phenotypic Analysis

The phenotype of pDCs and $\gamma\delta$ T cells was assessed either in the basal state or upon the 20 h cocultures and after the subsequent restimulation for pDCs as indicated. Cell suspensions were labeled with anti-human antibodies and their isotype-matched controls in PBS 2% FCS. pDCs were defined as CD45+ HLA-DR+ BDCA4+. $\gamma\delta$ T cells were identified as CD45+ CD3+ panTCR $\gamma\delta$ +, and further divided into δ 2+ and δ 2- subsets. The activation status of the cells was determined using anti-CD40, -CD80 (Beckman), -CD86 (BD) Abs for pDCs, and anti-CD69 (BD), -CD25 (eBiosciences) antibodies for $\gamma\delta$ T cells. The expression profile of immune checkpoints was analyzed using anti-OX40, -OX40L, -ICOS, -41BB, -41BBL, -PD1, -PDL1, -PDL2 (BD), -ICOSL, -TIM3, -CTLA4, -LAG3 (eBiosciences) Abs; activating and inhibitory NKR were depicted using NKG2D (BD), NKp30, NKp44 (Beckman) Abs. TRAIL expression was evaluated on pDCs using anti-TRAIL Abs (BD). The expression of BTN3A was assessed on pDCs and $\gamma\delta$ T cells at the basal state and upon specific stimulation using anti-BTN3A Abs (clone BT3.1, Miltenyi Biotec). Anti-TNF α RI, -TNF α RII Abs (R&D Systems), and anti-IFN α RI, -IFN α RII Abs (Miltenyi Biotec) were used to assess the expression of the corresponding molecules on pDCs and $\gamma\delta$ T cells at the basal state and upon specific stimulation. We analyzed either the percentage of positive cells or the mean fluorescence intensity (MFI) of the positive cells as indicated. Suspensions were analyzed by flow cytometry using a FACS CantoII and DIVA software (BD). To ensure quality control during the study, we performed a systematic standardization of the fluorescence intensities using cytometer setup and tracking beads (CST) (BD).

Cytotoxic Activity

$\gamma\delta$ T cells cytotoxic activity was evaluated by a CD107 degranulation assay and perforin measurement upon coculture with target cells. Upon pDCs- $\gamma\delta$ T cells 20 h cocultures, the cells were washed, $\gamma\delta$ T cells were counted and further co-cultured with melanoma tumor cells (COLO829, A375) in a 20:1 ratio for 5 h. Anti-human CD107a/b Abs (BD) were added at the start

of the coculture together with GolgiSTOP (BD) for the last 4 h. The cells were then labeled with CD45, CD3, panTCR $\gamma\delta$, TCR δ 2 Abs (BD) before flow cytometry analysis. Perforin secretion was evaluated in the coculture supernatants using Human Perforin (PRF1) ELISA kit (AbCam).

Soluble Factors Dosage

Human soluble IL4, IL10, IL17-A, IFN γ , TNF α , IFN α , IP10, TGF β , and granzyme B production were measured in the coculture supernatants by a Cytometric Bead Array assay (CBA, BD).

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed by Graph Pad Prism software using the Wilcoxon matched *t*-test combined with Bonferroni correction or Mann-Whitney unpaired *t*-test.

RESULTS

TLR-L or Zol-Activated pDCs Trigger Activation and Functionality of $\gamma\delta$ T Cells

We first evaluated the ability of pDCs to modulate the phenotype and functional activities of $\gamma\delta$ T cells. Purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells from healthy donors' blood were co-cultured in absence or presence of TLR7L (CL097) or TLR9L (CpG_A), together with Zol or not to promote accumulation of PAG and assess potential synergistic effect between TLR-L and Zol. Whole $\gamma\delta$ T cells were used to investigate the ability of pDCs to impact on both δ 2+ and δ 2- subsets. The phenotypic and functional features of $\gamma\delta$ T cells were then depicted (Figure 1A). When analyzing the whole population of $\gamma\delta$ T cells, heterogeneity could rely on the fact that the frequencies of V δ 2+ and V δ 2- cells can differ considerably between donors, therefore we precisely analyzed each subset independently. pDCs drove a potent activation of $\gamma\delta$ T cells as revealed by the upregulation of CD69 and CD25 activation markers following TLR7 or TLR9 stimulation, but also in presence of Zol (Figure 1B, Supplementary Figures 1A,B). These settings elicited also changes in immune checkpoint by $\gamma\delta$ T cells as demonstrated by the upregulation of TIM3 (CD366), LAG3 (CD223), PD-1 (CD279), and 4-1BB (CD137) (Figure 1C, Supplementary Figure 1C). Other markers investigated [GITR (CD357), OX40 (CD134), ICOS (CD278), NKp30 (CD337), NKp44 (CD336), NKG2D (CD314)] were not significantly affected (Supplementary Figure 2A). In addition, TLR-L and/or Zol-treated pDCs elicited production of IFN γ and TNF α in cocultures (Figure 1D) and stimulated the cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells as illustrated by the upregulation of CD107 surface expression and secretion of perforin following culture with tumor cells (Figure 1E). These phenotypic and functional modulations were strongly induced on δ 2+ T cells, whereas slightly triggered on δ 2- T cells (Supplementary Figures 2B–E). We demonstrated that TLR7-/9-L drove a potent activation of pDCs associated with TRAIL expression and IFN α secretion, whereas Zol didn't have such impact on pDCs (Supplementary Figure 3A). The levels of modulation of $\gamma\delta$ T cells induced by pDCs were similar to the one triggered by HMB-PP on $\gamma\delta$ T cells alone, a strong stimulator of $\gamma\delta$ T cells (Supplementary Figure 4A).

Furthermore, we checked that, as expected, TLR7/9-L, Zol alone or in combination didn't have any direct impact on $\gamma\delta$ T cells (Supplementary Figure 4B). Importantly, activation of pDCs was required as no modulation of $\gamma\delta$ T cells was induced by unstimulated pDCs compared to $\gamma\delta$ T cells cultured alone without pDCs (Supplementary Figure 5A). Altogether these data enlightened for the first time that TLR-L or Zol-activated pDCs trigger activation, cytokine secretion and cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells.

PAG-Activated $\gamma\delta$ T Cells Drive Activation and Functionality of pDCs

We further examined the capacity of $\gamma\delta$ T cells to modulate the phenotype and functional properties of pDCs. Purified $\gamma\delta$ T cells and pDCs from healthy donors' blood were co-cultured in absence or presence of the phosphoantigens IPP or HMBPP together with Zol or not to promote accumulation of PAG and assess potential synergistic effect between PAGs and Zol. The phenotypic and functional features of pDCs were then depicted (Figure 2A). As the frequencies of V δ 2+ and V δ 2- cells can differ considerably between donors, this could bring some heterogeneity in the pDCs' features especially when V δ 2+-specific regimens are used. In the presence of HMB-PP or Zol but not IPP, $\gamma\delta$ T cells induced the activation of pDCs as illustrated by the upregulation of CD40, CD80, and CD86 molecules (Figure 2B, Supplementary Figures 1D,E). PAG and Zol allowed $\gamma\delta$ T cells to modulate the expression of some immune checkpoints on pDCs, especially GITR-L, 41BB/41BB-L, PDL1, LAG3, and OX40 (Figure 2C, Supplementary Figure 1F). Notably, PAG and/or Zol-treated $\gamma\delta$ T cells elicited TRAIL upregulation on pDCs and production of IFN α and IP-10 (CXCL10) compared to $\gamma\delta$ T cells—pDCs cocultured in absence of stimulation (Figures 3A,B). Granzyme B and TNF α could be produced both by pDCs or $\gamma\delta$ T cells, but their levels were improved in presence of PAG and/or Zol. Furthermore, following coculture with PAG- and/or Zol-activated $\gamma\delta$ T cells, the ability of pDCs to respond to a subsequent TLR7/9L stimulation was enhanced, as attested by increased CD80 expression and TRAIL exposure compared to coculture with unstimulated $\gamma\delta$ T cells or to pDCs which didn't previously contact $\gamma\delta$ T cells (Figures 3C,D). Such boosting of pDCs occurred in absence of Zol, only for HMB-PP-activated $\gamma\delta$ T cells and TLR9-triggering of pDCs, and in presence of Zol, for unstimulated or activated $\gamma\delta$ T cells and restimulation of pDCs with both TLR7-L and TLR9-L. However, it is worth mentioning that the ability of pDCs to produce IFN α was not improved by previous co-culture with $\gamma\delta$ T cells. We demonstrated that HMB-PP drove a potent activation of $\gamma\delta$ T cells associated with IFN γ secretion and CD107 exposure (Supplementary Figure 4A), whereas Zol didn't have such impact on $\gamma\delta$ T cells (Supplementary Figures 4B,C), even so both activators were able to drive $\gamma\delta$ T cell-dependent pDCs activation (Figure 2B). The levels of modulation of pDCs induced by $\gamma\delta$ T cells were lower compared to the one triggered by TLR7/9L, strong stimulators of pDCs (Supplementary Figure 3A). Furthermore, we checked that HMB-PP, Zol alone or in combination didn't not have

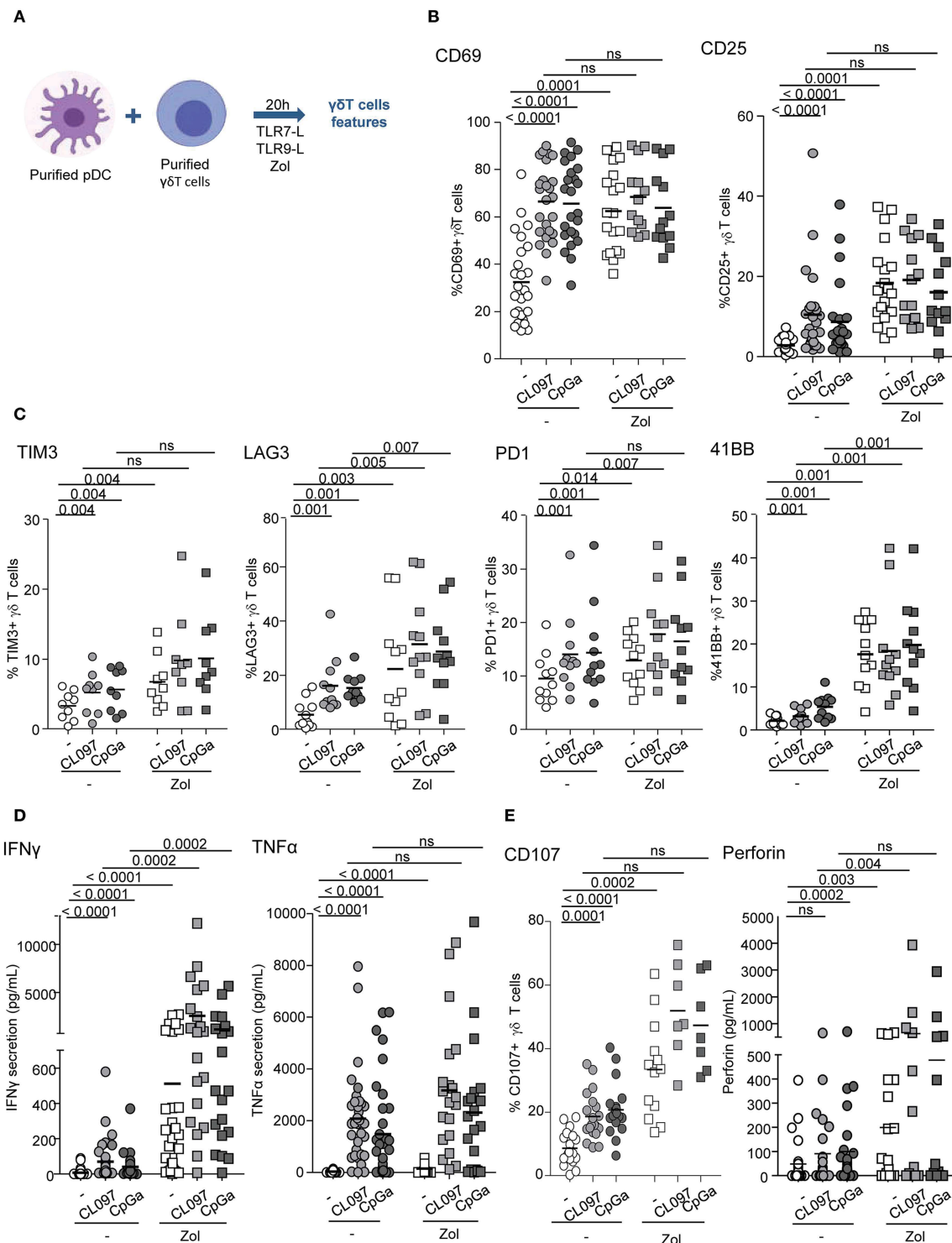


FIGURE 1 | pDCs trigger phenotypic modulation and functional activity of $\gamma\delta$ T cells. Purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells from healthy donors' blood were cocultured in absence (white dots) or presence of TLR7L (CL097) (light gray symbols), TLR9L (CpGa) (dark gray symbols) together with zoledronate (Zol) (square symbols) or not (round symbols). The phenotypic features of $\gamma\delta$ T cells were depicted by flow cytometry. **(A)** Experimental scheme. **(B)** Activation status of $\gamma\delta$ T cells evaluated by assessing CD69 and CD25 expression ($n = 13$ –26). **(C)** Expression of selected immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells: TIM3, LAG3, PD1, and 41BB ($n = 7$ –11). **(D)** IFN γ and TNF α cytokine secretions were quantified in the culture supernatants by CBA ($n = 20$ –30). **(E)** The cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells was evaluated through CD107 surface expression and perforin secretion upon subsequent coculture with melanoma tumor cells ($n = 7$ –21). P -values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction.

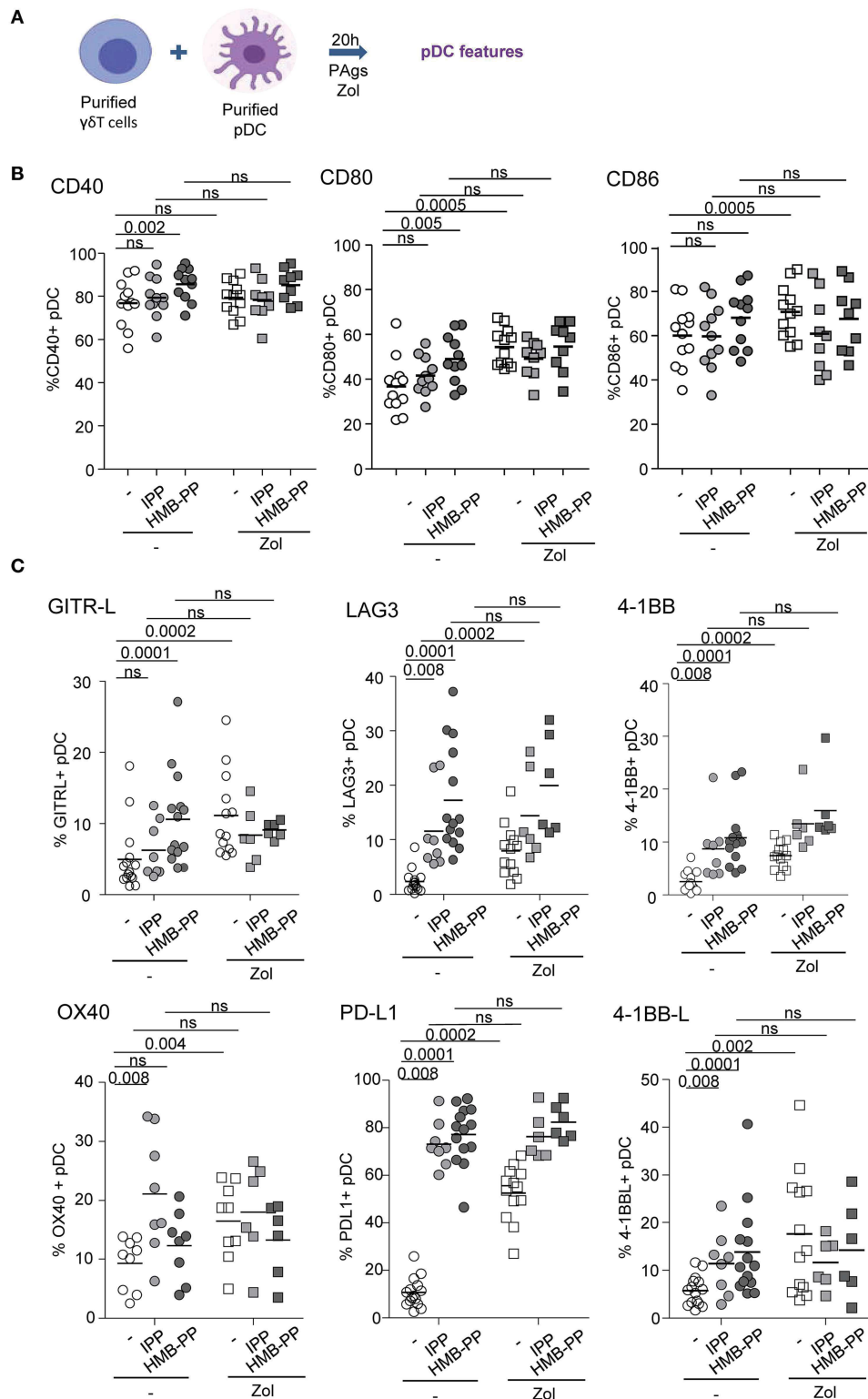


FIGURE 2 | $\gamma\delta$ T cells induce phenotypic modulation of pDCs. Purified $\gamma\delta$ T cells and pDCs from healthy donor blood were cocultured in absence (white dots) or presence of the phosphoantigens IPP (light gray symbols) or HMB-PP (dark gray symbols) together with zoledronate (Zol) (square symbols) or not (round symbols). The phenotypic features of pDCs were depicted by flow cytometry. **(A)** Experimental scheme. **(B)** Activation status of pDCs evaluated by assessing CD40, CD80, and CD86 expression ($n = 9-12$). **(C)** Expression of selected immune checkpoints by pDCs: GITR-L, PD-L1, LAG3, TIM3, 4-1BB, 4-1BB-L, and OX40 ($n = 6-12$). P -values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction.

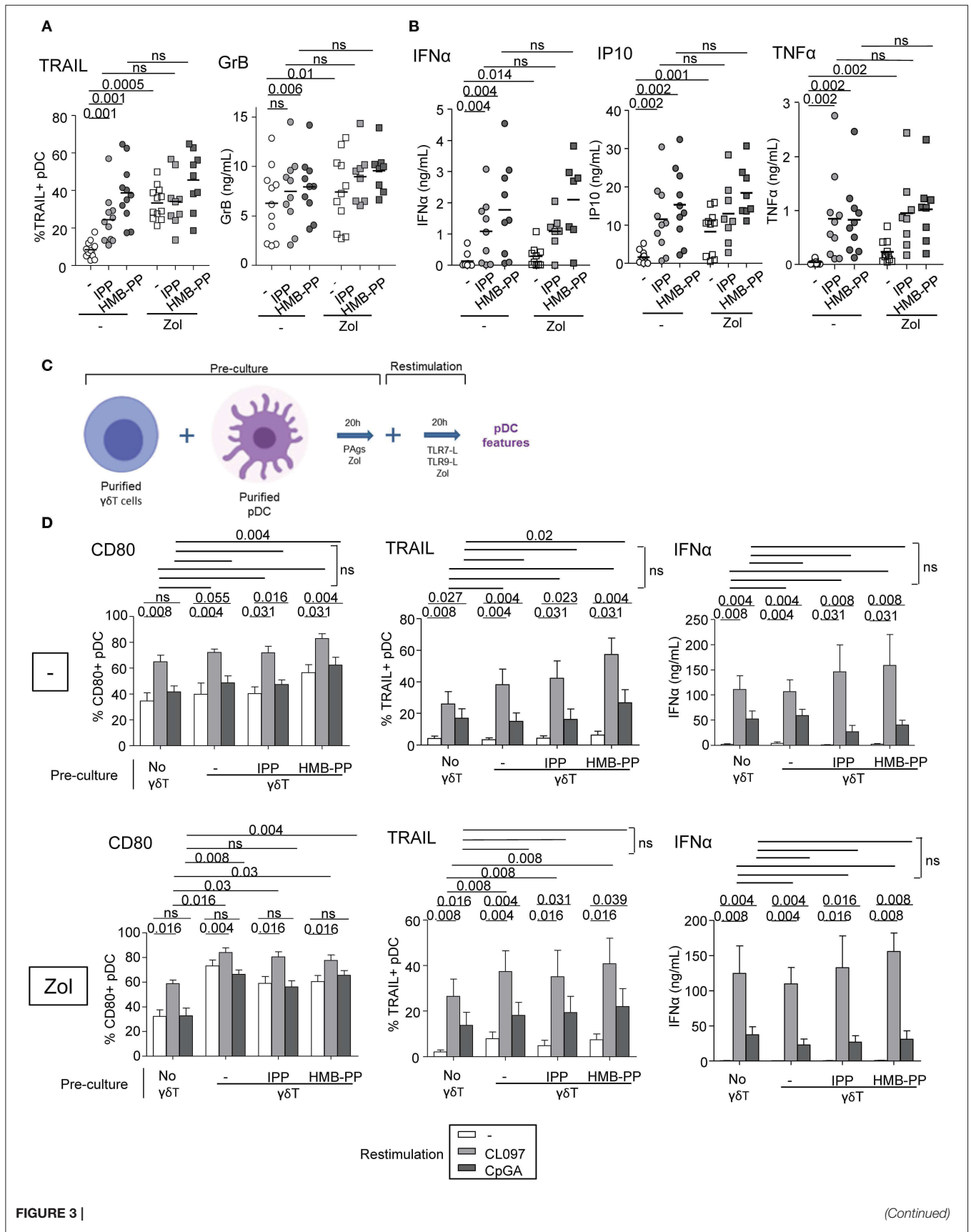


FIGURE 3 | $\gamma\delta$ T cells trigger functional activity of pDCs. Purified $\gamma\delta$ T cells and pDCs from healthy donor' blood were cocultured in absence (white dots) or presence of the phosphoantigens IPP (light gray symbols) or HMBPP (dark gray symbols) together with zoledronate (Zol) (square symbols) or not (round symbols). **(A)** The cytotoxic capacity of pDCs was measured through expression of TRAIL and secretion of Granzyme B ($n = 8-12$). **(B)** IFN α , IP10, and TNF α cytokine secretions were quantified by CBA in the culture supernatants ($n = 8-11$). *P*-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction. **(C,D)** The ability of pDCs to respond to a subsequent TLR stimulation was evaluated by measuring CD80 expression, TRAIL exposure and IFN α secretion upon further culture in presence or not of TLR7L (CL097) or TLR9L (CpG $_A$) and in absence (upper panels) or presence of Zol (lower panels) ($n = 9$). Bars represents mean \pm SEM. *P*-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test.

any direct impact on pDCs (**Supplementary Figure 3B**). Importantly, activation of $\gamma\delta$ T cells was required as no evident modulation of pDCs was induced by unstimulated $\gamma\delta$ T cells compared to pDCs cultured alone without $\gamma\delta$ T cells (**Supplementary Figure 5B**). During $\gamma\delta$ T cell/pDC cocultures, IFN γ was produced only in presence of phosphoantigens but not Zol alone (**Supplementary Figure 5C**). Thus, these observations unprecedentedly suggest that PAg-activated $\gamma\delta$ T cells elicit pDCs' activation and functionality, even enhancing their potentialities.

Both Soluble Factors and Membrane Contacts Are Required for pDCs— $\gamma\delta$ T Cells Reciprocal Interplays

We next investigated the implication of soluble factors and cell-cell contacts in the bidirectional cross-talk between pDCs and $\gamma\delta$ T cells. Co-cultures were performed by physically separating the cells using Transwells (0.4 μ m pores). In transwell conditions, the activation of $\gamma\delta$ T cells triggered by TLR7/9-stimulated pDCs was partially (CD69) or totally (CD25) abrogated while IFN γ secretion and cytotoxicity were almost totally inhibited (**Figure 4A**). Similar results were obtained for $\delta 2+$ and $\delta 2-$ T-cell subsets (**Supplementary Figure 6**). This suggests that both soluble mediators and membrane contacts are required for pDCs to tune $\gamma\delta$ T cells. Furthermore, the modulation of pDCs elicited by PAg-activated $\gamma\delta$ T cells didn't occur in transwell conditions, as revealed by the absence of upregulation of activation molecules, TRAIL exposure and IFN α secretion, even though IP-10 and TNF α secretions were strongly reduced but not totally (**Figure 4B**). These observations demonstrated that $\gamma\delta$ T cells use mostly cell contacts to modulate pDCs, and to a lesser extend soluble mediators. In presence of Zol, the reciprocal impact of pDCs and $\gamma\delta$ T cells on each other was totally abrogated when cells were physically separated (**Figures 4A,B**), suggesting exclusive cell-cell contacts. These results indicate that pDCs and $\gamma\delta$ T cells cross-regulate each other through soluble factors and membrane contacts, the TLR pathway requiring both signals whereas the PAg/Zol pathway mostly required cell contacts.

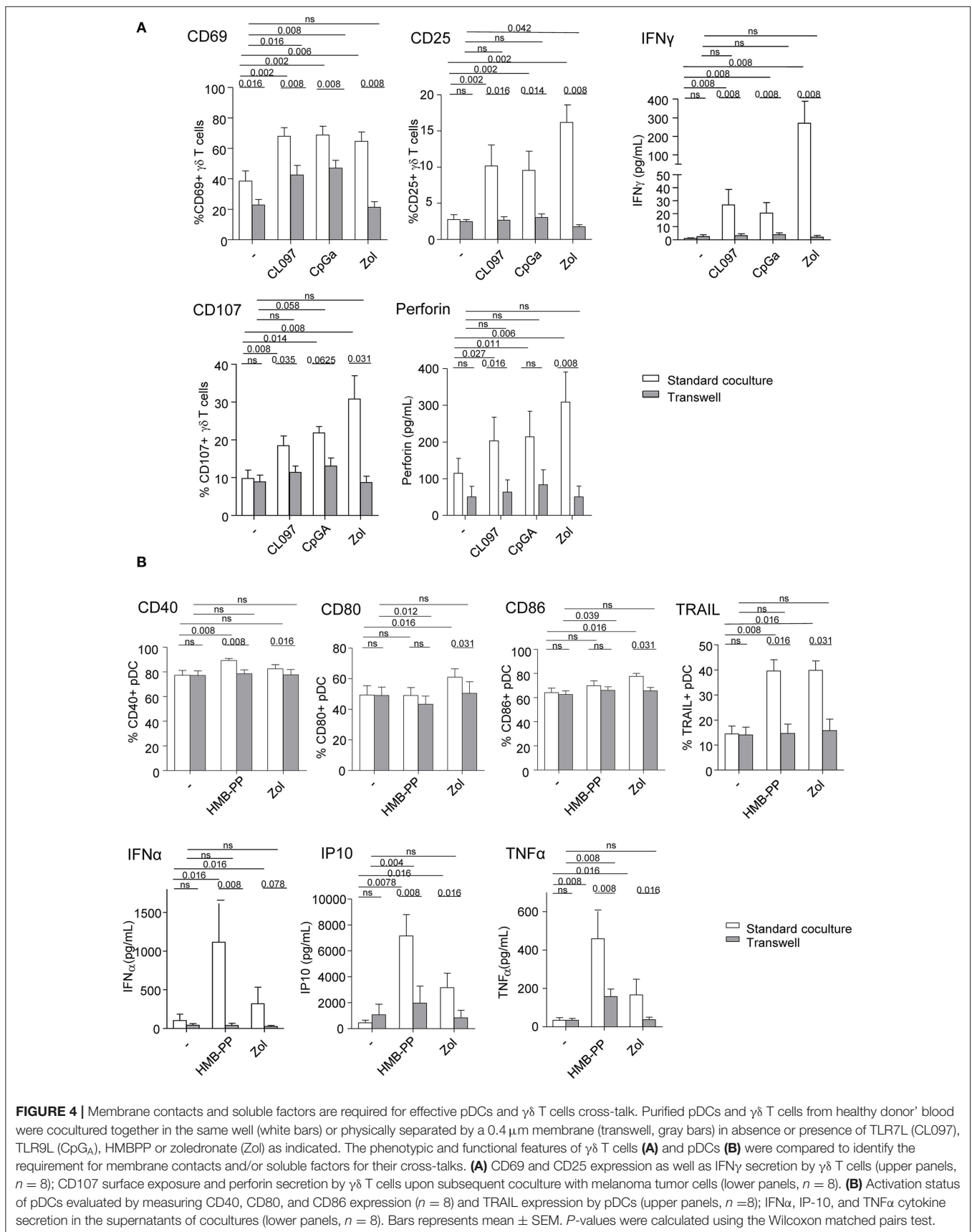
pDCs and $\gamma\delta$ T Cells Express BTN3A

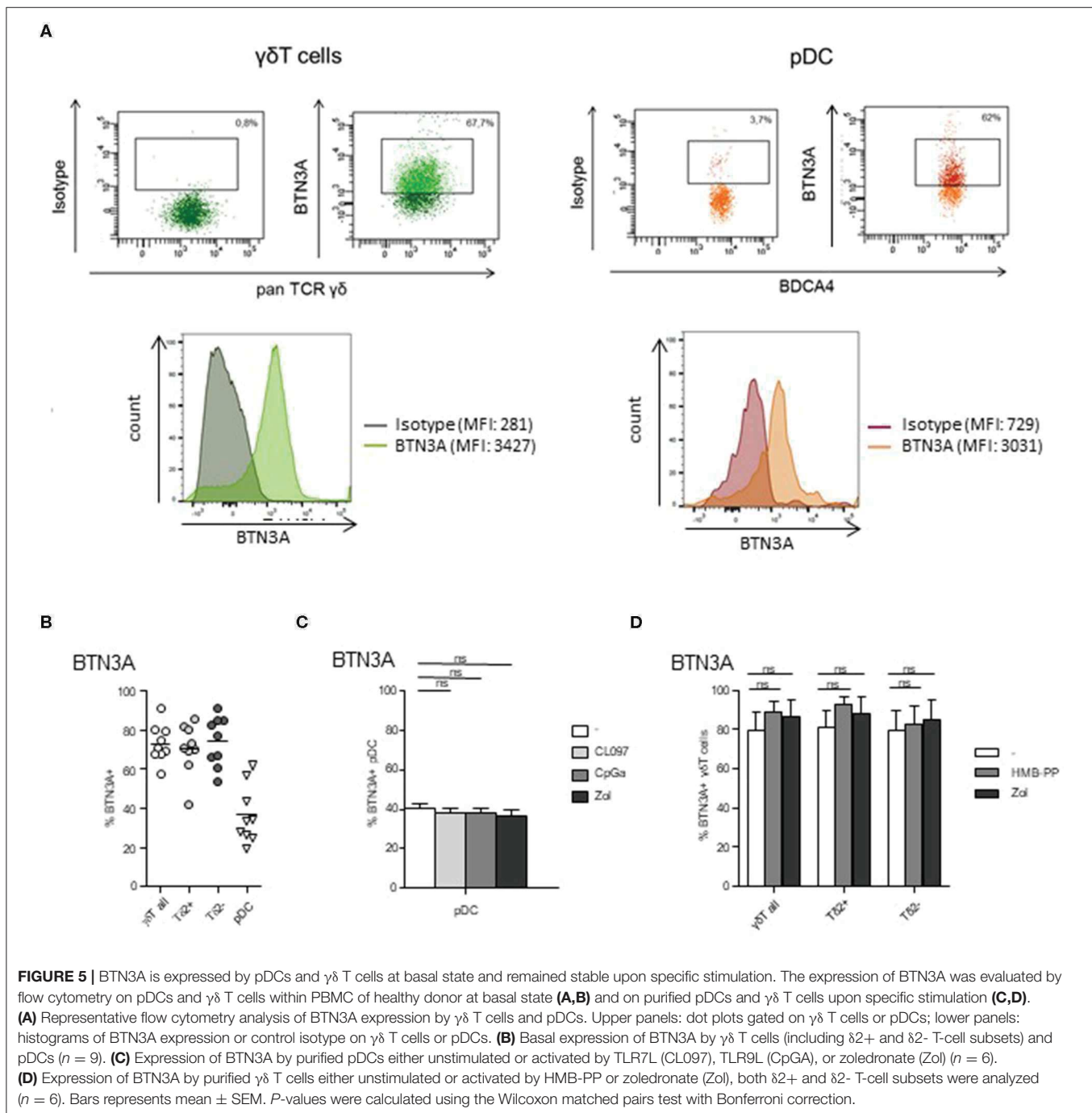
The BTN3A molecule is known to mediate the activation of $\gamma\delta$ T cells by PAg. As its expression by pDCs is totally unknown, we next examined the expression of BTN3A by pDCs as well as by $\gamma\delta$ T cells. We found that BTN3A was expressed by around 40% of pDCs (**Figures 5A,B**), and this level was not modulated by TLR7/9-L or Zol (**Figure 5C**). As expected, $\gamma\delta$ T cells, including both $\delta 2+$ and $\delta 2-$ T-cell subsets, also express BTN3A for 80% (**Figures 5A,B**) whose level stays stable in presence of HMB-PP or Zol (**Figure 5D**). Thus, Zol-treated

pDCs, by accumulating PAg, are well-equipped to activate $\gamma\delta$ T cells through BTN3A/Pag complexes.

TLR-L-Dependent pDC-Induced $\gamma\delta$ T Cells Activation Requires Soluble IFN α , TNF α , Membrane OX40L and Slightly BTN3A, Whereas Zol-Dependent pDC-Induced $\gamma\delta$ T Cells Full Potency Necessitates Mostly BTN3A and IFN α

To further gain insight into the mechanism of pDCs— $\gamma\delta$ T cells interplay, we explored the nature of the soluble factors and membrane molecules required for pDCs to modulate $\gamma\delta$ T cells. For each condition of stimulation (TLR7L, TLR9L, Zol), we performed the co-culture in presence of antibodies blocking the receptors for soluble factors or by pre-incubating pDCs with blocking antibodies directed toward specific surface molecules (**Supplementary Figure 7A**). Molecules were selected based on their expression by pDCs and/or modulation of expression upon TLR7/9 triggering (data not shown), and on the expression of the corresponding receptors on $\gamma\delta$ T cells. Hence, IFN α and TNF α could be potential soluble candidates, and ICOSL, TIM3, PDL1, 41BB, GITRL, LAG3, OX40L, and BTN3A possible membrane candidates. $\gamma\delta$ T cells express some levels of ICOS, PD1, 4-1BB, GITR, and OX40 (**Figure 1C, Supplementary Figure 2A**). We evaluated the expression of TNF α RI, TNF α RII, and IFN α RI/RII on both partners. Under steady state, pDCs expressed TNF α RI, TNF α RII and high level of IFN α RII, whereas $\gamma\delta$ T cells expressed low levels of TNF α RI, TNF α RII, and IFN α RII (**Supplementary Figure 8A**). During pDC/ $\gamma\delta$ T-cell co-cultures (**Supplementary Figure 8B**), we observed a down-modulation of TNF α RII and IFN α RII on pDCs in presence of HMB-PP, CLO97, or CpGA probably due to the presence of the corresponding cytokine on the receptors and/or its modulation of expression by the cytokine. The expression of TNF α RII on $\gamma\delta$ T cells increased in presence of HMB-PP, whereas the expression of IFN α RII remained low. These results suggest that TNF α and IFN α could potentially trigger signaling in $\gamma\delta$ T cells. We observed that single blocking of IFNAR, TNFAR, or OX40L inhibited at least one of the pDC-induced features of $\gamma\delta$ T cells following TLR7-L stimulation or Zol addition but not TLR9 triggering, whereas single blocking of ICOSL, TIM3, PDL1, 41BB, GITRL, or LAG3 had rather an enhancing impact (**Figure 6A**). Interestingly, the blocking of some immune checkpoint, especially LAG3, dramatically enhanced the activation and functionality of $\gamma\delta$ T cells induced by pDCs. By mixing the blocking antibodies displaying a negative ("mix -") or positive ("mix +") impact, the effect on $\gamma\delta$ T cells' potentialities was stronger: the activation,





IFN γ secretion and/or cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells in presence of TLR7/9L were significantly inhibited by simultaneously blocking IFN α , TNF α , and OX40L, whereas $\gamma\delta$ T cells' features were enhanced in presence of the mixture of anti-ICOSL, TIM3, PDL1, 41BB, GITRL, and LAG3 antibodies (Figure 6B). In Zol condition, only IFN γ secretion was strongly abrogated by the "mix -." Very interestingly, the features of $\gamma\delta$ T cells induced by TLR7/9L-activated pDCs were slightly but significantly impacted by the blocking of BTN3A, whereas this

setting totally abrogated Zol-dependent triggering of $\gamma\delta$ T cells (Figure 6C). We then elaborated a "Supermix" by combining the mixture of antibodies displaying an inhibitory impact (IFNAR, TNFAR and OX40L) together with anti-BTN3A1 antibodies. Strikingly, the Supermix totally abrogated the activation, IFN γ secretion and cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells triggered by TLR7/9L- or Zol-activated pDCs (Figure 6D). Importantly, blocking of BTN3A alone or use of the Supermix didn't impact the ability of pDCs to upregulate activation molecules or secrete IFN α

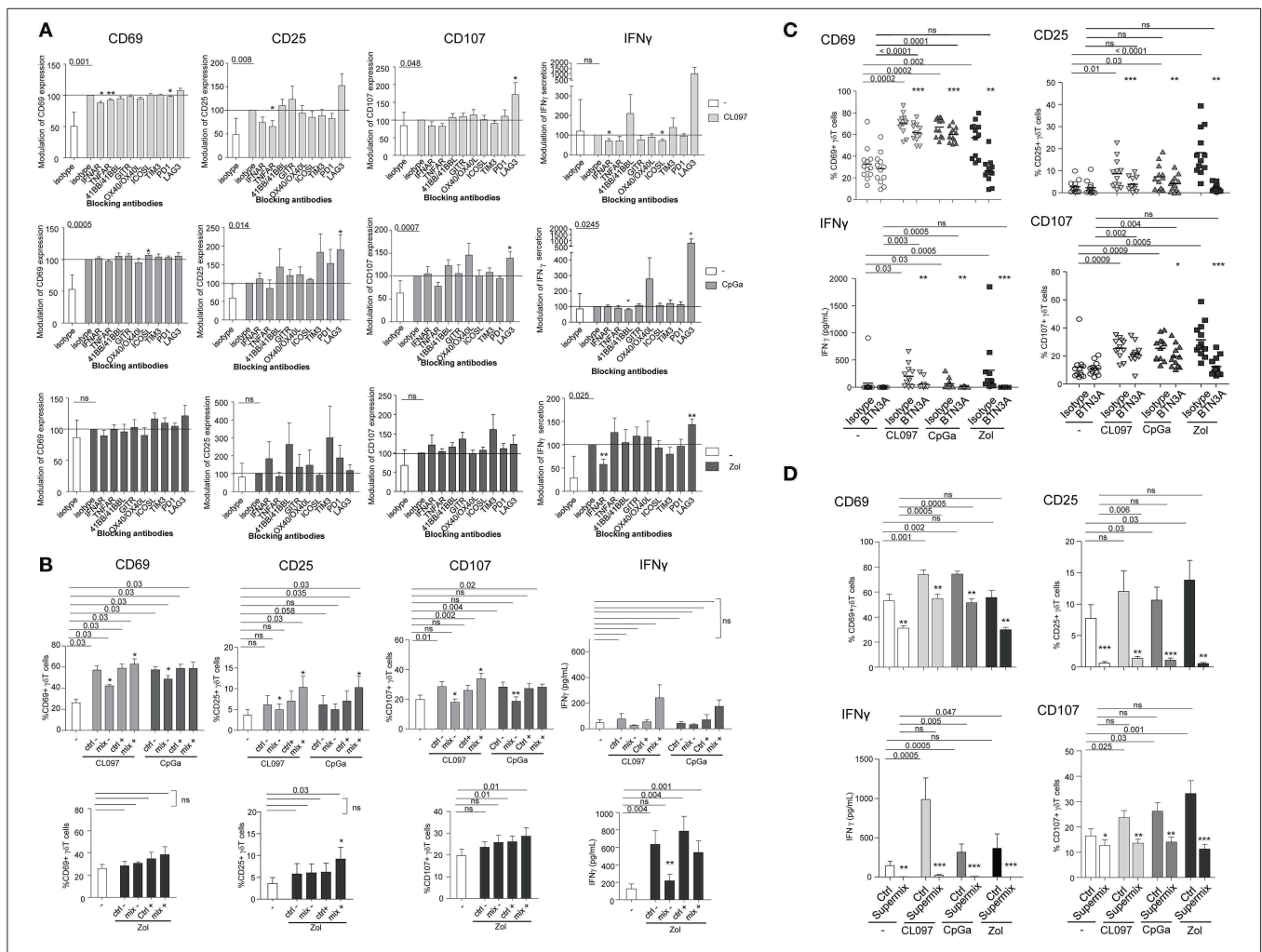


FIGURE 6 | Revealing the molecular mechanisms involved in the pDCs- $\gamma\delta$ T cells cross talk. Purified pDCs from healthy donors' blood were pre-incubated with single or mixtures of blocking antibodies and cocultured with purified $\gamma\delta$ T cells in the presence or not of TLR7-L (CL097) (light gray bars/symbols), TLR9-L (CpGa) (dark gray bars/symbols) or zoledronate (Zol) (black bars/symbols) as described in **Figure S7**. The features of $\gamma\delta$ T cells were then depicted: the activation status (CD25 and CD69 expression) and the cytotoxic activity (CD107 surface exposure) were analyzed by flow cytometry; IFN γ secretion was measured by CBA in the supernatants. **(A)** Blocking with single antibodies: anti-IFNAR2, -TNFR1/TNFR2, -ICOS-L, -TIM3, -PD1, -41BB/41BB-L, -GITR, -LAG3, OX40/OX40-L antibodies. Results were standardized toward the stimulated isotype-matched control condition ($n = 12-16$). **(B)** Blocking with a mixture of antibodies. For TLR7/9L and Zol stimulation, the "mix -" is composed of anti-IFNAR2, -TNFR1/TNFR2, and -OX40 antibodies, and the "mix +" composed of anti-TIM3, -PD-1, -4-1BB, -GITR antibodies ($n = 6-10$). The groups "ctrl -" and "ctrl +" correspond to the mixture of isotype control Abs corresponding, respectively, to the "mix -" and "mix +" groups. **(C)** Blocking with single anti-BTN3A antibodies ($n = 12$). **(D)** Blocking with a Supermix composed of the inhibitory mixture (mix- as in **B**) together with anti-BTN3A blocking antibody ($n = 12$). Bars represents mean \pm SEM. P -values were calculated using the Wilcoxon-matched pairs test. Lines: comparison between the stimulated condition and the unstimulated one. Stars: comparison within the stimulated conditions between the specific blocking and the corresponding control isotype (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); only significant statistics are reported.

in response to TLR7/9L stimulation (**Supplementary Figure 9**). By directly comparing the BTN3A and Supermix conditions (**Supplementary Figure 10**), we observed that, in presence of TLR-L, BTN3A has a slight inhibitory impact that can be further improved by the blocking of the molecules targeted by the Supermix, whereas in presence of Zol, BTN3A is the major player involved in the cross-talk as its effect cannot be further improved by the Supermix. Thus, these observations revealed that TLR-L-dependent pDC-induced $\gamma\delta$ T cells triggering required soluble IFN α , TNF α , membrane OX40L and slightly BTN3A, whereas

Zol-dependent pDC-induced $\gamma\delta$ T cells full potency relies mostly on BTN3A and IFN α .

PAg-Dependent $\gamma\delta$ T Cells-Induced pDC Stimulation Requires Exclusively BTN3A and IFN α

To decipher the mechanism of $\gamma\delta$ T cells—pDCs interplay, we further investigated the nature of the soluble factors and membrane molecules required for $\gamma\delta$ T cells to modulate

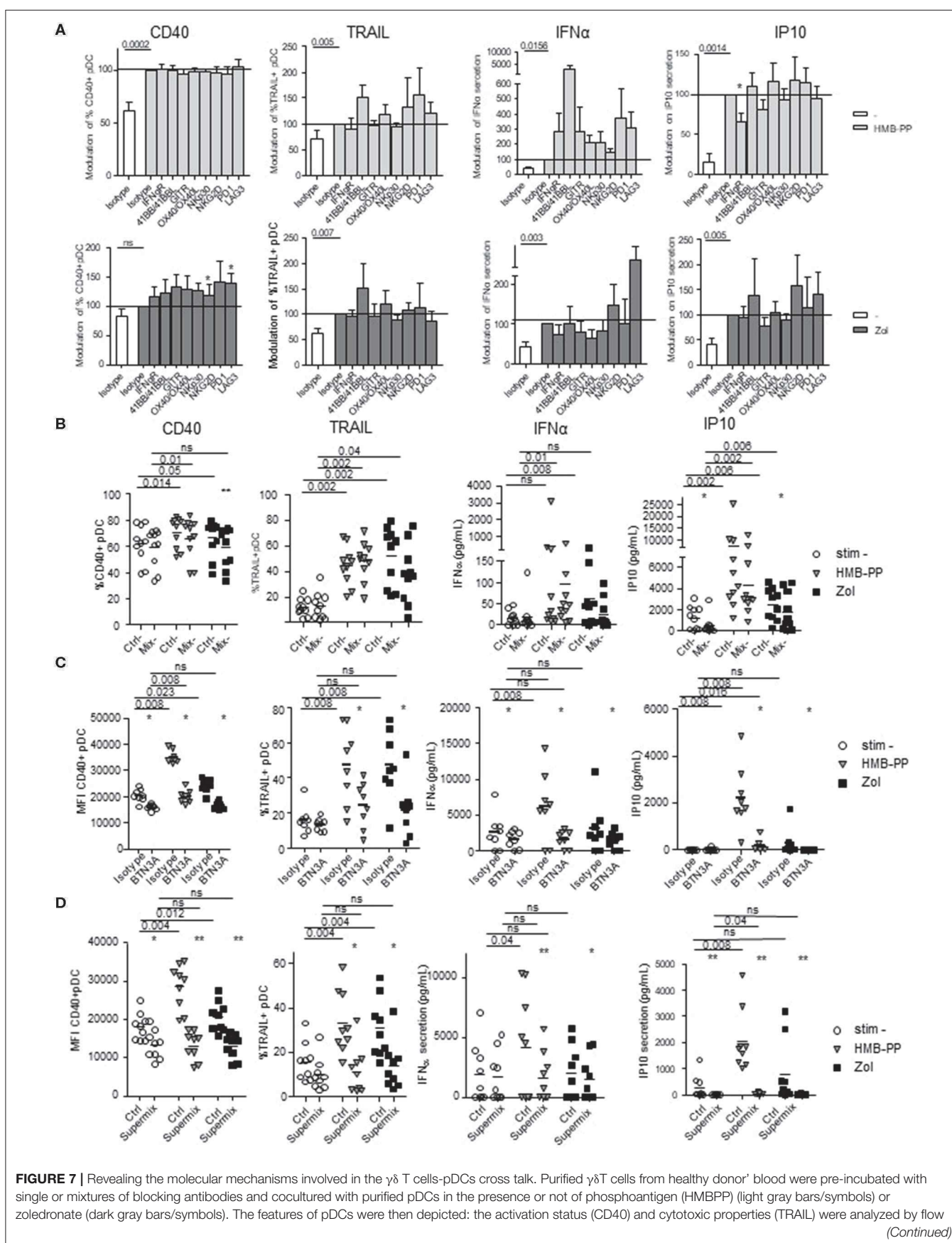


FIGURE 7 | cytometry, whereas the cytokine secretion (IFN α , IP10) was assessed by CBA in the supernatants. **(A)** Blocking with single antibodies: anti-IFN γ R, -NKG2D, -NKp30, -PD-1, -41BB/41BB-L, -GITR, -LAG3, -OX40/OX40-L antibodies. Modulations were standardized toward the isotype-matched control condition ($n = 15$). Bars represents mean \pm SEM. **(B)** Blocking with a mixture of blocking antibodies composed of anti-IFN γ R, -NKp30, and -GITR antibodies ($n = 10$). **(C)** Pre-activated $\gamma\delta$ T cells with HMB-PP and Zol during 4 h were mixed with pDCs pre-blocked with single anti-BTN3A for 2 h ($n = 8$). **(D)** Cultures were performed in presence of the Supermix composed of the inhibitory mix together with anti-BTN3A. $\gamma\delta$ T cells were pre-activated with HMB-PP and Zol during 4 h in presence of the inhibitory mix for the last 2 h and mixed with pDCs pre-blocked with single anti-BTN3A for 2 h ($n = 9$). Lines: comparison between the stimulated condition and the unstimulated one. Stars: comparison within the stimulated conditions between the specific blocking and the corresponding control isotype (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; only significant statistics are reported).

pDCs. For each condition of stimulation (HMB-PP, Zol), we performed the co-culture in presence of antibodies blocking the receptors for soluble factors or by pre-incubating $\gamma\delta$ T cells with blocking antibodies directed toward specific surface molecules (**Supplementary Figure 7B**). Molecules were selected based on their expression by $\gamma\delta$ T cells and/or modulation of expression upon HMB-PP stimulation (data not shown). Hence, IFN γ could be a potential soluble candidate, and NKG2D, NKp30, PD1, 41BB, GITR, LAG3, OX40, and BTN3A1 possible membrane candidates. We observed that single blocking of IFN γ R inhibited IP-10 secretion upon HMB-PP stimulation (**Figure 7A**). The single blocking of NKp30 and GITR had also a slight negative impact on at least one of the pDC-induced features of $\gamma\delta$ T cells, whereas single blocking of 41BB, NKG2D, or LAG3 had rather an enhancing impact in both HMB-PP and Zol conditions (**Figure 7A**). By mixing the blocking antibodies displaying a negative (“mix –”) impact, the effect on pDCs’ potentialities was stronger: the activation, TRAIL exposure, IFN α and IP10 secretion of pDCs in presence of HMB-PP or Zol were significantly inhibited by simultaneously blocking IFN γ , NKp30, and GITR (**Figure 7B**). However, by mixing the blocking antibodies displaying a positive (“mix +”) impact (anti-41BB, -NKG2D, and -LAG3 antibodies), pDCs’ features were not modified in presence of the mixture (not shown). Importantly, the use of the mix—didn’t impact the ability of $\gamma\delta$ T cells to upregulate activation molecules, secrete IFN γ or exhibit cytotoxicity in response to HMB-PP or Zol stimulation (**Supplementary Figure 11A**). As the blocking of BTN3A1 directly on $\gamma\delta$ T cells prevented their activation in response to HMB-PP (not shown), we pre-activated $\gamma\delta$ T cells with HMB-PP and Zol during 4 h before mixing them with pDCs pre-blocked with anti-BTN3A Abs to assess the involvement of BTN3A in the $\gamma\delta$ T cells-pDC cross-talk. In these settings, $\gamma\delta$ T cells responded to HMB-PP stimulation even though to a lesser extent than in control conditions (**Supplementary Figure 11B**). Strikingly, in these settings, the features of pDCs induced by HMB-PP-activated $\gamma\delta$ T cells were partially (for CD40 and IP10 secretion) or totally (for TRAIL and IFN α secretion) abrogated by the blocking of BTN3A1, whereas the inhibitory effect of BTN3A blocking was total for all parameters in the presence of Zol (**Figure 7C**). Cultures were then performed in presence of the Supermix composed of the inhibitory mix together with anti-BTN3A antibodies. $\gamma\delta$ T cells were pre-activated with HMB-PP and Zol during 4 h in presence of the inhibitory mix for the last 2 h and mixed with pDCs pre-blocked with single anti-BTN3A antibodies for 2 h. Remarkably, pDCs activation, TRAIL expression, IFN α and IP10 secretion were totally abrogated in

presence of the Supermix (**Figure 7D**). By directly comparing the BTN3A and Supermix conditions (**Supplementary Figure 12**), we observed that BTN3A has a major inhibitory impact that can be slightly further increased by the blocking of the molecules targeted by the Supermix (especially for CD40, TRAIL, and IP10). Altogether, these observations enlightened that HMB-PP/Zol-dependent $\gamma\delta$ T cells—induced pDCs triggering required mostly soluble IFN γ and membrane BTN3A1. Such interplay could be further enhanced by NKp30 and GITR.

DISCUSSION

Based on their outstanding features, both pDCs and $\gamma\delta$ T cells can be considered as sentinels and orchestrators of immune responses, able to trigger and orientate immune responses against pathogens and tumors. However, these two actors can be corrupted by pathogens or tumor cells, leading to pathogenic immune responses. We explored the interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells and highlight for the first time the existence of reciprocal interactions between these key potent immune players, deciphering the mechanisms underlying such cross-talk (**Figure 8**).

We demonstrate that TLR7/9L- or Zol-stimulated pDCs drive potent $\gamma\delta$ T cells activation, enhancing Th1 cytokine secretion and cytotoxic activity. We also show that $\gamma\delta$ T cells activated by PAg trigger pDC phenotypic changes and elicit their functional activities. Moreover, we provide evidence that these interactions require cell-cell contact and soluble factors, and identify the underlying mechanism of their interplay. The features of $\gamma\delta$ T cells triggered by pDCs activated by ABP (Zol) or TLRL were comparable in intensity to the DC-independent ones elicited by PAg such as HMB-PP. However, while PAg activate only the V δ 2+ T cell subset, pDCs were able to additionally activate the V δ 2- T cell subset. Interestingly, we point out that $\gamma\delta$ T cells activated by pDCs displayed some differences compared to $\gamma\delta$ T cells activated by moDC. Indeed, previous studies, mostly relying on the use of *ex-vivo* generated moDCs, highlighted that in presence of Zol, moDCs can induce the activation, proliferation and immunoregulatory functions of $\gamma\delta$ T cells without enhancing their cytotoxicity (34, 39). In turn, $\gamma\delta$ T cells promote DC maturation and improve their capacity to trigger adaptive $\alpha\beta$ T cell responses (3). We demonstrate that pDCs can elicit the cytotoxic function of $\gamma\delta$ T cells, whereas most studies using moDCs revealed that cytotoxicity was not induced. Also, compared to previous studies that exclusively used ABP, we enlightened that TLRL-activated pDCs can drive potent $\gamma\delta$ T cells’ activation and functionality. This is in accordance with

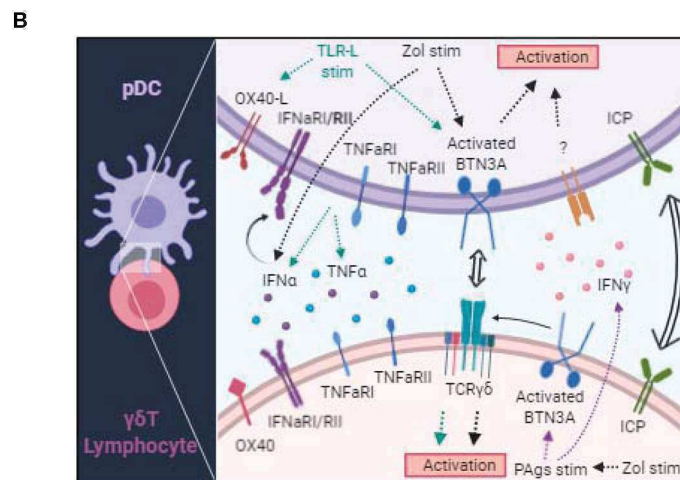
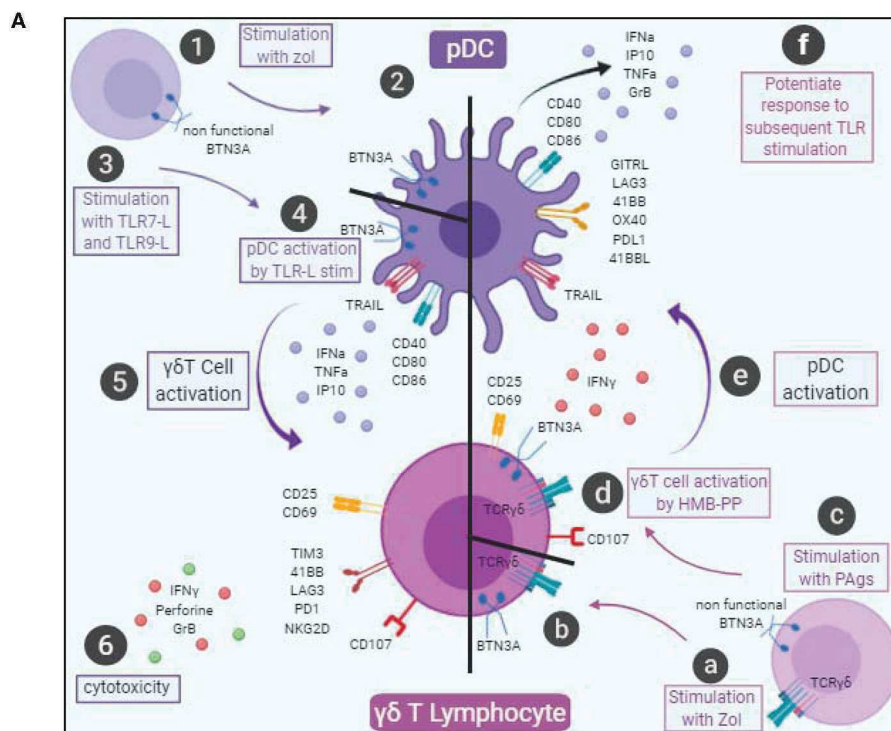


FIGURE 8 | Graphical summary. **(A)** Cellular interactions between pDCs and $\gamma\delta$ T cells. pDCs stimulated with Zol probably undergo a BTN3A conformational change (steps 1–2). pDCs stimulated with TLR7L or TLR9L upregulate CD40, CD80, CD86 and secrete IFN α , TNF α , and IP10 (steps 3–4). These changes drive $\gamma\delta$ T cell activation, modulation of immune checkpoint expression together with IFN γ secretion and trigger their cytotoxic potential (steps 5–6). $\gamma\delta$ T cells stimulated in presence of Zol (steps a–b) or with PAg (step c) probably undergo a BTN3A conformational change that subsequently elicit activation molecules, cytotoxic potential and IFN γ secretion (step d). Such modifications trigger pDC activation, modulation of immune checkpoint expression together with secretion of IFN α , TNF α , and IP10 and upregulation of TRAIL (step e), and potentiate their response to a subsequent TLR-L triggering (step f). **(B)** Molecular mechanisms involved in the bidirectional cross-talk between pDCs and $\gamma\delta$ T cells. pDC-triggered $\gamma\delta$ T cell activation involves soluble factors (IFN α , TNF α) and surface molecules (OX40L and BTN3A). $\gamma\delta$ T cell-triggered pDC activation involves soluble factors (IFN γ) and surface molecules (BTN3A). Both cross-talks can be modulated negatively or positively by immune checkpoints.

one study that demonstrated that mDCs and pDCs activated by TLR3L, TLR7/8L, or TLR9L can trigger IFN γ secretion by V γ 9 δ 2 T cells (37). In our hands, pDCs activate both V δ 2+ and

V δ 2- T cells, provoke major phenotypic changes (upregulation of CD25 and CD69, modulation of immune checkpoint expression) and drive their cytotoxicity toward tumor cells. We also

demonstrate that in turn IPP or HMB-PP stimulated- $\gamma\delta$ T cells triggered major phenotypic and functional changes in pDCs, driving their activation (CD40, CD80, CD86), cytokine release (IFN α , IP10), and cytotoxicity (TRAIL upregulation). We used both IPP and HMB-PP to decipher whether phosphoantigens from different sources (bacterial/mammalian) could have similar effects on the pDC/ $\gamma\delta$ T cell cross-talk. Even though IPP and HMB-PP exhibit the same potency on $\gamma\delta$ T/pDC cross-talk but with different magnitude, this is not a matter of doses because we chose the optimal dose for each of them, within the μ M range for IPP and within the nM range for HMB-PP. HMB-PP is a more potent stimulator at doses 1,000 times inferior. Actually, it has been demonstrated that IPP and HMB-PP have a different affinity for the B30.2 intracellular domain of BTN3A, IPP exhibiting an affinity of 672 mM and HMB-PP was found to bind with an affinity of 1.1 mM, explaining the 1,000- to 10,000-fold difference in bioactivity of the two molecules (25, 40). Another study revealed that, upon a 6-day coculture, CpG β -activated pDCs triggered the proliferation of V γ 9 δ 2 T cells with a preferential expansion of the memory subsets (both central memory and effector memory), and induced their polarization toward IL-17 secretion (41). We also found a slight (but not significant) increase in IL17 secretion in cocultures of pDC- $\gamma\delta$ T cells in presence of TLR7L+Zol compared to unstimulated cocultures (data not shown), which may confirm the tendency of pDCs to drive Th17-oriented $\gamma\delta$ T cells. Notably, we also reported that pDC- $\gamma\delta$ T cells interplay can be strongly enhanced or inhibited by blocking selective immune checkpoints, offering opportunities to further modulate and orientate the outcomes of these cross-talks.

We deciphered the mechanism of such interplay, and highlight differential TLR-L- or Zol-dependent pathways. Previous reports have demonstrated that interplay between moDC and $\gamma\delta$ T cells involved both soluble and membrane-bound signals. Such interaction was found to be dependent on PAg (IPP) (32, 42, 43), cytokines (IL12, IL15, TNF α , IFN α/β) (34, 37, 39) and cell contact (adhesion molecules CD54-CD11a, CD86-CD28) (33, 35). Reciprocally, V γ 9V δ 2 T cell lines stimulated with HMB-PP promote moDC maturation and IL12 secretion (33, 36), which was found to depend on CD1c and TNF α (44) or IFN γ (45) or cell contact (33). Neither immature moDCs nor their mature counterparts were capable of activating $\gamma\delta$ T cells, but they acquired this ability when stimulated with zoledronate (32). We also point out that the cross-talk between pDCs and $\gamma\delta$ T cells occurs only upon activation of one partner. Our study revealed that TLR-L dependent pDC-induced $\gamma\delta$ T cells triggering required soluble IFN α , TNF α , membrane OX40L and slightly BTN3A, whereas Zol-dependent pDC-induced $\gamma\delta$ T cells full potency necessitated mostly BTN3A and IFN α . ABP target the intracellular mevalonate pathway and by blocking the farnesyl pyrophosphate synthase induces the accumulation of metabolites (such as IPP). ABP triggers a DC-dependent activation of $\gamma\delta$ T cells. Even though Zol had no direct effect on pDCs activation or cytokine secretion, it most likely elicits accumulation of IPP that further activate $\gamma\delta$ T cells through BTN3A. It would be also critical to investigate the TCR $\gamma\delta$ -dependency of activation of $\gamma\delta$ T cells in pDC/ $\gamma\delta$ T

cells cross-talk, even though we can expect, based on BTN3A blocking experiments, that the TCR $\gamma\delta$ is likely to be slightly involved in the activation of the $\gamma\delta$ T cells by TLR-L-stimulated pDCs, but strongly required in the pDC-dependent activation of $\gamma\delta$ T cells in presence of Zol. We show for the first time that human pDCs express BTN3A molecules, hence being potent mediators of PAg-induced $\gamma\delta$ T cells activation. Zol treatment of pDCs may lead to accumulation of IPP, which either provokes a conformational change of BTN3A or is released through ABCA1 transporter, mediating activation of $\gamma\delta$ T cells. It has been recently demonstrated that intracellular IPP, accumulated following mevalonate pathway inhibition, is released by Zol-treated DCs through the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in cooperation with apolipoprotein A-I (apo-I) and BTN3A1 (46). Regulation of BTN3A1 stability together with protein trafficking and expression of the transporter ABCA1 within tumor microenvironment, as shown for doxorubicin (47), may be crucial to trigger optimal cross-talks between DCs and $\gamma\delta$ T cells. Conformational changes of BTN3A1 might represent a key step in the detection of infection or tumorigenesis by $\gamma\delta$ T cells (48). Depending on the isoform, BTN3 molecules could have stimulatory or inhibitory activity, suggesting that they might be considered as novel immune checkpoint to be targeted to potentiate the anti-tumor/viral activity of $\gamma\delta$ T cells (49). The mandatory role of BTN3A in pDCs/ $\gamma\delta$ T cells bidirectional cross-talks that we highlight here renders it central in the regulation of immune responses toward infected or tumor cells, and very promising to design or optimize immunotherapeutic strategies.

Interestingly, it has been demonstrated that MICA and MICB can be expressed by DCs under certain conditions and function as activator ligands for NK and $\gamma\delta$ T cells. Indeed, in response to IFN α , DCs are able to express MICA/B and activate NK cells following ligation of NKG2D (50), and Mycobacterium tuberculosis-infected DCs were shown to express MICA and subsequently activate V δ 2+ T cells (51). The ability of pDCs to express MICA/B still remains to be determined, but this is likely that pDCs may express MICA/B upon TLR-L stimulation that drive IFN α production, and further regulate $\gamma\delta$ T cells through NKG2D.

Our study highlights that the interactions between pDCs and $\gamma\delta$ T cells could play a role in the therapeutic activity of ABP. Such cross-talk may participate to the beneficial immune effects of Zol administration in cancer (9). ABP drugs used as adjuvant cancer therapy for the treatment of malignant osteolytic bone disease, could activate the anti-tumor effector functions of $\gamma\delta$ T cells via pDCs. Interestingly, it has been shown in colorectal cancer that Zol can induce the expression of BTN3A1 within the tumor microenvironment thus stimulating effector $\gamma\delta$ T cells with antitumor activity (52).

Therapies exploiting the potential of either pDCs or $\gamma\delta$ T cells are currently emerging (53–55). Indeed, anti-cancer therapies can exploit the power of $\gamma\delta$ T cells (56) through indirect stimulation by ABP (zoledronate, pamidronate) of V δ 2+ cells or adoptive transfer of *ex-vivo* expanded $\gamma\delta$ T cells that revealed promising clinical efficacy. Besides, pDCs can be mobilized by administration of TLR-L leading to protective

antitumor responses (57), or can be directly used as vectors for vaccination (11, 58, 59). The interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells could be exploited to achieve reciprocal activation and pave the way for novel immune-based strategies, influencing pDCs through modulation of $\gamma\delta$ T cells and reciprocally affecting $\gamma\delta$ T cells by impacting pDCs. Our findings provide rationale for combinatorial therapy engaging both cell types, by simultaneously targeting pDCs and $\gamma\delta$ T cells using both TLR agonists and ABP for synergistic activity. The expanded knowledge on pDC— $\gamma\delta$ T cells interactions brings opportunities for new immunotherapies harnessing their potential.

All studies including ours were performed *ex vivo*, but we can envision that pDCs and $\gamma\delta$ T cells have the opportunity to meet and interact *in vivo* in pathophysiological conditions. Indeed, pDCs can be located in blood and lymphoid tissues, and accumulate at inflammatory sites. $\gamma\delta$ T cells, which are found in the circulation and in tissue (such as epidermis, dermis, intestine, lung, uterus), express chemokine receptor allowing them to migrate to inflamed tissues (CXCR3, CCR5) or lymph nodes (CCR7, CD62L) (60) and are able to migrate to sites of infections (61) where they could meet pDCs. Furthermore, both pDCs and $\gamma\delta$ T cells infiltrate tumors and could meet within tumor microenvironment. Strikingly, there are *in vivo* evidences that the cross-talk between DCs and $\gamma\delta$ T cells is involved in many physiopathological situations. For example, the DC/ $\gamma\delta$ T cells cross-talk can be exploited by pathogens for immune evasion. HIV-infection of mDCs inhibits V γ 9V δ 2 T cell functions (proliferation, cytokine production) and reciprocal DC activation (62). On the opposite, DC/ $\gamma\delta$ T cells cross-talk can initiate/boost immune responses to pathogens. $\gamma\delta$ T cells promote the maturation of DCs and subsequent T-cell priming during West Nile Virus infection (63), and BCG-infected DCs can prime and expand cytotoxic $\gamma\delta$ T cells (39). Such DC/ $\gamma\delta$ T cells cross-talk is also central in host-microbiota interactions as shown for microbiota-activated CD103+ DCs that can elicit $\gamma\delta$ T17 (64) and therefore is central in IL17-driven inflammatory diseases. In addition, DCs activated by ABP can empower $\gamma\delta$ T cells with anti-tumor immunity (43, 65, 66) (activation of $\gamma\delta$ T cells in turn elicit TAA-specific CD8 T cell responses). The cross-talk between pDCs and $\gamma\delta$ T cells has never been address *in vivo*. Investigating $\gamma\delta$ T cell function in mice deficient for pDCs, and pDC function in mice deficient for $\gamma\delta$ T cells in the context of infection or cancer would provide significant relevance for the phenomena that we described *in vitro*. The understanding of the cross-talk between DCs and $\gamma\delta$ T cells is crucial to better exploit it for immunotherapy.

Together, pDCs and $\gamma\delta$ T cells have strategic locations covering all epithelial barriers (skin, intestine, lung), circulation and lymph nodes, and sense all potential danger directly on pathogens or on infected/transformed cells through PRR or TCR by recognizing different types of PAMPs, thereby widening the scope of immune responsiveness. pDCs and $\gamma\delta$ T cells display a large panel of cytokine secretion especially type I and II IFN, offer distinct combinations of functional potentials, and may finally decide the tolerogenic or immunogenic nature of the response to elaborate. The cross-talk between these key cellular partners may help refining the type of immune response to elicit to precisely

adjust it to the danger to face. Knowing the crucial involvement of pDCs and $\gamma\delta$ T cells in immunopathologies (cancer, infections, autoimmunity) and given their key role in bridging innate and adaptive immunity through regulation of any other cell function, a better understanding of the interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells can bring opportunities to control the outcome of immune responses against tumors, pathogens, and autoantigens. Our study reveals that pDC and $\gamma\delta$ T cells have the capacity to harness each other potential and to synergise through diverse pathways involving soluble factors and membrane contacts. Acting on such synergy represents a promising way to restore appropriate immune responses in cancers, infections, and autoimmune diseases. These fascinating cell types with unique and crucial functions unveil an additional facet of their potential.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by French Blood Agency's Institutional Review Board (reference #DC-2008-787). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CA conceived the project and directed research. CA and PG designed the experiments and wrote the manuscript. PG, BP, and CA performed the experiments. PG, BP, CA, and LC analyzed the data. LC and JC provided research input and contributed to data interpretation and manuscript editing.

FUNDING

This work was supported by the Etablissement Français du Sang (EFS) AuRA, ANRT, Ligue contre le Cancer, and the Societe Française de Dermatologie (SFD).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. D. Legrand and her staff at EFS Auvergne Rhone-Alpes for providing healthy volunteers' blood samples. We are grateful to the donors who accepted to participate in this study. We thank Dr. Olivier Manches for advices with statistical analyses, Leana Corneloup for experimental help, and Dr. Nathalie Bendriss-Vermare and Dr. Myriam Capone for stimulating discussions and precious advices.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00861/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* (2004) 5:1219–26. doi: 10.1038/ni1141
- Hayday AC. $\gamma\delta$ T cell update: adaptate orchestrators of immune surveillance. *J Immunol.* (2019) 203:311–20. doi: 10.4049/jimmunol.1800934
- Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* (2013) 13:88–100. doi: 10.1038/nri3384
- Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells: development, regulation, and function. *Immunity.* (2019) 50:37–50. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.027
- Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann NY Acad Sci.* (2010) 1183:89–103. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x
- Lalor SJ, McLoughlin RM. Memory $\gamma\delta$ T cells—newly appreciated protagonists in infection and immunity. *Trends Immunol.* (2016) 37:690–702. doi: 10.1016/j.it.2016.07.006
- Khairallah C, Dechanet-Merville J, Capone M. $\gamma\delta$ T cell-mediated immunity to cytomegalovirus infection. *Front Immunol.* (2017) 8:105. doi: 10.3389/fimmu.2017.00105
- Lawand M, Dechanet-Merville J, Dieu-Nosjean MC. Key features of gamma-delta T-cell subsets in human diseases and their immunotherapeutic implications. *Front Immunol.* (2017) 8:761. doi: 10.3389/fimmu.2017.00761
- Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. $\gamma\delta$ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat Rev Cancer.* (2019) 19:392–404. doi: 10.1038/s41568-019-0153-5
- Hannani D, Ma Y, Yamazaki T, Dechanet-Merville J, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing $\gamma\delta$ T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol.* (2012) 33:199–206. doi: 10.1016/j.it.2012.01.006
- Tel J, van der Leun AM, Figdor CG, Torensma R, de Vries IJ. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunol Immunother.* (2012) 61:1279–88. doi: 10.1007/s00262-012-1210-z
- Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* (2008) 8:594–606. doi: 10.1038/nri2358
- Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* (2015) 15:471–85. doi: 10.1038/nri3865
- Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN- γ -secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol.* (2003) 33:1052–62. doi: 10.1002/eji.200323676
- Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* (2008) 29:352–61. doi: 10.1016/j.immuni.2008.09.002
- Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* (2006) 176:248–55. doi: 10.4049/jimmunol.176.1.248
- Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu CI, Glaser C, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol.* (2009) 182:6815–23. doi: 10.4049/jimmunol.0802008
- Sisirak V, Faget J, Gobert M, Goutagny N, Vey N, Treilleux I, et al. Impaired IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res.* (2012) 72:5188–97. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3468
- Aspord C, Leccia MT, Charles J, Plumaz J. Melanoma hijacks plasmacytoid dendritic cells to promote its own progression. *Oncoimmunology.* (2014) 3:e27402. doi: 10.4161/onci.27402
- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* (2010) 10:467–78. doi: 10.1038/nri2781
- Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, Michaud HA, Gros L, Eliaou JF, et al. Plasticity of $\gamma\delta$ T cells: impact on the anti-tumor response. *Front Immunol.* (2014) 5:622. doi: 10.3389/fimmu.2014.00622
- Karunakaran MM, Herrmann T. The V γ 9V δ 2 T cell antigen receptor and butyrophilin-3 A1: models of interaction, the possibility of co-evolution, and the case of dendritic epidermal T cells. *Front Immunol.* (2014) 5:648. doi: 10.3389/fimmu.2014.00648
- Gu S, Nawrocka W, Adams EJ. Sensing of pyrophosphate metabolites by V γ 9V δ 2 T Cells. *Front Immunol.* (2014) 5:688. doi: 10.3389/fimmu.2014.00688
- Harly C, Peigne CM, Scotet E. Molecules and mechanisms implicated in the peculiar antigenic activation process of human V γ 9V δ 2 T cells. *Front Immunol.* (2014) 5:657. doi: 10.3389/fimmu.2014.00657
- Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel MC, et al. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T cells. *Immunity.* (2014) 40:490–500. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.003
- Vantourout P, Laing A, Woodward MJ, Zlatareva I, Apolonia L, Jones AW, et al. Heteromeric interactions regulate butyrophilin (BTN) and BTN-like molecules governing $\gamma\delta$ T cell biology. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2018) 115:1039–44. doi: 10.1073/pnas.1701237115
- Yang Y, Li L, Yuan L, Zhou X, Duan J, Xiao H, et al. A structural change in butyrophilin upon phosphoantigen binding underlies phosphoantigen-mediated V γ 9V δ 2 T cell activation. *Immunity.* (2019) 50:1043–53 e1045. doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.016
- Vavassori S, Kumar A, Wan GS, Ramanjaneyulu GS, Cavallari M, El Daker S, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol.* (2013) 14:908–16. doi: 10.1038/ni.2665
- Wrobel P, Shojaei H, Schittek B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, 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.* (2007) 66:320–8. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.01963.x
- Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* (2005) 175:2144–51. doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2144
- Scotet E, Nedellec S, Devilder MC, Allain S, Bonneville M. Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk. *Front Biosci.* (2008) 13:6872–85. doi: 10.2741/3195
- Fiore F, Castella B, Nuschak B, Bertieri R, Mariani S, Bruno B, et al. Enhanced ability of dendritic cells to stimulate innate and adaptive immunity on short-term incubation with zoledronic acid. *Blood.* (2007) 110:921–7. doi: 10.1182/blood-2006-09-044321
- Conti L, Casetti R, Cardone M, Varano B, Martino A, Belardelli F, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol.* (2005) 174:252–60. doi: 10.4049/jimmunol.174.1.252
- von Lilienfeld-Toal M, Sievers E, Bodemuller V, Mihailescu C, Marten A, Gorschluter M, et al. Coculture with dendritic cells promotes proliferation but not cytotoxic activity of gamma/delta T cells. *Immunol Lett.* (2005) 99:103–8. doi: 10.1016/j.imlet.2005.02.001
- Devilder MC, Maillat S, Bouyge-Moreau I, Donnadiou E, Bonneville M, Scotet E. Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol.* (2006) 176:1386–93. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1386
- Dunne MR, Madrigal-Estebas L, Tobin LM, Doherty DG. (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2 enyl pyrophosphate-stimulated Vgamma9Vdelta2 T cells possess T helper type 1-promoting adjuvant activity for human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* (2010) 59:1109–20. doi: 10.1007/s00262-010-0839-8
- Devilder MC, Allain S, Dousset C, Bonneville M, Scotet E. Early triggering of exclusive IFN- γ responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* (2009) 183:3625–33. doi: 10.4049/jimmunol.0901571
- Kunzmann V, Kretzschmar E, Herrmann T, Wilhelm M. Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology.* (2004) 112:369–77. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01908.x
- Martino A, Casetti R, Sacchi A, Poccia F. Central memory Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes primed and expanded by bacillus calmette-guerin-infected dendritic cells kill mycobacterial-infected monocytes. *J Immunol.* (2007) 179:3057–64. doi: 10.4049/jimmunol.179.5.3057
- Rhodes DA, Chen HC, Price AJ, Keeble AH, Davey MS, James LC, et al. Activation of human gammadelta T cells by cytosolic interactions of BTN3A1

- with soluble phosphoantigens and the cytoskeletal adaptor perioplakin. *J Immunol.* (2015) 194:2390–8. doi: 10.4049/jimmunol.1401064
41. Lo Presti E, Caccamo N, Orlando V, Dieli F, Meraviglia S. Activation and selective IL-17 response of human V γ 9V δ 2 T lymphocytes by TLR-activated plasmacytoid dendritic cells. *Oncotarget.* (2016) 7:60896–905. doi: 10.18632/oncotarget.11755
 42. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenó 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.20021500
 43. Cabillic F, Toutirais O, Lavoue V, de La Pintiere CT, Daniel P, Rioux-Leclerc N, et al. Aminobisphosphonate-pretreated dendritic cells trigger successful Vgamma9Vdelta2 T cell amplification for immunotherapy in advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* (2010) 59:1611–9. doi: 10.1007/s00262-010-0887-0
 44. Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, Das H, Sugita M, Morita CT, et al. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med.* (2002) 196:1575–84. doi: 10.1084/jem.20021515
 45. Ismaili J, Olislagers V, Poupot R, Fournie JJ, Goldman M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol.* (2002) 103(3 Pt. 1):296–302. doi: 10.1006/clim.2002.5218
 46. Castella B, Kopecka J, Sciancalepore P, Mandili G, Foglietta M, Mitro N, 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.* (2017) 8:15663. doi: 10.1038/ncomms15663
 47. Rhodes DA, Chen HC, Williamson JC, Hill A, Yuan J, Smith S, et al. Regulation of human $\gamma\delta$ T cells by BTN3A1 protein stability and ATP-binding cassette transporters. *Front Immunol.* (2018) 9:662. doi: 10.3389/fimmu.2018.00662
 48. Boutin L, Scotet E. Towards deciphering the hidden mechanisms that contribute to the antigenic activation process of human V γ 9V δ 2 T cells. *Front Immunol.* (2018) 9:828. doi: 10.3389/fimmu.2018.00828
 49. Blazquez JL, Benyamine A, Pasero C, Olive D. New insights into the regulation of $\gamma\delta$ T cells by BTN3A and other BTN/BTNL in tumor immunity. *Front Immunol.* (2018) 9:1601. doi: 10.3389/fimmu.2018.01601
 50. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* (2003) 170:1249–56. doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1249
 51. Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity.* (2001) 15:83–93. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00168-6
 52. Zocchi MR, Costa D, Vene R, Tosetti F, Ferrari N, Minghelli S, et al. Zoledronate can induce colorectal cancer microenvironment expressing BTN3A1 to stimulate effector $\gamma\delta$ T cells with antitumor activity. *Oncoimmunology.* (2017) 6:e1278099. doi: 10.1080/2162402X.2016.1278099
 53. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* (2012) 12:239–52. doi: 10.1038/nri3174
 54. Eggermont A, Robert C, Soria JC, Zitvogel L. Harnessing the immune system to provide long-term survival in patients with melanoma and other solid tumors. *Oncoimmunology.* (2014) 3:e27560. doi: 10.4161/onci.27560
 55. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies. *Eur J Cancer.* (2016) 53:125–34. doi: 10.1016/j.ejca.2015.09.013
 56. Kobayashi H, Tanaka Y. $\gamma\delta$ T cell immunotherapy—a review. *Pharmaceuticals.* (2015) 8:40–61. doi: 10.3390/ph8010040
 57. Speiser DE, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest.* (2005) 115:739–46. doi: 10.1172/JCI23373
 58. Aspord C, Leccia MT, Salameire D, Laurin D, Chaperot L, Charles J, et al. HLA-A(*)0201(+) plasmacytoid dendritic cells provide a cell-based immunotherapy for melanoma patients. *J Invest Dermatol.* (2012) 132:2395–406. doi: 10.1038/jid.2012.152
 59. Tel J, Aarntzen EH, Baba T, Schreiber G, Schulte BM, Benitez-Ribas D, et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res.* (2013) 73:1063–75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2583
 60. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, et al. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med.* (2003) 198:391–7. doi: 10.1084/jem.20030235
 61. Huang D, Shen Y, Qiu L, Chen CY, Shen L, Estep J, et al. Immune distribution and localization of phosphoantigen-specific Vgamma2Vdelta2 T cells in lymphoid and nonlymphoid tissues in Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun.* (2008) 76:426–36. doi: 10.1128/IAI.01008-07
 62. Sacchi A, Rinaldi A, Tumino N, Casetti R, Agrati C, Turchi F, et al. HIV infection of monocytes-derived dendritic cells inhibits V γ 9V δ 2 T cells functions. *PLoS ONE.* (2014) 9:e111095. doi: 10.1371/journal.pone.0111095
 63. Fang H, Welte T, Zheng X, Chang GJ, Holbrook MR, Soong L, et al. gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (2010) 59:71–80. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00663.x
 64. Fleming C, Morrissey S, Cai Y, Yan J. $\gamma\delta$ T cells: unexpected regulators of cancer development and progression. *Trends Cancer.* (2017) 3:561–70. doi: 10.1016/j.trecan.2017.06.003
 65. Kamigaki T, Takahara M, Maekawa R, Goto S. Zoledronate-pulsed dendritic cell-based anticancer vaccines. *Oncoimmunology.* (2013) 2:e25636. doi: 10.4161/onci.25636
 66. Van Acker HH, Anguille S, Van Tendeloo VF, Lion E. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology.* (2015) 4:e1021538. doi: 10.1080/2162402X.2015.1021538

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 Girard, Ponsard, Charles, Chaperot and Aspord. 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 Material

1 Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. Flow cytometry gating strategy

Purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells from healthy donors' blood were cocultured in absence or presence of TLR7L (CL097), TLR9L (CpG_A), phosphoantigens IPP or HMBPP together with zoledronate (Zol) or not. The phenotypic features of pDCs or $\gamma\delta$ T cells were depicted by flow cytometry. (A-C) Upon pDC stimulation, $\gamma\delta$ T cell features were defined: $\gamma\delta$ T cells were defined using CD45, CD3, pan $\gamma\delta$ TCR and $\delta 2$ markers (A), and CD69, CD25 and CD107 expression were further analyzed (B) together with immune checkpoints (LAG3 is shown) (C). (D-F) Upon $\gamma\delta$ T cell activation, pDC features were depicted: pDCs were determined using CD45, HLA-DR and BDCA4 markers (D), and expression of CD40, CD86 and TRAIL was analyzed (E) together with immune checkpoints (PDL1 is shown) (F).

Supplementary Figure 2. pDCs trigger phenotypic modulation of $\gamma\delta$ T-cell subsets

Purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells from healthy donors' blood were cocultured in absence (white dots) or presence of TLR7L (CL097) (light gray symbols), TLR9L (CpG_A) (dark gray symbols) together with zoledronate (Zol) (square symbols) or not (round symbols). The phenotypic features of $\gamma\delta$ T cells including $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ subsets were depicted by flow cytometry. (A) Expression of selected immune checkpoints and NKR by $\gamma\delta$ T cells: GITR, OX40, NKp30, NKp44 and ICOS (n= 7 to 11). (B-C) Activation status of $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ T-cell subsets evaluated by assessing CD69 (B) and CD25 (C) expression (n=13 to 26). (D) Expression of selected immune checkpoints and NKR by $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ T-cell subsets: TIM3, LAG3, PD-1, 41BB, and NKG2D (n=7 to 11). (E) The cytotoxic activity of $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ T-cell subsets was evaluated through CD107 surface expression upon subsequent coculture with melanoma tumor cells (n=7 to 21). P-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction.

Supplementary Figure 3. TLR7/9L stimulation triggers pDC activation while Zol and HMB-PP have no direct impact on pDC' features

Purified pDCs from healthy donors' blood were cultured with or without (A) TLR7L (CL097), TLR9L (CpGA) or zoledronate (Zol) (n=9 to 11) or (B) HMB-PP alone or combined with Zol (n=4). The phenotypic and functional features of pDCs were then assessed through CD40, CD80 and CD86 expression, TRAIL exposure and IFN α secretion. Bars represents mean \pm SEM. P-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction.

Supplementary Figure 4. HMB-PP elicits activation and functionality of $\gamma\delta$ T cells while TLR7/9L and Zol have no direct impact on $\gamma\delta$ T cells' features

Purified $\gamma\delta$ T cells from healthy donor' blood were cultured with or without (A) HMB-PP (n=13 to 25) or (B,C) TLR7L (CL097), TLR9L (CpGA), zoledronate (Zol) alone or in combination (n=4). The phenotypic and functional features of $\gamma\delta$ T cells, $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ T-cell subsets were assessed through CD69, CD25 expression, IFN γ secretion and CD107 exposure upon further coculture with tumor cells. Bars represents mean \pm SEM. P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction.

Supplementary Figure 5. The interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells require the activation of one partner

(A-B) Purified pDCs or $\gamma\delta$ T cells from healthy donors' blood were cultured alone (white symbols) or in presence of the cross-talk partner (dark symbols) in absence of any stimulation. (A) The phenotypic and functional features of $\gamma\delta$ T cells were assessed through CD69 and CD25 expression, IFN γ secretion and CD107 exposure upon further coculture with tumor cells (n=18 to 26). Bars represents mean \pm SEM. (B) The phenotypic and functional features of pDCs were assessed through CD40, CD80 and CD86 expression, TRAIL exposure and IFN α secretion (n=9 to 12). (C) IFN γ secretion during $\gamma\delta$ T cell/pDC co-culture in absence of stimulation (-) or in presence of HMB-PP or Zol. Bars represents mean \pm SEM. P-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test.

Supplementary Figure 6. Membrane contacts and soluble factors are required for effective cross-talk between pDCs and $\delta 2^+$ / $\delta 2^-$ T-cell subsets

Purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells from healthy donor' blood were cocultured together in the same well (white bars) or physically separated by a 0.4 μ m membrane (transwell, gray bars) in absence or presence of TLR7L (CL097), TLR9L (CpG_A) or zoledronate (Zol) as indicated. The phenotypic features (CD69 and CD25 expression) and cytotoxic properties (CD107 exposure upon coculture with tumor cells) of $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ T-cell subsets were assessed to identify the requirement for membrane contacts and/or soluble factors for their cross-talk with pDCs (n=8). Bars represents mean \pm SEM. P-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test.

Supplementary Figure 7. Experimental schemes for blocking experiments

(A) Strategy for blocking single molecules, BTN3A or mixtures to determine the mechanism of the pDC- $\gamma\delta$ T cells cross-talk. (B) Strategy for blocking single molecules, BTN3A or mixtures to determine the mechanism of the $\gamma\delta$ T cell-pDC cross-talk.

Supplementary Figure 8. pDCs and $\gamma\delta$ T cells differentially expressed TNF α RI, TNF α RII and IFN α RI/RII

(A) Basal expression of TNF α RI, TNF α RII, IFN α RI and IFN α RII by $\gamma\delta$ T cells and pDCs determined within PBMC (n=4). (B) The expression of TNF α RI, TNF α RII, IFN α RI and IFN α RII by $\gamma\delta$ T cells and pDCs was evaluated during the coculture of purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells in presence or not of HMB-PP, CLO97, CpGA or Zol (n=2).

Supplementary Figure 9. The blocking of BTN3A or the use of the Supermix doesn't prevent pDC response to TLR7/9L stimulation

Purified pDCs from healthy donor' blood were cultured with or without TLR7L (CL097), TLR9L (CpG_A) or zoledronate (Zol) in presence or not of blocking antibodies. The ability of pDCs to upregulate activation molecules (CD40, CD80, CD86), express TRAIL and secrete IFN α was then evaluated. (A) Cultures performed in presence or not of anti-BTN3A blocking antibody (n=6). (B) Cultures performed in presence or not of the Supermix composed of anti-IFNAR, -TNFR1, -TNFR2 and -OX40 blocking antibodies together with anti-BTN3A1 blocking antibodies (n=6). Bars represents mean \pm SEM. P-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test.

Supplementary Figure 10. Relative impact of BTN3A compared to the other molecules targeted by the Supermix on the pDCs- $\gamma\delta$ T cells cross talk

Purified pDCs from healthy donors' blood were pre-incubated either with single anti-BTN3A antibodies (n=12) or a Supermix composed of anti-IFNAR2, -TNFR1/TNFR2 and -OX40 antibodies together with anti-BTN3A blocking antibody (n=12), and cocultured with purified $\gamma\delta$ T cells in the presence or not of TLR7-L (CL097) (light gray bars), TLR9-L (CpG_A) (dark gray bars) or zoledronate (Zol) (black bars). The features of $\gamma\delta$ T cells were then depicted: the activation status (CD25 and CD69 expression) and the cytotoxic activity (CD107 surface exposure) were analyzed by flow cytometry; IFN γ secretion was measured by CBA in the supernatants. Bars represents mean \pm SEM. P-values were calculated using the Wilcoxon-matched pairs test (full lines) or Mann-Whitney test (dotted lines) (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001).

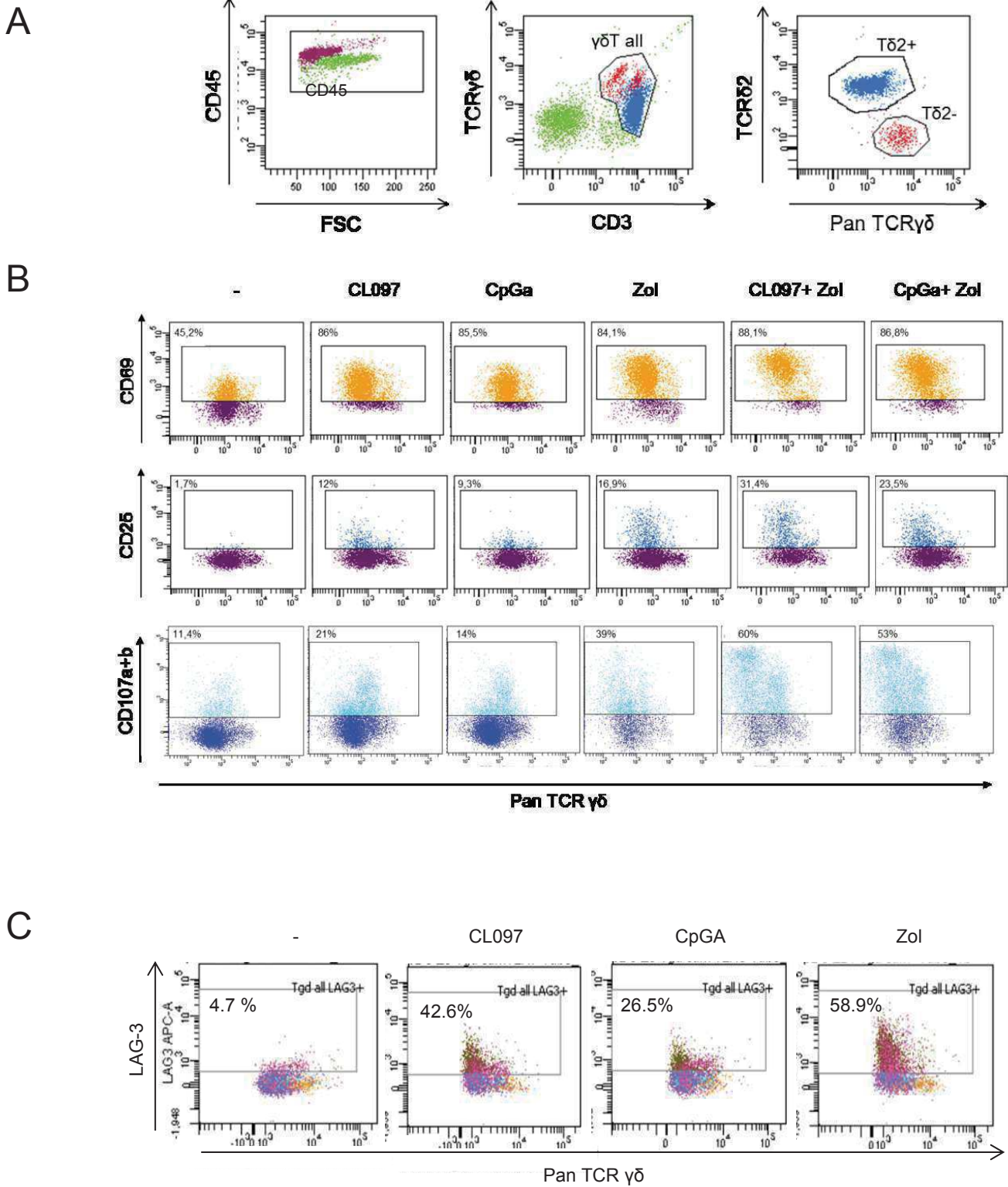
Supplementary Figure 11. $\gamma\delta$ T cells keep their ability to respond to HMB-PP stimulation in presence of blocking antibodies composing the "mix -" or blocking of BTN3A

(A) Purified $\gamma\delta$ T cells from healthy donor' blood were cultured with or without HMB-PP or zoledronate (Zol) in presence or not of the "mix -" composed of anti-IFN γ R, -NKp30 and -GITR blocking antibodies (n=4-10). The ability to upregulate activation molecules (CD69, CD25) and secrete IFN γ was then evaluated on $\gamma\delta$ T cells. (B) Purified $\gamma\delta$ T cells from healthy donor' blood were pre-activated for 4 hours with or without HMB-PP or zoledronate (Zol) and mixed with purified pDCs pre-cultured for 2 hours in presence or not of anti-BTN3A blocking antibodies (n=8). The ability to upregulate activation molecules (CD69, CD25) and secrete IFN γ was then evaluated on $\gamma\delta$ T cells. P-values were calculated using the Wilcoxon matched pairs test.

Supplementary Figure 12. Relative impact of BTN3A compared to the other molecules targeted by the Supermix on the $\gamma\delta$ T cells-pDCs cross talk

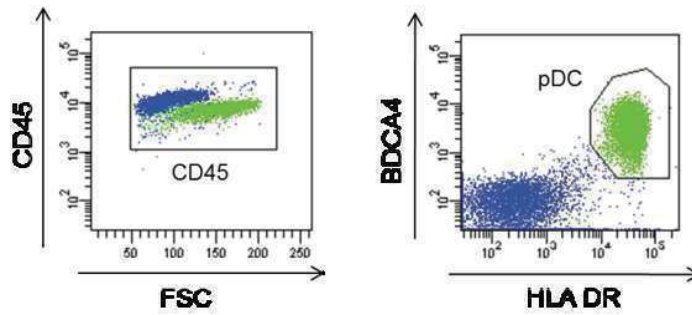
Purified $\gamma\delta$ T cells from healthy donor' blood were pre-activated with HMB-PP (light gray symbols) or Zol (dark gray symbols) during 4hours in absence (condition "BTN3A", n=8) or presence of a mixture of blocking antibodies composed of anti-IFN γ R, -NKp30, and -GITR antibodies (condition "Supermix", n=9-10), and mixed with pDCs pre-blocked with single anti-BTN3A for 2hours. The features of pDCs were then depicted: the activation status (MFI CD40 on CD40-positive cells) and cytotoxic properties (TRAIL) were analyzed by flow cytometry, whereas the cytokine secretion (IFN α and IP10) was assessed by CBA in the supernatants. P-values were calculated using the Wilcoxon-matched pairs test (full lines) or Mann-Whitney test (dotted lines) (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001).

Supplementary Figure 1

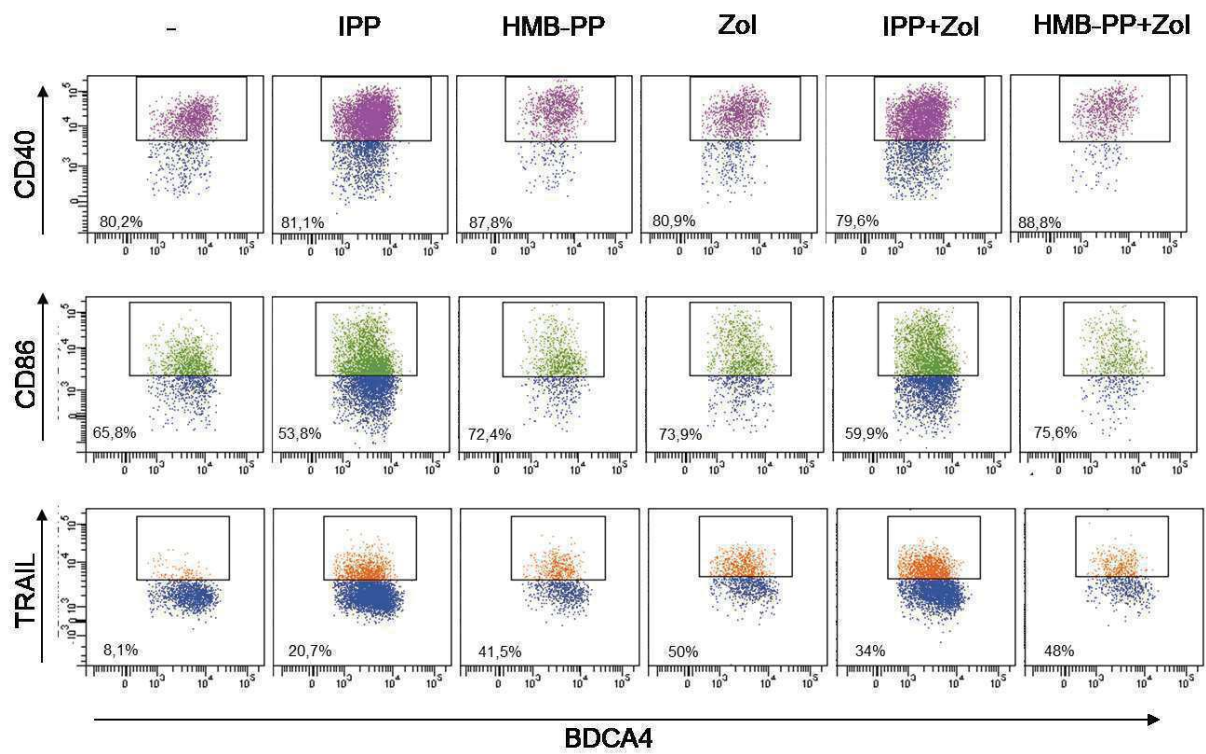


Supplementary Figure 1 follow

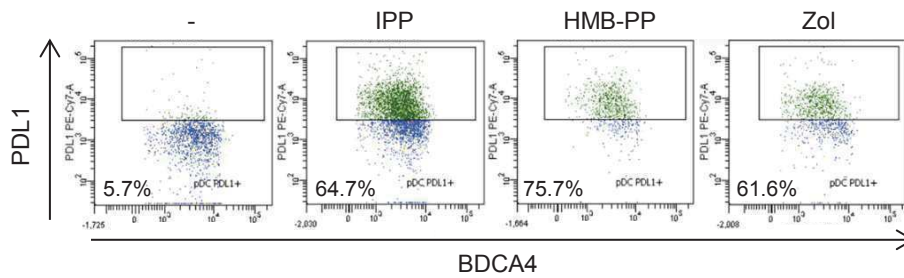
D



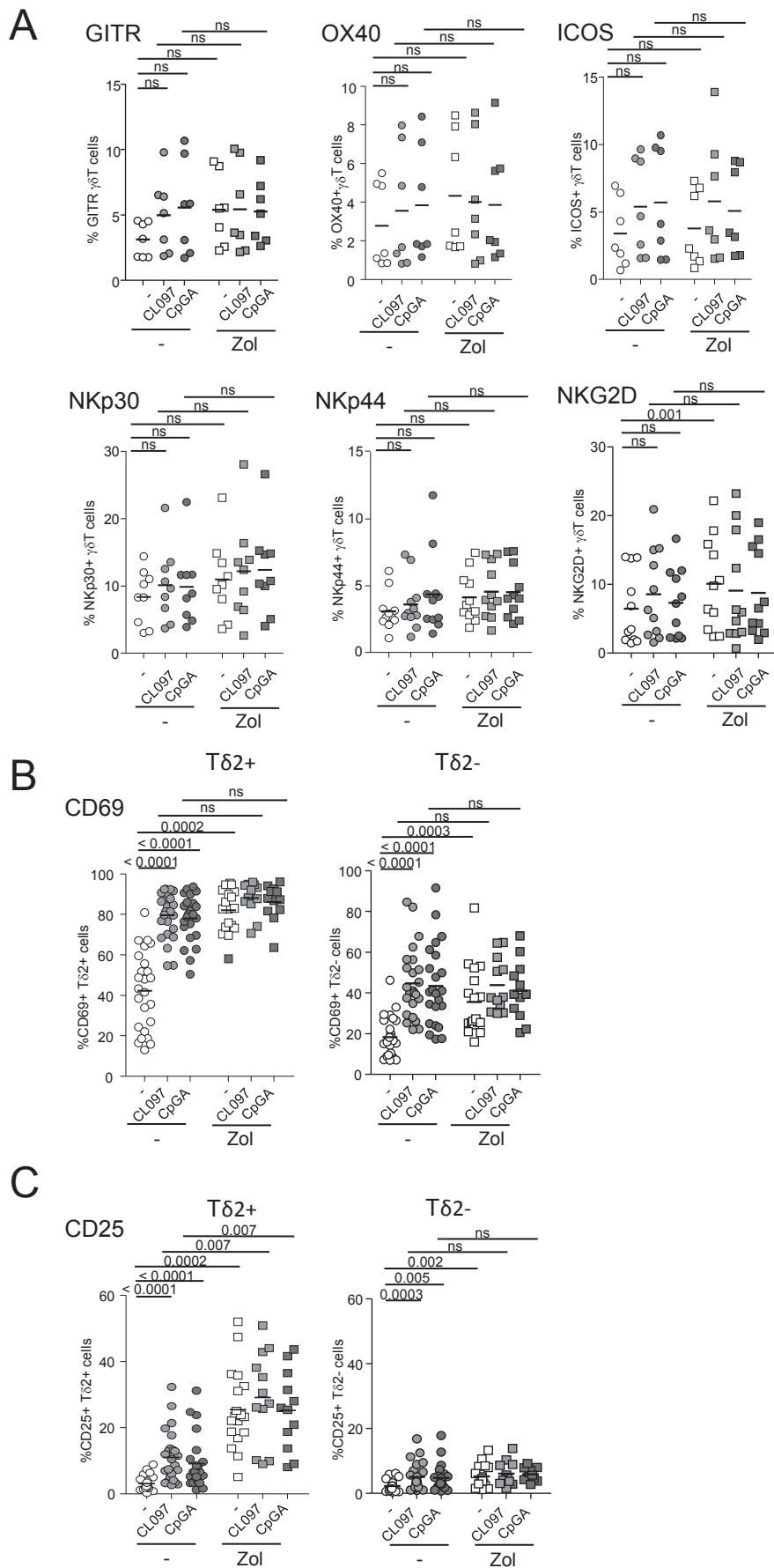
E



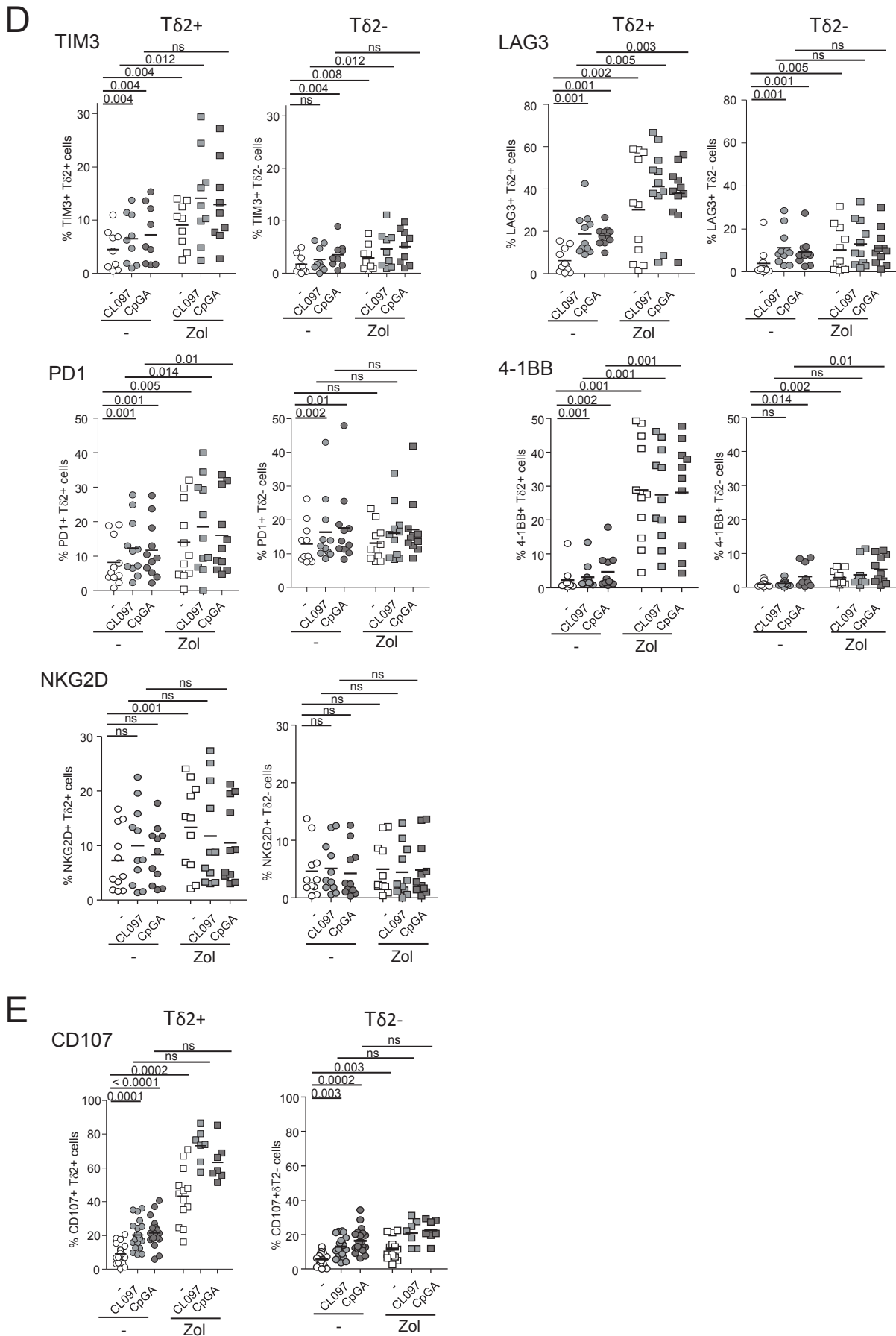
F



Supplementary Figure 2

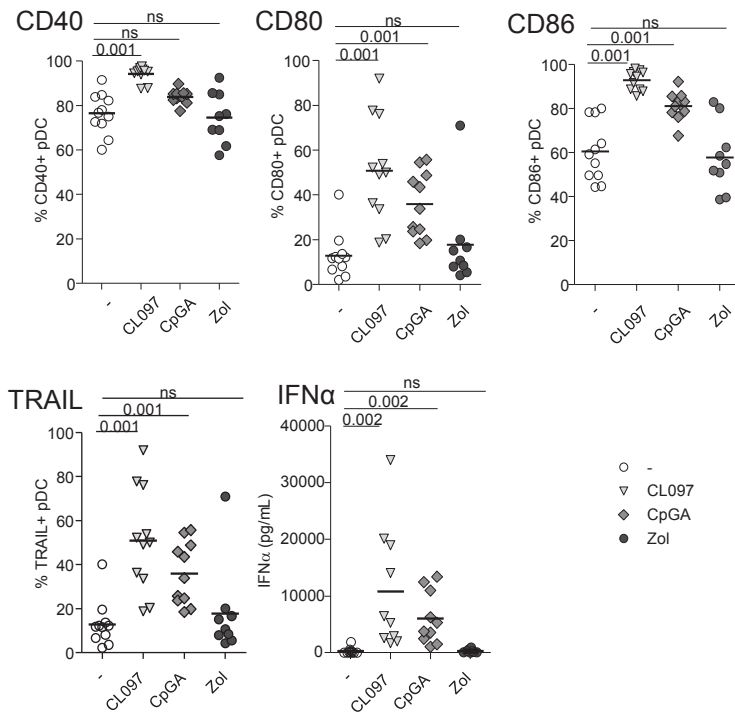


Supplementary Figure 2 follow

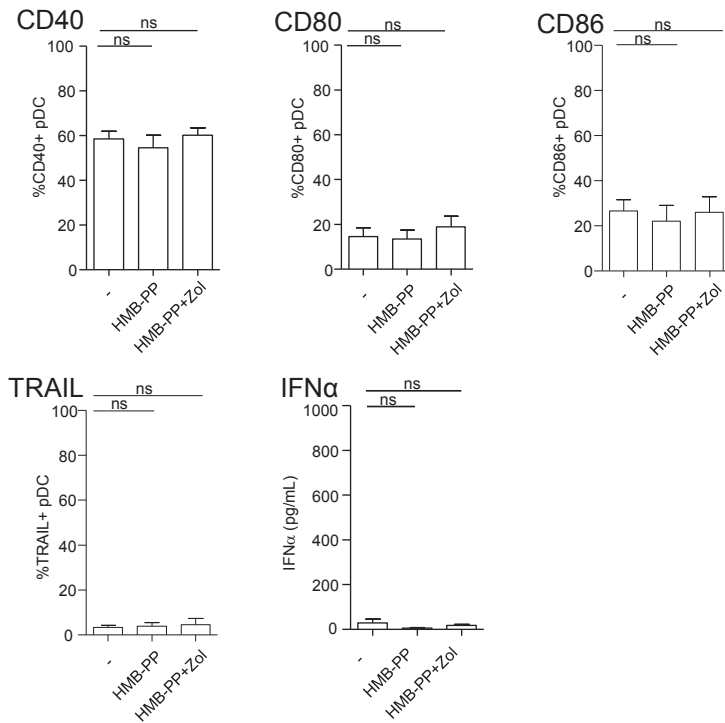


Supplementary Figure 3

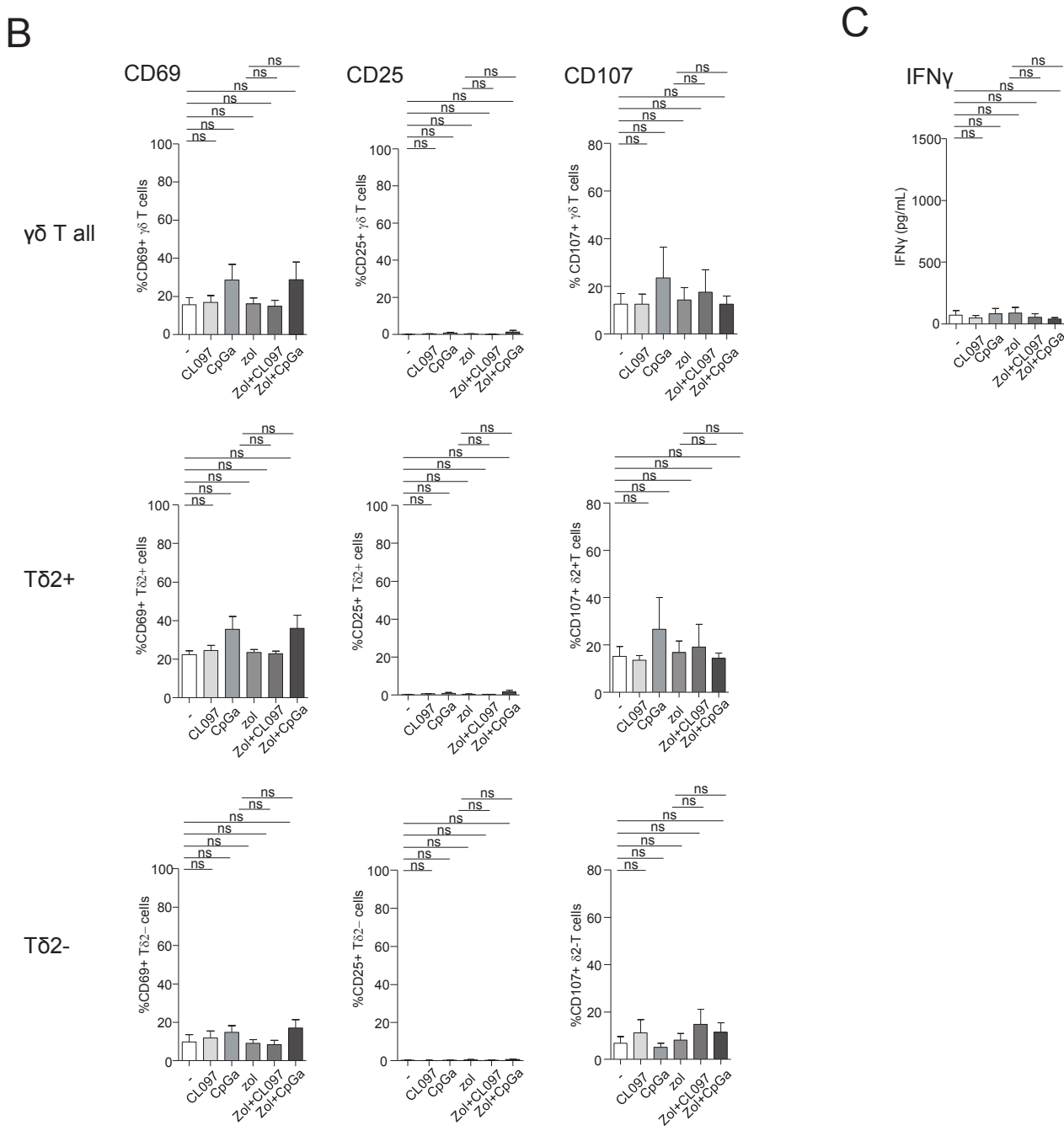
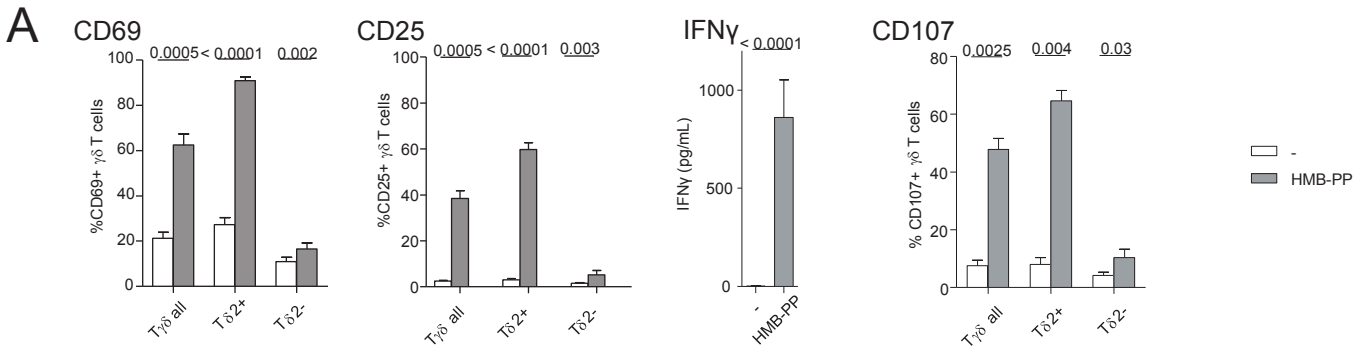
A



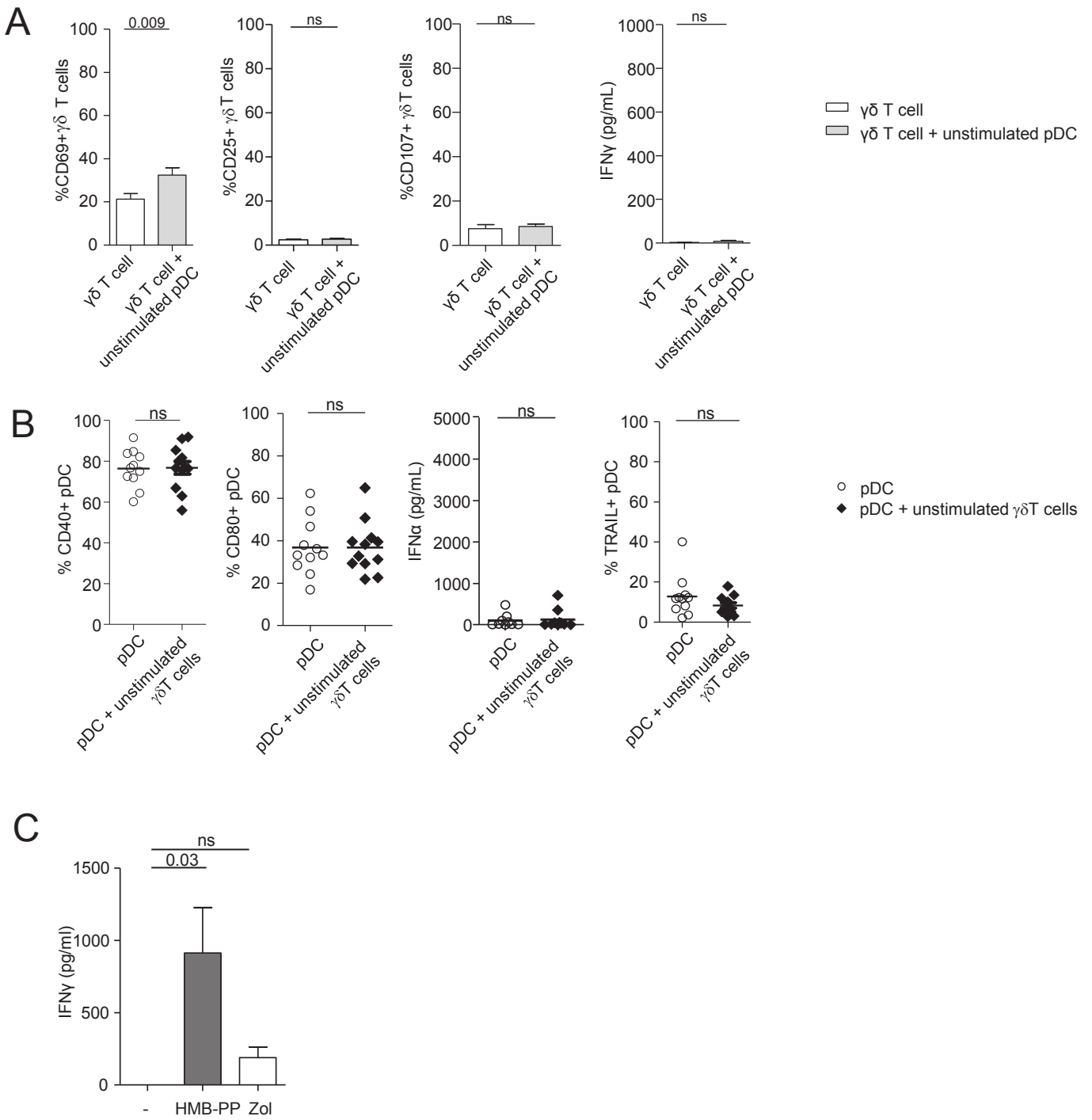
B



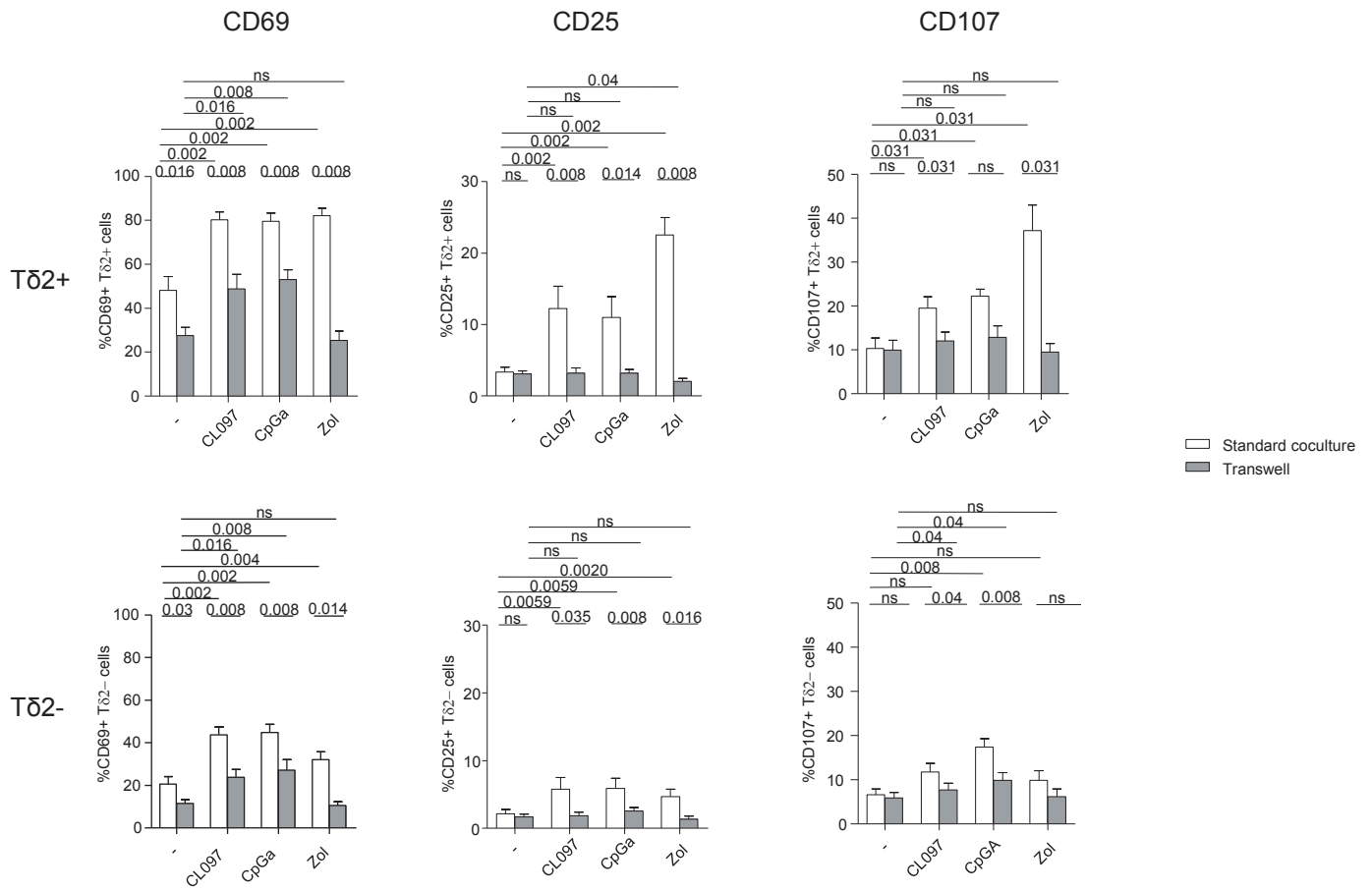
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

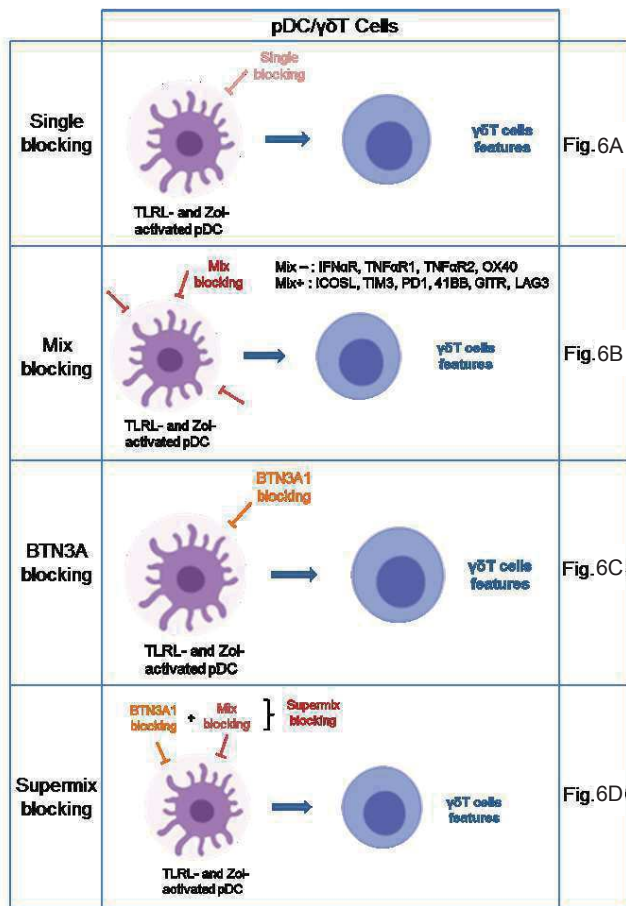


Supplementary Figure 6

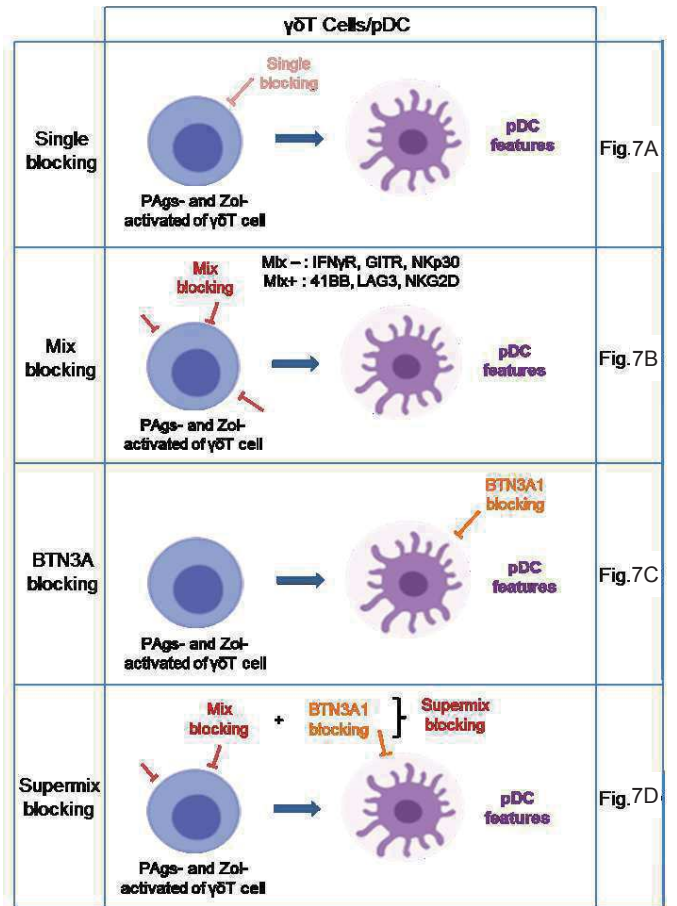


Supplementary Figure 7

A

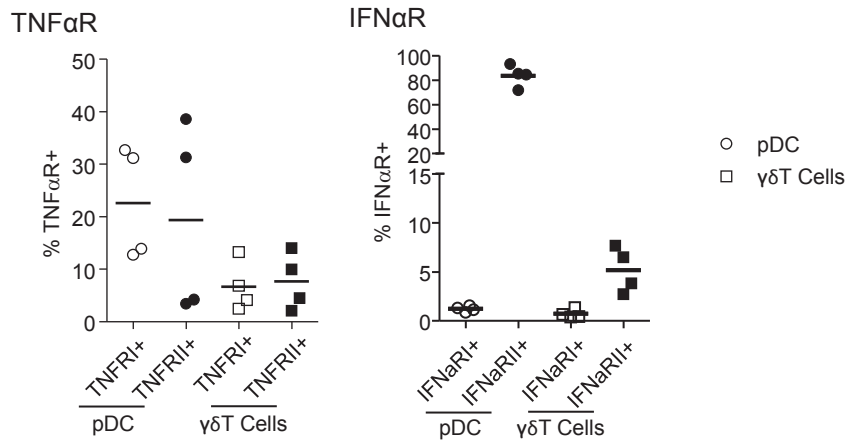


B

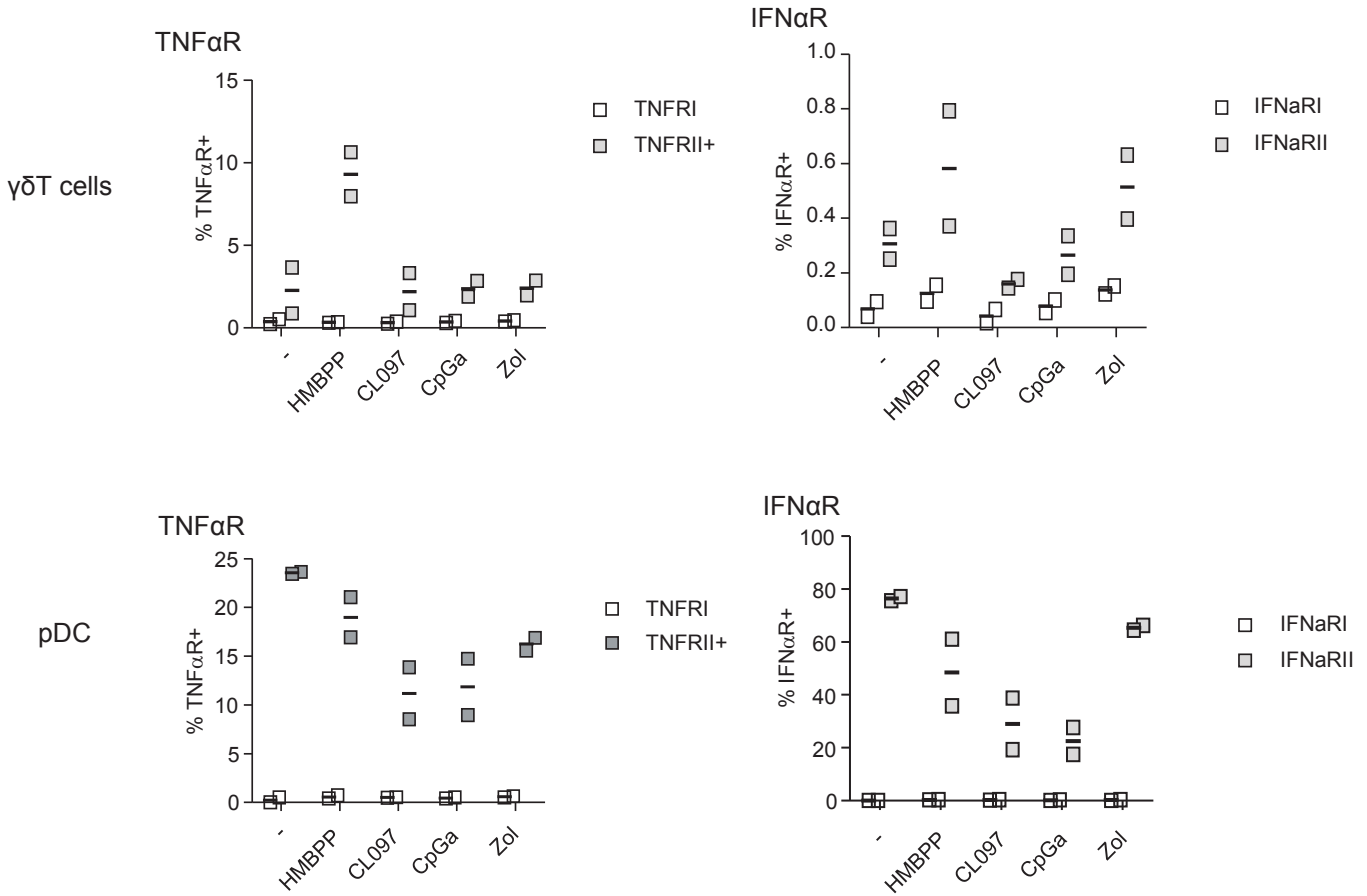


Supplementary Figure 8

A

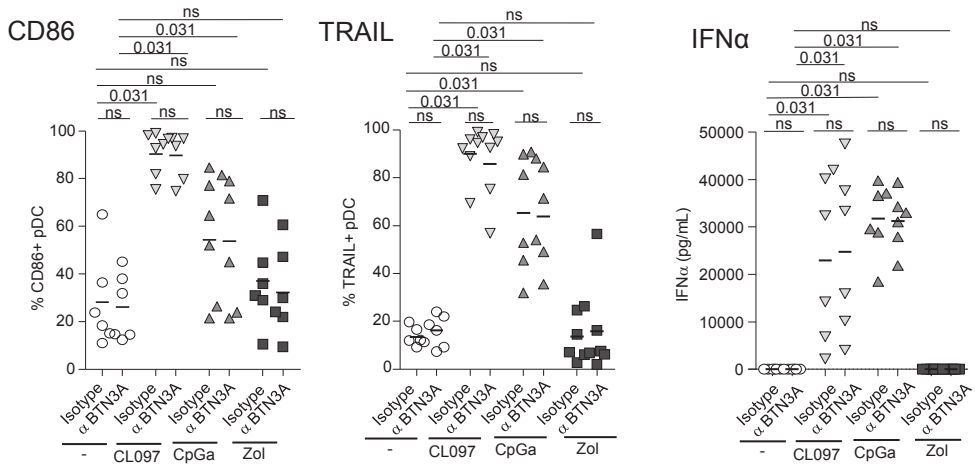


B

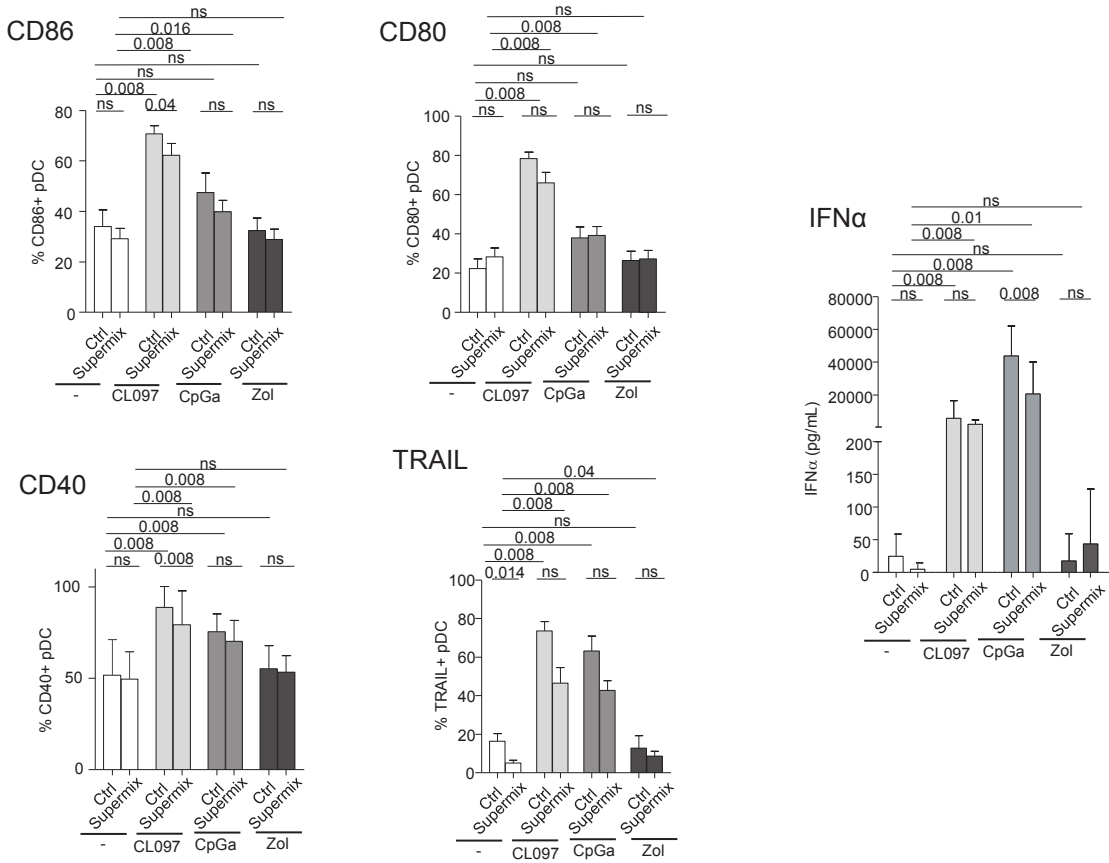


Supplementary Figure 9

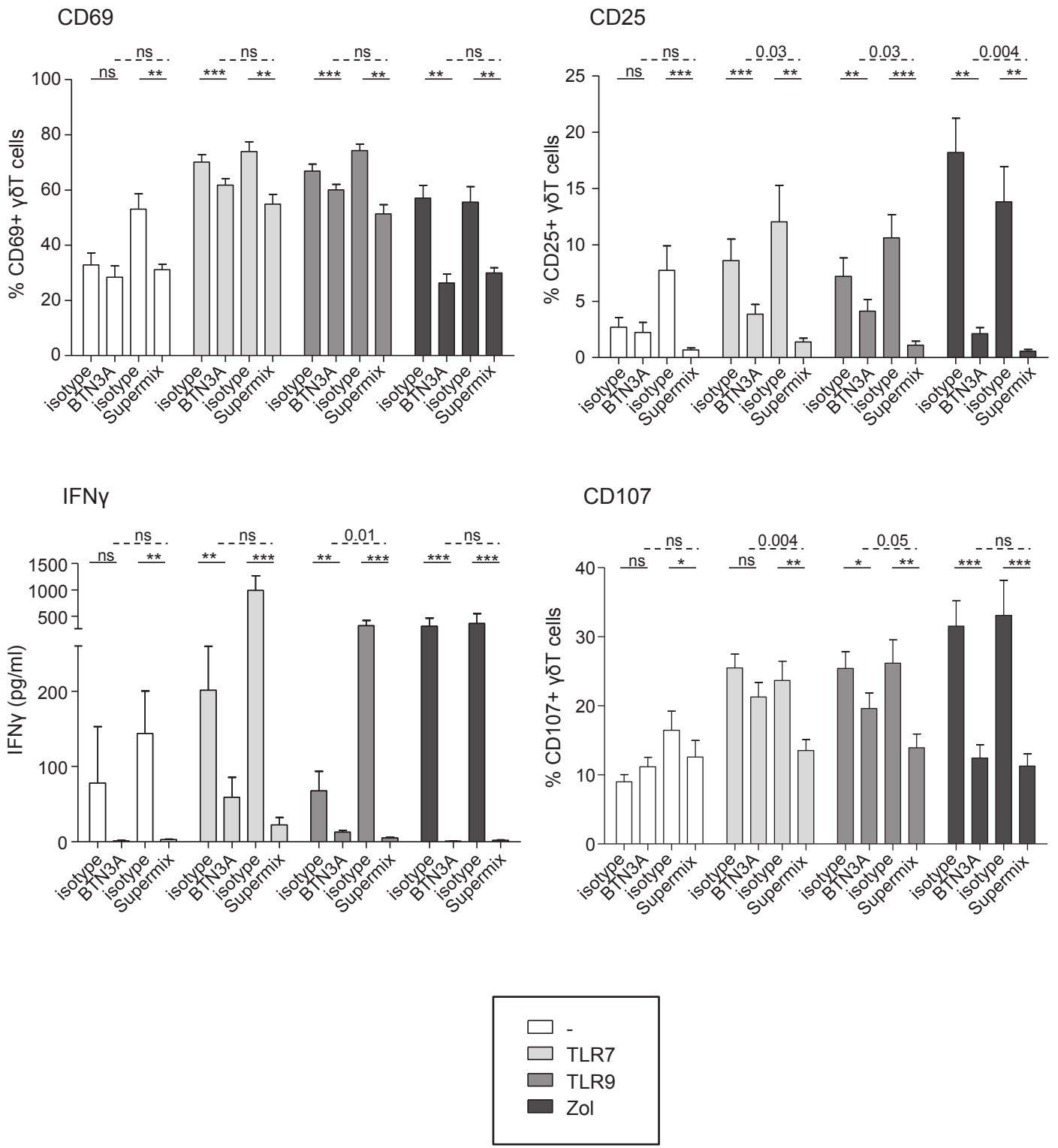
A



B

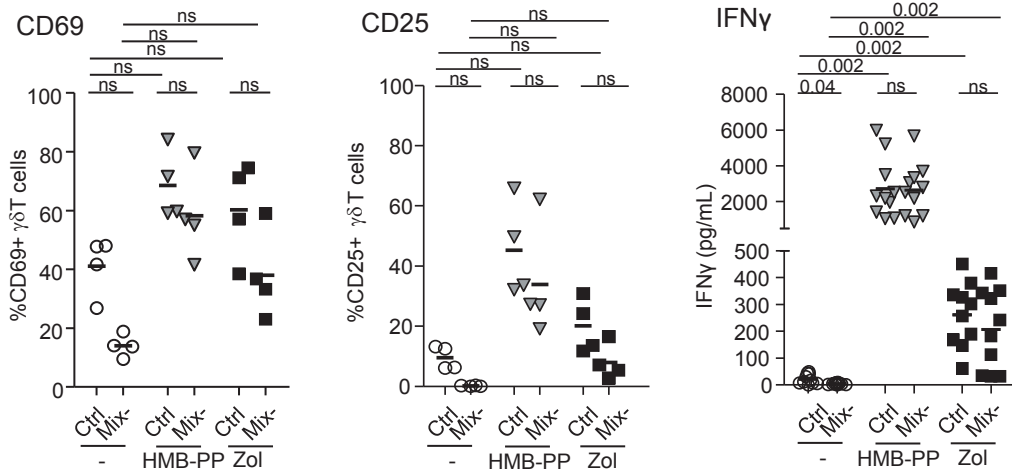


Supplementary Figure 10

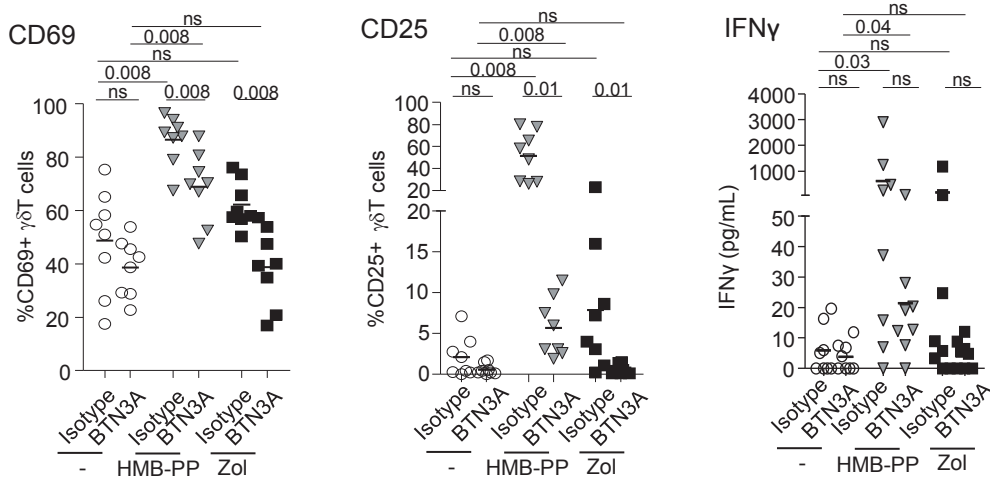


Supplementary Figure 11

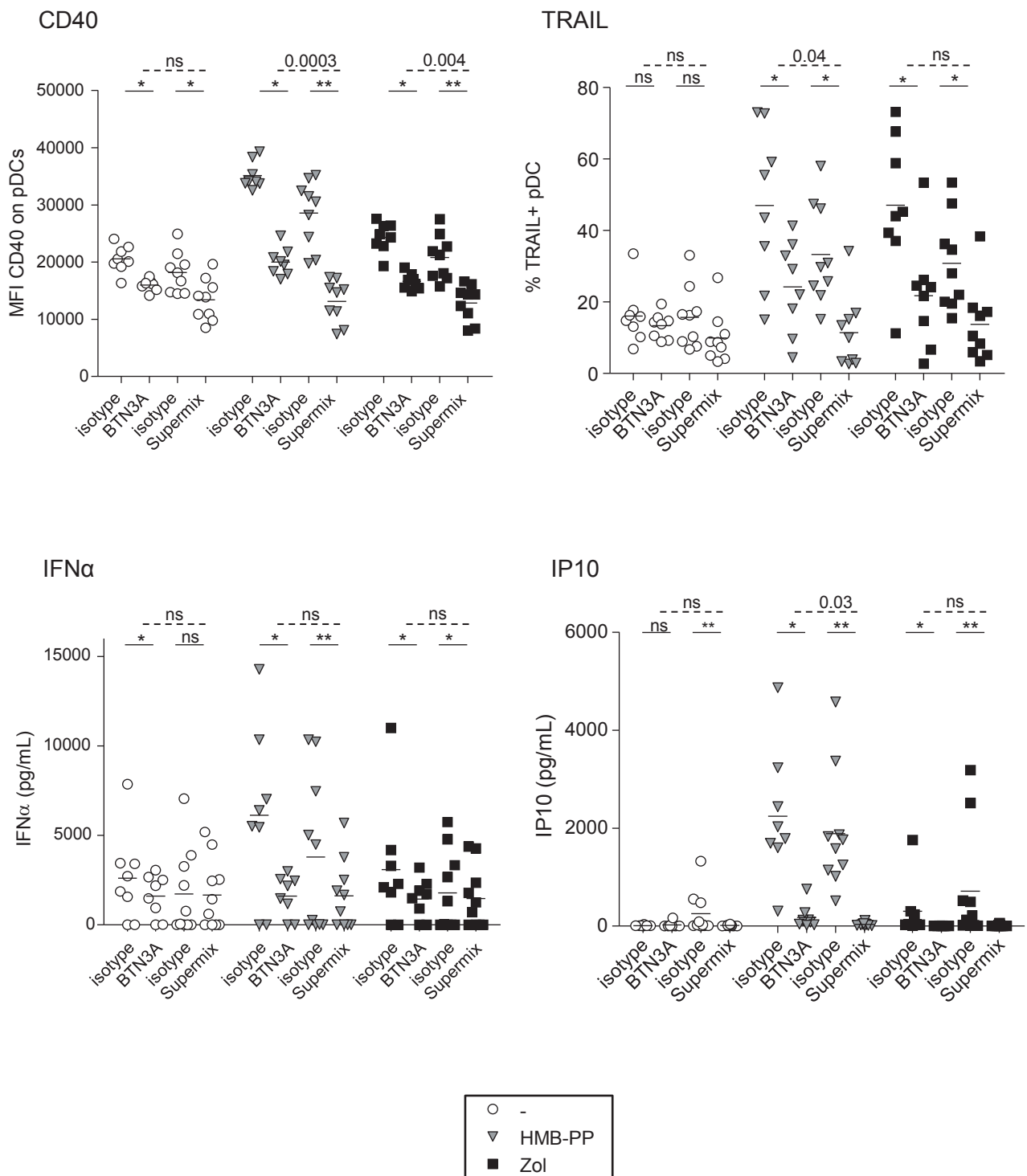
A



B



Supplementary Figure 12



Chapitre 5 : Caractérisation des interactions entre pDCs et lymphocytes T $\gamma\delta$ en contexte mélanome

Dysfunctional BTN3A and deregulated immune checkpoints and cytokines dictate defective cross-talks between circulating or tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients that impact clinical outcomes

Pauline Girard^{1,2}, Eleonora Sosa Cuevas^{1,2}, Bénédicte Ponsard^{1,2}, Stéphane Mouret³, Florence De Fraipont⁴, Julie Charles^{1,3}, Olivier Manches^{1,2}, Laurence Chaperot^{1,2}, Caroline Aspod^{1,2,*}

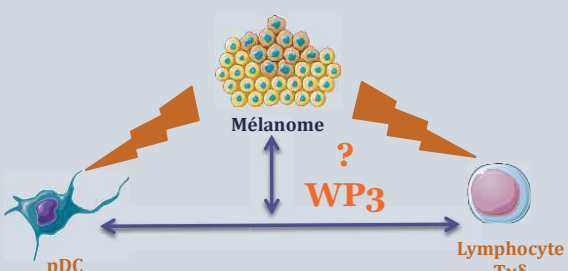
¹Institute for Advanced Biosciences, Immunobiology and Immunotherapy in Chronic Diseases, Inserm U 1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble-FRANCE

²Etablissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes, R&D Laboratory, 38000 Grenoble-France

³Dermatology clinic, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

⁴Medical Unit of Molecular genetic (hereditary diseases and oncology), Grenoble University Hospital, Grenoble, France

★★★★★★★★★★



Le système immunitaire est crucial pour contrer le développement tumoral. Les pDCs et $T\gamma\delta$ émergent comme deux puissants acteurs immuns impliqués dans la pathophysiologie des cancers, et dont le rôle reste énigmatique à ce jour, bien que présentant un potentiel prometteur pour la translation en clinique.

Les interactions entre pDCs et $T\gamma\delta$ en contexte tumoral n'ont pas toutes été déchiffrées, et notamment dans le cas du mélanome, où le contrôle des tumeurs à long terme reste un défi. Cela nous a poussés à explorer les interactions de ces deux populations immunitaires dans le contexte de mélanome, et les impacts phénotypiques et fonctionnels induits par un type cellulaire sur le partenaire, les mécanismes impliqués et les associations avec l'évolution clinique.

Les pDCs circulantes ou infiltrant les tumeurs, activées par TLR-L, ont des capacités altérées à activer et à moduler l'expression de points de contrôle immunitaire chez les $T\gamma\delta$ et perdent leur capacité à induire la fonctionnalité des $T\gamma\delta$. A l'inverse, les $T\gamma\delta$ provenant de sang de patients ou de tumeurs, activées par PAg, perdent leur capacité à induire une activation des pDCs, à moduler l'expression de leur point de contrôle immunitaire, et ne parviennent plus à induire la fonctionnalité des pDCs. L'administration de cytokines spécifiques ou d'anticorps bloquants peut reverser ces dysfonctions. Nous avons également identifié une augmentation de l'expression de BTN3A sur les pDCs et $T\gamma\delta$ circulant et infiltrant les tumeurs et mis en évidence leur potentielle altération fonctionnelle.

Cette étude démontre le détournement des interactions pDCs/ $T\gamma\delta$ par le mélanome pour échapper au système immunitaire, et souligne la dysfonction de BTN3A. La compréhension de ces mécanismes permettra d'exploiter leur potentiel anti-tumoral respectif et leur synergie, pour développer de nouvelles approches thérapeutiques contournant leur détournement par le mélanome et améliorer le devenir des patients.

★★★★★★★★★★

Title:

Dysfunctional BTN3A and deregulated immune checkpoints and cytokines dictate defective cross-talks between circulating or tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients that impact clinical outcomes

Running title:

pDCs and $\gamma\delta$ T cells interplay in melanoma

Authors:

Pauline Girard^{1,2}, Eleonora Sosa Cuevas^{1,2}, Bénédicte Ponsard^{1,2}, Stéphane Mouret³, Florence De Fraipont⁴, Julie Charles^{1,3}, Olivier Manches^{1,2}, Laurence Chaperot^{1,2}, Caroline Aspod^{1,2,*}

Affiliations:

¹Institute for Advanced Biosciences, Immunobiology and Immunotherapy in Chronic Diseases, Inserm U 1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble-FRANCE

²Etablissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes, R&D Laboratory, 38000 Grenoble-France

³Dermatology clinic, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

⁴Medical Unit of Molecular genetic (hereditary diseases and oncology), Grenoble University Hospital, Grenoble, France

Financial support:

This work was supported by the Etablissement Français du Sang (EFS) AuRA, Ligue contre le Cancer, the Societe Française de Dermatologie (SFD) and GEFLUC.

*** Corresponding Author:**

Dr Caroline Aspod, EFS-R&D laboratory, EMR EFS-UGA-INSERM U1209- CNRS, 29 avenue du Maquis Gresivaudan, 38700 La Tronche, France, Phone: +33-(0)4-76-42-43-44. FAX: +33-(0)4-76-54-69-18. Email: caroline.aspod@efs.sante.fr

Disclosure of interest:

The authors report no conflict of interest.

Keywords: pDCs, $\gamma\delta$ T cells, melanoma, immune subversion, cross-talk, BTN3A

Abstract

The fitness of the host immune system is crucial to counteract tumor development. pDCs and $\gamma\delta$ T cells emerges as two potent immune players that participate in the pathophysiology of cancers, yet still remaining enigmatic while harboring a promising potential for clinical translations. Despite strategic and closed missions, cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells have not been deciphered yet in cancers, especially in melanoma where the long-term control of the tumor still remains a challenge. This prompted us to explore the interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in the context of melanoma, investigating the phenotypic and functional features of pDCs or $\gamma\delta$ T cells induced by the other partner, the underlying molecular mechanisms and its impact on clinical outcomes. TLR2-activated pDCs from blood and tumor infiltrate of melanoma patients displayed an impaired ability to activate, modulate immune checkpoints, and trigger the functionality of $\gamma\delta$ T cells. Conversely, $\gamma\delta$ T cells from blood or tumor infiltrate of melanoma patients activated by PAg were defective in triggering pDCs' activation and modulation of immune checkpoints, and failed to elicit the functionality of pDCs. Reversion of the dysfunctional bidirectional cross-talks could be achieved by specific cytokine administration and immune checkpoint targeting. We also revealed an increased expression of BTN3A on circulating and tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients but stressed out its potential functional impairment. Thus, our study uncovered that melanoma hijacked pDCs/ $\gamma\delta$ T cells bidirectional interplay to escape from immune control, and pointed out BTN3A dysfunction. Such understanding will help harnessing and synergizing the power of these potent immune cells to design new therapeutic approaches exploiting their antitumor potential while counteracting their skewing by tumors to improve patient outcomes.

Introduction

Interactions between several immune cells are crucial to initiate and orchestrate robust anti-tumor responses. Tumor microenvironment (TME) comprises various immune cells, including pDCs and $\gamma\delta$ T cells, two potent immune players that emerged to participate in the pathophysiology of the disease, yet still remaining enigmatic but harboring a promising potential for clinical translations. pDCs and $\gamma\delta$ T cells are both orchestrators of immune responses¹⁻⁵ and critical complementary players in immunosurveillance against cancer⁶⁻⁹, due to their ability to sense cell stress through recognition of damaged-associated molecular patterns (DAMPs) or altered metabolism (phosphoantigens (PAgs)). They exhibit a rapid response through respectively massive type I or type II IFN secretion and subsequently initiate immune responses. Their unique features, high functional plasticity and ability to interact with many immune cell types allow them to critically bridge innate and adaptive immunity, initiating and orientating widely immune responses.

pDCs are major players in the regulation of immunity^{1, 3}. The expression of TLR7/9 confers on them the ability to recognize pathogenic motifs (single stranded RNA, unmethylated CpG-containing DNA). Upon activation, pDCs exhibit robust IFN- α production and promote innate and adaptive immune responses. The functional plasticity of pDCs as well as their ability to interact with different immune cells allows them to direct immunity towards multiple profiles (immunity or tolerance) according to the microenvironment^{10, 11}. pDCs play a crucial role in the initiation and orientation of anti-tumor immune responses, by their ability to induce antigen-specific adaptive responses^{12, 13} or by exerting a direct cytotoxic activity towards the tumor cells via TRAIL^{14, 15}, but are found to be subverted in many cancers and to contribute to the establishment of an immunosuppressive tumor microenvironment¹⁶⁻¹⁹.

$\gamma\delta$ T cells are unconventional T cells playing a crucial role in immune responses against tumor cells^{4, 5, 20, 21} due to their prompt activation, their capacity to recognize tumor- and

stress-associated ligands neglected by conventional $\alpha\beta$ T cells in an MHC-unrestricted manner, their potential to exhibit cytotoxic activity through secretion of cytotoxic pro-apoptotic protease granzymes and pore-forming molecules perforin, and their ability to secrete immunostimulatory cytokines in particular $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ regulating and potentiating the effectiveness of other immune cells leading to coordinated immune responses⁵. Among the different $\gamma\delta$ T cell subsets, $\text{V}\delta 2^+$ cells, bearing the TCR $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$, are predominant in peripheral blood and lymphoid tissues, and recognize pAg derived from isoprenoid/mevalonate or non-mevalonate pathways such as (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) produced by many pathogens, and isopentenyl pyrophosphate (IPP), which accumulate intracellularly during dysregulated metabolism in many tumors. Cells treated with aminobiphosphonates (ABP) such as zoledronate (Zol) are potent activators of $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ T cells due to the accumulation of IPP upon inhibition of the IPP metabolizing farnesyl diphosphate synthase (FPPS). The sensing of pAg by $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ T cells requires the contact with cells expressing CD277/butyrophilin-3 A1 (BTN3A1) molecule^{22, 23}.

pDCs and $\gamma\delta$ T cells owe essential contribution to many types of protective immune responses, but may also drive pathogenic immune responses leading to immuno-pathologies^{1, 3-5}. In cancer, pDCs and $\gamma\delta$ T cells have a pivotal role in triggering efficient antitumor immune responses, but the skewing of their potentialities may contribute to tumor escape from immunity and establishment of an immunosuppressive tumor microenvironment^{8, 24}. pDCs²⁵ and $\gamma\delta$ T cells²⁶ were found in multiple cancer types especially in melanoma^{16, 27, 28}. Notably, whereas tumor-infiltrating pDCs were associated with poor clinical outcome^{16, 18, 29}, tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells have been demonstrated to be the most favorable prognostic immune population among many cancer types^{28, 30}. In patients with melanoma, we have highlighted functional alterations of pDCs within the tumor microenvironment associated with impaired response to TLR7/9 activation and major modulations of the expression of certain immune

checkpoints (OX40L, ICOSL) leading to the induction of TH2-type and regulatory T-cell responses^{16, 17}. Besides, functional impairments of peripheral $\gamma\delta$ T cells have been reported in melanoma patients³¹⁻³³. $\gamma\delta$ T cells can be subverted by tumors to exhibit tumor-promoting functions^{21, 34} through polarization toward Th2, Th17 or regulatory profile³⁵, recruitment of immunosuppressive myeloid cells³⁶, inhibition of antitumor immune responses³⁷, all converging to favor tumor progression³⁸. We previously highlighted that circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cell' features display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome²⁸: altered expression of NCR, KIR and immune checkpoints, impairment of cytotoxic activity and cytokine secretion. We identified NKp44, PD1, 41BB, TIM3 and LAG3 as crucial checkpoints allowing immune escape and tumor progression.

Based on their importance in contributing to immune-mediated control, both pDCs and $\gamma\delta$ T cells have been already exploited as vectors or targets for immunotherapy of cancers^{7, 39-43}, especially in melanoma. Agonists of TLR7/TLR9, triggering high levels of type I IFN by pDCs while avoiding their impairment by the TME, are being clinically explored^{44, 45}. Tumor antigen-loaded pDCs properly activated can be vectors for immunotherapy and elicit favorable anti-tumor immune responses in patients upon vaccination^{46, 47}. Indirect stimulation of V δ 2+ cells through administration of aminobisphosphonates can lead to objective tumor responses in prostate cancer⁴⁸ and melanoma⁴⁹. The adoptive transfer of ex-vivo expanded $\gamma\delta$ T cells is feasible in patients⁵⁰ and can inhibit melanoma tumor progression in SCID mice⁵¹. These promising results on pDCs- and $\gamma\delta$ T cell-based clinical translations sustain further investigations of these cells and their cross-talks.

Despite strategic and closed missions, cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells have not been deciphered yet in cancers. Available studies demonstrated bidirectional interactions between ex-vivo generated monocyte-derived DCs (moDCs) and $\gamma\delta$ T cells in healthy settings⁵². Zol- or ABP-treated moDCs could trigger the expansion and activation of $\gamma\delta$ T cells with effector

and costimulatory activities⁵³⁻⁵⁵. Besides, TLR-L stimulated moDCs or pDCs trigger activation and IFN γ secretion by V γ 9V δ 2 T cell subset^{56, 57}, that in turn promote DC maturation and secretion of IL12p70^{54, 58}, underlying the potential cross-talk between PAMP-activated DCs and $\gamma\delta$ T cells. Notably, we recently uncovered, in healthy settings, a potent bidirectional cross-talk between pDCs and $\gamma\delta$ T cells through BTN3A, type I/II IFNs and immune checkpoints⁵⁹. Remarkably, a recent study revealed that activated pDCs preferentially attracted $\gamma\delta$ T cells following their injection in the skin of melanoma patients⁶⁰, supporting the potential interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in vivo in cancer patients.

pDCs and $\gamma\delta$ T cells represent critical players in anti-tumor immunity due to their unique properties, but tumor hijacked them by exploiting their functional plasticity leading to tumor progression, and exhibit opposite clinical impacts. Yet, interactions between these potent immune players have never been deciphered in cancer, especially in melanoma where the long-term control of the tumor in a majority of patients still remains a challenge despite major improvements using immune checkpoint blockers. Such controversy prompted us to explore the interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in the context of melanoma, investigating the phenotypic and functional features of pDCs or $\gamma\delta$ T cells induced by the other partner purified from the blood or tumor infiltrate of melanoma patients, the underlying molecular mechanisms and its impact on clinical outcomes. We highlighted for the first time crucial impairments of the bidirectional interactions between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma, deciphering the mechanisms underlying such cross-talk and clinical impact. Thus, melanoma hijacked pDCs/ $\gamma\delta$ T cells interplay to escape from immune control. Such understanding of the physiopathology of pDCs / $\gamma\delta$ T cells interplays will help harnessing and synergize the power of these potent immune cells to design new therapeutic approaches exploiting their antitumor potential while counteracting their skewing by tumors to improve patient outcomes.

Material and Methods

Melanoma patients and healthy donor (HD)' samples

Blood and tumor (primary tumor, cutaneous metastases and lymph node metastasis) samples not needed for pathological investigations were obtained from 62 and 47 melanoma patients respectively, stage I-IV. Patients were staged according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for melanoma 2009 (V7). Clinical features are shown in Supplementary Table 1 (blood samples) and Table 2 (tumor samples). Progression Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) were calculated both from diagnosis and sampling times. Blood samples were also obtained from 40 healthy volunteers (HDs). PBMCs were purified by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation (Eurobio). Tumor samples were mechanically dilacerated and digested with 2 mg/ml collagenase-D (Roche) 20U/ml DNase (Sigma). The resulting tumor-infiltrating cell suspensions were filtered and washed. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the Ethics committee of Grenoble University Hospital (CHUGA) and the French Blood Agency's Institutional Review Board, and declared under the reference #DC-2008-787 (EFS) and collection AC-2017-2949 (CHUGA). All participants signed informed consent forms.

Purification of pDCs and $\gamma\delta$ T cells

pDCs and $\gamma\delta$ T cells were purified using respectively EasySep Human pDC enrichment kit and EasySep Human $\gamma\delta$ T-cell enrichment kit (StemCell) according to manufacturer's instructions. The purity obtained was routinely above 90.5% for pDCs and 95% for $\gamma\delta$ T cells. Samples from all groups were treated similarly, and cell viability was systematically assessed.

Tumor cell lines

Human melanoma lines COLO829 and A375 were purchased from ATCC (LGC-Standards).

Cultures were performed in RPMI1640-Glutamax (Invitrogen) supplemented with 1% non-essential amino-acids, 1mM sodium pyruvate (Sigma), 100µg/ml gentamycin and 10% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen).

pDCs- $\gamma\delta$ T cells coculture experiments

Purified pDCs and $\gamma\delta$ T cells or whole PBMCs / tumor infiltrates (as indicated on Figures) were resuspended respectively at 2×10^6 /ml or 250.000 cells/50µl in complete RPMI1640 10% FCS and cocultured in a 1:1 ratio 20h at 37°C, 5% CO₂ (1×10^6 /ml final for each cell subset). Cocultures were performed as indicated in absence or presence of TLR7L (CL097, 1µg/mL), TLR9L (CpGA, 1.5µM) (Invivogen) and/or zoledronate (10µM) (Novartis) to activate pDCs, IPP (80µM) or HMB-PP (200nM) (Sigma) together with IL2 (0.1 UI/ml) (Peprotech) and/or zoledronate (38.1µM) to activate $\gamma\delta$ T cells. In some experiments, cultures were performed in presence of blocking antibodies (functional grade quality) and human recombinant cytokines mixture: mixture of anti-41BB (antibodies online) (1µg/mL), -OX40L, -PD1 (R&D Systems), -ICOSL (Invitrogen), -GITR (Thermofischer) (all at 10µg/mL), recombinant human (rh)IFN α A and IFN α 2b each at 2000UI/ml and rhTNF α at 50pg/mL (BioTechne) to assess impact on pDC-triggered $\gamma\delta$ T cells' features; mixture of anti-41BB (antibodies online) (at 1µg/mL), -OX40L (R&D Systems), -TIM3 (Biolegend), -LAG3 (Adipogen) (all at 10µg/mL), rhIFN γ at 10ng/mL and rhTNF α at 10ng/mL (BioTechne) to assess impact on $\gamma\delta$ T cell-triggered pDCs' features. Controls were performed using mouse IgG and/or Goat IgG control isotypes (31-41µg/mL according to the corresponding amount of specific antibodies mixed together) (Thermofisher).

pDC restimulation

When assessing the impact of $\gamma\delta$ T cells on pDCs, the ability of pDCs to respond to a

subsequent TLR stimulation was assessed following the first coculture. In this case, the $\gamma\delta$ T cells-pDCs cocultures were harvested upon 20h, washed, counted and pDCs were resuspended at 1×10^6 /ml and further cultured 24h in absence or presence of TLR7L (CL097, 1 μ g/mL) or TLR9L (CpGA, 1.5 μ M) (Invivogen).

Phenotypic analysis

The phenotypic features of pDCs and $\gamma\delta$ T cells were assessed either in the basal state or upon the 20h cocultures, and after the subsequent restimulation for pDCs as indicated. Cell suspensions were stained with anti-human antibodies and their isotype-matched controls in PBS 2% FCS. pDCs were defined as CD45⁺ HLA-DR⁺ BDCA2⁺. $\gamma\delta$ T cells were identified as CD45⁺ CD3⁺ panTCR $\gamma\delta$ ⁺, and further divided into δ 2⁺ and δ 2⁻ subsets. The activation status of the cells was determined using anti-CD40, -CD80 (Beckman), -CD86 (BD) Abs for pDCs, and anti-CD69 (BD), -CD25 (eBiosciences) antibodies for $\gamma\delta$ T cells. The expression profile of immune checkpoints was analyzed using anti-OX40, -OX40L, -ICOS, -41BB, -41BBL, -PD1, -PDL1, -PDL2,(BD), -ICOSL, -TIM3, -CTLA4, -LAG3 (eBiosciences) Abs; activating and inhibitory NKR were depicted using NKG2D (BD), NKp30, NKp44 (Beckman) Abs. TRAIL expression was evaluated on pDCs using anti-TRAIL Abs (BD). The expression of BTN3A was assessed on pDCs and $\gamma\delta$ T cells at the basal state using anti-BTN3A Abs (clone BT3.1, Miltenyi Biotec). Suspensions were submitted to flow cytometry analysis using a FACS CantoII and DIVA software (BD). We analyzed either the percentage of positive cells or the mean fluorescence intensity (MFI) of the positive cells as indicated. To ensure quality control during the study, we performed a systematic standardization of the fluorescence intensities using cytometer setup and tracking beads (CST) (BD).

Cytotoxic activity

$\gamma\delta$ T cells cytotoxic activity was evaluated by a CD107 degranulation assay and perforin measurement upon coculture with target cells. Upon pDCs - $\gamma\delta$ T cells 20h cocultures, the cells were washed, $\gamma\delta$ T cells were counted and further co-cultured with melanoma tumor cells (COLO829, A375) in a 20:1 ratio for 5h. Anti-human CD107a/b Abs (BD) were added at the start of the coculture together with GolgiSTOP (BD) for the last 4h. The cells were then labeled with CD45, CD3, panTCR $\gamma\delta$, TCR δ 2 Abs (BD) before flow cytometry analysis. Perforin secretion was evaluated in the coculture supernatants using Human Perforin (PRF1) ELISA kit (AbCam).

Soluble factors dosage

Human soluble IL4, IL10, IL17-A, IFN γ , TNF α , IFN α , IP10, TGF β and granzyme B production were measured in the coculture supernatants using a Cytometric Bead Array assay (CBA, BD) and FCAPArray software (BD).

Quantification of the isoforms of BTN3A by RT-qPCR

PBMC from healthy donor blood, patient blood and tumor infiltrates were directly lysed in Buffer RLT from the Qiagen RNeasy Plus mini kit and homogenized with QIAshredder (Qiagen). RNA was extracted with Qiagen kit RNeasy Plus mini kit according to the manufacturer's instructions and quantified on a NanoDrop spectrophotometer. 1 μ g of RNA was used to synthesize cDNA using the iScript reverse transcription kit (Bio-Rad) according to manufacturer' instructions (5 min at 25 $^{\circ}$ C, 20 min at 46 $^{\circ}$ C, 1 min at 95 $^{\circ}$ C). qPCR was performed using the iTaq universal SYBR Green supermix (Bio-Rad) on a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) with the following protocol: 95 $^{\circ}$ C 30s, [95 $^{\circ}$ C 5 sec, 60 $^{\circ}$ C 20sec] (45 cycles), 72 $^{\circ}$ C 10min. Analysis was done with the CFX Manager software (Bio-Rad). The primers designed and used for the qPCR analysis are shown on

Supplementary Table 3 (synthesized by Eurogentec). Amplification products were run on a 5% agarose gel to verify the size of amplicons and the absence of non-specific products. The specificity of amplification for BTN3A1 is due to the forward primer, while the reverse primer for BTN3A2 binds to a unique BTN3A2 region. Both forward and reverse primers contribute to the specific amplification of BTN3A3.

BTN3A functionality

BTN3A functionality of $\gamma\delta$ T cells and pDCs was assessed within PBMCs from HDs or melanoma patients, and within tumor infiltrates. PBMCs or tumor infiltrates were incubated with anti-BTN3A agonist antibody (clone 20.1) or anti-BTN3A blocking antibody (clone 103.2) (Creative Biolabs) at 10 μ g/mL, or with mouse IgG control isotype (10 μ g/mL), in presence or not of HMB-PP (200nM) (Sigma), or zoledronate (10 μ M) (Novartis). Activation of $\gamma\delta$ T cells (CD69 and CD25 expression), pDCs (CD40 expression) and cytokine secretion (IFN γ , TNF α) were assessed upon 20h of culture. Analyses were done by flow cytometry using a FACS CantoII and DIVA software (BD).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism software using the Wilcoxon matched t-test and the Mann-Whitney unpaired non-parametric test combined with Bonferroni correction, and the Log-rank test. Survival analyses (Cox regression, Kaplan-Meier), correlation matrix, heatmaps and Principal Component Analysis (PCA) were performed using the survival, GGally, gplots, ggplot2, ggbiplot, MissMDA and FactoMineR packages of the R i386 software version 3.6.2.

Results

Circulating and tumor-infiltrating pDCs from melanoma patients are impaired in their ability to activate and modulate immune checkpoints on $\gamma\delta$ T cells, in accordance with the clinical outcome of the patients

We first evaluated the ability of pDCs from the melanoma microenvironment to modulate the phenotype of $\gamma\delta$ T cells. Purified pDCs from healthy donors' blood, patients' blood or tumor infiltrate were co-cultured with $\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood in absence or in presence of TLR7-L (CL097) or TLR9-L (CpGA), together with Zol or not, to promote accumulation of PAg and assess the potential synergistic effect between TLR-L and Zol (Figure 1A). The use of whole $\gamma\delta$ T cells allowed investigating the impact of pDCs on both T δ 2+ and T δ 2- cell subsets. The phenotypic features including activation markers, immune checkpoints (ICP) and KIR/NCR expression of $\gamma\delta$ T cells were then depicted (Figures 1B-1D, Supplementary Figures S1, S2). For all studied parameters, levels on $\gamma\delta$ T cells in presence of unstimulated pDCs from HD were similar to the one expressed by $\gamma\delta$ T cells alone²⁸, attesting that in HD conditions, unstimulated pDCs do not modulate $\gamma\delta$ T cells. Whereas pDCs from HD' blood trigger a strong upregulation of CD69 and CD25 markers on $\gamma\delta$ T cells upon TLR7, TLR9, or Zol stimulation alone or in combination, pDCs from blood and tumor infiltrate of patients were defective in activating $\gamma\delta$ T cells in most cases (Figure 1B, Supplementary Figures S1A, S1B, S2A), both T δ 2+ and T δ 2- subsets (Supplementary Figure 2B). Interestingly, circulating pDCs from patients were still able to trigger T δ 2+ activation in presence of Zol to levels similar to the HD group.

To further gain insight into the modulations induced by pDCs from melanoma patients, we analyzed the expression of a panel of immune checkpoints on $\gamma\delta$ T cells. 41BB (CD137), PD1 (CD279), TIM3 (CD366) and LAG3 (CD223) expressions were significantly induced on

whole $\gamma\delta$ T and T δ 2+ cells and, although at a lower level on T δ 2- subsets, in presence of TLRL-/Zol-stimulated pDCs in the HD group (Figure 1C, Supplementary Figure S1C, S2C). This ICP profile was not further triggered by pDCs from melanoma patients in presence of TLRL or Zol compared to the pDC/ $\gamma\delta$ T cell coculture in absence of stimulation (condition -) (Figure 1C, Supplementary Figures S1C, S2C). However unstimulated circulating pDCs from patients drove higher levels of 4-1BB and TIM3 on $\gamma\delta$ T cells compared to HDs that were not further improved upon stimulation. Interestingly, among the KIR/NCR molecules, we observed that NKp44 (CD336) was induced on $\gamma\delta$ T cells by circulating pDCs from melanoma patients in absence of additional ex-vivo stimulation (Figure 1D) whereas the expression of NKG2D and NKp30 remained similar between the groups (Supplementary Figure S2D). Heat map based on ICP or KIR/NCR expression illustrated the differential profile of $\gamma\delta$ T cells triggered by pDCs from blood and tumor infiltrate of melanoma patients compared to HDs (Supplementary Figures S2E, S2F). To assess the clinical relevance of our findings, we performed correlations between the features of $\gamma\delta$ T cells cultured with circulating or tumor-infiltrating pDCs and clinical outcomes of the corresponding patients (Supplementary Tables 4A and 4B respectively). Circulating or tumor-infiltrating pDCs able to trigger high proportions of CD69-, TIM3-, LAG3-expressing $\gamma\delta$ T cells (in unstimulated or TLRL conditions) were linked with a better clinical outcome, whereas high proportions of NKp44-expressing $\gamma\delta$ T cells was associated with a worse clinical outcome (Figure 1E, Supplementary Figure S2G, S2H). Taken together, these results highlight that circulating and tumor-infiltrating pDCs harbored an altered capacity to properly activate $\gamma\delta$ T cells and skewed their ICP and NCR profile.

pDCs from blood and tumor infiltrate of melanoma patients exhibit a deficient ability to trigger the functionality of $\gamma\delta$ T cells, in relation with the clinical outcome of the patients

We further examined the ability of pDCs from melanoma patients to trigger the functional features of $\gamma\delta$ T cells by evaluating the secretion of cytokines and cytotoxic properties of $\gamma\delta$ T cells upon co-cultures. TLR-L and/or Zol-treated pDCs elicited productions of IFN γ and TNF α in cocultures in healthy context, which were not upregulated in the presence of pDCs from blood or tumor infiltrates of melanoma patients (Figure 2A, Supplementary Figure S3A). Besides, TGF β , IL4, IL10, IL13 and IL17 secretions were not impacted by melanoma patients' pDCs (Supplementary Figure S3A). We then explored the cytotoxic potential of $\gamma\delta$ T cells toward melanoma tumor cells by assessing membrane-bound CD107a/b and perforine and granzyme B secretions (Figures 2B, 2C, Supplementary Figures S3B, S3C, S3D). Notably, whereas the cytotoxic abilities of $\gamma\delta$ T cells were strongly triggered by activated HD' pDCs, circulating or tumor-infiltrating pDCs from melanoma patients induced significantly lower expression of CD107 (Figure 2B, Supplementary Figure S3C) and weaker granzyme B and perforin secretions (Figure 2C). Such impairment in the melanoma groups were mostly observed in TLRL alone conditions, as the presence of Zol ensured a certain level of cytotoxicity of the $\gamma\delta$ T cells compared to unstimulated conditions, even though lower than the HD group, which was attributable to the T δ 2+ subset (Supplementary Figure S3D). Remarkably, higher secretions of IFN γ (Figure 2D) and TNF α (Supplementary Figure S3E), and greater CD107 upregulation and grB secretion (Figure 2E, Supplementary Figure S3F) in co-cultures with pDCs from blood and/or tumor infiltrate of melanoma patients in presence of Zol together or not with TLR9L were associated with better PFS and/or OS of the patients (Supplementary Table 4). All together these data enlightened for the first time that melanoma impaired the capacity of TLRL-/Zol-stimulated pDCs to trigger a potent Th1-orientated cytotoxic response of $\gamma\delta$ T cells. The heat map bringing together all the features of $\gamma\delta$ T cells (activation, cytokine secretion, cytotoxicity) (Supplementary Figure 4) illustrated the dysfunctional cross-talk between pDCs and $\gamma\delta$ T cells triggered by pDCs from blood and

tumor infiltrate of melanoma patients.

$\gamma\delta$ T cells from blood or tumor infiltrate of melanoma patients were defective in triggering pDCs' activation and modulation of immune checkpoints, in link with the clinical outcomes

We next assessed the ability of $\gamma\delta$ T cells from the melanoma microenvironment to modulate the activation status and phenotype of pDCs. Purified whole $\gamma\delta$ T cells from HD' blood, patients' blood or tumor infiltrate were co-cultured with pDCs purified from HD' blood in absence or in presence of PAg (IPP or HMB-PP) to promote the activation of $\gamma\delta$ T cells (Figure 3A). The phenotypic features of pDCs including activation markers and immune checkpoint profile were then depicted (Figures 3B-C, Supplementary Figures S5A-H). For all studied parameters, levels on pDCs in presence of unstimulated $\gamma\delta$ T cells from HD were similar to the one expressed by pDCs alone⁵⁹, attesting that in HD conditions, unstimulated $\gamma\delta$ T cells do not modulate pDCs. Whereas $\gamma\delta$ T cells from HD' blood induced a marked upregulation of the activation markers CD40, CD80 and CD86 on pDCs in presence of IPP or HMB-PP, circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from patients were strongly impaired to activate pDCs (Figure 3B, Supplementary Figures S5A, S5B, S5C). Notably, we also observed that higher CD86 expression induced by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells in presence of HMB-PP was associated with better OS (Supplementary Figure S5D, Supplementary Table 5). To further decipher the impact of $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients on pDCs, we analyzed the expression of a panel of immune checkpoints on pDCs (Figure 3C, Supplementary Figures S5E, S5F). We observed that $\gamma\delta$ T cells from HDs elicited the expression of GITR-L, LAG3, 4-1BBL, PDL1, PDL2 and OX40 on pDCs in the presence of IPP or HMB-PP stimulation (Figure 3C, Supplementary Figure S5F). Such modulations were triggered to a lesser extent by circulating $\gamma\delta$ T cells from patients or totally abrogated when tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells

were used, except for 4-1BBL, PDL2 and OX40/OX40L which expression was higher when using circulating $\gamma\delta$ T cells from patients compared to HDs. Apart from that, in unstimulated conditions, $\gamma\delta$ T cells from blood and tumor infiltrate of patients elicited lower levels of ICOS-L compared to HDs. Heat map based on ICP expression upon HMB-PP stimulation illustrated the differential profile of pDCs triggered by $\gamma\delta$ T cells from blood and tumor infiltrate of melanoma patients compared to HDs (Supplementary Figure S5G). By further performing Euclidian distance based hierarchical clustering, each group was located in distinct areas of PCA analyses (based on PC1 and PC2), thus allowing intra-groups clustering by ICP profile of pDCs (Supplementary Figure S5H). Interestingly, by assessing the interrelations between ICPs triggered by HMB-PP-stimulated $\gamma\delta$ T cells on pDCs through correlation analyses (Supplementary Figure S6), we found that the cross-regulations between ICP elicited by $\gamma\delta$ T cells from HD blood were modified when considering $\gamma\delta$ T cells from the blood and tumor infiltrate of melanoma patients. For example, ICOSL and 4-1BBL, that tend to negatively correlate with all other ICPs in HDs, showed mostly positive correlations in the blood and tumor infiltrate of melanoma patients. All these observations suggested that circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from patients have an altered ability to properly activate pDCs and skewed their ICP profile.

$\gamma\delta$ T cells from blood or tumor infiltrate of melanoma patients failed to elicit the functionality of pDCs

To go deeper in the characterization of $\gamma\delta$ T cells / pDCs interplay and further decipher the impact of deregulated $\gamma\delta$ T cells on pDCs, we then studied the capacity of $\gamma\delta$ T cells from melanoma microenvironment to modulate the functional properties of pDCs. Notably, the ability of PAg-activated $\gamma\delta$ T cells to induce IFN α , IP10 and TNF α secretions by pDCs observed in a healthy context was strongly impaired with circulating or tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T

cells of melanoma patients (Figure 4A). Such deficiency was associated with a shorter OS of patients (Figure 4B). Furthermore, the triggering of TRAIL expression on pDCs by PAg-activated $\gamma\delta$ T cells observed in a healthy context was totally abrogated when using circulating or tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients (Figure 4C, Supplementary Figure S7). We then assessed, following the co-culture with unstimulated or PAg-activated $\gamma\delta$ T cells, the ability of pDCs to respond to a subsequent TLR9L (CpGA) stimulation. Following co-culture with unstimulated or PAg-activated $\gamma\delta$ T cells from HD' blood, pDCs upregulated at least one of the activation marker (CD40 and/or CD80), TRAIL expression and IFN α secretion upon CpGA stimulation compared to the control condition (-) (Figures 4D, 4E, white bars). Remarkably, upon coculture with circulating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients, pDCs kept their ability to respond to TLR9L stimulation as revealed for most of the studied parameters, except for basal IP10 secretion following pre-culture with the PAg-activated $\gamma\delta$ T cells which was abrogated (Figures 4D, 4E, light grey bars). Even though upon coculture with unstimulated and/or PAg-activated tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients, pDCs displayed an altered ability to express CD40 and secrete IFN α / IP10 in control conditions (-), as well as to upregulate CD80 and secrete IP10 in response to CpGA stimulation, their potential to secrete IFN α in response to TLR9L stimulation remained intact compared to the HD group (Figures 4D, 4E, dark grey bars), suggesting that pDCs are still able to respond to a TLRL stimulation despite their deregulation by $\gamma\delta$ T cells. Thus, all these observations revealed that circulating or tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients severely failed to trigger direct pDCs' functionality, yet sparing the capacity of pDCs to respond to a subsequent TLR9L stimulation.

The phenotypic and functional features of $\gamma\delta$ T cells-triggered pDCs allowed patients' clustering and highlighted perturbed interrelations between pDCs' capacities dictated

by melanoma

To have a global view of the features of pDCs driven by $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients compared to controls, we executed Euclidian distance based hierarchical clustering and ran PCA analyses. Heat map based on the phenotypic (activation status, ICP profile) and functional (TRAIL expression, cytokine secretion) parameters of pDCs elicited upon coculture with PAg-stimulated $\gamma\delta$ T cells illustrated the distinct patterns of pDCs' features depending on the source of $\gamma\delta$ T cells (Supplementary Figure S8A). Furthermore, each group was located in distinct areas of PCA analyses (based on PC1 and PC2), thus allowing intra-groups clustering when considering pDCs' potentialities driven by $\gamma\delta$ T cells (Supplementary Figure S8B). In addition, to assess the interrelations between the features elicited on pDCs, we performed statistical correlation analyses between the parameters for each group. Graphical spearman correlation matrix revealed that the profile of positive and negative interrelations between the parameters observed in HDs was modified in blood and tumor infiltrate of patients (Supplementary Figure S9). Thus, we uncovered that the profile of pDCs dictated by $\gamma\delta$ T cells allowed patients clustering, and that melanoma may drive perturbed regulations between pDCs' capacities.

Reversion of the dysfunctional bidirectional cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients by cytokine administration and immune checkpoint blocking

We next explored potential strategies to restore proper pDCs / $\gamma\delta$ T cells bidirectional interplays in the context of melanoma. We previously uncovered the pathophysiologic features of both pDCs^{16, 17} and $\gamma\delta$ T cells²⁸ in melanoma patients together with the molecular mechanisms of pDCs / $\gamma\delta$ T cells bidirectional interplay⁵⁹, given us tracks and clues on potential defects to fill, and skewed parameters to block. For the pDCs/ $\gamma\delta$ T cells interplay (Figures 5A-5C), molecules to block were selected based on their overexpression by pDCs

from melanoma patients compared to HDs, on the expression of the corresponding receptors/ligands on $\gamma\delta$ T cells, and factors to restore were picked based on their defective secretion by pDCs from melanoma patients compared to HDs upon TLR7/9 triggering. Hence, possible membrane candidates to counteract are 41BB-L, OX40L, ICOS-L, PD1, and GITR, and potential soluble candidates required are IFN α and TNF α . Notably, blocking interactions between 41BB/4-1BB-L, OX40/OX40L, ICOS/ICOS-L, PD1/PDL1, GITR/GITR-L and adding rhIFN α and rhTNF α can restore patients' pDCs' ability to properly activate $\gamma\delta$ T cells (Figure 5A, Supplementary Figure S10A) especially T δ 2+ cells (Supplementary Figure S10B) with appropriate cytokine secretion (Figure 5B) and cytotoxic properties (Figure 5C). For the $\gamma\delta$ T cells/pDCs interplay (Figures 5D-5F), molecules to block were selected based on their overexpression by $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients compared to HDs, the expression of the corresponding receptors/ligands on pDCs, and factors to restore were picked based on their defective secretion by $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients compared to HDs upon PAg stimulation. Hence, possible membrane candidates to block were 41BB, OX40, TIM3, and LAG3, and potential soluble candidates to add were IFN γ and TNF α . We observed that the blocking of 41BB, OX40, TIM3, LAG3 and addition of rhIFN γ and rhTNF α can restore patients' $\gamma\delta$ T cells' ability to properly activate pDCs (Figure 5D), and trigger their cytotoxicity (Figures 5E, 5F) in most cases. Thus, the restoration of efficient pDCs / $\gamma\delta$ T cells bidirectional interplays in melanoma patients can be achieved through specific cytokine administration and immune checkpoint targeting, opening new opportunities to potentiate these crucial immune players toward effective anti-tumor immunity.

Circulating and tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients displayed higher level of BTN3A that revealed to be nonfunctional

As we previously demonstrated the key role of BTN3A during pDCs / $\gamma\delta$ T cells interplays,

we then assessed whether the dysfunctional cross-talks highlighted here in the context of melanoma could be due to an altered expression of BTN3A by pDCs or $\gamma\delta$ T cells. We evaluated the expression of BTN3A on pDCs and $\gamma\delta$ T cells of HD' blood, patients' blood and tumor infiltrate by flow cytometry (Figure 6A). Unexpectedly, we observed an increased expression of BTN3A on tumor-infiltrating pDCs compared to pDCs from the HD group (Figure 6B) as well as a higher expression of BTN3A on $\gamma\delta$ T cells from the blood and tumor of melanoma patients compared to the blood of HDs, especially on the T δ 2+ subset (Figure 6C), linked with a better clinical outcome (Supplementary Table S6). We then investigated whether melanoma patients displayed the expression of the three isoforms of BTN3A and their relative expression level. As BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3 could not be distinguished based on their extracellular part, we performed RT-qPCR on PBMC from the different groups to analyze the relative expression of the isoforms (Figures 6D-6E). BTN3A2 was the greatest expressed isoform in all groups (Figure 6D), and BTN3A1 and BTN3A2 tended to be more expressed in tumor infiltrate compared to HD' blood (Figure 6D). As the BTN3A1/A3 isoforms, which are sensitive to PAg, do not seem to be defective in melanoma patients, we then evaluated the functionality of BTN3A using an agonistic antibody (clone 20.1). Notably, whereas anti-BTN3A 20.1 Abs triggered an upregulation of CD69 expression on $\gamma\delta$ T cells especially T δ 2+ subset and of CD40 on pDCs within PBMC of HDs, we observed no impact of this agonistic Abs on $\gamma\delta$ T cells (Figure 7A) and pDCs (Figure 7B) within PBMC or tumor infiltrate of melanoma patients, suggesting a functional impairment of BTN3A in melanoma patients. The combined use of agonistic anti-BTN3A 20.1 Abs together with HMB-PP or Zol do not improve the response observed with HMB-PP or Zol alone. Thus, our investigations pointed out for the first time a higher expression of BTN3A on circulating and tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients with adequate BTN3A1/A2/A3 isoforms expressed, but stressed out the potential functional impairment of

this molecule.

Discussion

pDCs and $\gamma\delta$ T cells harbored unique properties and functional plasticity that steer their attractiveness for immunotherapy. Although being investigated individually, their interplay has not been extensively explored especially in melanoma where these potent immune players are involved in the pathophysiology of the disease and represent targets and vectors for immunotherapies. We provide here a detailed investigation of the bidirectional cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells both in blood and tumor microenvironment, elucidating the phenotypic and functional features driven by the other partner, in relationship with the clinical outcome of the patients. Our study brings better understanding of the physiopathology of pDCs/ $\gamma\delta$ T cells interplays in melanoma that will help designing new therapeutic approaches exploiting their potential to improve patient outcomes.

We have demonstrated here severe alterations of the bidirectional cross-talk between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma. Whereas healthy TLR-activated pDCs drove potent $\gamma\delta$ T cells activation and functionality, pDCs from blood and tumor infiltrate of melanoma patients displayed an impaired ability to activate and modulate immune checkpoints on $\gamma\delta$ T cells, and exhibited a deficient ability to trigger the functionality of $\gamma\delta$ T cells. Conversely, healthy $\gamma\delta$ T cells activated by PAg triggered pDC phenotypic changes and elicited their functional activities, but $\gamma\delta$ T cells from blood or tumor infiltrate of melanoma patients were defective in triggering pDCs activation and modulation of immune checkpoints, and failed to elicit the functionality of pDCs. Thus we revealed that melanoma hijacked pDCs/ $\gamma\delta$ T cells interplay to escape from immune control, and highlighted that circulating and tumor-infiltrating pDCs / $\gamma\delta$ T cell features are promising potential biomarkers of clinical evolution.

By exploring potential strategies to restore pDCs / $\gamma\delta$ T cells bidirectional interplays in the context of melanoma, we demonstrated that the reversion of the dysfunctional bidirectional cross-talks could be achieved by specific cytokine administration and immune checkpoint

targeting, opening new opportunities to potentiate these crucial immune players toward effective anti-tumor immunity and further modulate and orientate the outcomes of these cross-talks. Indeed, we identified critical immune checkpoint molecules governing pDCs / $\gamma\delta$ T cells interplays: OX40/OX40L, ICOS/ICOS-L, PD1/PDL1, 41BB/4-1BB-L, GITR/GITR-L, TIM3, and LAG3, who are all targets of the current and next generation immune checkpoint therapies⁶¹. Thus, pDCs, $\gamma\delta$ T cells and their inter-relationships are likely to be affected by immune checkpoint blocker therapies, supporting their study in the context of these immunotherapies.

We previously depicted specific features of $\gamma\delta$ T cells in the context of melanoma²⁸, and uncovered here that some of them may be driven by melanoma-skewed pDCs, as they are recapitulated on healthy $\gamma\delta$ T cells co-cultured with circulating- or tumor-infiltrating pDCs from melanoma patients. The reported accumulation of FoxP3+ regulatory $\gamma\delta$ T cells within melanoma tumors could be linked to the higher IL10 production by $\gamma\delta$ T cells upon coculture with pDCs. The impaired ability of $\gamma\delta$ T cells to exhibit activation molecules, secrete cytokines in response to stimulation, and altered anti-tumor cytotoxic potential may be driven by pDCs. Furthermore, we also previously highlighted higher proportions of circulating $\gamma\delta$ T cells expressing 4-1BB and TIM3 in melanoma patients. We showed here that pDCs from the blood of melanoma patients drove increased expression of 4-1BB and TIM3 on healthy $\gamma\delta$ T cells. Interestingly, we previously identified high proportions of NKp44+ circulating $\gamma\delta$ T cells which were predictive of poor clinical outcomes, and highlighted here that circulating pDCs from melanoma patients triggered NKp44 expression on $\gamma\delta$ T cells, also linked to an early relapse. Notably, splice variants of human NCR encoding receptor isoforms with inhibitory functions have been recently discovered⁶², influencing outcomes in many immunopathological contexts⁶³. Such differential splicing arises in some tissue microenvironments where inhibitory NCR are triggered by specific ligands, as this is the case

for the inhibitory isoform of NKp44 that cross-link Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) on tumor cells, a ligand expressed by many cancer types. Blocking NKp44-PCNA interaction results in inhibition of tumor growth in mouse models⁶⁴. Hence, NCR can be considered as novel innate immune checkpoints, which, based on our results, offer an exciting potential therapeutic target to manipulate in cancer.

BTN3A harbors an emergent yet growing role in the field of tumor immunity, and our study brings crucial insights regarding BTN3A function on immune cells from tumor microenvironment. We previously uncovered that human pDCs express BTN3A molecules⁵⁹ which are mandatory for the proper cross-talk with $\gamma\delta$ T cells⁵⁹. We now revealed for the first time an increased expression of BTN3A on circulating and tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells of melanoma patients, yet paradoxically associated with a defective interplay between these two immune cells, stressing out its potential functional impairment. Such observations have been made using antibodies that recognize the extracellular part of BTN3A, therefore unable to distinguish the isoforms of BTN3A. It remains to be determined which isoform is overexpressed on pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma, even though RT-PCR analyses of the three BTN3A1/A2/A3 isoforms seem to suggest an increased expression of BTN3A2 in melanoma patients compared to HDs. In addition, mutations within the intracellular part of BTN3A1 affect 5-10% of melanoma patients and may prevent the proper sensing of PAg by BTN3A1. Thus, pDCs and $\gamma\delta$ T cells from melanoma microenvironment may be deficient for PAg sensing despite displaying high level of BTN3A, thus not well equipped to favor PAg-dependent cellular interplays. It has been demonstrated that intracellular IPP, accumulated following mevalonate pathway inhibition through Zol treatment, will either provoke a conformational change of BTN3A1/A3 or be released by DCs through the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in cooperation with apolipoprotein A-I (apo-I) and BTN3A1⁶⁵, mediating the activation of $\gamma\delta$ T cells. Regulation of BTN3A1 stability together

with protein trafficking and expression of the transporter ABCA1 within tumor microenvironment may be crucial to trigger optimal cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells. Moreover, it has been demonstrated that BTN3A1 is essential for type I IFN signaling upon nucleic acid sensing⁶⁶. In addition, the recent discovery that BTN2A1 plays a critical role in PAg recognition by $\gamma\delta$ T cells by binding the $\gamma\delta$ TCR in conjunction with BTN3A1⁶⁷ sustain even more the rationale to study deeply the BTN family of molecules both on tumor cells and immune infiltrating cells to elucidate the mechanism of BTN3A dysfunction in melanoma. Besides, it has been highlighted that the polymorphism of genes coding for BTNs is associated with pathologies in humans⁶⁸ especially cancers. A positive association between BTN3A2 expression, higher T-cell infiltration and better prognosis has been pointed out in ovarian cancer⁶⁹ and breast cancer⁷⁰, suggesting that BTN3A2 expression in tumor microenvironment modulate the density and nature of immune infiltration. BTN3A2 is the most expressed isoform on tumor cells (solid tumors or hematologic tumors) as shown in colon cancer⁷¹ and pancreatic adenocarcinoma⁷². Its overexpression is strongly associated with worse clinical outcome⁷²: BTN3A2 lacks the B30.2 intracellular domain, therefore behaving as a potential decoy receptor that favor immune escape by avoiding recognition of tumor by $\gamma\delta$ T cells. Outstandingly, circulating levels of soluble forms of BTN3A1 and pan-BTN3As have a strong prognostic significance in patient with pancreatic adenocarcinoma, high levels being associated with short survivals^{72, 73}, potentially by preventing V γ 9V δ 2 T cells to exhibit cytotoxic activities towards tumor cells. In the light of our data, it would be interesting to further explore the expression of BTN3A isoforms in melanoma, both on tumor cells and on immune infiltrating cells, together with the circulating levels of soluble forms of BTN3A, and assess their prognostic impact on clinical outcomes as well as their influence on the nature and density of immune infiltration. The mandatory role of BTN3A in pDCs/ $\gamma\delta$ T cells bidirectional cross-talks renders it central in the regulation of immune responses towards

tumor cells, and very promising to design or optimize immunotherapeutic strategies. Depending on the isoform, BTN3 molecules could have stimulatory or inhibitory activity, suggesting that they might be considered as novel immune checkpoint to be targeted to potentiate the anti-tumor activity of $\gamma\delta$ T cells⁷⁴.

Despite all studies including ours were performed *ex vivo*, we can envision that pDCs and $\gamma\delta$ T cells have the opportunity to meet and interact *in vivo* in pathophysiologic conditions. Both pDCs and $\gamma\delta$ T cells infiltrate tumors and could meet within tumor microenvironment. Remarkably, a recent study revealed that activated pDCs preferentially attracted $\gamma\delta$ T cells following their injection in the skin of melanoma patients⁶⁰, supporting the potential interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells *in vivo* in cancer patients. Strikingly, there are *in vivo* evidences that the cross-talk between DCs and $\gamma\delta$ T cells is involved in many physiopathological situations. Granulysin secreted by activated V δ 2+ T cells induce chemotaxis or fugetaxis of DCs depending on their maturation status⁷⁵. The DCs / $\gamma\delta$ T cells cross-talk can be exploited by pathogens for immune evasion. HIV-infection of moDCs inhibits V γ 9V δ 2 T cell functions (proliferation, cytokine production) and reciprocal DC activation⁷⁶. On the opposite, DCs / $\gamma\delta$ T cells cross-talk can initiate or boost immune responses to pathogens. $\gamma\delta$ T cells promote the maturation of DCs and subsequent T-cell priming during West Nile Virus infection⁷⁷, and BCG-infected DCs can prime and expand cytotoxic $\gamma\delta$ T cells⁷⁸. Such DCs / $\gamma\delta$ T cells cross-talk is also central in host-microbiota interactions as shown for microbiota-activated CD103+ DCs that can elicit $\gamma\delta$ T17⁷⁹ and therefore is central in IL17-driven inflammatory diseases. Besides, activated $\gamma\delta$ T cells promote DC maturation and exacerbate the development of autoimmune disease in a mouse model⁸⁰. In addition, DCs activated by ABP can empower $\gamma\delta$ T cells with anti-tumor immunity⁸¹ through elicitation of TAA-specific CD8 T cell responses. Despite their hijacking by melanoma, positive correlates of some pDCs / $\gamma\delta$ T cells' features with clinical outcome revealed them as crucial antitumor effectors, which prompt their use as

vectors or targets for cancer immunotherapy. Anti-cancer therapies based on the exploitation of the potential of pDCs³⁹ or $\gamma\delta$ T cells^{41, 43} are emerging, especially in melanoma^{82, 83}. Successful clinical trials aiming at stimulating V δ 2+ cells with ABP (zoledronate, pamidronate) or at adoptively transferring ex-vivo expanded $\gamma\delta$ T cells proved that $\gamma\delta$ T cell-based therapeutic approaches are promising to fight tumors and improve patient outcome. Besides, pDCs can be mobilized by administration of TLR leading to protective antitumor responses, or can be directly used as vectors for vaccination^{39, 46, 84}. Yet, the impact of pDC-based immunotherapies on $\gamma\delta$ T cells as well as the effect of strategies based on $\gamma\delta$ T cells on pDCs is not investigated. Our study highlights that the interactions between pDCs and $\gamma\delta$ T cells could play a role in the therapeutic activity of ABP. Such cross-talk may participate to the beneficial immune effects of Zol administration in cancer⁸⁵. ABP drugs used as adjuvant cancer therapy for the treatment of malignant osteolytic bone disease, could activate the anti-tumor effector functions of $\gamma\delta$ T cells via pDCs. Interestingly, it has been shown in colorectal cancer that Zol induces the expression of BTN3A1 within the tumor microenvironment thus stimulating effector $\gamma\delta$ T cells with antitumor activity and sensitize tumor cells to $\gamma\delta$ T cells mediated cytotoxicity⁸⁶. The interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells could be exploited to harness reciprocal activation and pave the way for novel immune-based strategies, influencing pDCs through modulation of $\gamma\delta$ T cells and reciprocally affecting $\gamma\delta$ T cells by impacting pDCs. Our findings provide rationale for combinatorial therapy engaging both cell types, by simultaneously targeting pDCs and $\gamma\delta$ T cells using both TLR agonists and ABP for synergistic activity. The expanded knowledge on pDCs / $\gamma\delta$ T cells interactions brings opportunities to design new immunotherapies harnessing their potential.

Altogether, our study uncovered that melanoma hijacked bidirectional pDCs/ $\gamma\delta$ T cells interplays to escape from immune control. Yet pDCs and $\gamma\delta$ T cells have the potential to exhibit and trigger potent antitumor responses to successfully drive favorable clinical

outcome. A better understanding of the functional plasticity of pDCs/ $\gamma\delta$ T cells will help designing new therapeutic approaches exploiting the potential and interplay of these potent immune players while counteracting their skewing by tumor cells. Both pDCs and $\gamma\delta$ T cells harbor critical roles in immune responses induction and orientation. Their unique and crucial properties together with their functional plasticity render them very attractive both as targets and vectors for cancer immunotherapy. The understanding of the interplay between pDCs and $\gamma\delta$ T cells will help harnessing their power against cancer to improve cancer immunotherapies and patient outcomes. Our findings pave the way to manipulate these potent and promising cell partners to design novel immunotherapeutic strategies.

Acknowledgments

We thank Dr D. Legrand and her staff at EFS Auvergne Rhone-Alpes for providing healthy volunteers' blood samples. We acknowledge the surgeons and anatomo-pathology Department from CHU Grenoble Alpes for providing tumor samples especially Dr Nicole Pinel and Pr Nathalie Sturm. We thank Dr Nathalie Bendriss-Vermare and Dr Myriam Capone for stimulating discussions and precious advices. We are grateful to all the volunteers and patients who agreed to participate in this study.

References

1. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:471-85.
2. Hayday AC. gammadelta T Cell Update: Adaptate Orchestrators of Immune Surveillance. *J Immunol* 2019;203:311-320.
3. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* 2019;50:37-50.
4. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 2013;13:88-100.
5. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:467-78.
6. Kabelitz D, Kalyan S, Oberg HH, et al. Human Vdelta2 versus non-Vdelta2 gammadelta T cells in antitumor immunity. *Oncoimmunology* 2013;2:e23304.
7. Monti M, Consoli F, Vescovi R, et al. Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Cutaneous Melanoma. *Cells* 2020;9.
8. Koucky V, Boucek J, Fialova A. Immunology of Plasmacytoid Dendritic Cells in Solid Tumors: A Brief Review. *Cancers (Basel)* 2019;11.
9. Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, et al. Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Front Immunol* 2014;5:622.
10. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1183:89-103.
11. Alculumbre S, Raieli S, Hoffmann C, et al. Plasmacytoid pre-dendritic cells (pDC): from molecular pathways to function and disease association. *Semin Cell Dev Biol* 2019;86:24-35.
12. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008;29:352-61.
13. Salio M, Cella M, Vermi W, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 2003;33:1052-62.
14. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006;176:248-55.
15. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol* 2009;182:6815-23.
16. Aspod C, Leccia MT, Charles J, et al. Plasmacytoid dendritic cells support melanoma progression by promoting Th2 and regulatory immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer Immunol Res* 2013;1:402-15.
17. Aspod C, Leccia MT, Charles J, et al. Melanoma hijacks plasmacytoid dendritic cells to promote its own progression. *Oncoimmunology* 2014;3:e27402.
18. Sisirak V, Faget J, Gobert M, et al. Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res* 2012;72:5188-97.
19. Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, et al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011;71:5423-34.
20. Lawand M, Dechanet-Merville J, Dieu-Nosjean MC. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Front Immunol* 2017;8:761.

21. Wesch D, Peters C, Siegers GM. Human gamma delta T regulatory cells in cancer: fact or fiction? *Front Immunol* 2014;5:598.
22. Gu S, Nawrocka W, Adams EJ. Sensing of Pyrophosphate Metabolites by Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Front Immunol* 2014;5:688.
23. Rhodes DA, Chen HC, Williamson JC, et al. Regulation of Human gammadelta T Cells by BTN3A1 Protein Stability and ATP-Binding Cassette Transporters. *Front Immunol* 2018;9:662.
24. Fleming C, Morrissey S, Cai Y, et al. gammadelta T Cells: Unexpected Regulators of Cancer Development and Progression. *Trends Cancer* 2017;3:561-570.
25. Hubert M, Gobbini E, Bendriss-Vermare N, et al. Human Tumor-Infiltrating Dendritic Cells: From in Situ Visualization to High-Dimensional Analyses. *Cancers (Basel)* 2019;11.
26. Kabelitz D, Glatzel A, Wesch D. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:1-7.
27. Cordova A, Toia F, La Mendola C, et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One* 2012;7:e49878.
28. Girard P, Charles J, Cluzel C, et al. The features of circulating and tumor-infiltrating gammadelta T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. *Oncoimmunology* 2019;8:1601483.
29. Labidi-Galy SI, Treilleux I, Goddard-Leon S, et al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncoimmunology* 2012;1:380-382.
30. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 2015;21:938-945.
31. Argentati K, Re F, Serresi S, et al. Reduced number and impaired function of circulating gamma delta T cells in patients with cutaneous primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2003;120:829-34.
32. Petrini I, Pacini S, Galimberti S, et al. Impaired function of gamma-delta lymphocytes in melanoma patients. *Eur J Clin Invest* 2011;41:1186-94.
33. Toia F, Buccheri S, Anfosso A, et al. Skewed Differentiation of Circulating Vgamma9Vdelta2 T Lymphocytes in Melanoma and Impact on Clinical Outcome. *PLoS One* 2016;11:e0149570.
34. Rei M, Pennington DJ, Silva-Santos B. The emerging Protumor role of gammadelta T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy. *Cancer Res* 2015;75:798-802.
35. Ma S, Cheng Q, Cai Y, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2014;74:1969-82.
36. Wu P, Wu D, Ni C, et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* 2014;40:785-800.
37. Peng G, Wang HY, Peng W, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 2007;27:334-48.
38. Ma C, Zhang Q, Ye J, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol* 2012;189:5029-36.
39. Tel J, van der Leun AM, Figdor CG, et al. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:1279-88.
40. Hannani D, Ma Y, Yamazaki T, et al. Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol* 2012;33:199-206.
41. Kobayashi H, Tanaka Y. gammadelta T Cell Immunotherapy-A Review. *Pharmaceuticals (Basel)* 2015;8:40-61.

42. Fisher JP, Heuwerkerk J, Yan M, et al. gammadelta T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology* 2014;3:e27572.
43. Rafia C, Harly C, Scotet E. Beyond CAR T cells: Engineered Vgamma9Vdelta2 T cells to fight solid tumors. *Immunol Rev* 2020.
44. Smith M, Garcia-Martinez E, Pitter MR, et al. Trial Watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2018;7:e1526250.
45. Molenkamp BG, Sluijter BJ, van Leeuwen PA, et al. Local administration of PF-3512676 CpG-B instigates tumor-specific CD8+ T-cell reactivity in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:4532-42.
46. Tel J, Aarntzen EH, Baba T, et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res* 2013;73:1063-75.
47. Charles J, Chaperot L, Hannani D, et al. An innovative plasmacytoid dendritic cell line-based cancer vaccine primes and expands antitumor T-cells in melanoma patients in a first-in-human trial. *Oncoimmunology* 2020;9:1738812.
48. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, et al. Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007;67:7450-7.
49. Laggner U, Lopez JS, Perera G, et al. Regression of melanoma metastases following treatment with the n-bisphosphonate zoledronate and localised radiotherapy. *Clin Immunol* 2009;131:367-73.
50. Donia M, Ellebaek E, Andersen MH, et al. Analysis of Vdelta1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 2012;1:1297-1304.
51. Lozupone F, Pende D, Burgio VL, et al. Effect of human natural killer and gammadelta T cells on the growth of human autologous melanoma xenografts in SCID mice. *Cancer Res* 2004;64:378-85.
52. Scotet E, Nedellec S, Devilder MC, et al. Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk. *Front Biosci* 2008;13:6872-85.
53. Fiore F, Castella B, Nuschak B, et al. Enhanced ability of dendritic cells to stimulate innate and adaptive immunity on short-term incubation with zoledronic acid. *Blood* 2007;110:921-7.
54. Conti L, Casetti R, Cardone M, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol* 2005;174:252-60.
55. Devilder MC, Maillet S, Bouyge-Moreau I, et al. Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol* 2006;176:1386-93.
56. Kunzmann V, Kretzschmar E, Herrmann T, et al. Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology* 2004;112:369-77.
57. Devilder MC, Allain S, Dousset C, et al. Early triggering of exclusive IFN-gamma responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2009;183:3625-33.
58. Dunne MR, Madrigal-Estebas L, Tobin LM, et al. (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2 enyl pyrophosphate-stimulated Vgamma9Vdelta2 T cells possess T helper type 1-promoting adjuvant activity for human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1109-20.
59. Girard P, Ponsard B, Charles J, et al. Potent Bidirectional Cross-Talk Between Plasmacytoid Dendritic Cells and gammadeltaT Cells Through BTN3A, Type I/II IFNs and Immune Checkpoints. *Front Immunol* 2020;11:861.

60. van Beek JJP, Florez-Grau G, Gorris MAJ, et al. Human pDCs Are Superior to cDC2s in Attracting Cytolytic Lymphocytes in Melanoma Patients Receiving DC Vaccination. *Cell Rep* 2020;30:1027-1038 e4.
61. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, et al. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol* 2018;11:39.
62. Shemesh A, Brusilovsky M, Kundu K, et al. Splice variants of human natural cytotoxicity receptors: novel innate immune checkpoints. *Cancer Immunol Immunother* 2017.
63. Pazina T, Shemesh A, Brusilovsky M, et al. Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Front Immunol* 2017;8:369.
64. Shemesh A, Kundu K, Peleg R, et al. NKp44-Derived Peptide Binds Proliferating Cell Nuclear Antigen and Mediates Tumor Cell Death. *Front Immunol* 2018;9:1114.
65. Castella B, Kopecka J, Sciancalepore P, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 regulates phosphoantigen release and Vgamma9Vdelta2 T cell activation by dendritic cells. *Nat Commun* 2017;8:15663.
66. Seo M, Lee SO, Kim JH, et al. MAP4-regulated dynein-dependent trafficking of BTN3A1 controls the TBK1-IRF3 signaling axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:14390-14395.
67. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by gammadelta T cells. *Science* 2020;367.
68. Redwan EM, Al-Hejin AM, Almehdar HA, et al. Prediction of Disordered Regions and Their Roles in the Anti-Pathogenic and Immunomodulatory Functions of Butyrophilins. *Molecules* 2018;23.
69. Le Page C, Marineau A, Bonza PK, et al. BTN3A2 expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor infiltrating T cells and a better prognosis. *PLoS One* 2012;7:e38541.
70. Cai P, Lu Z, Wu J, et al. BTN3A2 serves as a prognostic marker and favors immune infiltration in triple-negative breast cancer. *J Cell Biochem* 2020;121:2643-2654.
71. Lebrero-Fernandez C, Wenzel UA, Akeus P, et al. Altered expression of Butyrophilin (BTN) and BTN-like (BTNL) genes in intestinal inflammation and colon cancer. *Immun Inflamm Dis* 2016;4:191-200.
72. Benyamine A, Loncle C, Foucher E, et al. BTN3A is a prognosis marker and a promising target for Vgamma9Vdelta2 T cells based-immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Oncoimmunology* 2017;7:e1372080.
73. Bian B, Fanale D, Dusetti N, et al. Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 2019;8:e1561120.
74. Blazquez JL, Benyamine A, Pasero C, et al. New Insights Into the Regulation of gammadelta T Cells by BTN3A and Other BTN/BTNL in Tumor Immunity. *Front Immunol* 2018;9:1601.
75. Sparrow EL, Fowler DW, Fenn J, et al. The cytotoxic molecule granulysin is capable of inducing either chemotaxis or fugetaxis in dendritic cells depending on maturation: a role for Vdelta2(+) gammadelta T cells in the modulation of immune response to tumour? *Immunology* 2020.
76. Sacchi A, Rinaldi A, Tumino N, et al. HIV infection of monocytes-derived dendritic cells inhibits Vgamma9Vdelta2 T cells functions. *PLoS One* 2014;9:e111095.

77. Fang H, Welte T, Zheng X, et al. gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;59:71-80.
78. Martino A, Casetti R, Sacchi A, et al. Central memory Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes primed and expanded by bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells kill mycobacterial-infected monocytes. *J Immunol* 2007;179:3057-64.
79. Fleming C, Cai Y, Sun X, et al. Microbiota-activated CD103(+) DCs stemming from microbiota adaptation specifically drive gammadeltaT17 proliferation and activation. *Microbiome* 2017;5:46.
80. Wang B, Tian Q, Guo D, et al. Activated gammadelta T Cells Promote Dendritic Cell Maturation and Exacerbate the Development of Experimental Autoimmune Uveitis (EAU) in Mice. *Immunol Invest* 2020:1-20.
81. Van Acker HH, Anguille S, Van Tendeloo VF, et al. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology* 2015;4:e1021538.
82. Eggermont A, Robert C, Soria JC, et al. Harnessing the immune system to provide long-term survival in patients with melanoma and other solid tumors. *Oncoimmunology* 2014;3:e27560.
83. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of novel therapies. *Eur J Cancer* 2016;53:125-34.
84. Aspod C, Leccia MT, Salameire D, et al. HLA-A(*)0201(+) plasmacytoid dendritic cells provide a cell-based immunotherapy for melanoma patients. *J Invest Dermatol* 2012;132:2395-2406.
85. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. gammadelta T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat Rev Cancer* 2019;19:392-404.
86. Zocchi MR, Costa D, Vene R, et al. Zoledronate can induce colorectal cancer microenvironment expressing BTN3A1 to stimulate effector gammadelta T cells with antitumor activity. *Oncoimmunology* 2017;6:e1278099.

Figure legends

Figure 1: Circulating and tumor-infiltrating pDCs from melanoma patient loss their ability to properly activate $\gamma\delta$ T cells and modulate their immune checkpoint and NCR profiles

pDCs purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with $\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood in absence (white symbols) or presence (grey symbols) of TLR7L (CL097), TLR9L (CpGA) or zoledronate (Zol) alone or in combination. The phenotypic features of $\gamma\delta$ T cells were depicted by flow cytometry. A/ Experimental scheme. B/ Activation status of $\gamma\delta$ T cells evaluated by assessing CD69 and CD25 expression (HDs: n=14-23; patient blood: n=4-15; tumor infiltrates: n=9-15). C-D/ Expression of selected immune checkpoints (PD1, LAG3, 41BB and TIM3) (C) or NKp44 (D) by $\gamma\delta$ T cells: (HDs: n=11; patient blood: n=1-7; tumor infiltrates: n=3-6). B-D/ P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (stars, intragroup comparisons compared to the unstimulated condition) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons) with Bonferroni correction; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. E/ Comparative PFS (from diagnosis time) of patients whose tumor-infiltrating pDCs induced low or high CD69+ $\gamma\delta$ T cells in unstimulated conditions. Groups were separated using the median percentage of CD69+ $\gamma\delta$ T 31.1% (n=8 patients/group). Comparison using Log-rank test.

Figure 2: Circulating and tumor-infiltrating pDCs from melanoma patients displayed an impaired ability to trigger $\gamma\delta$ T cells' functional activity that drive worse clinical outcome

pDCs purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with $\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood in absence (white

symbols) or presence (grey symbols) of TLR7L (CL097), TLR9L (CpGA) or zoledronate (Zol) alone or in combination. The functionality of $\gamma\delta$ T cells was then assessed. A/ IFN γ cytokine secretion was quantified in the culture supernatants by CBA (HDs: n=21-36; patient blood: n=5-27; tumor infiltrates: n=14-25). B/ The cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells was evaluated through CD107 surface expression upon subsequent coculture with melanoma tumor cells (COLO829) (HDs: n=8-22; patient blood: n=4-15; tumor infiltrates: n=11-19). C/ Granzyme B secretion (left panel) was quantified in the culture supernatants by CBA, and perforin secretion (right panel) assessed by ELISA upon subsequent coculture with melanoma tumor cells (COLO829) (HDs: n=12-26; patient blood: n=6-16; tumor infiltrates: n=3-13). P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (stars, intragroup comparisons compared to the unstimulated condition) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons) with Bonferroni correction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. D/ Comparative PFS (left panel) and OS (right panel) (from diagnosis time) of patients whose tumor-infiltrating pDCs induced low or high IFN γ production by $\gamma\delta$ T cells in the presence of Zol+CpGA. Groups were separated using the median value of IFN γ secretion 50.25pg/ml (n=6 patients/group). E/ Comparative PFS (from diagnosis time) (left panel) and OS (from sampling time) (right panel) of patients whose tumor-infiltrating pDCs induced low or high cytotoxic activity by $\gamma\delta$ T cells and grB secretion in the presence of Zol+CpGA. Groups were separated using the median value of CD107 expression by $\gamma\delta$ T cells 22.6% (n=4-5 patients/group) or grB secretion 2580pg/ml (n=7-8 patients/group). D-E/ Comparison using Log-rank test.

Figure 3: Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients have a defective ability to activate pDCs and modulate their profile of immune checkpoints that impacted clinical outcomes

$\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with pDCs purified from HD' blood in absence (white symbols) or presence of the phosphoantigens IPP (light grey symbols) or HMB-PP (dark grey symbols). The phenotypic features of pDCs were depicted by flow cytometry. A/ Experimental scheme. B/ Activation status of pDCs evaluated by assessing the MFI of CD40, CD80 and CD86 on positive cells (HDs: n=11-18; patient blood: n=6-8; tumor infiltrates: n=5-7). C/ Expression of selected immune checkpoints by pDCs: GITR-L, ICOS-L, PDL2, OX40-L, 41BB-L and PDL1 (HDs: n=8-15; patient blood: n=6-8; tumor infiltrates: n=6-7). P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (intragroup comparisons compared to the unstimulated condition) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons) with Bonferroni correction.

Figure 4 : Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patient loss their abilities to properly trigger the functional activity of pDCs

$\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with pDCs purified from HD' blood in absence (white symbols) or presence of the phosphoantigens IPP (light grey symbols) or HMB-PP (dark grey symbols). The functionality of pDCs was then assessed. A/ IFN α , IP10 and TNF α cytokine secretions were quantified by CBA in the culture supernatants (HDs: n=16; patient blood: n=6-10; tumor infiltrates: n=8-10). B/ Comparative OS from sampling time of patients whose tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells triggered low or high TNF α production by pDCs in the presence of HMB-PP. Groups were separated using the median value of TNF α secretion 45,2 pg/ml (n=4 patients/group). Comparison using Log-rank test. C/ The cytotoxic capacity of pDCs was measured through expression of TRAIL (HDs: n=11-18; patient blood: n=6-8; tumor infiltrates: n=5-7). D-E/ The ability of pDCs to respond to a subsequent TLRL stimulation

was evaluated by measuring D/ CD40, CD80 and CD86 expression, TRAIL exposure and E/ IFN α and IP10 secretions upon further culture of pDCs in presence or not of TLR9L (CpGA) following pre-incubation with unstimulated (upper panels) or HMB-PP stimulated (lower panels) $\gamma\delta$ T cells (HDs: n=9; patient blood: n=5; tumor infiltrates: n=3). Bars represents mean \pm SEM. P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (intragroup comparisons compared to the unstimulated condition) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons) with Bonferroni correction.

Figure 5: Reversion of the dysfunctional bidirectional cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients by recombinant cytokines administration and immune checkpoint blocking

PBMC from HD' blood (circles) and patient' blood (squares) and tumor immune infiltrates (triangles) were cultured in presence of blocking antibodies and human recombinant cytokines mixtures together or not with TLR7-L (CL097), TLR9-L (CpGA), HMB-PP or zoledronate (Zol) (black symbols). Controls were performed using mouse IgG and/or goat IgG control isotypes (white symbols). A-C/ pDC-triggered $\gamma\delta$ T cells' features were assessed in the presence of a mixture of anti-41BB, -OX40L, -PD1, -ICOSL, -GITR Abs and rhIFN α A, IFN α 2b and rhTNF α . $\gamma\delta$ T cells were identified as CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ panTCR $\gamma\delta^{+}$. A/ The activation status of $\gamma\delta$ T cells was evaluated by assessing the expression of CD69 (MFI) and CD25 (%) (HDs: n=9; patient blood: n=8; tumor infiltrates: n=7). B-C/ The functionality of $\gamma\delta$ T cells was determined by measuring IFN γ (B) and grB (C) secretions in the culture supernatants (HDs: n=9; patient blood: n=8; tumor infiltrates: n=7). D-F/ $\gamma\delta$ T cell-triggered pDCs' features were depicted in the presence of a mixture of anti-41BB, -OX40L, -TIM3, -LAG3 Abs and rhIFN γ and rhTNF α . pDCs were depicted as CD45 $^{+}$ HLA-DR $^{+}$ BDCA4 $^{+}$. D/ The activation status of pDCs was evaluated by assessing the expression of CD40 and CD80

expression (HDs: n=8-9; patient blood: n=8; tumor infiltrates: n=7). E/ The functionality of pDCs was depicted by measuring the expression of TRAIL (E) and the secretion of grB in the culture supernatants (F) (HDs: n=9; patient blood: n=8; tumor infiltrates: n=7). Bars represents mean±SEM. P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (stars: intragroup comparisons between the corresponding reversion and control conditions; lines: intragroup comparisons between the stimulated and unstimulated condition within the same subgroup) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons), all with Bonferroni correction; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 6: BTN3A is expressed at higher levels on both circulating and tumor-infiltrating pDCs and $\gamma\delta$ T cells of melanoma patients compared to HDs

The basal expression of BTN3A was evaluated by flow cytometry and its three isoforms using RT-qPCR on pDCs and $\gamma\delta$ T cells within PBMC of HDs, and PBMC and tumor infiltrates of melanoma patients. A/ Representative dot plots of BTN3A basal expression on pDCs and $\gamma\delta$ T cells of HDs, patients' blood and tumor infiltrate. Dot plots are pre-gated on HLA-DR+ BDCA4+ and CD3+ panTCR $\gamma\delta$ + respectively. B/ Basal expression of BTN3A by pDCs (HDs: n=12; patient blood: n=16; tumor infiltrates: n=15). B/ Basal expression of BTN3A by $\gamma\delta$ T cells (including δ 2+ and δ 2- T-cell subsets) (HD: n=11; patient blood: n=14; tumor infiltrates: n=12). D/ Relative expression of BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3 (quantification / GAPDH) by immune cells within PBMC of HDs, PBMC and tumor infiltrates of patients (n=2 samples / group). E/ RT-qPCR amplification products.

Figure 7: The functionality of BTN3A on pDCs and $\gamma\delta$ T cells is altered in melanoma patients

PBMCs from HD' (circles) or patient' blood (squares) and tumor infiltrates (triangles) were

incubated with anti-BTN3A agonist antibody (clone 20.1) or control isotype, in presence or not of HMB-PP or zoledronate (Zol) for 20h. The phenotypic and functional features of pDCs and $\gamma\delta$ T cells were assessed by flow cytometry. A/ Comparative expression of CD69 (MFI) by $\gamma\delta$ T cells (left panels) and $\delta 2^+$ subset (right panels) (HDs: n=7-9; patient blood: n=7-8; tumor infiltrates: n=5). B/ Comparative expression of CD40 (MFI) by pDCs (HDs: n=6-9; patient blood: n=6-8; tumor infiltrates: n=5-7). P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test with Bonferroni correction (comparison within a group between the stimulated conditions and the control isotype (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)).

Figure 8: Graphical summary

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1: Flow cytometry gating strategy

pDCs purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with $\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood in absence (white symbols) or presence (grey symbols) of TLR7L (CL097), TLR9L (CpGA) or zoledronate (Zol) alone or in combination. The phenotypic features of $\gamma\delta$ T cells were depicted by flow cytometry. A/ $\gamma\delta$ T cells were defined using CD45, CD3, pan $\gamma\delta$ TCR and $\delta 2$ markers. Whole $\gamma\delta$ T cells are depicted as the sum of $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ gates. B/ CD69 and CD25 expressions were further analyzed on whole $\gamma\delta$ T cells. One representative sample per group is shown. C/ Dot plots depicting the expression of PD1, LAG3 and 4-1BB on $\gamma\delta$ T cells. One representative sample per group is shown.

Supplementary Figure 2: Circulating and tumor-infiltrating pDCs from melanoma patients are impaired in activating $\gamma\delta$ T cells as well as $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ subsets

pDCs purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with $\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood in absence (white symbols) or presence (grey symbols) of TLR7L (CL097), TLR9L (CpGA) or zoledronate (Zol) alone or in combination. The phenotypic features of $\gamma\delta$ T cells including $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ subsets were depicted by flow cytometry. A/ Activation status of $\gamma\delta$ T cells assessed by measuring CD69 (MFI), CD25 (MFI) and CD40 (%) expression (HDs: n=14-27; patient blood: n=4-19; tumor infiltrates: n=9-18). B/ Activation status of $\delta 2^+$ (upper panels) and $\delta 2^-$ (lower panels) T-cell subsets evaluated by assessing CD69, CD25 and CD40 expression (HDs: n=13-26; patient blood: n=4-16; tumor infiltrates: n=9-18). C/ Expression of selected immune checkpoints by $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ T-cell subsets: PD1, LAG3, 41BB and TIM3 (HDs:

n=11; patient blood: n=7-8; tumor infiltrates: n=3-6). D/ Expression of selected KIR and NCR by $\gamma\delta$ T cells: NKG2D and NKp30 (HDs: n=11; patient blood: n=7-8; tumor infiltrates: n=3-6). P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (stars, intragroup comparisons compared to the unstimulated condition) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons) with Bonferroni correction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. E/ Heat map based on the expression of immune checkpoints by $\gamma\delta$ T cells after 20h stimulation or not with TLR-L (CLO97 (left) or CpGA (right)) in each sample type (HD blood, patient blood and tumor infiltrate). F/ Heat map based on the expression of KIR and NCR by $\gamma\delta$ T cells after 20h stimulation or not with TLR-L (CLO97 (left) or CpGA (right)) in each sample type (HD blood, patient blood and tumor infiltrate). G/ Comparative PFS (from sampling time, left panel or diagnosis time, right panel) of patients whose circulating pDCs induced low or high TIM3 or NKp44 by $\gamma\delta$ T cells in absence of stimulation. Groups were separated using the median percentage of TIM3+ (7.3%) or NKp44+ (6.2%) $\gamma\delta$ T cells (n=3-4 patients/group). H/ Comparative PFS (from sampling time) of patients whose tumor-infiltrating pDCs induced low or high TIM3-, LAG3-, or NKp44-expressing $\gamma\delta$ T cells upon CpGA (TIM3) or CL097 (LAG3, NKp44) stimulation. Groups were separated using the median percentage of respectively TIM3+ (7.07%), LAG3+ (3.42%), or NKp44+ (5.11%) $\gamma\delta$ T cells (n=3-4 patients/group). Comparison using Log-rank test.

Supplementary Figure 3: Circulating and tumor-infiltrating pDCs from melanoma patients have a defective ability to trigger $\gamma\delta$ T cells' functional activity that impacts clinical outcomes

pDCs purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with $\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood in absence (white symbols) or presence (grey symbols) of TLR7L (CL097), TLR9L (CpGA) or zoledronate

(Zol) alone or in combination. The functional features of $\gamma\delta$ T cells including $\delta 2^+$ and $\delta 2^-$ subsets were depicted by flow cytometry. A/ IL4, IL10, IL13, IL17, TNF α and TGF β cytokine secretions were quantified in the culture supernatants by CBA (HDs: n=15-36; patient blood: n=5-27; tumor infiltrates: n=14-25). B-C/ The cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells was evaluated through CD107 surface expression upon subsequent coculture with melanoma tumor cells (COLO829 and A375). B/ Representative dot plots of CD107 expression by $\gamma\delta$ T cells in each condition pre-gated on $\gamma\delta$ T cells. C/ Comparative CD107 expression on $\gamma\delta$ T cells upon coculture with A375 target cells. D/ Comparative CD107 expression on $\delta 2^+$ (left panels) and $\delta 2^-$ (right panels) T-cell subsets upon coculture with COLO829 (upper panels) or A375 (lower panels) target cells (HDs: n=8-21; patient blood: n=4-15; tumor infiltrates: n=10-19). P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (stars, intragroup comparisons compared to the unstimulated condition) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons) with Bonferroni correction; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. E/ Comparative PFS (from sampling time, left panel or diagnosis time, right panel) of patients whose tumor-infiltrating pDCs induced low or high secretion of TNF α by $\gamma\delta$ T cells in presence of Zol and/or CL097. Groups were separated using the median value of TNF α in each condition (225,7 pg/ml or 2440 pg/ml respectively) (n=7-8 or 5-6 patients/group respectively). Comparison using Log-rank test. F/ Comparative PFS or OS (from diagnosis or sampling time) of patients whose tumor-infiltrating pDCs induced low or high grB secretion by $\gamma\delta$ T cells or CD107 expression by $\delta 2^+$ T cells in the presence of Zol or Zol+CpGA. Groups were separated using the median value of grB secretion (5227 pg/ml) or CD107 expression (26.1%) (n=6-7 or 5-6 patients/group respectively). Comparison using Log-rank test.

Supplementary Figure 4 : Melanoma patients displayed a differential profile of the features of pDCs/ $\gamma\delta$ T cells cross-talk compared to HDs

Heat maps based on the expression of activation markers (CD40, CD69, CD25), secretion of cytokines (IFN γ , TNF α , IL4, IL10, IL13, IL17, TGF β) and cytotoxic activity (CD107 expression, grB and perforin secretions) of $\gamma\delta$ T cells after 20h stimulation or not with TLR-L (CLO97, upper panel or CpGA, lower panel) in each sample type (HD blood, patient blood and tumor infiltrate).

Supplementary Figure 5: Circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells from melanoma patients modulate the features of pDCs

$\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood (circles), patient' blood (squares) or tumor infiltrates (triangles) were cocultured with pDCs purified from HD' blood in absence (white symbols) or presence of the phosphoantigens IPP (light grey symbols) or HMB-PP (dark grey symbols). The phenotypic and functional features of pDCs were depicted by flow cytometry. A/ pDC gating strategy. pDCs were defined using CD45, HLA-DR and BDCA4 markers. B/ CD40 and CD80 expressions were further analyzed on pDCs. One representative sample per group is shown. C/ Comparative expression of CD40, CD80, CD86 (%) on pDCs in the different conditions (HDs: n=11-18; patient blood: n=6-8; tumor infiltrates: n=5-7). D/ Comparative OS from diagnosis time (left panel) and sampling time (right panel) of patients whose tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells triggered low or high percentage of CD86+ pDCs in the presence of HMB-PP. Groups were separated using the median percentage of CD86+ pDCs 71.4% (n=3 patients/group). Comparison using Log-rank test. E/ Dot plots depicting the expression of immune checkpoints on pDCs: PDL1, LAG3, 4-1BBL, GITR-L, OX40L, ICOSL. One representative sample per group is shown. F/ Comparative expression of PDL2, GITR and OX40 by pDCs in the different conditions (HDs: n=8-9; patient blood: n=4-8; tumor infiltrates: n=4-6). G/ Heat map based on the expression of immune checkpoints by pDCs after 20h stimulation or not with HMB-PP in each sample type (HD blood, patient blood and

tumor infiltrate). H/ Principal component analysis (PCA) based on immune checkpoints expression by pDCs (left panel) including graph of variables (right panel).

Supplementary Figure 6: The inter-relations between immune checkpoint-expressing pDCs upon co-culture with $\gamma\delta$ T cells were perturbed in the context of melanoma

$\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood, patient' blood or tumor infiltrates were cocultured with pDCs purified from HD' blood in absence or presence of the phosphoantigens IPP or HMB-PP. The expression of immune checkpoints by pDCs were depicted by flow cytometry and correlations between the different markers were performed. Correlation matrix between proportions of immune-checkpoint expressing pDCs using $\gamma\delta$ T cells purified from HD blood, patient blood, and tumor infiltrate. Spearman correlations with significant P-values (< 0.05) after Bonferroni–Holm's correction are circled in black. The table beside the matrix summarized the spearman correlations showing r factors with their significant P-values (< 0.05) after Bonferroni–Holm's.

Supplementary Figure 7: The ability of $\gamma\delta$ T cells to elicit TRAIL expression by pDCs was totally abrogated in melanoma patients

$\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood, patient' blood or tumor infiltrates were cocultured with pDCs purified from HD' blood in absence or presence of the phosphoantigens or HMB-PP. Dot plots illustrating the expression of TRAIL by pDCs (pre-gated on BDCA4+ pDCs). One representative sample per group is shown.

Supplementary Figure 8: Melanoma patients displayed a differential signature of the features of $\gamma\delta$ T cells/pDCs cross-talk compared to HDs

$\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood, patient' blood or tumor infiltrates were cocultured with

pDCs purified from HD' blood in absence or presence of the phosphoantigens IPP or HMB-PP. The phenotypic and functional features of pDCs were depicted. A/ Heat map based on the expression of activation markers (CD40, CD80, CD86), immune checkpoints (ICOSL, PDL1, PDL2, TIM3, GITRL, 4-1BBL, OX40L), secretion of cytokines (IFN α , IP10, TNF α) and cytotoxic activity (TRAIL expression, grB secretion) of pDCs after 20h stimulation with phosphoantigen-activated $\gamma\delta$ T cells purified from each sample type (HD blood, patient blood and tumor infiltrate). B/ PCA and graph of variables (in HD blood, patient blood and tumor infiltrate) of the phenotypic and functional features of pDCs upon coculture with $\gamma\delta$ T cells in presence of HMB-PP.

Supplementary Figure 9 : The inter-relations between the features of pDCs triggered by $\gamma\delta$ T cells were disturbed in the context of melanoma

$\gamma\delta$ T cells purified from HD' blood, patient' blood or tumor infiltrates were cocultured with pDCs purified from HD' blood in presence of the phosphoantigens HMB-PP. The features of pDCs were depicted and correlations between the different parameters were performed. Correlation matrix between proportions of immune-checkpoint expressing pDCs using $\gamma\delta$ T cells purified from HD blood, patient blood, and tumor infiltrate. Spearman correlations with significant P-values (< 0.05) after Bonferroni–Holm's correction are circled in black.

Supplementary Figure 10 : Reversion of the dysfunctional bidirectional cross-talks between pDCs and $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients by cytokines administration and immune checkpoint blocking

PBMC from HD' blood and patient' blood and tumor immune infiltrates were cultured in presence of blocking antibodies and human recombinant cytokines mixtures (reversion) together or not with TLR7-L (CL097), TLR9-L (CpGA), or zoledronate (Zol). Controls were

performed using mouse IgG and/or goat IgG control isotypes (control). The pDC-triggered $\gamma\delta$ T cells' features were assessed in the presence of a mixture of anti-41BB, -OX40L, -PD1, -ICOSL, -GITR Abs and rhIFN α A, IFN α 2b and rhTNF α . A/ Expression of CD69 (%) by $\gamma\delta$ T cells (HDs: n=9; patient blood: n=8; tumor infiltrates: n=7). B/ The activation status of δ 2+ T cells was evaluated by assessing the expression of CD69 (% MFI) and CD25 (%) (HDs: n=9; patient blood: n=8; tumor infiltrates: n=7). P-values calculated using the Wilcoxon matched pairs test (stars: intragroup comparisons between the corresponding reversion and control conditions; lines: intragroup comparisons between the stimulated and unstimulated condition within the same subgroup) and the Mann-Whitney test (dotted lines, intergroup comparisons), all with Bonferroni correction; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Supplementary Table 1: Clinical features of patients from whom blood samples were used

Supplementary Table 2: Clinical features of patients from whom tumor samples were used

Supplementary Table 3: Primers used to perform qPCR analyses of BTN3A isoforms

Supplementary Table 4: Impact of the clinical features of patients on the ability of their circulating (4A) or tumor-infiltrating (4B) pDCs to trigger $\gamma\delta$ T cells' hallmarks (Log-rank test analysis). Green : positive correlation; red : negative correlation.

Supplementary Table 5: Impact of the clinical features of patients on the ability of their circulating (5A) and tumor-infiltrating (5B) $\gamma\delta$ T cells to trigger pDCs' hallmarks (Log-rank test analysis). Green : positive correlation; red : negative correlation.

Supplementary Table 6: Correlations between BTN3A expression by pDCs and $\gamma\delta$ T cells and the clinical features of the patients. Green : positive correlation; red : negative correlation.

Figure 1

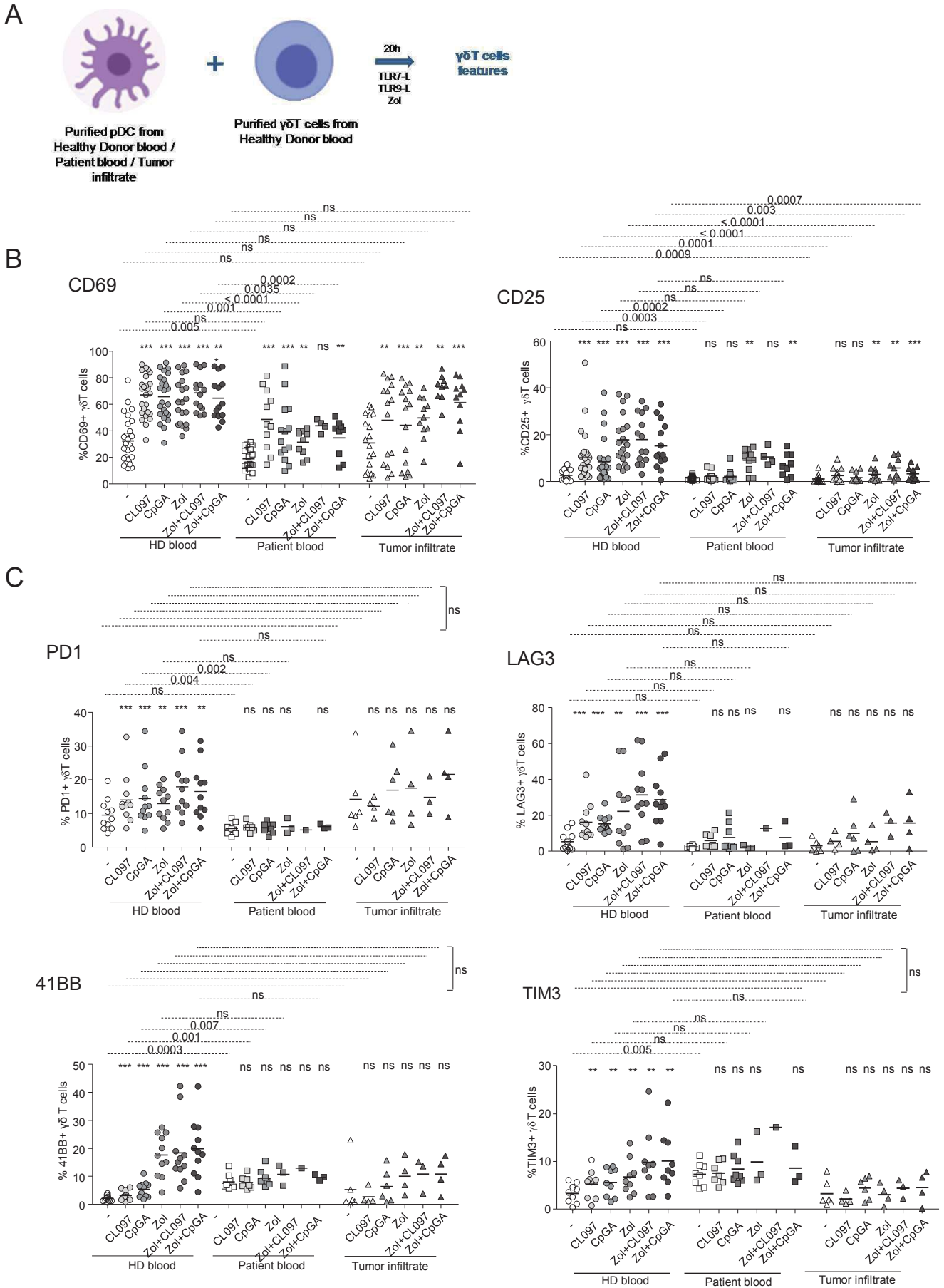
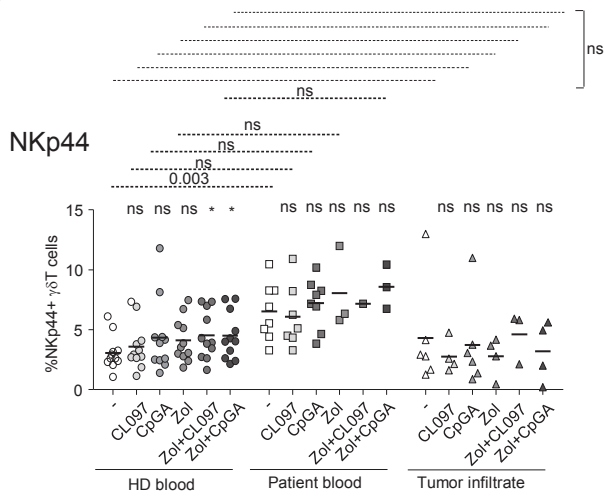


Figure 1 follow

D



E

Tumor Infiltrate

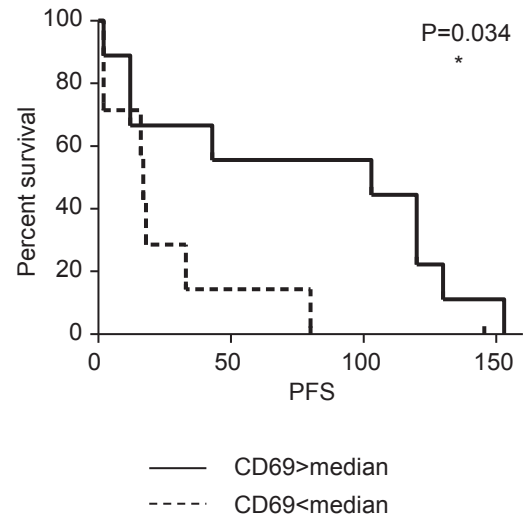


Figure 2

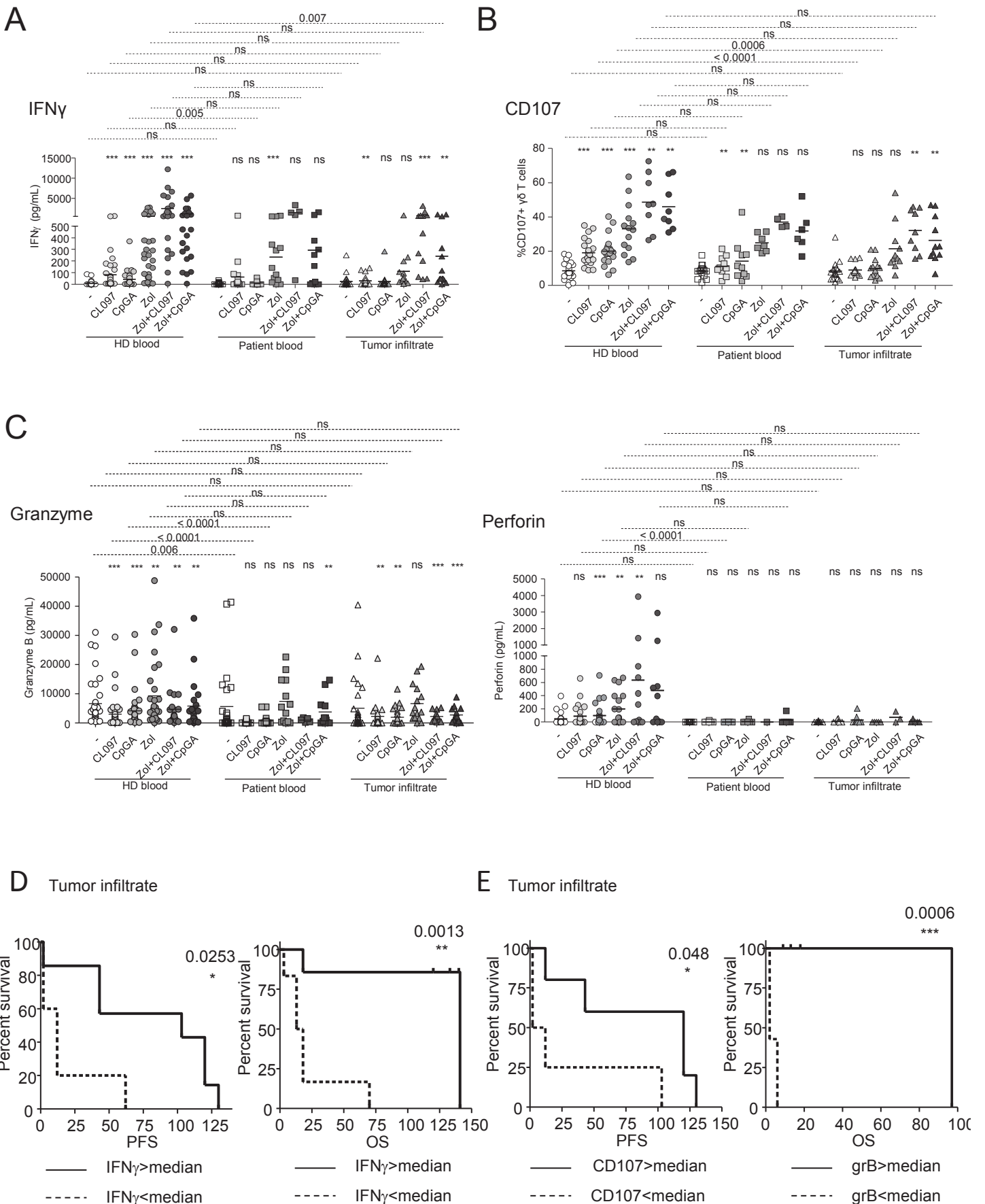


Figure 3

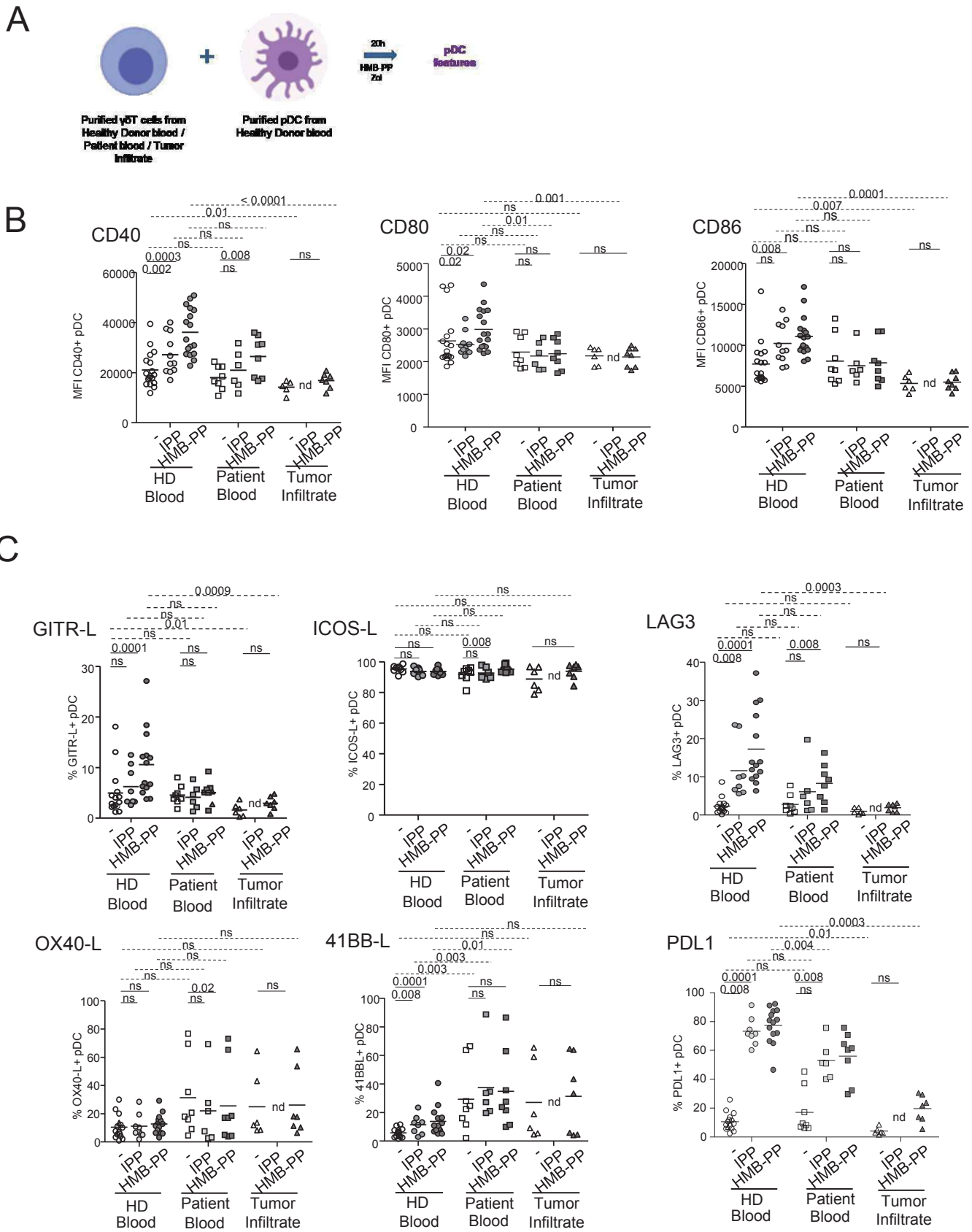


Figure 4

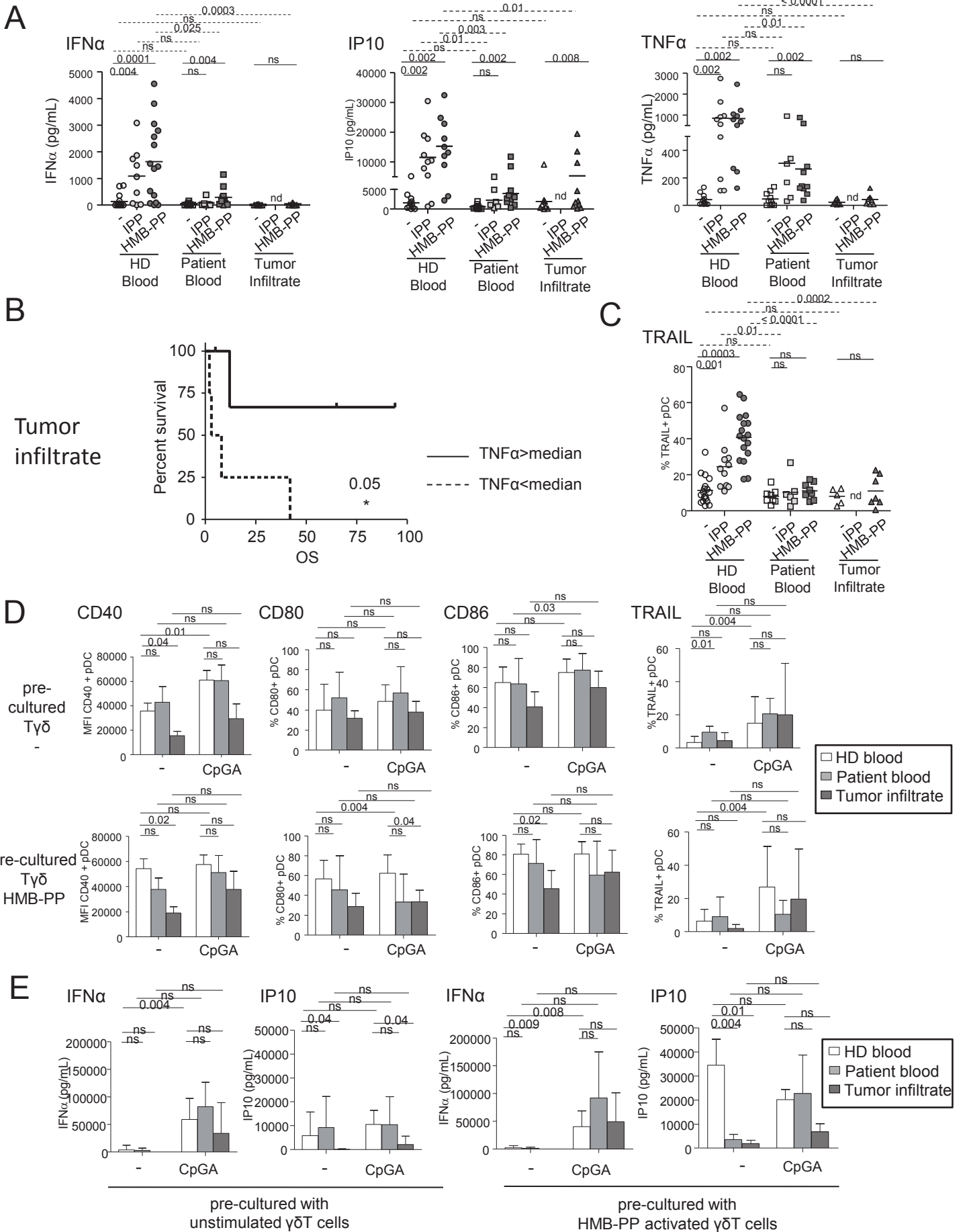
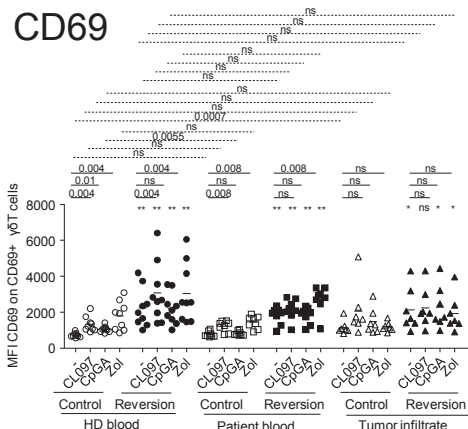


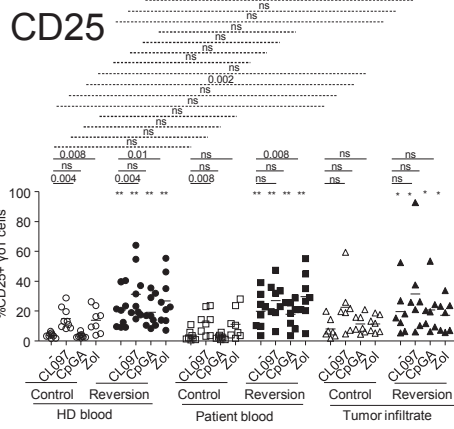
Figure 5

A

CD69

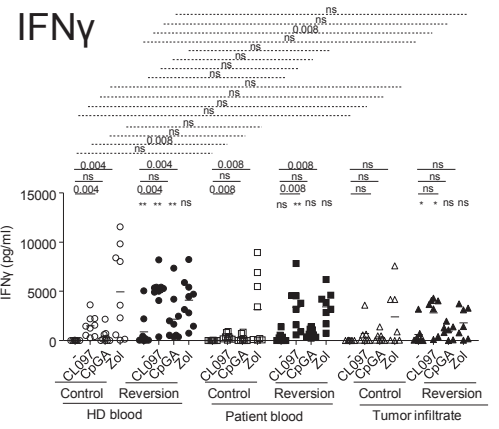


CD25



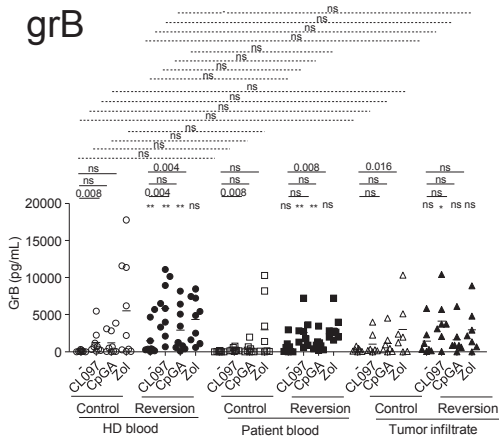
B

IFN γ



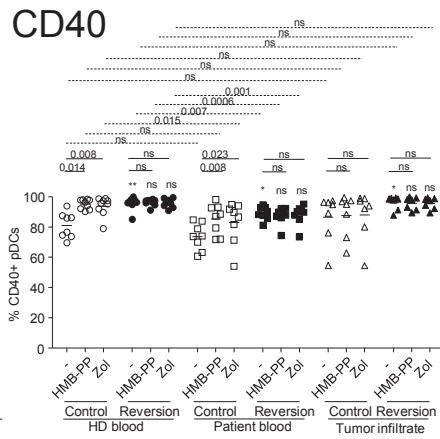
C

GrB

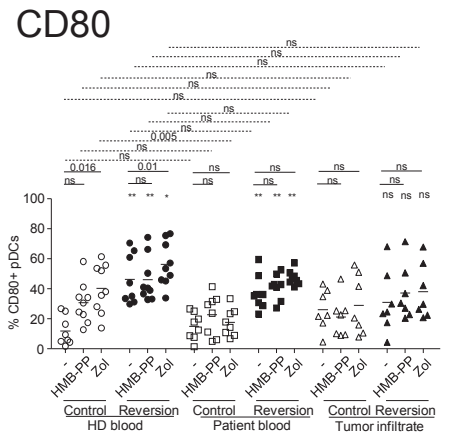


D

CD40

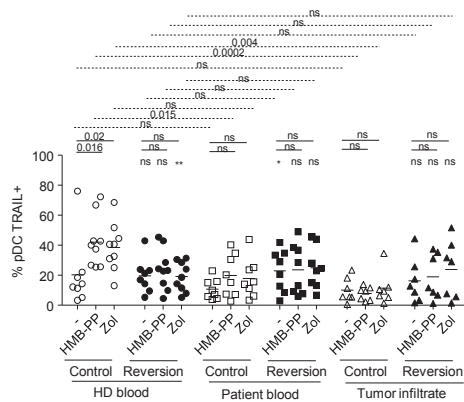


CD80



E

TRAIL



F

GrB

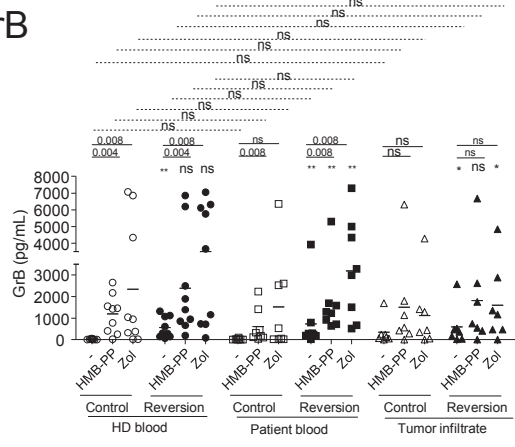
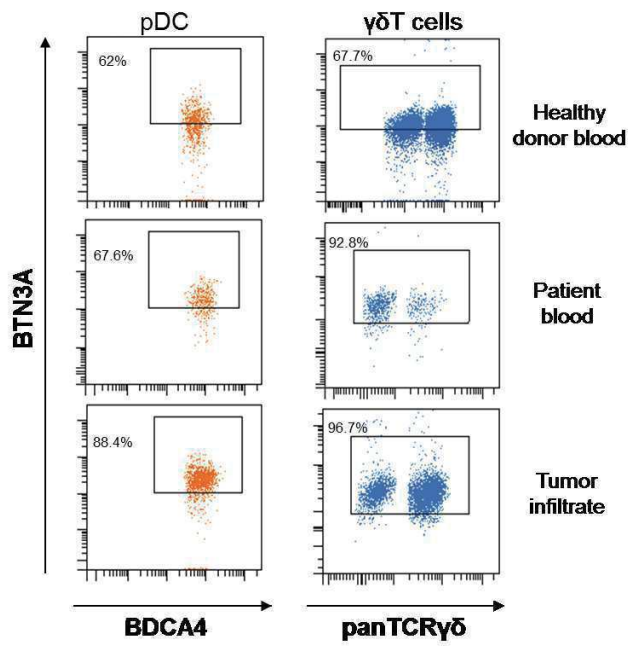
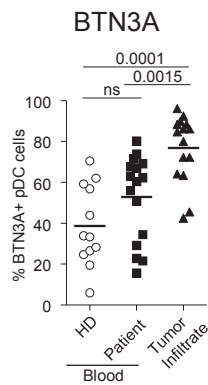


Figure 6

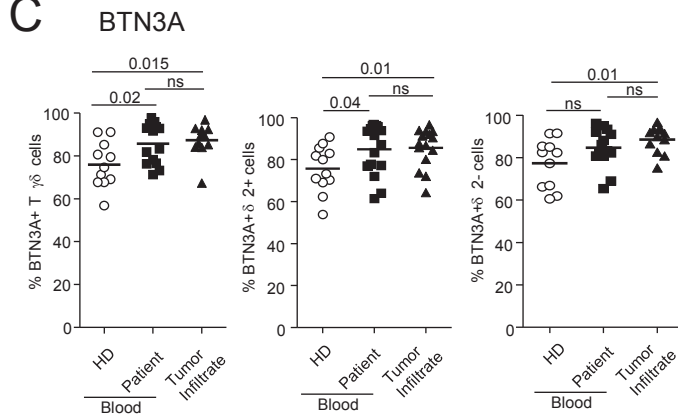
A



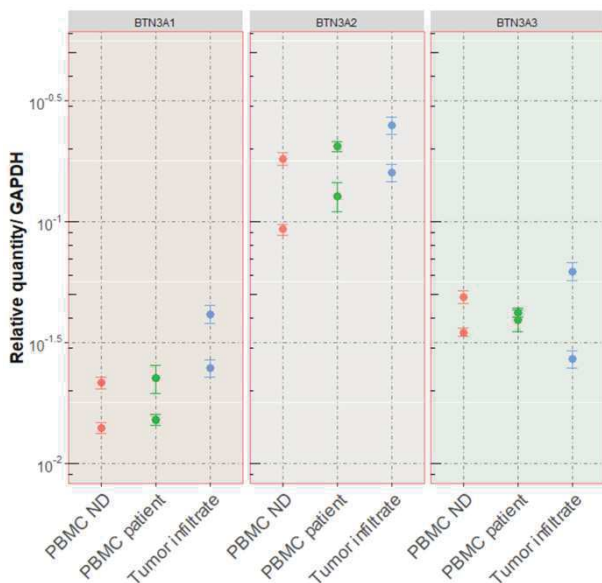
B



C



D



E

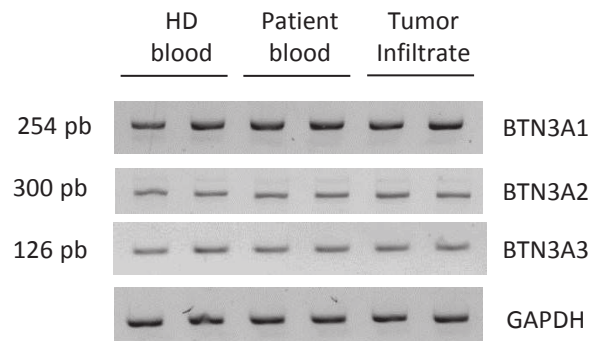


Figure 7

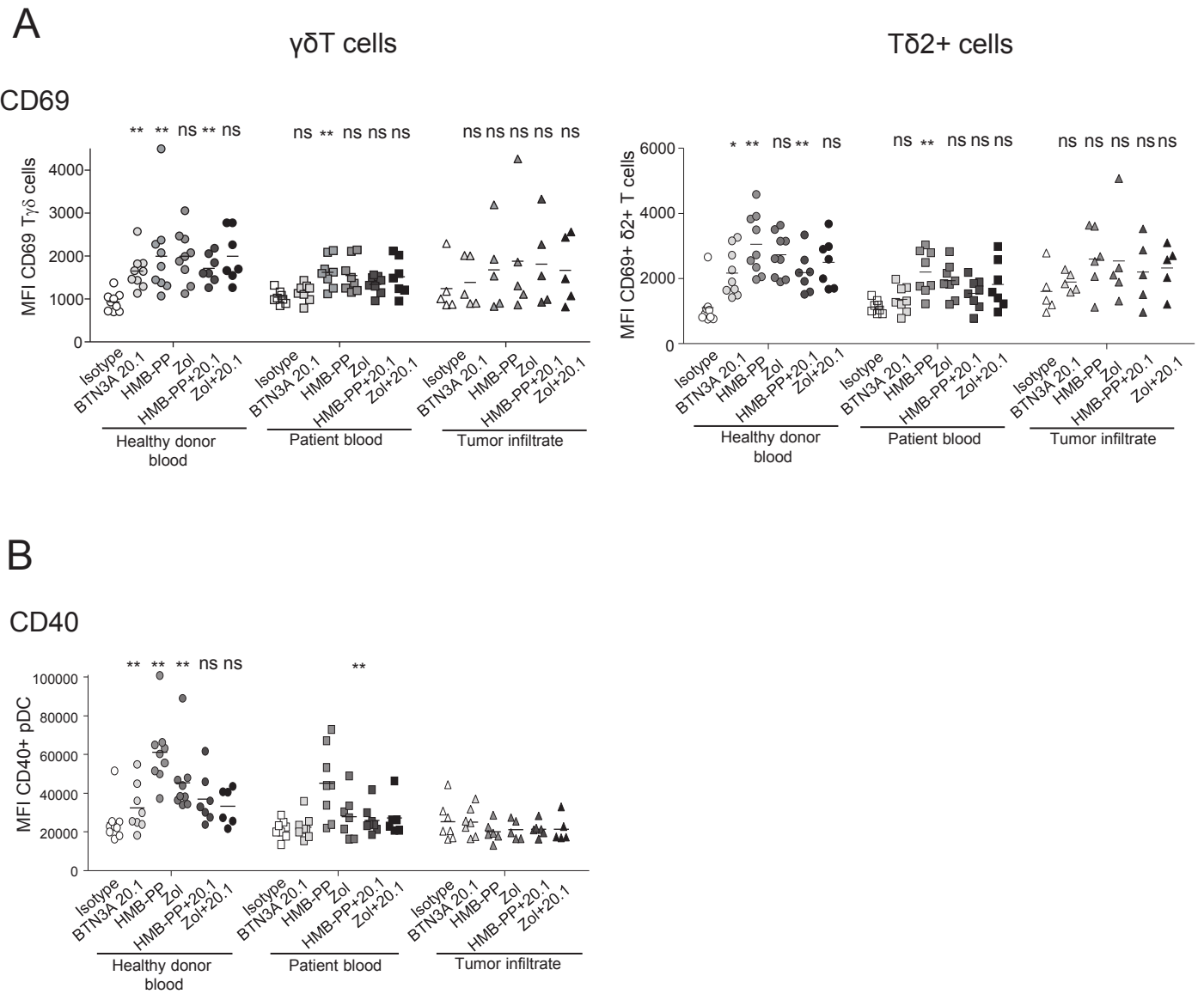
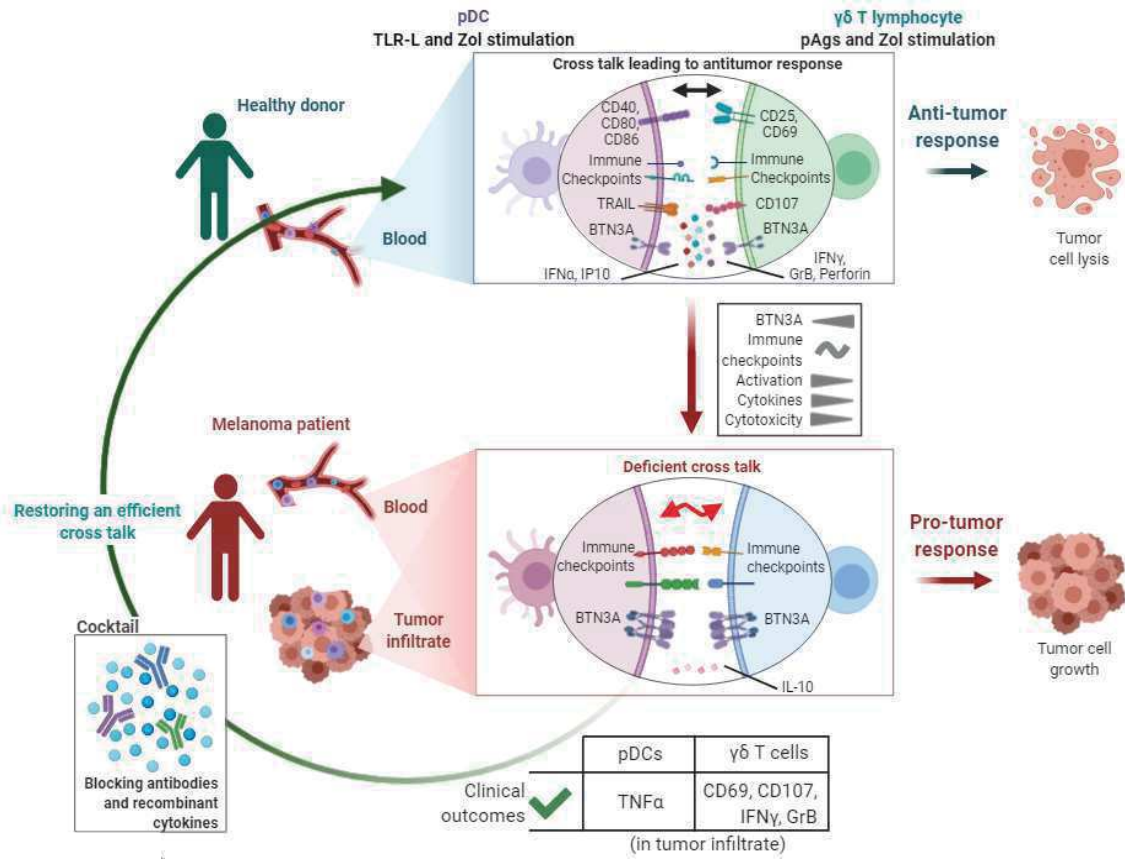
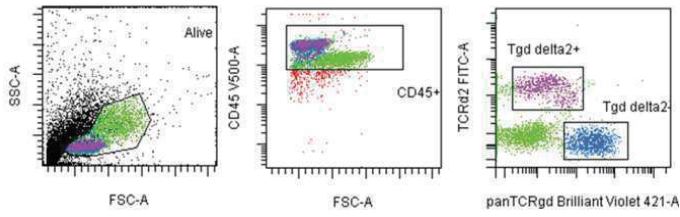


Figure 8

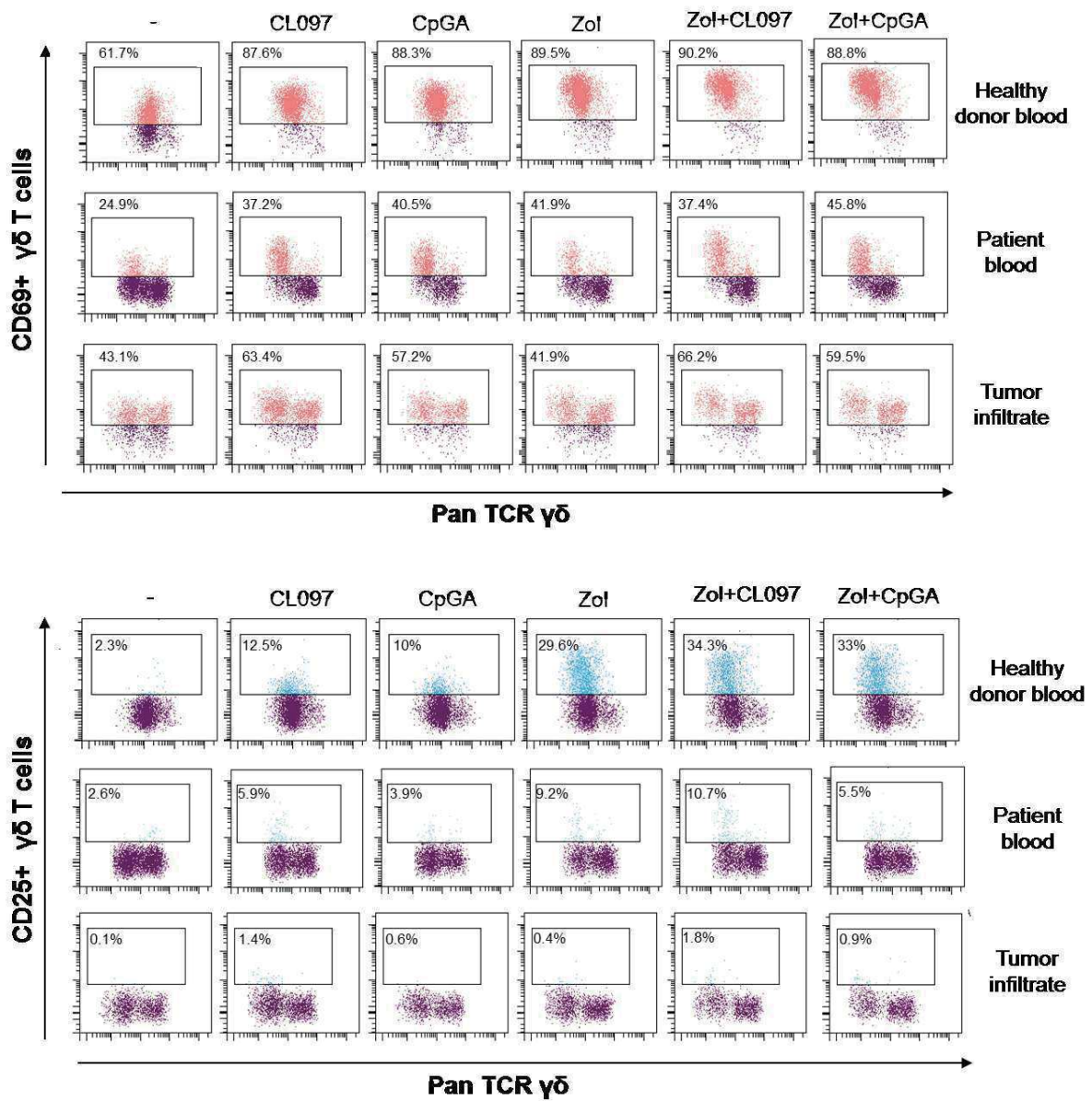


Supplementary Figure 1

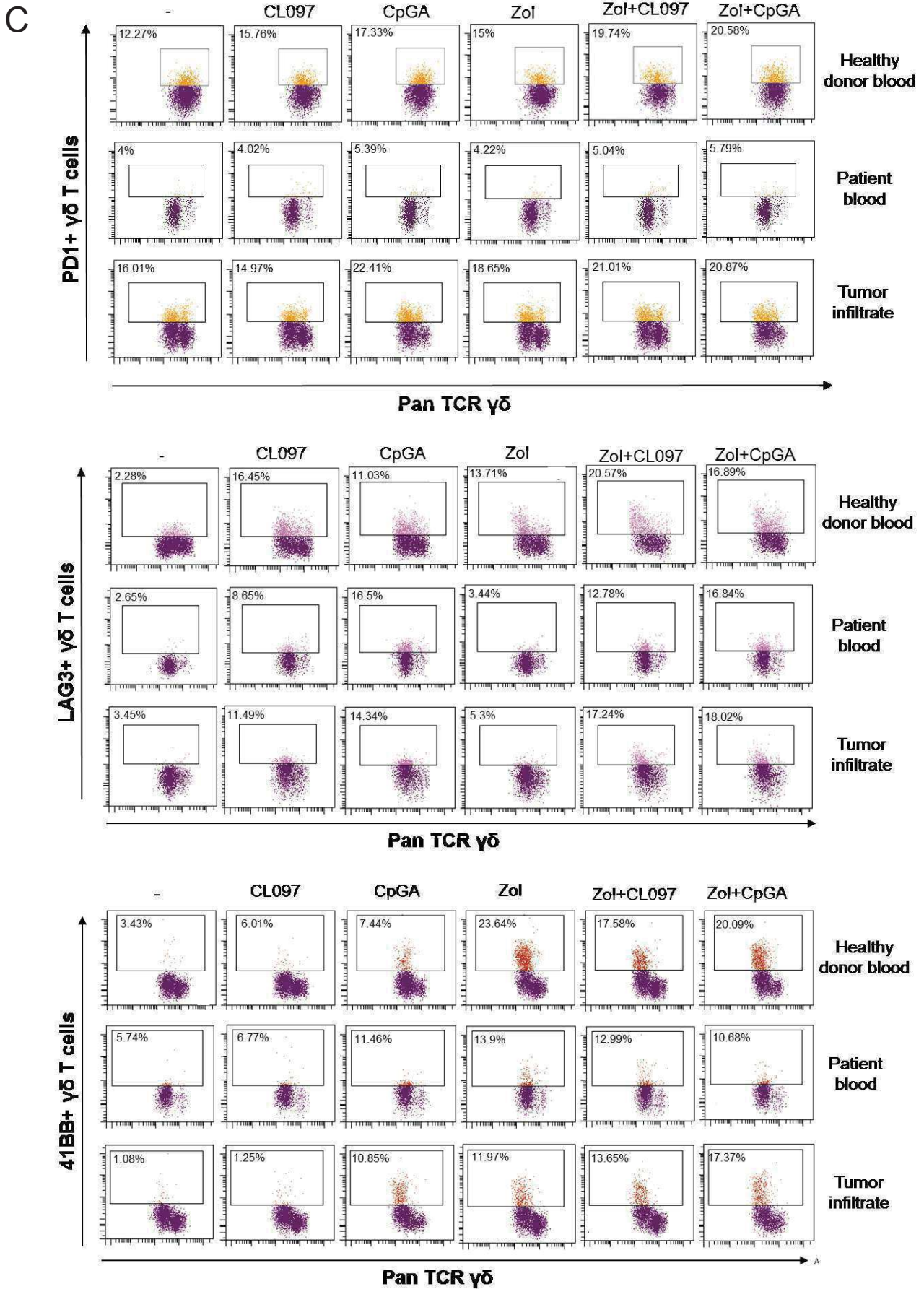
A



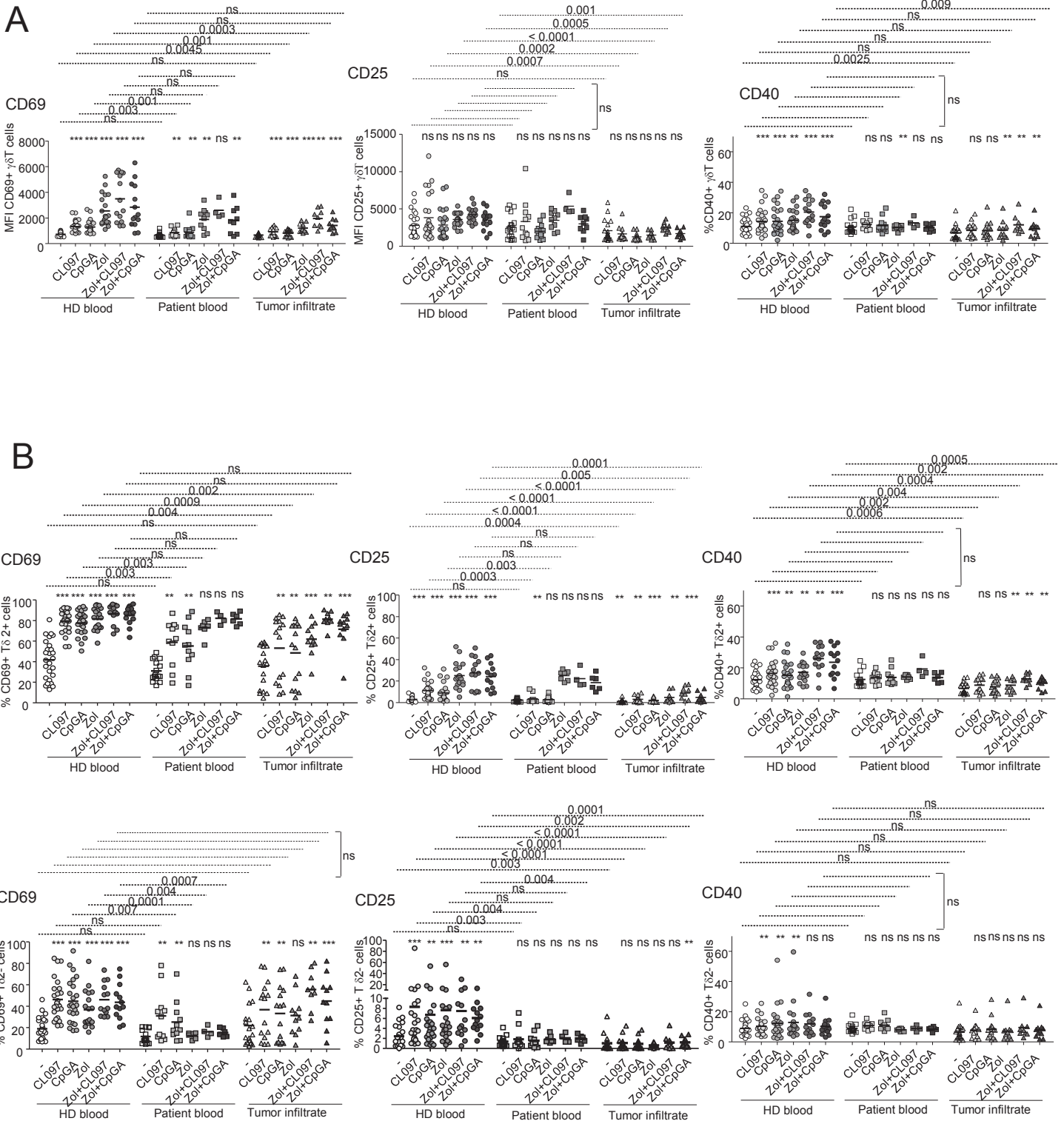
B



Supplementary Figure 1 follow

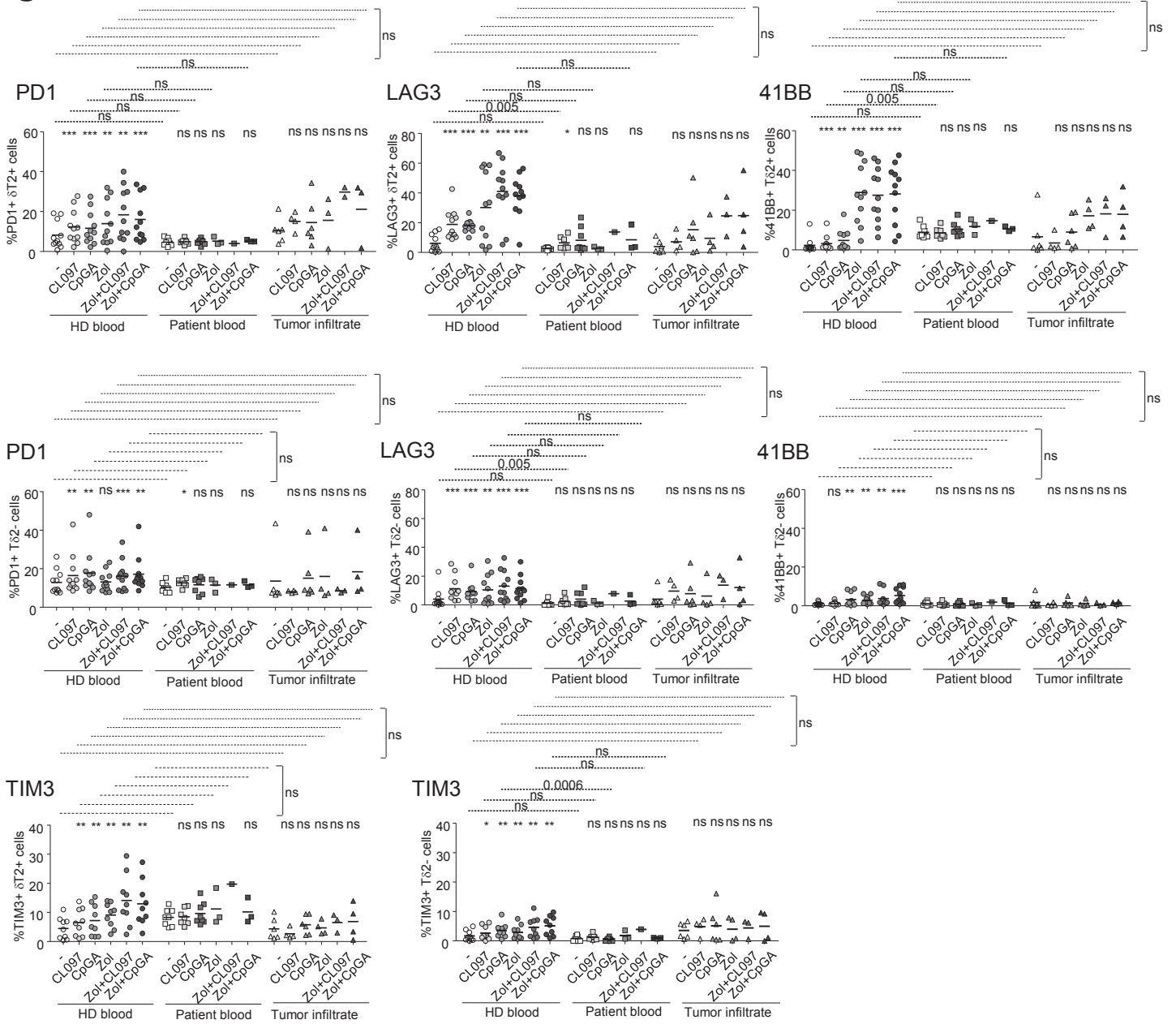


Supplementary Figure 2

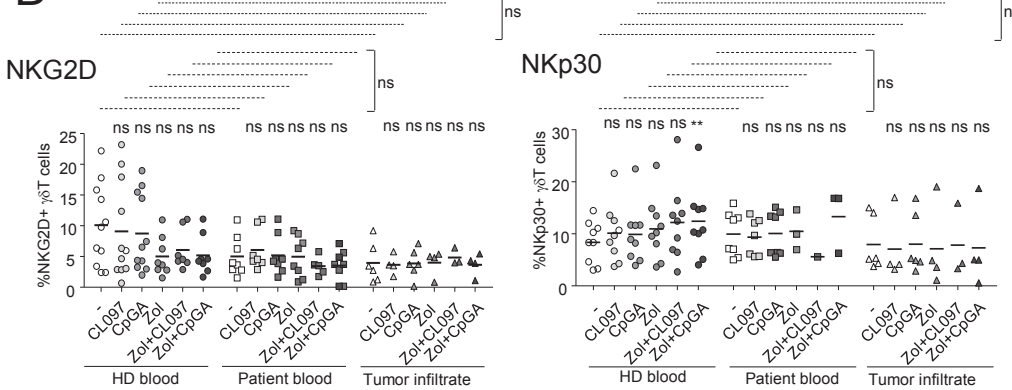


Supplementary Figure 2 follow

C

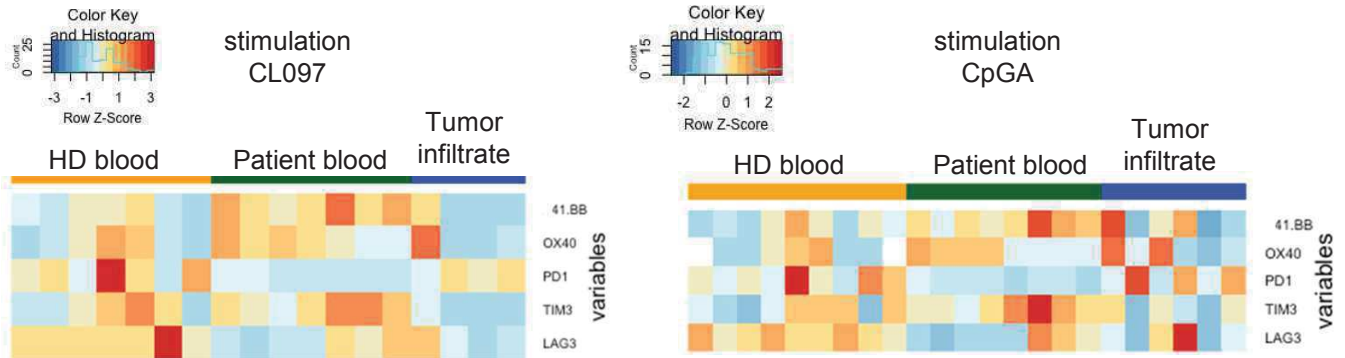


D

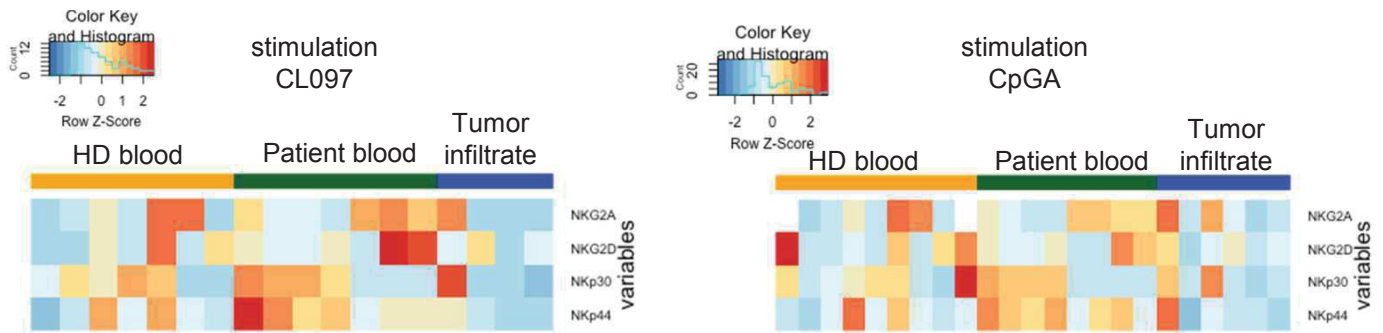


Supplementary Figure 2 follow

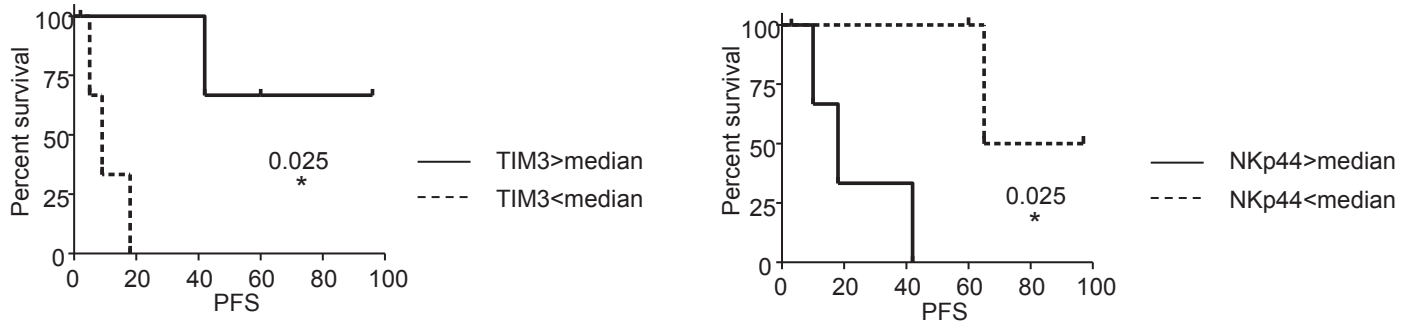
E Heatmap based on immune checkpoint expression



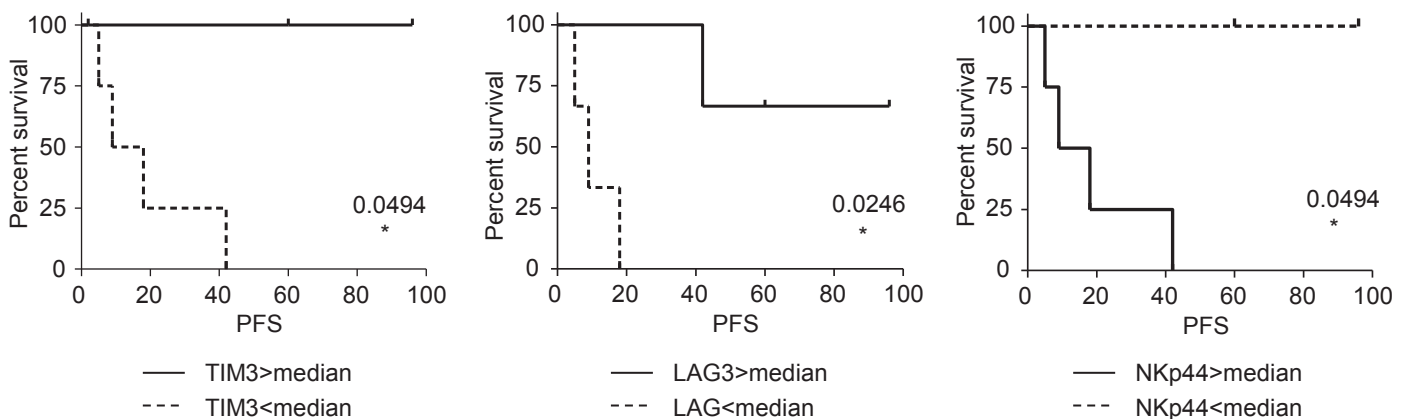
F Heatmap based on KIR/NCR expression



G Blood

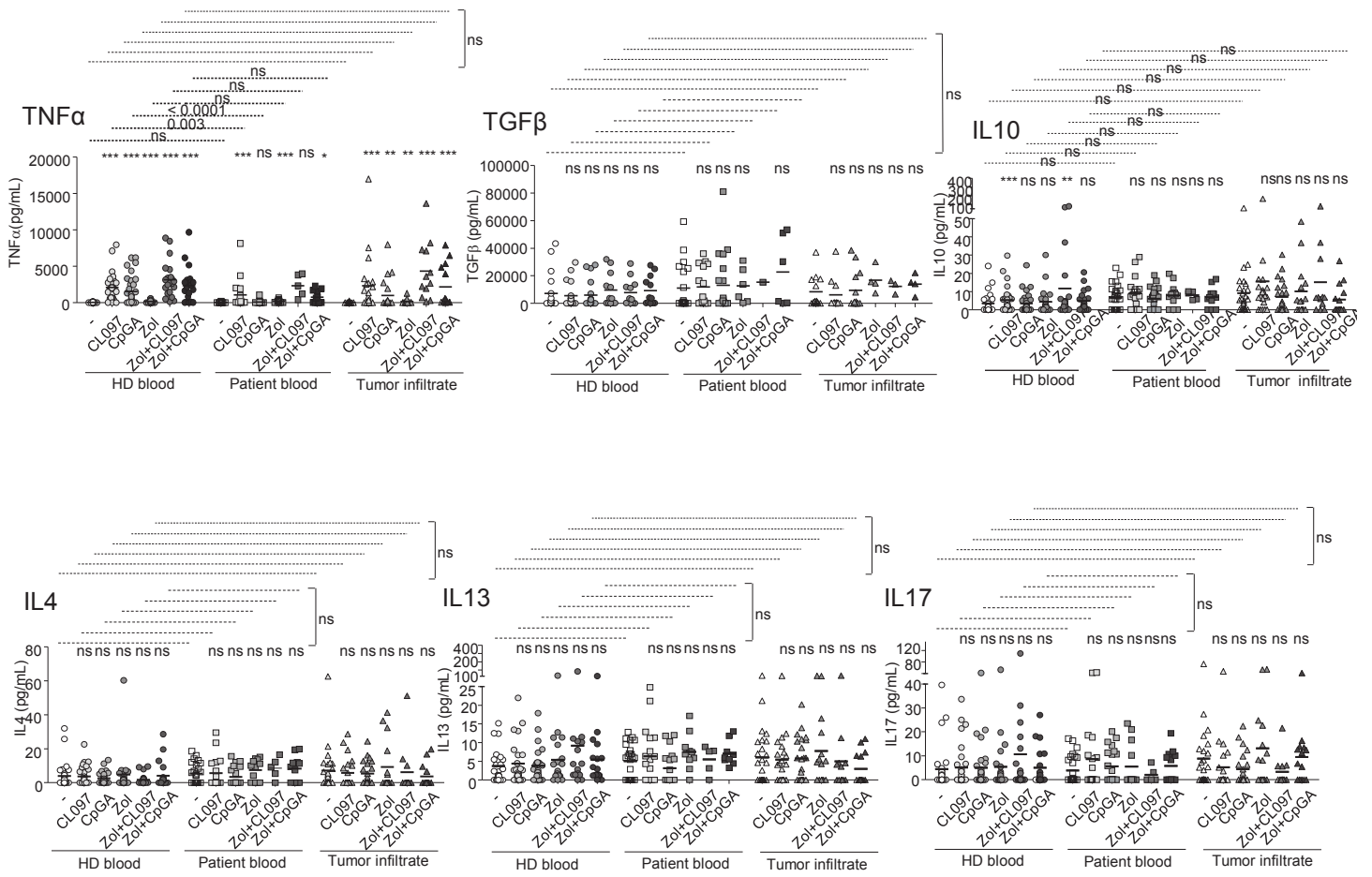


H Tumor infiltrate

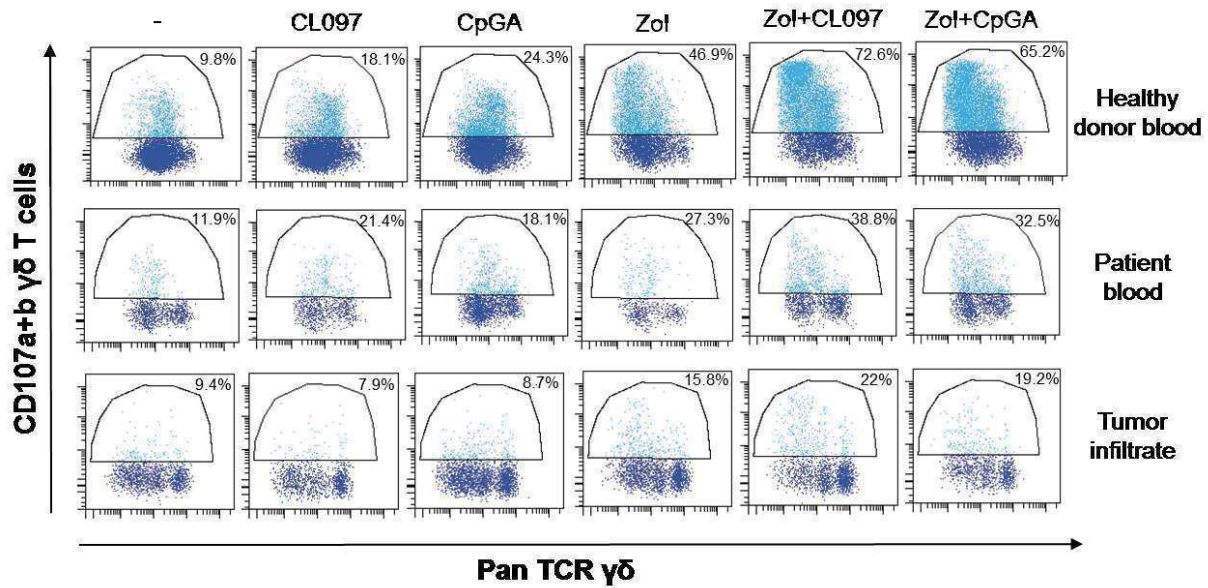


Supplementary Figure 3

A

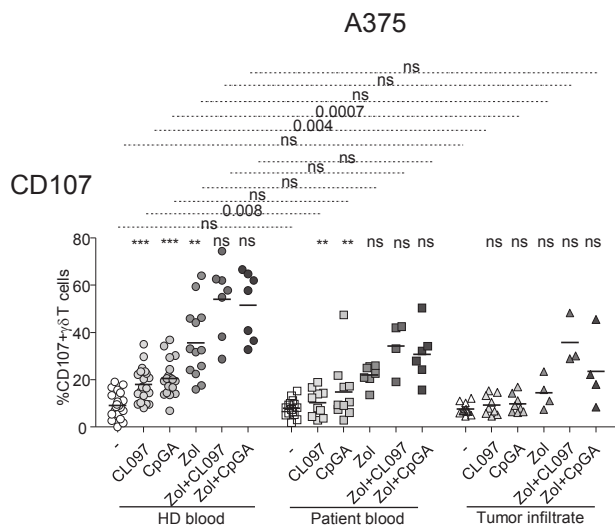


B

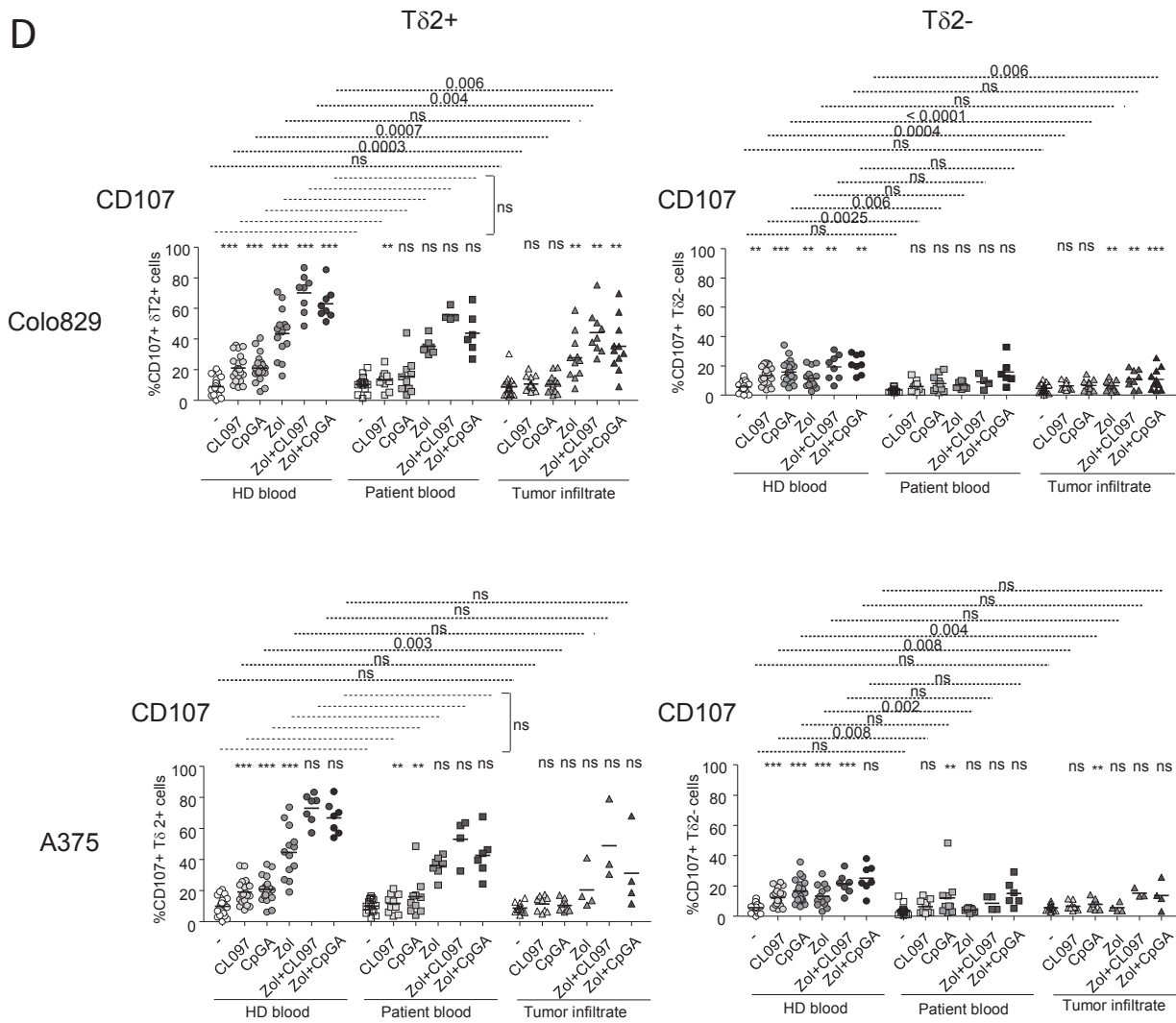


Supplementary Figure 3 follow

C

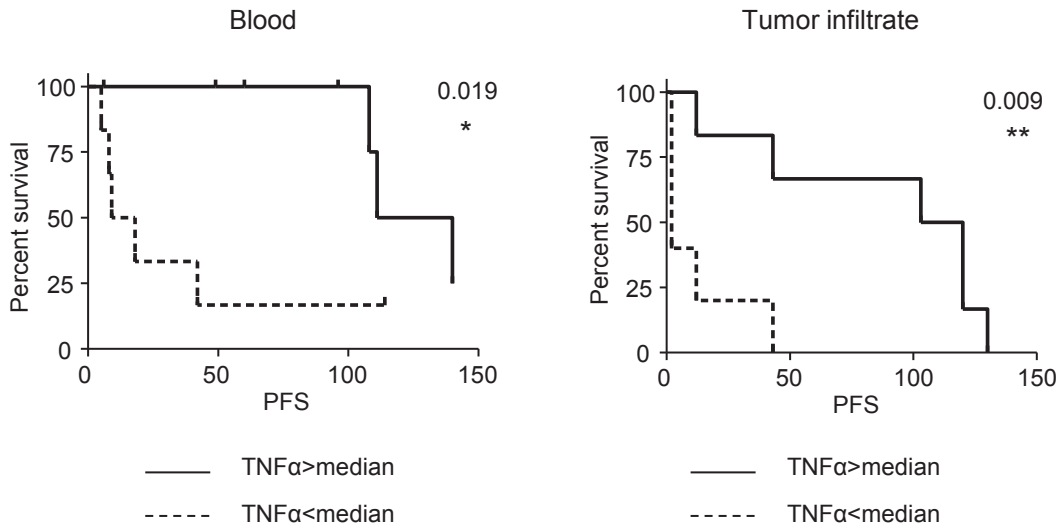


D

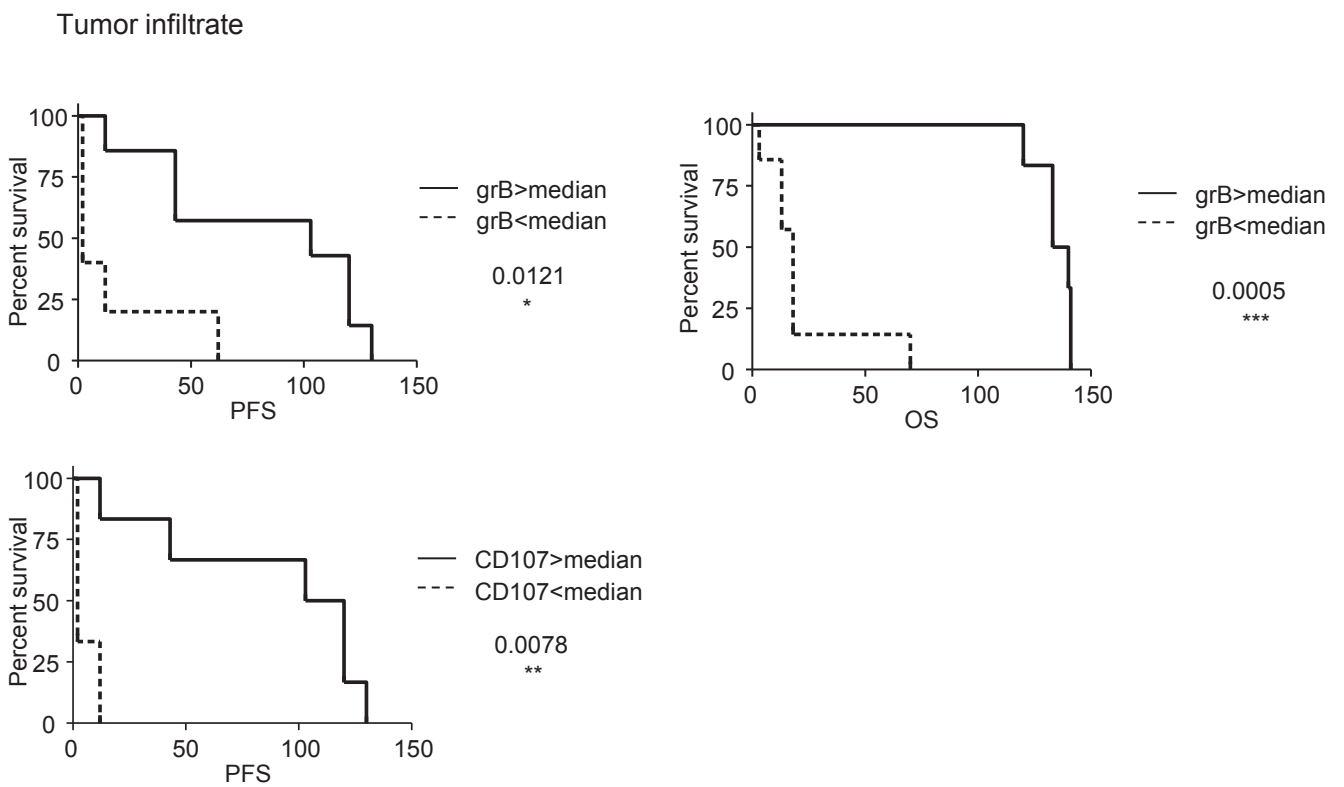


Supplementary Figure 3 follow

E

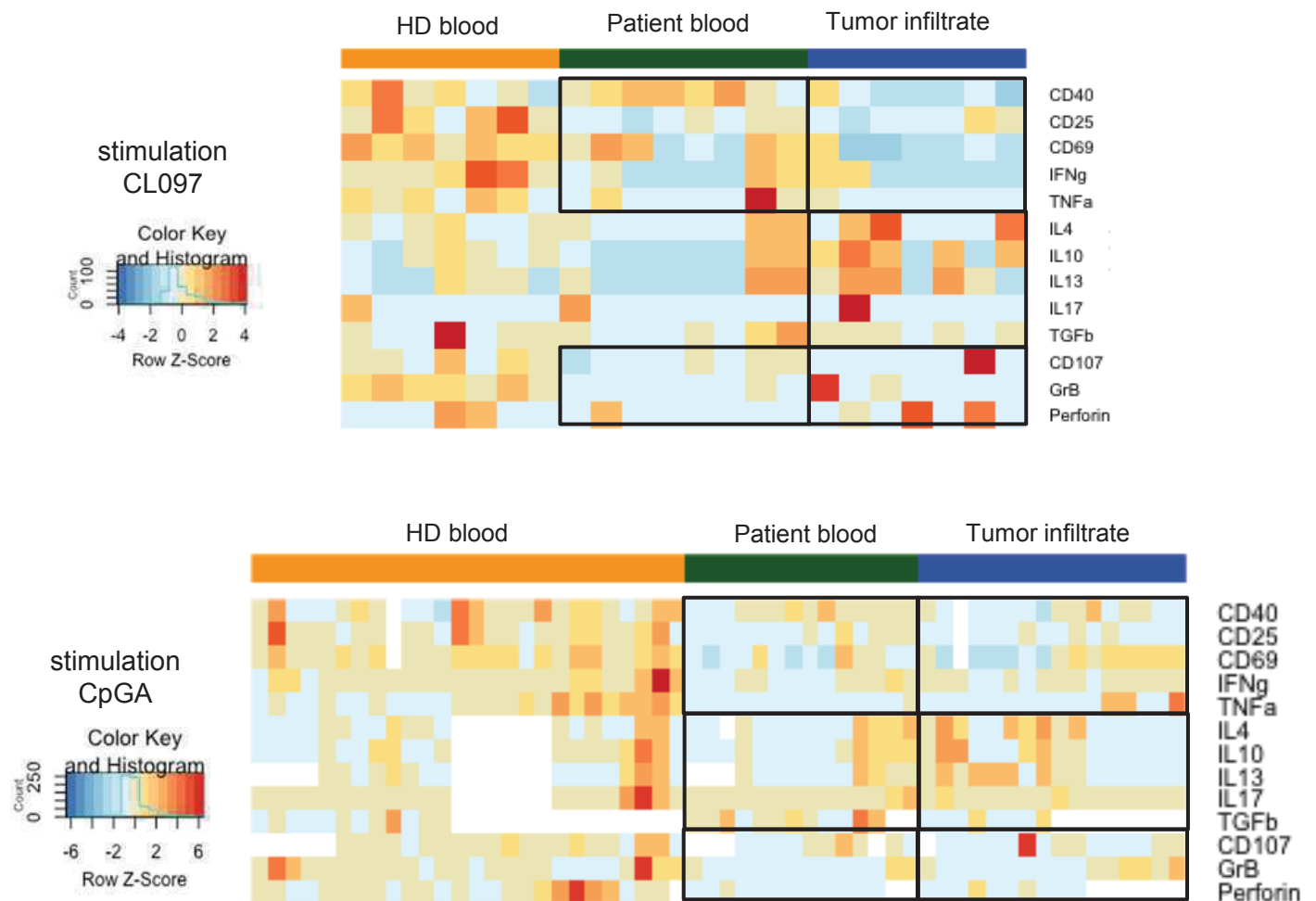


F

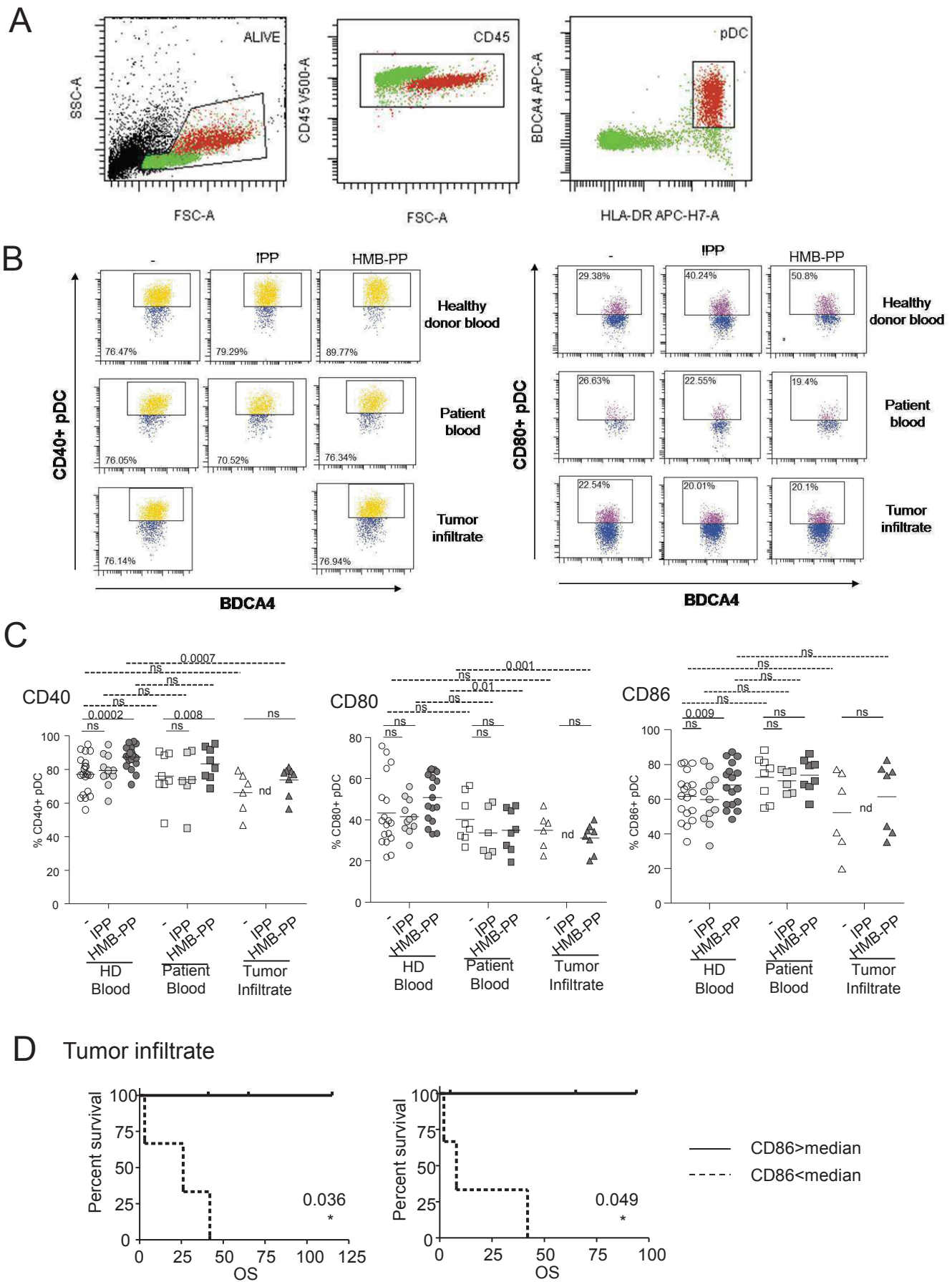


Supplementary Figure 4

Heatmap based on activation status,
cytokine secretion and cytotoxicity

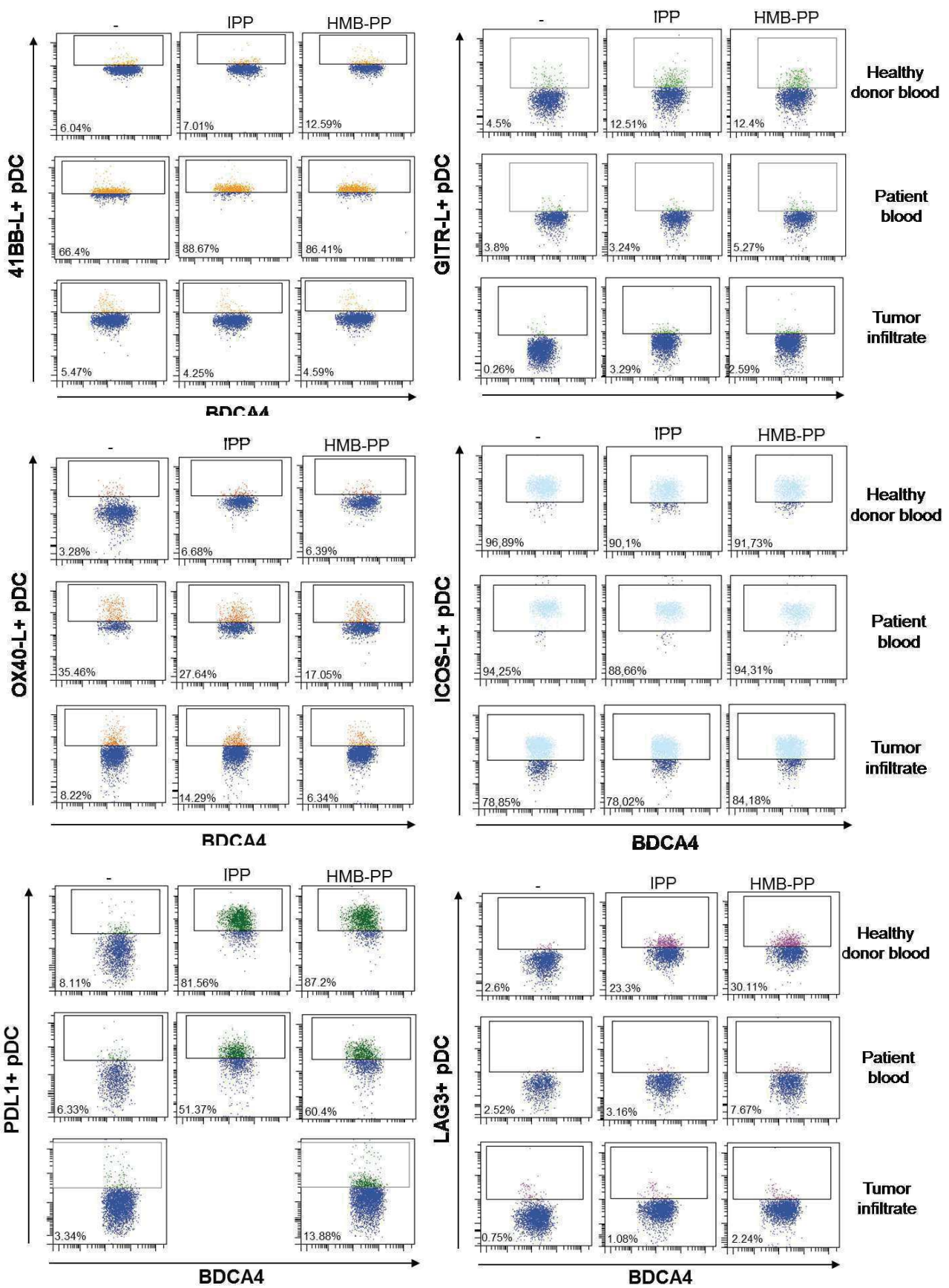


Supplementary Figure 5



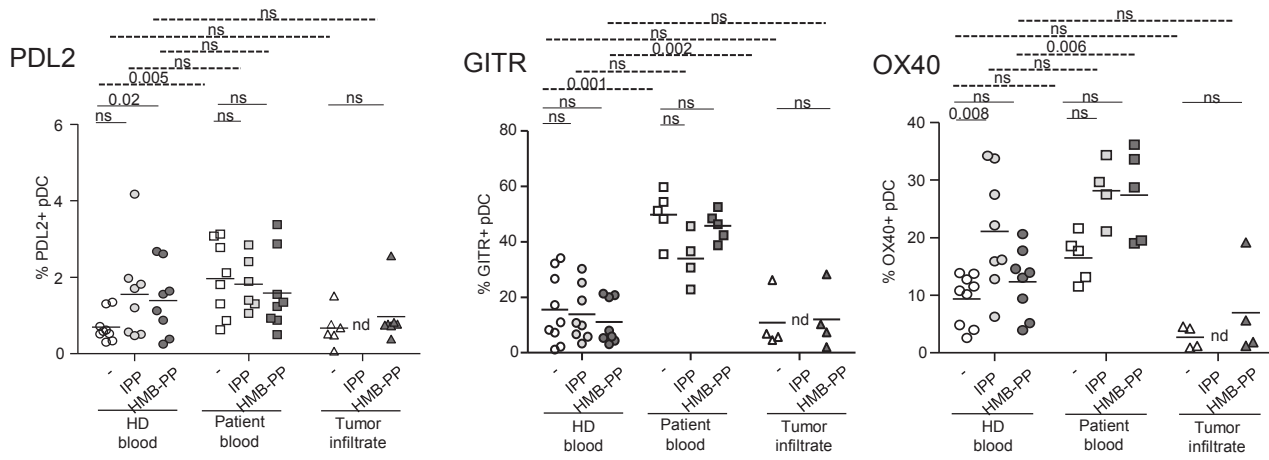
Supplementary Figure 5 follow

E



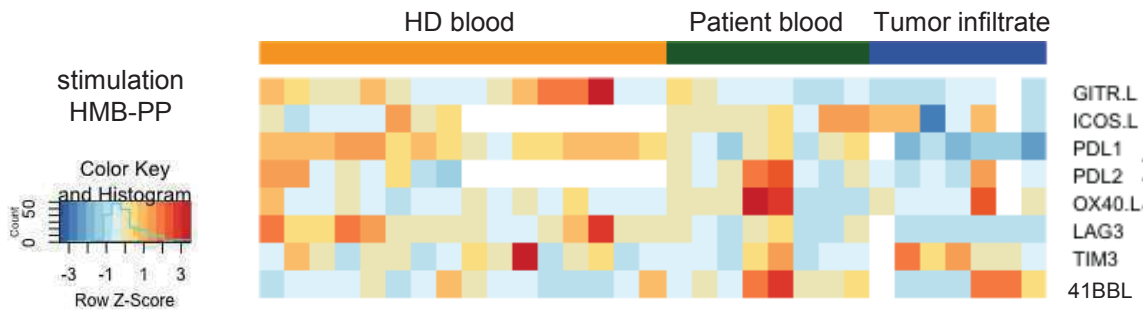
Supplementary Figure 5 follow

F

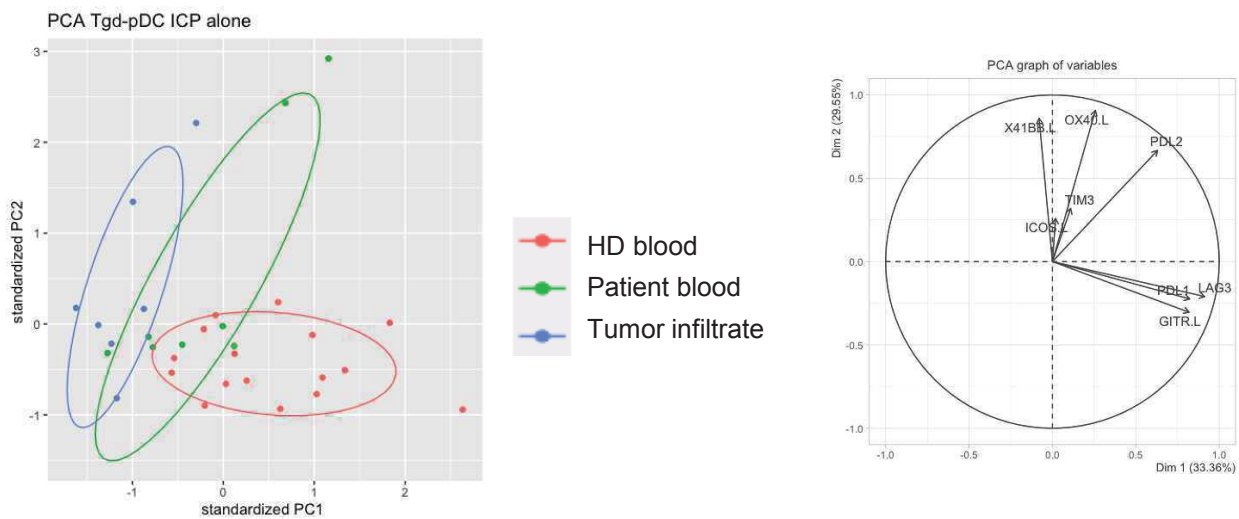


G

Heatmap based on immune checkpoint expression



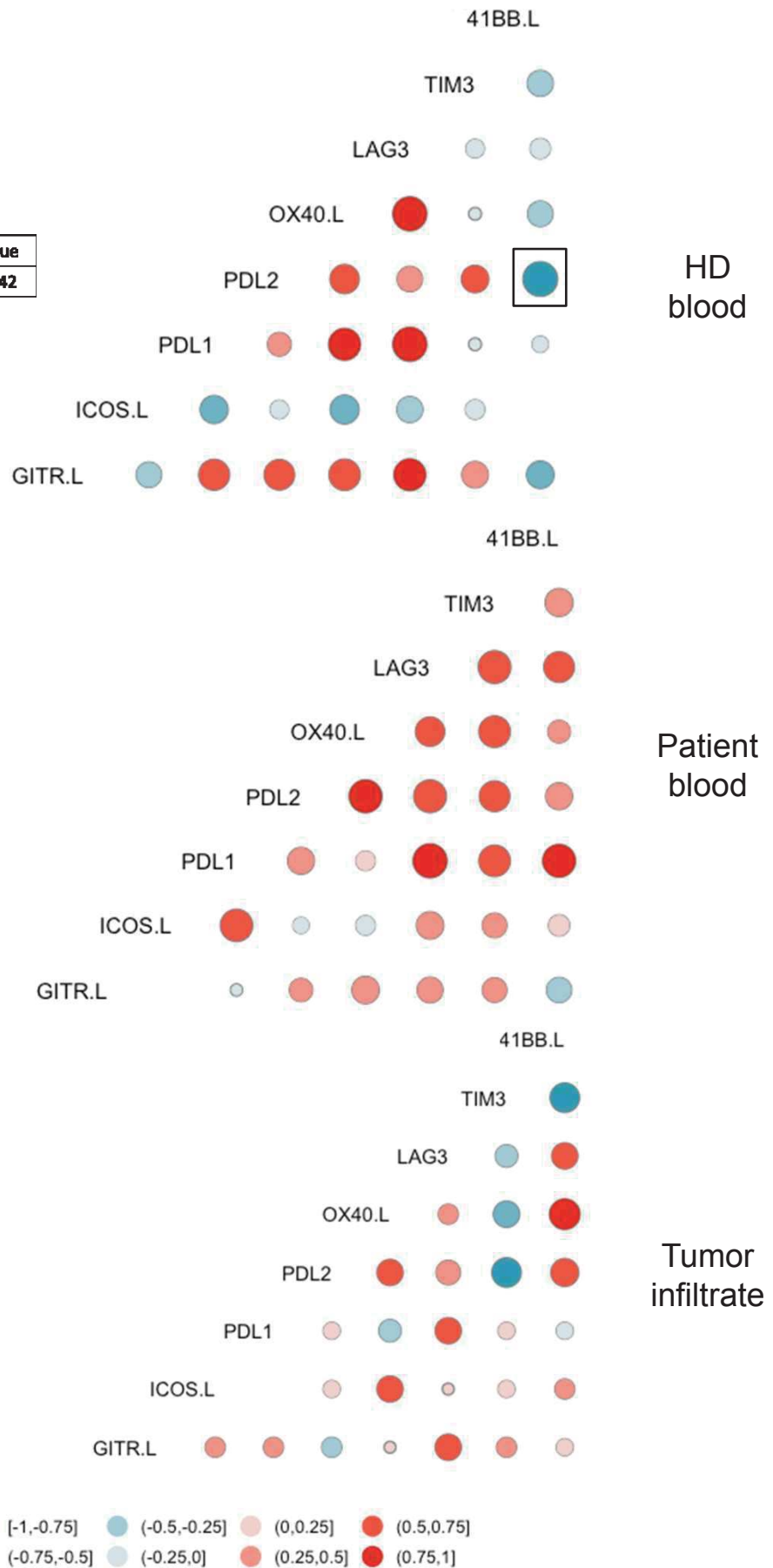
H



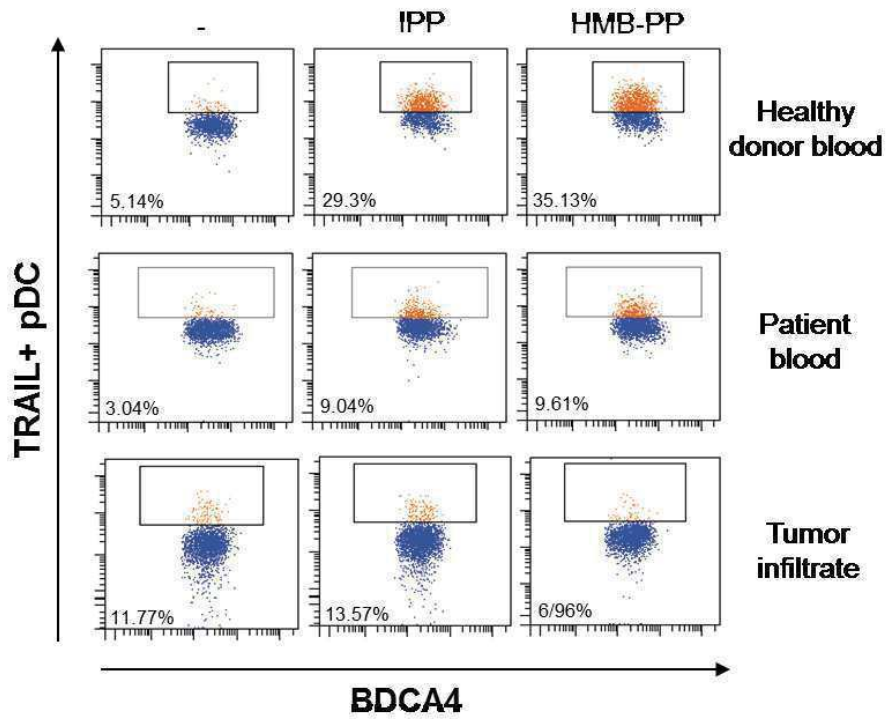
Supplementary Figure 6

Correlation matrix between immune checkpoints (stimulation HMB-PP)

HD blood		Spearman	P-value
PDL2	41-BBL	-0.93	0.0242

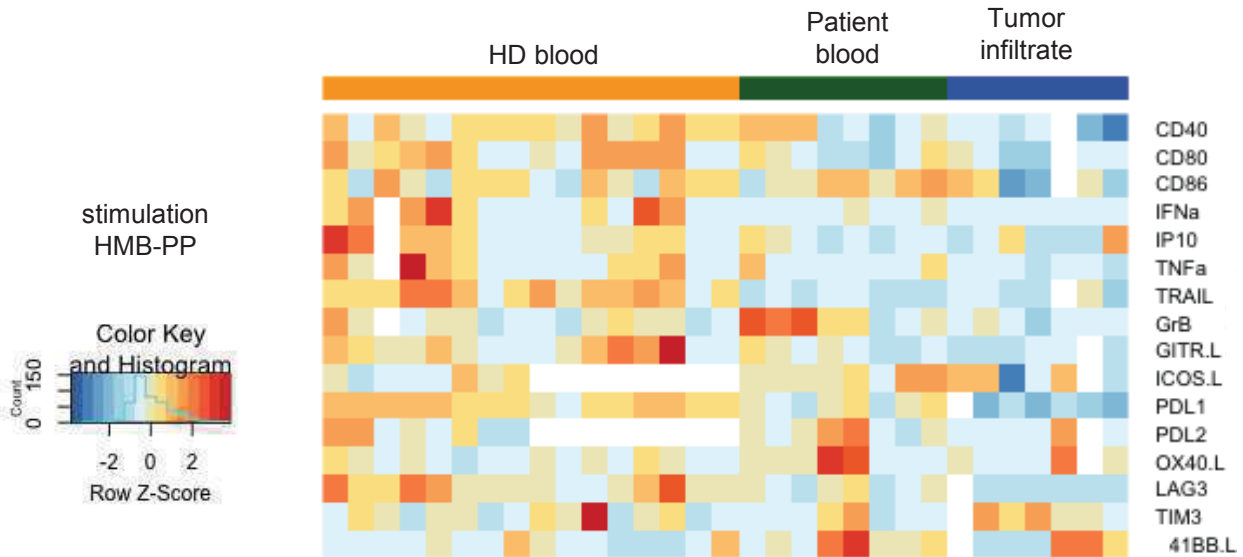


Supplementary Figure 7

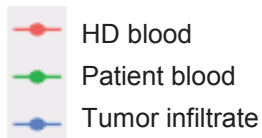
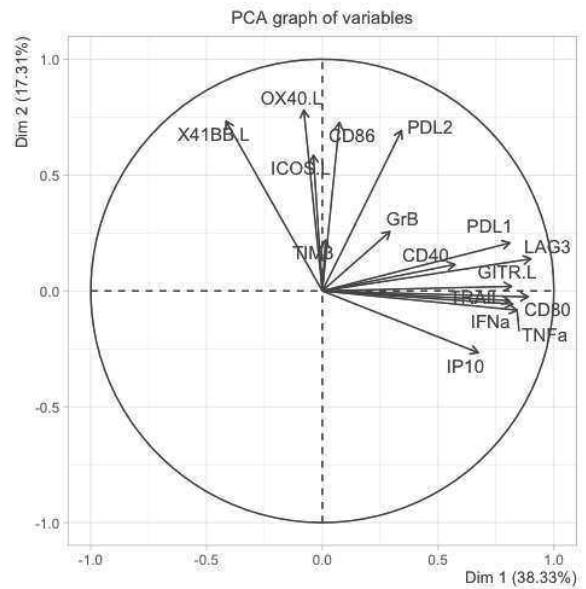
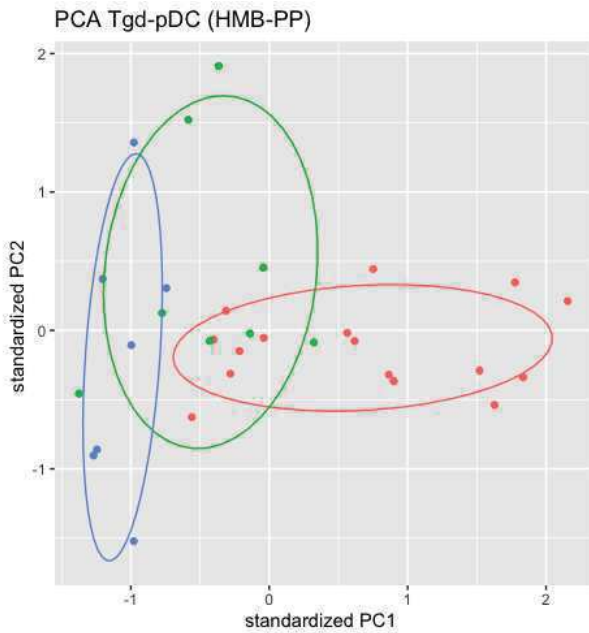


Supplementary Figure 8

A Heatmap based on activation status, cytokine secretion, immune checkpoint expression and cytotoxicity

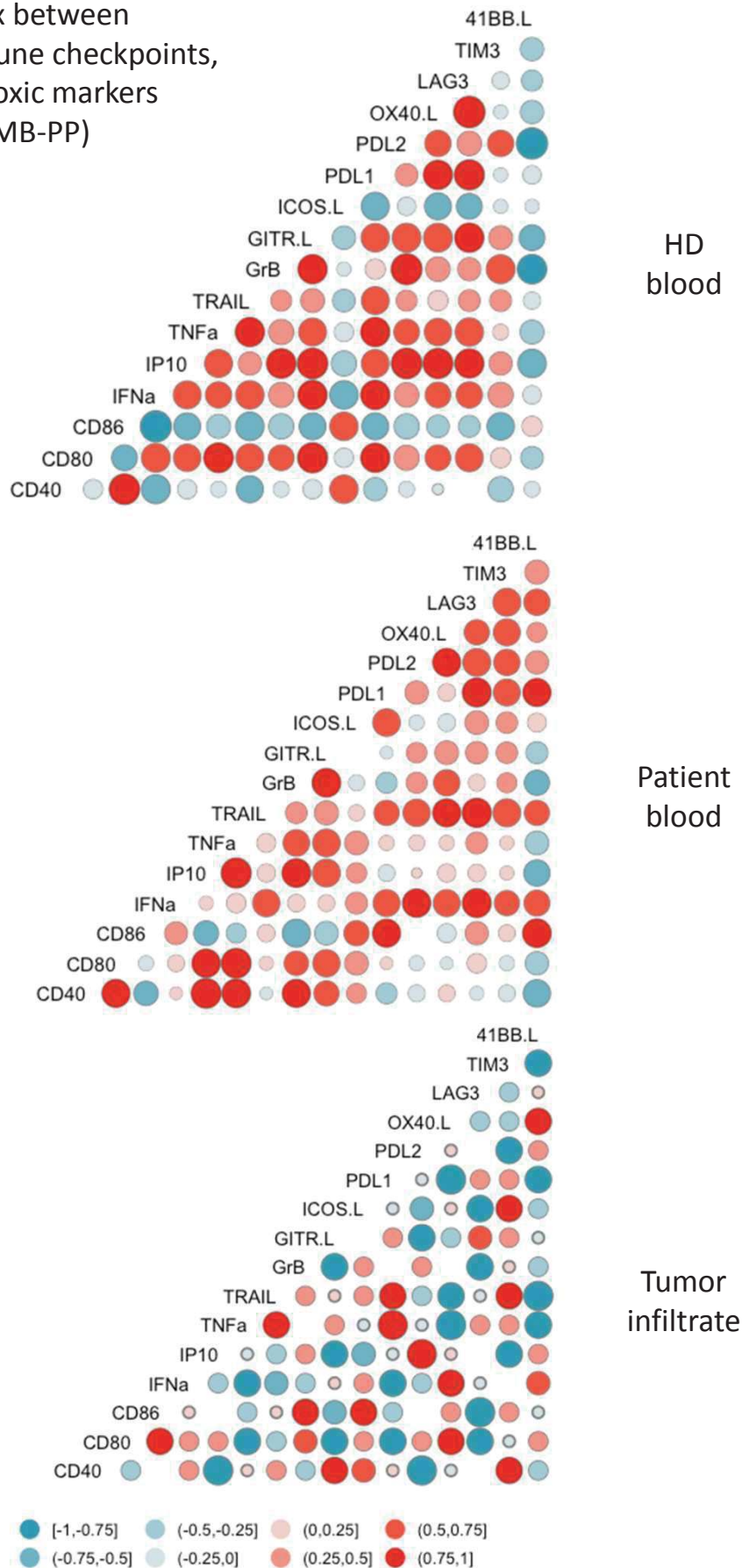


B



Supplementary Figure 9

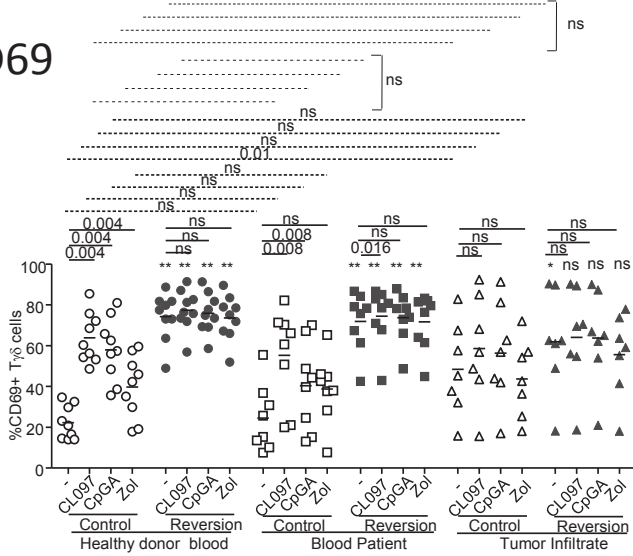
Correlation matrix between
activation markers, immune checkpoints,
cytokines and cytotoxic markers
(stimulation HMB-PP)



Supplementary Figure 10

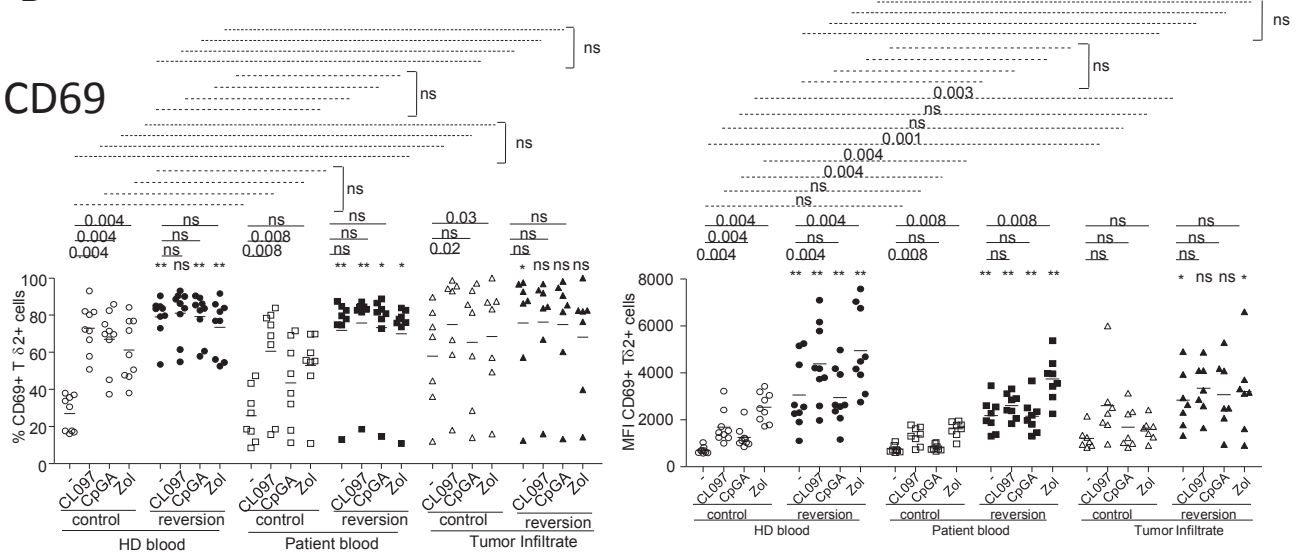
A

CD69

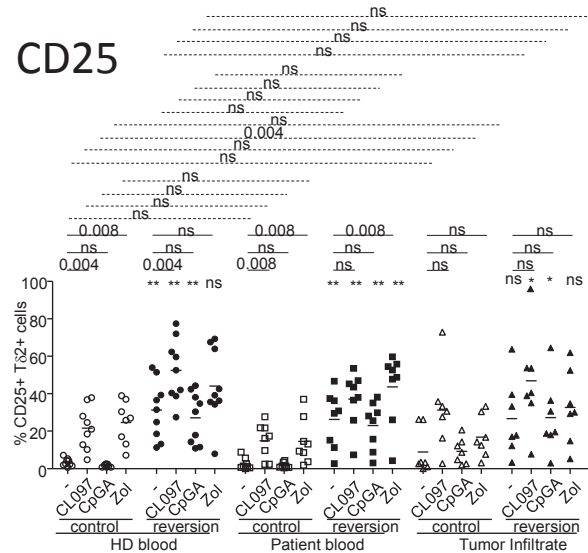


B

CD69



CD25



Supplementary Table 1

patient #	sample type	gender	age	Breslow (mm)	Clark	Ulcer	TNM classification (at sampling time)	clinical status at sampling time	treatment before sampling	calcul / diagnosis		calcul / sampling	
										PFS	OS	PFS	OS
1	PBMC	M	67	8	III	yes	Ic (T4b N0 M0)	diagnosis	no	9	136	8	135
2	PBMC	F	62	5	IV	nd	IIa ou IIIb (T4 N1a M0)	diagnosis	no		70		69
3	PBMC	M	33	hard histologic diagnosis			unclassifiable	diagnosis	no	>142	>142	>140	>140
4	PBMC	M	65	2	IV	no	IIa (T2a N1a M0)	diagnosis	no		>136		>136
5	PBMC	M	49	3	IV	no	IIa (T3a N0M0)	diagnosis	no	>115	>115	>114	>114
6	PBMC	F	69	1.8	nd	nd	IIIb ou IIIc (T2 N2c M0)	relapse	surgery	8	126	0	117
7	PBMC	M	52	1.7	IV	yes	IIa (T2b N0 M0)	diagnosis	no	109	142	108	141
8	PBMC	M	40	1.67	IV	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	140	>160	140	>160
9	PBMC	M	31	0.98	III	nd	Ia ou Ib (T1 N0 M0)	diagnosis	no	111	>146	111	>146
10	PBMC	F	67	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	PBMC	M	36	nd	nd	nd	nd	diagnosis	surgery	9	25	6	22
12	PBMC	F	43	1.05	IV	no	IIIb (T2a N2c M0)	relapse	surgery	22	>85	0	>62
13	PBMC	F	46	1.25	IV	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>98	>98	>98	>98
14	PBMC	F	32	3	IV	no	IIa (T3a N0 M0)		no	>49	>49	>49	>49
15	PBMC	M	47	1.9	IV	no	IV (T2a N0 M1b)	relapse	interferon	42	57	0	14
16	PBMC	M	80	2	IV	yes	IIa (T2b N0 M0)	diagnosis	no	>6	>6	>6	>6
17	PBMC	M	34	2	IV	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>39	>39	>37	>37
18	PBMC	M	65	1.95	IV	yes	IIa (T2b N0 M0)	diagnosis	no	>61	>61	>60	>60
19	PBMC	M	75	4	IV	yes	IIb (T3b N0 M0)	diagnosis	no	9	14	8	13
20	PBMC	M	75	no histologic data			nd	diagnosis/metastatic	no	1	9	0	8
21	PBMC	F	58	1	IV	yes	Ib (T1b N0 M0)	diagnosis	no	>73	>73	>72	>72
22	PBMC	F	44	11	V	yes	IIIc (T4b N2b M0)	diagnosis	no		>49		>49
23	PBMC	F	79	2.8	IV	yes	IV (T3b N2 M1b)	relapse	surgery	84	>111	0	>4
24	PBMC	F	31	primitive unknown			IV (TxN2bM1c)	relapse	no	16	>28	0	>12
25	PBMC	M	74	3	III	yes	IIb (T3b N0 M0)	diagnosis	no	>108	>163	>108	>163
26	PBMC	M	27	2	IV	nd	IIa (T2 N2a M0)	diagnosis	no	>125	>125	>123	>123
27	PBMC	F	43	1.05	IV	no	IIIb (T2a N2c M0)	relapse	surgery	22	>85	0	>61
28	PBMC	F	81	4.1	IV	yes	Ic (T4b N0 M0)	diagnosis	no	20	94	19	93
29	PBMC	F	45	0.54	III	no	Ia (T1a N0 M0)	diagnosis	no	>8	>8	>8	>8
30	PBMC	F	50	0.4 / 1.62	III / III	nd	IV (T2a N1 M1c)	diagnosis	surgery	30	36	0	6
31	PBMC	F	65	3	IV	nd	IIa (T3a N0 M0)	diagnosis	no	>87	>86	>86	>85
32	PBMC	F	72	1.1	IV	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>11	>11	>9	>9
33	PBMC	M	41	1.8	IV	no	IIa (T1a N1a M0)	diagnosis	no	>182	>182	>182	>182
34	PBMC	M	43	0.9	III	no	IIa (T1a N1a M0)	diagnosis	no	>120	>120	>119	>119
35	PBMC	M	36	3	III	no	IIa (T3a N2a M0)	diagnosis	no	>41	>41	>40	>40
36	PBMC	M	67	7	V	no	IIIc (T4a N3 M0)	diagnosis	no	3	16	3	16
37	PBMC	F	34	3	II	no	IIa (T3a N0 M0)	diagnosis	no	>109	>109	>109	>109
38	PBMC	M	77	4.2	III	yes	Ic (T4b N0 M0)	diagnosis	no	>73	>73	>72	>72
39	PBMC	F	59	1.15	III	no	IIIb (T2a N1b M0)	relapse	surgery	34	>39	3	>4
40	PBMC	F	45	1.02 / 0.28	III / II	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>188	>188	>188	>188
41	PBMC	F	33	1.1	III	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no		>2		>1

Supplementary Table 1 follow

patient #	sample type	gender	age	Breslow (mm)	Clark	Ulcer	TNM classification (at sampling time)	clinical status at sampling time	treatment before sampling	calcul / diagnosis		calcul / sampling	
										PFS	OS	PFS	OS
42	PBMC	F	33	3	IV	yes	IIc (T3b N3 M0)	diagnosis	no	4	11	3	10
43	PBMC	F	33	1.5	IV	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	chemotherapy	>151	>151	>150	>150
44	PBMC	F	64	1.2	III	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>97	>97	>96	>96
45	PBMC	F	82	1.6	III	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>3	67	>2	66
46	PBMC	F	70	1.74	III	yes	Ila (T2b N0 M0)	diagnosis	no	> 60	94	> 60	94
47	PBMC	M	57	0.55	III	non	Ia (T1aN0M0)	diagnosis	no		109		109
48	PBMC	M	47	1.82	IV	nd	IIIb (T2 N1b M0)	diagnosis	surgery	42	>167	42	>166
49	PBMC	F	39	unknown primitive			IV (Tx Nx M1c)	diagnosis	no	10	124	9	123
50	PBMC	M	63	2.7	IV	yes	IV (T3b N0 M1a)	relapse	surgery	65	137	5	9
51	PBMC	F	32	4.2	III	no	IIc (T4a N2a M0)	diagnosis	no	18	25	18	25
52	PBMC	M	50	6	IV	nd	IIb ou IIc (T4 N0 M0)	diagnosis	no	>48	117	>47	116
53	PBMC	F	63	1.3	IV	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>165	>165	>164	>164
54	PBMC	M	65	12.88	IV	yes	(T4b N1a M)	relapse	surgery	12	53	2	39
55	PBMC	M	41	2	IV	nd	Ib ou Ila (T2 N0 M0)	follow-up	no	>108	>108	>92	>92
56	PBMC	F	81	3.1	IV	yes	IIc (T3b N1a M0)	diagnosis	no	>42	154	>41	153
57	PBMC	F	65	1.3	III	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>188	>188	>187	>187
58	PBMC	M	31	1.66	IV	no	IIc (T2a N3b M0)	diagnosis	surgery	5	>186	>120	>182
59	PBMC	M	73	1.3	nd	nd	Ib ou Ila (T2 N0 M0)	diagnosis	no	101	>102	100	>101
60	PBMC	F	34	1.2	III	nd	Ib ou Ila (T2 N0 M0)	diagnosis	no	>85	>185	>84	>184
61	PBMC	M	67	1.8	V	yes	Ila (T2b N0 M0)	diagnosis	no	>95	>178	>94	>177
62	PBMC	F	74	5	IV	yes	IIId (T4b N3c M0)	diagnosis	no	5	21	5	21

Supplementary Table 2

patient #	sample type	gender	age	Breslow (mm)	Clark	Ulcer	TNM classification (at sampling time)	clinical status at sampling time	treatment before sampling	calcul / diagnosis		calcul / sampling	
										PFS	OS	PFS	OS
63	lymph node metastasis	M	51	4	IV	nd	IIc (T4 N3 M0)	diagnosis/relapse?	no	18	28	15	25
64	metastasis	M	48	3.7	IV	yes	IV (T3b N3 M1a)	relapse	surgery	2	>14	0	>4
65	metastasis	F	78	1.2	III	nd	IIIb ou IIc (T2 N2b M0)	relapse	surgery; radiotherapy	62	70	0	2
66	metastasis	F	79	4	IV	yes	IIIb (T3b N1a M0)	diagnosis	no	33	41	32	40
67	lymph node metastasis	F	56	4.6	V	nd	IV (T4 Nx M1a)	relapse	interferon alpha	35	>35	0	
68	lymph node metastasis	M	44	1	III	nd	IIc (T1 N3 M0)	relapse	no	17	26	0	8
69	sub-cutaneous metastasis		59	3.36	III	nd	IV (T3 N1 M1a)	relapse	interferon alpha	16	>41	0	>14
70	metastasis	M	56	0.9	IV	no	Ia (T1aN0M0)	diagnosis	no	> 114	>200	> 113	>199
71	metastasis	F	71	0.7	III	no	IV (T1a N2b M1b)	relapse	surgery, radio-immunotherapy (radiotherapy+ interferon alpha, chemotherapy)	153	172	0	5
72	metastasis	M	60	3.2	III	yes	IIb (T3b N0 M0)	diagnosis	no	>121	>121	>120	>120
73	metastasis	M	52	0.4	II	nd	IV (T1 Nx M1c)	relapse	no	80	>87	0	>6
74	metastasis	M	57	9	V	nd	IIb (T4 N0 M0)	diagnosis	no	17	>19	16	>18
75	metastasis	M	74	nd	nd	nd	nd	nd	no	nd	nd	nd	nd
76	lymph node metastasis	F	54	1.2	III	nd	IIc (T2 N3 M0)	relapse	no	43	141	0	97
77	lymph node metastasis	F	40	primitive unknown			IV	metastatic	no		3	0	2
78	pulmonary ascite	F	65	15	V	yes	IV (T4b N3 M1c)	relapse	surgery; pembrolizumab	2	18	0	6
79	metastasis	M	93	3.9	IV	no	IIIb (T3a N1b M0)	relapse	surgery	12	13		2
80	lymph node metastasis	F	72	2.5	IV	no	IIIb (T3 N2b M0)	relapse	surgery	120	>133	0	>13
81	metastasis	F	67	1.4	IV	no	IIIb (T2a N2b M0)	relapse	surgery	103	>120	2	>18
82	metastasis	F	50	4	IV	nd	IIc (T4 N1b M0)	relapse	surgery	130	>140	0	>9
83	sub-cutaneous metastasis		59	3.36	III	nd	IV (T3 N1 M1b)	relapse	interferon alpha, chemotherapy	16	>41	0	>5
84	metastasis	F	81	4.5	IV	yes	IIc (T4b N1b M0)	relapse	no	21	>115	0	>94
85	metastasis	M	72	4.2	V	no	IIIb (T4a N2b M0)	diagnosis	no	43	>65	43	>65
86	metastasis	F	21	4	III	nd	IV (T3 N1 M1a)	relapse	interferon alpha	70	84	0	13
87	metastasis	M	55	9	V	nd	IV (T4 N0 M1a)	relapse	no	17	>46	11	>27
88	metastasis	F	81	1.16	IV	no	Ib (T2a N0 M0)	diagnosis	no	>140	>140	>139	>139
89	metastasis	F	77	18	V	yes	Ic (T4b N0 M0)	diagnosis	no	8	13	7	12
90	metastasis	M	28	1.5	III	no	IIa (T2a N1a M0)	diagnosis	no	34	42	34	42
91	cutaneous metastasis	F	76	5	IV	yes	IV (T4bN2bM1c)	relapse	deticene	7	21	0	3
92	primary tumor	F	43	0.9	III	no	Ia (T1a N0 M0)		no	>25	>25	>24	>24
93	lymph node metastasis	F	75	5	IV	yes	IIc (T4b N3 M0)	diagnosis	surgery	9	21	7	19
94	lymph node metastasis	F	62	5	IV	no	IIa (T4a N1a M0)	diagnosis	surgery		70		67
95	metastasis	F	45	2.1	IV	nd	IV (T3 N0 M1a)	relapse	Interferon alpha	50	>63	0	>13
96	metastasis	F	52	0.974 / 0.35	III / II	no	Ia (T1a N0 M0)	diagnosis	no	>20	>20	>19	>19
97	metastasis	M	54	unknown primitive			IV (Tx N2b M1b)	relapse	surgery, radiotherapy	15	>29	>12	>12
98	metastasis	M	78	8	IV	no	IV (T4a N3 M1b)	relapse	surgery, immunotherapy (pembrolizumab)	12	>49	0	>14
99	lymph node metastasis	F	83	4.5	IV	nd	IV (T4 N0 M1b)	relapse	surgery, immunotherapy (ipilimumab; pembrolizumab)	9	68	0	6
100	metastasis	F	74	nd	nd	nd	IV (T3 N0 M1c)	relapse	adjuvant radiotherapy, immunotherapy (nivolumab)	17	>31	0	>3
101	lymph node metastasis	F	65	1.2	IV	nd	IV (T2 N M1a)	metastatic	no		>14		>12
102	cutaneous metastasis	F	69	0.78	III	nd	Ia ou Ib (T1N0M0)	relapse	deticene, DC vaccination	44	107	0	12
103	metastasis	M	56	5	IV	yes	IIc (T4b N1a M0)	diagnosis	no	26	63	25	63
104	metastasis	M	88	22	V	yes	Ic (T4b N0 M0)	diagnosis surgery	no	48	56	18	21
105	metastasis	M	73	0.5	II	no	Ia (T1a N0 M0)	diagnosis	no		>2		>1
106	metastasis	F	89	7		yes	Ic (T4b N0 M0)	diagnosis	no	>2	>2	>2	>2
107	metastasis	F	46	1.4	III	no	IV (T2a N1b M1d)	diagnosis	no	1	>2	0	>1
108	metastasis	M	75	3	IV	yes	IIc (T3b N3 M0)	relapse	surgery	7	>37	>29	>29
109	metastasis	F	80	unknown primitive			IV (T0 Nx M1a)	diagnosis	no				

Supplementary Table 3

Primers RT-qPCR

GAPDH	CGA GGC CGT CAC CAA GAA C	F	Hybridation : 60 °C
	GTA GTG GTC GAT GCG GTA GA	R	
BTN3A1	CTT CTT CCA GGT CAT AGT GTC TG	F	Hybridation : 60°C
	AGC TCC ATG GTC TCT GCA CT	R	
BTN3A2	TCC ATC GCA GAC CCC TTC	F	Hybridation : 60°C
	TCA GGC TGA CTT ATT GGT ATC G	R	
BTN3A3	GCC CAA TAC CAA AAG AAG TAG AG	F	Hybridation : 60°C
	AGA AGC AGA GAT GTT ACT TCA GC	R	

Supplementary Table 4 (follow)

B

Patient tumor infiltrate Log-rank tests (p values)	pDC Tγδ all				pDC Tδ2+			
	PFS diagnosis	OS diagnosis	PFS sampling	OS sampling	PFS diagnosis	OS diagnosis	PFS sampling	OS sampling
% CD40.stim..	0,8750	0,5696	0,8249	0,0670	0,9331	0,8014	0,0801	0,3810
% CD40.stim.CL097	0,5004	0,5770	0,6678	0,7903	0,2686	0,8695	0,6678	0,3272
% CD40.stim.CpGA	0,8569	0,5770	0,6678	0,1982	0,2362	0,1805	0,0790	0,8944
% CD40.stim.Zol	0,7090	0,8137	0,3173	0,7198	0,7090	0,8137	0,3173	0,7198
% CD40.stim.Zol.CL097	0,2397	0,4157	0,3865	0,4157	0,0344	0,4157	0,3865	0,4157
% CD40.stim.Zol.CpGA	0,7090	0,8137	0,3173	0,7198	0,0344	0,8137	0,3173	0,7198
% CD25.stim..	0,7887	0,7369	0,3544	0,9896	0,7887	0,7369	0,3544	0,9896
% CD25.stim.CL097	0,1189	0,3015	0,5101	0,9962	0,1189	0,3015	0,5101	0,9962
% CD25.stim.CpGA	0,4834	0,3015	0,3261	0,9962	0,9430	0,8695	0,4545	0,2792
% CD25.stim.Zol	0,6310	0,3038	0,1967	0,3339	0,6310	0,3038	0,1967	0,3339
% CD25.stim.Zol.CL097	0,6310	0,5391	0,1138	0,5391	0,7472	0,5391	0,1138	0,5391
% CD25.stim.Zol.CpGA	0,6310	0,3038	0,1967	0,3339	0,6310	0,3038	0,1967	0,3339
% CD69.stim..	0,0338	0,2596	0,2507	0,7205	0,0338	0,2596	0,2507	0,7205
% CD69.stim.CL097	0,9919	0,6470	0,2524	0,4778	0,8529	0,8695	0,6678	0,9700
% CD69.stim.CpGA	0,9919	0,6470	0,2524	0,4778	0,9919	0,6470	0,2524	0,4778
% CD69.stim.Zol	0,4426	0,4702	0,3173	0,5185	0,2193	0,0930	0,3173	0,0990
% CD69.stim.Zol.CL097	0,4426	0,7817	0,3865	0,7817	0,7472	0,5391	0,1138	0,5391
% CD69.stim.Zol.CpGA	0,4426	0,4702	0,3173	0,5185	0,3100	0,3038	0,4386	0,3339
IFNg.stim..	0,1519	0,4700	0,4437	0,5899				
IFNg.stim.CL097	0,5502	0,2628	0,4769	0,7622				
IFNg.stim.CpGA	0,4900	0,7225	0,0393	0,1686				
IFNg.stim.Zol	0,0760	0,0901	0,1859	0,0536				
IFNg.stim.Zol.CL097	0,1695	0,2621	0,1573	0,2621				
IFNg.stim.Zol.CpGA	0,0253	0,0013	0,4497	0,0011				
TNFa.stim..	0,6239	0,8583	0,8635	0,9502				
TNFa.stim.CL097	0,9040	0,9543	0,8173	0,3776				
TNFa.stim.CpGA	0,9253	0,9615	0,2853	0,4126				
TNFa.stim.Zol	0,7440	0,3848	0,1859	0,4719				
TNFa.stim.Zol.CL097	0,0086	0,0791	0,3711	0,0791				
TNFa.stim.Zol.CpGA	0,7613	0,1144	0,2733	0,1105				
IL4.stim..	0,9500	0,6109	0,4437	0,7273				
IL10.stim..	0,8433	0,8831	0,4437	0,4286				
IL10.stim.CL097	0,2502	0,3850	0,8173	0,5541				
IL10.stim.CpGA	0,6784	0,3673	0,4322	0,0177				
IL10.stim.Zol	0,0267	0,3154	0,1859	0,3011				
IL10.stim.Zol.CL097	0,7749	0,4491	0,3711	0,4491				
IL13.stim..	0,0679	0,0749	0,8635	0,2304				
IL13.stim.CL097	0,3492	0,1968	0,2493	0,0673				
IL13.stim.CpGA	0,0101	0,1003	0,8752	0,4459				
IL13.stim.Zol	0,0267	0,3154	0,1859	0,3011				
IL17.stim.Zol	0,0267	0,3154	0,1859	0,3011				
IL17.stim.Zol.CpGA	0,0267	0,3154	0,1859	0,3011				
GrB.stim..	0,9368	0,6606	0,8635	0,0999				
GrB.stim.CL097	0,7437	0,8101	0,0809	0,0502				
GrB.stim.CpGA	0,9183	0,9619	0,8752	0,2698				
GrB.stim.Zol	0,0121	0,0041	0,3613	0,0047				
GrB.stim.Zol.CL097	0,0011	0,0015	0,4795	0,0015				
GrB.stim.Zol.CpGA	0,0121	0,0041	0,3613	0,0047				
TGFb.stim..	0,8979	0,6171	0,1025	0,7583				
TGFb.stim.CL097	0,0570	0,6729	0,5485	0,0943				
% CD107.stim..	0,9977	0,7158	0,6496	0,5102	0,9977	0,8488	0,6496	0,2333
% CD107.stim.CL097	0,2182	0,6089	0,0597	0,5691	0,6123	0,6861	0,5263	0,3688
% CD107.stim.CpGA	0,9677	0,7914	0,1106	0,7345	0,9677	0,7914	0,1106	0,7345
% CD107.stim.Zol	0,8018	0,4702	0,3173	0,5185	0,0483	0,0930	0,3173	0,0990
% CD107.stim.Zol.CL097	0,8018	0,7817	0,2482	0,7817	0,9823	0,9724	0,3865	0,9724
% CD107.stim.Zol.CpGA	0,8018	0,4702	0,3173	0,5185	0,0483	0,0930	0,3173	0,0990

Supplementary Table 5

A

Patient blood rank tests (p values)	Log-				
		PFS diagnosis	OS diagnosis	PFS sampling	OS sampling
% CD80.stim..		0,9191	0,3173	0,7276	0,3865
% CD80.stim.IPP		0,2207	1,0000	0,2207	1,0000
% CD80.stim.HMB.PP		0,9191	0,3173	0,7276	0,3865
% CD40.stim..		0,7276	0,3173	0,9191	0,3865
% CD40.stim.IPP		0,2207	1,0000	0,2207	1,0000
% CD40.stim.HMB.PP		0,9191	0,3173	0,7276	0,3865
% CD86.stim..		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% CD86.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% CD86.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% TRAIL.stim..		0,0701	0,3173	0,0701	0,2482
% TRAIL.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% TRAIL.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% GITR.L.stim..		0,9191	0,3173	0,7276	0,3865
% GITR.L.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% GITR.L.stim.HMB.PP		0,0701	0,3173	0,0701	0,2482
% ICOS.L.stim..		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% ICOS.L.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% ICOS.L.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% PDL2.stim..		0,7276	0,3173	0,9191	0,3865
% PDL2.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% PDL2.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% OX40.L.stim..		0,7276	0,3173	0,9191	0,3865
% OX40.L.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% OX40.L.stim.HMB.PP		0,7276	0,3173	0,9191	0,3865
% LAG3.stim..		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% LAG3.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% LAG3.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% TIM3.stim..		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% TIM3.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% TIM3.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% PDL1.stim..		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% PDL1.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% PDL1.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% 41BB.L.stim..		0,9191	0,3173	0,7276	0,3865
% .41BB.L.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
% 41BB.L.stim.HMB.PP		0,1869	0,3173	0,1869	0,2482
% GITR.stim..		0,3173	1,0000	0,3173	1,0000
% GITR.stim.HMB.PP		0,3173	1,0000	0,3173	1,0000
% 41BB.stim..		0,3173	1,0000	0,3173	1,0000
% 41BB.stim.HMB.PP		0,3173	1,0000	0,3173	1,0000
% OX40.stim..		0,3173	1,0000	0,3173	1,0000
% OX40.stim.HMB.PP		0,5637	1,0000	0,5637	1,0000
% ICOS.stim..		0,5637	1,0000	0,5637	1,0000
% ICOS.stim.HMB.PP		0,5637	1,0000	0,5637	1,0000
IL6.stim..		0,2284	0,1343	0,3532	0,1081
IL6.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
IL6.stim.HMB.PP		0,4719	0,9372	0,2568	0,6878
GrB.stim..		0,2284	0,1343	0,3532	0,1081
GrB.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
GrB.stim.HMB.PP		0,6649	0,9372	0,2568	0,6878
IFNa.stim..		0,2284	0,1343	0,3532	0,1475
IFNa.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
IFNa.stim.HMB.PP		0,4719	0,9372	0,2568	0,6878
IP10.stim..		0,5505	0,9372	0,3532	0,8563
IP10.stim.IPP		0,4142	1,0000	0,4142	1,0000
IP10.stim.HMB.PP		0,4719	0,9372	0,2568	0,6878
TNFA.stim..		0,2284	0,1343	0,3532	0,1081
TNFA.stim.IPP		0,2207	1,0000	0,2207	1,0000
TNFA.stim.HMB.PP		0,4719	0,9372	0,2568	0,6878

Supplementary Table 5 (follow)

B

Patient tumor infiltrate				
Log rank tests (p-value)	PFS diagnosis	OS diagnosis	PFS sampling	OS sampling
% CD80 stim HMB-PP	0,6104	0,7822	0,5351	0,9183
% CD40 stim HMB-PP	0,0634	0,6076	0,1138	0,6949
% CD86 stim HMB-PP	0,7857	0,0363	0,5351	0,0499
% TRAIL stim HMB-PP	0,4547	0,3636	0,5351	0,4328
% GITR-L stim HMB-PP	0,1823	0,9835	0,4142	0,7822
% ICOS-L stim HMB-PP	0,9183	0,2072	0,4142	0,0624
% PDL2 stim HMB-PP	0,0896	0,5019	0,4142	0,5019
% OX40-L stim HMB-PP	0,0896	0,5019	0,4142	0,5019
% LAG3 stim HMB-PP	0,9183	0,6104	0,1824	0,6104
% TIM3 stim HMB-PP	0,1823	0,5860	0,3701	0,5860
% PDL1 stim HMB-PP	0,5151	0,2072	0,1824	0,0389
% 41BB-L stim HMB-PP	0,6949	0,2769	0,1824	0,4547
IL10 stim-	0,4547	0,5860	0,1138	0,9458
IL10 stim HMB-PP	0,0177	0,3000	0,1802	0,1831
IL6 stim-	0,5860	0,7857	0,1138	0,5860
IL6 stim HMB-PP	0,4883	0,6522	0,7399	0,6522
GrB stim-	0,2072	0,1966	0,1138	0,0246
GrB stim HMB-PP	0,6729	0,0943	0,5067	0,0510
IFN α stim-	0,4547	0,5860	0,1138	0,9458
IFN α stim HMB-PP	0,5614	0,7419	0,0404	0,9344
IP10 stim-	0,4547	0,5860	0,1138	0,9458
IP10 stim HMB-PP	0,4097	0,7622	0,5067	0,3770
TNF α stim-	0,2072	0,1966	0,1138	0,0246
TNF α stim HMB-PP	0,6729	0,0943	0,5067	0,0510

Supplementary Table 6

Log-rank (p-values)	Patient blood				Patient tumor infiltrate			
	PFS diagnosis	OS diagnosis	PFS sampling	OS sampling	PFS diagnosis	OS diagnosis	PFS sampling	OS sampling
% BTN3A+ T γ δ all	0.8395	0.5824	0.9547	0.5516	0.4153	0.4297	0.0348	0.9183
% BTN3A+ T δ 2+	0.7094	0.8837	0.6754	0.7707	0.3778	0.6470	0.2914	0.7061
% BTN3A+ T δ 2-	0.8395	0.5824	0.9547	0.5516	0.7152	0.4855	0.0963	0.4328
% BTN3A+ pDCs	0.8395	0.9855	0.9547	0.9463	0.6564	0.4248	0.3420	0.7566

Chapitre 6 : Discussion et perspectives

Les cellules tumorales développent des caractéristiques intrinsèques leur permettant une croissance démesurée malgré l'immuno-surveillance. La subversion des effecteurs immunitaires au cours du développement tumoral est une des signatures décrivant la carcinogénèse et représente aujourd'hui un challenge clinique majeur. Une partie des recherches portent aujourd'hui sur ces effecteurs immunitaires, précieux alliés face à la complexité et à l'hétérogénéité des tumeurs.

De par son taux de mutation élevé, le mélanome présente une forte immunogénicité, mais parvient malgré tout à contourner le contrôle immunitaire. Le comportement des effecteurs immunitaires dans ce contexte reste à élucider.

- **pDCs et T $\gamma\delta$, acteurs cruciaux**

Les pDCs sont décrites comme initiatrices majeures de la réponse anti-tumorale, infiltrant les lésions primaires et les métastases mais sont cependant liées à un mauvais pronostic. Leurs fonctions ont été décrites comme détournées par la tumeur, et de la même façon, le mélanome ou son microenvironnement détourne d'autres effecteurs également. Les T $\gamma\delta$ sont de puissants effecteurs anti-tumoraux et présentent des caractéristiques uniques les rendant indispensables à une lutte anti-tumorale. Des analyses CYBERSORT de 18000 tumeurs ont révélé que la sous-population la plus significativement favorable au pronostic clinique était les T $\gamma\delta$ (176), valorisant d'autant plus l'intérêt de leur étude. Pourtant, dans le mélanome, leur caractérisation a été très succincte, se limitant à la démonstration de leur capacité d'infiltrer des tumeurs primaires, à leur représentation en périphérie et la description de leur fonction cytotoxique directe via la sécrétion de perforine, leur activation, et la sécrétion d'IFN γ . Aucune donnée ne relate l'expression de points de contrôle immunitaire, ne décrit leur fonction en contexte de mélanome ou encore n'étudie leur impact clinique. Ce travail a apporté des connaissances en immunologie fondamentale à travers une caractérisation détaillée du phénotype et de la fonctionnalité des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le mélanome, ainsi qu'à travers une description, pour la première fois, des mécanismes d'interaction de ces cellules avec les pDCs en contexte sain. Nous avons de ce fait également pu décrire les dysfonctions de ces interactions en contexte de mélanome et identifier des

biomarqueurs pronostiques d'évolution de la maladie. Nos études ont été réalisées sur des cellules de patients, pertinentes pour un transfert clinique potentiel.

- **Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des T $\gamma\delta$**

De façon complémentaire à Wistuba et ses collègues, nous avons démontré que les proportions et caractéristiques phénotypiques des T $\gamma\delta$ circulants et intra-tumoraux étaient des facteurs pronostiques d'évolution clinique. Bien que les proportions soient identiques dans le sang des patients par rapport aux donneurs sains, leur composition est significativement différente : le ratio T δ 2+/T δ 2- a tendance à augmenter dans le sang et une meilleure représentation de T δ 2+ circulants est corrélée significativement avec une plus longue survie sans progression. Leur capacité d'infiltration et le lien entre proportion d'infiltrat et la survie sans progression révèlent leur potentiel clinique et l'avantage qu'ils peuvent présenter en tant que vecteur d'immunothérapie. La tendance à l'augmentation pour le stade de différenciation TCM et la diminution pour le TEMRA dans les tumeurs par rapport au sang de donneur sain, ainsi que le lien entre la proportion des T $\gamma\delta$ et la PFS montrent une modulation de la tumeur sur leur différenciation et leur importance dans la défense anti-tumorale. L'analyse globale du phénotype que nous proposons montre un état d'activation plus élevé chez les patients, mais l'expression d'un phénotype plutôt régulateur dans les tumeurs, lié à une très mauvaise survie sans progression et survie globale en lien avec la littérature (152). Plus précisément, une forte expression de CD86 est associée à un mauvais pronostic alors qu'une forte expression de CD69 est associée à un bon pronostic. Nous pouvons déduire, à partir de ces marqueurs que lorsque le T $\gamma\delta$ met en jeu ses capacités de cellules présentatrices d'antigènes plutôt que ses propriétés effectrices, ses fonctions nécessaires ne sont pas mises à profit et la survie est impactée.

Pour la première fois, nous avons complété les études phénotypiques par l'analyse de l'expression de points de contrôle immunitaire et autres KIR et NCR. Concernant les points de contrôle immunitaire, 41BB, TIM3, LAG3 et ICOS-L ont montré une expression plus élevée dans le sang de patients, et TIM3 et LAG3 également dans la tumeur. L'expression de PD1 est plus élevée sur les T $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs en comparaison avec l'expression sur les T $\gamma\delta$ circulants de patients ou de donneurs sains, ce qui est associé à une rechute rapide et une survie plus courte. Dans nos résultats, TIM3 et LAG3 sont corrélés à l'expression de PD1, et le ciblage de ces

molécules en combinaison est testé en clinique (177). L'implication de CTLA4, PD1, TIM3, TIGIT et LAG3 dans la balance entre tolérance et immunité a été démontrée pour la première fois dans des modèles d'auto-immunité, et leur influence sur le devenir clinique en contexte tumoral a ensuite été démontrée (178). De ce fait il serait également intéressant d'intégrer TIGIT et CTLA4 dans notre étude. Dans la littérature, la co-expression de TIM3 avec PD1 ou CTLA4 sur les T peut être marqueur d'exhaustion (modèle murin). En effet TIM3 apparaît comme un biomarqueur de résistance au blocage de l'axe PD-1/PD-L1, et le double blocage de ces molécules apporte des résultats précliniques anti-tumoraux prometteurs confortant les stratégies de thérapies combinées pour le traitement des tumeurs (177). Concernant 41BB, bien que les pourcentages d'expression soient faibles, il est intéressant de constater que les $T\gamma\delta$ issus de donneurs sains expriment au niveau basal 41BB ainsi que son ligand, et que le ligand est exprimé avec un plus grand pourcentage. Ces récepteurs sont peut être impliqués dans l'autorégulation du $T\gamma\delta$ et peuvent aussi mettre en valeur les fonctions de cellules présentatrices d'antigènes. NKG2A, NKG2D et NKp46 ont une expression significativement plus forte dans le sang de patients et NKG2A, Nkp30 et NKp44 dans les tumeurs. Bien qu'il n'y ait pas de significativité, nous avons observé une tendance entre une forte expression de NKG2A et une courte survie. Les récepteurs NKp30 et NKG2A ont tendance à se corrélent positivement dans les tumeurs ($p=0.08$). L'ensemble de ces récepteurs inhibiteurs ou activateurs influencent la capacité du $T\gamma\delta$ à mettre en place leur capacité anti-tumorale. De plus, il a récemment été découvert que certaines pathologies étaient influencées par des isoformes de NCR à fonctions inhibitrices (179-181). C'est notamment le cas pour le récepteur NKp44 qui se lie au récepteur PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) exprimé par les cellules tumorales, ou par NKp30, dont un isoforme induirait une réponse TH1(182) alors que les 2 autres soutiendraient un environnement tolérogène. De manière intéressante, lors du développement clinique de DOT, le protocole d'expansion induit une augmentation de l'expression de NKp44 et de NKp30, et leur engagement augmenterait leur capacité à éliminer des cellules tumorales en contexte AML(117, 183). Nous avons montré ici qu'en contexte de mélanome, les $T\gamma\delta$ circulant et infiltrant les tumeurs présentent également des altérations phénotypiques au niveau des récepteurs KIR, NCR et points de contrôle immunitaire, mettant à jour de nouvelles cibles

potentiellement responsables des défaillances de réponses immunes. L'expression isolée de ces marqueurs inhibiteurs n'est pas forcément synonyme de dysfonction, en revanche la co-expression de facteurs inhibiteurs renforce la probabilité de mener à un échec de la surveillance immunitaire. Nous avons mis en valeur certains marqueurs tels que PD1, 41BB ou NKp44 comme prédictifs de mauvaise évolution de la maladie, et des récepteurs potentiellement intéressants comme cibles d'immunothérapies.

- **IL17**

Un autre point intéressant dans l'induction potentielle du rôle pro-tumoral des $T\gamma\delta$ concerne la sécrétion d'IL17 corrélée négativement avec la survie globale. A l'état basal, l'IL17 a tendance à être plus sécrétée par les $T\gamma\delta$ du sang de patients ou des tumeurs. Cette sécrétion a tendance à augmenter sous stimulation zolédronate dans le sang de patients atteints de mélanome par rapport aux donneurs sains. Lors d'études du cross talk, nous n'observons pas d'induction spécifique de sécrétion d'IL17 par les $T\gamma\delta$ en co-culture avec des pDCs provenant de contexte tumoral. Dans une étude similaire, Lo Presti et ses collègues observent une sécrétion d'IL17 par les $T\gamma\delta$, induite par les pDCs après 6 jours de co-culture en présence d'IL3 et de TLR9-L, montrant le rôle potentiel des pDCs dans l'orientation vers un profil TH17.

Cette cytokine pro-inflammatoire pose encore question : certaines études montrent qu'elle est a priori peu représentée chez les individus sains, mais semble être issue majoritairement des $T\gamma\delta$ chez les patients atteints de cancers, et même en lien avec l'angiogénèse (184) ; d'autres montrent qu'au contraire la quantité de $T\gamma\delta$ IL17+ est négligeable en contexte de cancer (123, 185).

Des études plus récentes sur le rôle des $T\gamma\delta$ dans le développement de cancer pulmonaire montrent une association entre la dérégulation du microbiote pulmonaire commensal et la stimulation des lymphocytes $T\gamma\delta$ résidents qui vont alors produire de l'IL17. Il a notamment été montré que différentes espèces bactériennes telles que les *Herbaspirillum* et les *Sphingomonadaceae* étaient sur-représentées dans les poumons atteints de tumeurs alors que des poumons sains sont plutôt enrichis en espèces de type *Aggregatibacter* ou *Lactobacillus*. De façon intéressante, des études encore précliniques (modèle murin) montrent que le microbiote commensal des voies

respiratoires induit un phénotype de $T\gamma\delta$ produisant de l'IL17 associé au développement de cancer des poumons(186). Chez l'homme, Gao et al. ont associé une augmentation de la population $T\gamma\delta$ H17 avec l'invasion tumorale et le développement de métastases dans le cancer du poumon. De plus, la composition du microbiote intestinal influence la réponse aux immunothérapies par inhibition de point de contrôle immunitaire. La représentation d'une espèce bactérienne notamment (*A. muciniphila*) est corrélée positivement avec une réponse immunitaire TH1 augmente la survie sans progression sous traitement $\alpha PD1$, chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules et de carcinome renal (187).

Les $T\gamma\delta$ et notamment les $T\delta 2+$ étant spécialisés dans la reconnaissance des PAgS d'origine bactérienne et exprimant ces points de contrôle immunitaire, pourraient avoir des interactions spécifiques avec le microbiote, et donc être modulés par celui-ci pour améliorer les réponses anti tumorales. L'étude des interactions $T\gamma\delta$ -microbiote pourrait permettre l'utilisation du microbiote comme inducteur de réponse anti-tumorale par les $T\gamma\delta$. Ainsi, l'activation des $T\gamma\delta$ induite par le microbiote peut être une stratégie thérapeutique intéressante à étudier.

- **Description des interactions pDCs- $T\gamma\delta$ en contexte sain et mélanome et mécanismes liés à la subversion ; Caractérisations phénotypiques et fonctionnelles des sous populations $T\delta 2+$ et $T\delta 2-$**

Nous avons également apporté des connaissances fondamentales sur les mécanismes d'interaction et de régulation entre pDCs et $T\gamma\delta$ qui n'avaient jamais été décrits. Pour la première fois, nous avons démontré que les pDCs détectent les PAgS et activent par ce biais les $T\gamma\delta$ et particulièrement les $T\delta 2+$. Ce travail a mis également en évidence la fonction anti-tumorale spécifique de la sous-population $T\delta 2+$ en comparaison aux $T\delta 2-$ suite à l'interaction avec les pDCs, complétant alors les données de la littérature décrivant les $T\delta 2+$ comme senseurs de cellules transformées.

Nous avons montré que les pDCs et $T\gamma\delta$ modulent l'expression des points de contrôle immunitaire du partenaire lors de ces interactions, et les matrices de corrélations entre points de contrôle immunitaire mettent en évidence des

associations de récepteurs différentes en fonction de la source des cellules entre les donneurs sains et les patients.

Nous avons également pu distinguer l'impact des pDCs sur les $T\gamma\delta$ et l'inverse, en fonction de leur voie de signalisation activée. Concernant l'activation des pDCs, les voies TLR7 et 9, respectivement impliquées dans les productions d'IFN α ou de TNF α , ainsi que l'induction d'une accumulation de PAgS dans les pDCs par le blocage de la voie mévalonate par le zolédronate mènent à une activation des $T\gamma\delta$ par des voies différentes. A l'inverse, l'identification des voies de stimulations différentes pour les $T\gamma\delta$ entre un apport d'IPP ou de HMB-PP ou une induction de l'accumulation de PAgS par le zolédronate mènent à des impacts différents sur les pDCs. La mise en évidence de l'induction des fonctions effectrices des $T\gamma\delta$ par les pDCs, ainsi que celles des pDCs par les $T\gamma\delta$ rend possible une exploitation de ces fonctions dans le développement de thérapies. La dysfonction des pDCs étant impliquée dans d'autres pathologies (188, 189), l'exploitation de ces interactions comme axe thérapeutique peut être ciblée au-delà des applications anti-tumorales.

Manipulations complémentaires :

Nous avons mis en évidence que les $T\gamma\delta$ en circulation ou infiltrant sont activés mais leurs fonctions sont modifiées en contexte de mélanome et notamment dans la nature des cytokines produites. Leur capacité à répondre aux stimulations est également altérée. Afin d'approfondir les études, nous pourrions réaliser des marquages intra-cellulaires de cytokines couplés à des marquages phénotypiques pour éventuellement identifier des sous populations cellulaires spécifiquement polarisées TH17 et voir si la production de ces cytokines est liée à un profil d'ICP particulier. En effet, l'identification de sous-populations $T\gamma\delta$ IL17+ et $T\gamma\delta$ IFN γ + infiltrant les tumeurs sont des valeurs pronostiques (173, 190). Nos analyses se sont portées sur les sous-populations T δ 2+ et T δ 2-, mais il serait intéressant de mieux caractériser les T δ 2- comprenant donc les T δ 1, δ 3 et δ 5 et d'étudier leurs profils TH1 ou TH17. En effet, les ratios $T\gamma\delta$ IL17+ vs $T\gamma\delta$ IFN γ + pourraient également être utilisés comme biomarqueurs et l'IL15 est de plus déjà testé pour verrouiller les $T\gamma\delta$ dans un mode producteur d'IFN γ .

Plus récemment, les sous-populations de cDC1 et cDC2 ont été caractérisées dans le mélanome et révèlent des fonctions et des interactions modifiées par le contexte tumoral(191). Il serait intéressant d'étudier les interactions de ces sous-types de DCs

avec les populations de $T\gamma\delta$. Des sous-populations de pDCs ont également été identifiées par l'expression différentielle de PDL1 et de CD80 en fonction d'un simple stimulus inné (188). La sous-population PDL1+ CD80- a un phénotype de cellule plasmocytoïde et est identifiée comme spécialisée dans la production d'IFN α ; les PDL1- CD80+ ont un phénotype de DC et promeuvent l'activation des cellules T vers une polarisation Th2 ; et enfin le sous type PDL1+ CD80+, qui a une morphologie intermédiaire et des fonctions innées et adaptatives. Les sous-populations de pDCs se différencient aussi par l'expression de CD2. Les découvertes montrant un rôle inhibiteur des pDCs exprimant PD-L1 contrastent avec les récentes études qui classent le sous-type de pDCs PDL1+ comme étant spécialisées dans la production d'interféron de type I, et retrouvées en grande quantité dans le sang et la peau de patients atteints de maladie auto-immune (188). Il serait intéressant dans nos études d'identifier quel(s) sous-type(s) de pDCs et de $T\gamma\delta$ interagissent et si ces interactions sont en lien avec une orientation particulière de réponse.

L'analyse d'un grand nombre de points de contrôle immunitaire nous a permis de mettre en évidence l'importance de l'impact des $T\gamma\delta$ sur les pDCs. En effet, certains ICP sont complètement abolis et on voit clairement que les $T\gamma\delta$ venant de contexte mélanome ne sont plus impactés par les stimulations et n'induisent plus d'expression d'ICP par les pDCs. Etudier les fréquences, les interactions de chacune de sous-populations de DCs avec les différentes populations de $T\gamma\delta$, et caractériser les fonctions induites par ces DCs ferait suite à notre travail.

NKG2D est un récepteur impliqué dans l'activation des $T\gamma\delta$ (133). Lors de nos études de cross-talk, nous avons observé que NKG2D intervient dans la régulation des $T\gamma\delta$ par les pDCs. Nous pourrions alors étudier aussi la régulation de l'expression de MICA/MICB par les pDCs en contexte sain et de mélanome et en fonction de la stimulation des TLR.

Enfin, il faudrait également montrer la dépendance directe du TCR $\gamma\delta$ dans ces interactions par l'utilisation d'anticorps bloquant ce TCR.

Dans le but de compléter ce travail, des analyses multiparamétriques comme tSNE permettraient une vue globale de l'ensemble des éléments étudiés. En effet, associer tous les facteurs analysés lors de la caractérisation d'effecteurs immunitaires en contexte sain et pathologique donnerait le résultat d'une balance de signaux caractérisant la réponse immunitaire.

- **BTN3A**

Un des points centraux de ce travail est l'étude de BTN3A. Nous avons mis en évidence pour la première fois son expression par les pDCs. Il est intéressant de pouvoir étudier son rôle dans l'interaction entre pDCs et $T\gamma\delta$ et dans un contexte tumoral. Nous avons montré que l'expression basale pour tous les sous-types de $T\gamma\delta$ est d'environ 70-80% et de 40% pour les pDCs. L'apport de PAgS n'induit pas de surexpression de BTN3A en surface de ces types cellulaires. Cependant l'interaction de BTN3A avec les PAgS est déterminante pour l'activation des $T\gamma\delta$, et les mécanismes de régulation et d'action de ce récepteur ne sont pas encore complètement élucidés. Notre travail a pu mettre en évidence la nécessité de l'engagement de BTN3A entre les pDCs et les $T\gamma\delta$ pour induire une activation, la fonctionnalité et la cytotoxicité de ces deux partenaires, et la découverte surprenante de la surexpression de cette molécule sur les pDCs et $T\gamma\delta$ venant de sang ou de tumeur de patients a levé plusieurs questionnements.

BTN3A regroupe trois isoformes différenciés majoritairement par leur partie intracellulaire. BTN3A1 et BTN3A3 possèdent le domaine de fixation des PAgS, B30.2, contrairement à BTN3A2. La liaison des PAgS dans ce domaine induit un changement de conformation de BTN3A1 vers une forme active. L'anticorps utilisé au cours de cette étude pour mettre en évidence l'expression de BTN3A, ne permet pas de distinguer les différents isoformes, et n'ayant pas observé de baisse d'expression de BTN3A chez les patients mais, à l'inverse et de façon surprenante, une hausse d'expression par rapport aux donneurs sains, nous pouvons émettre deux hypothèses :

- soit la proportion d'expression relative de chaque isoforme est modulée, BTN3A2 étant exprimée de manière majoritaire par rapport à BTN3A1 et BTN3A3, menant à l'insensibilité aux PAgS et au dysfonctionnement du cross-talk mais expliquant l'augmentation d'expression observée par marquage;
- soit l'isoforme BTN3A1 est toujours exprimée mais reste en conformation non active.

Nos analyses préliminaires de l'expression de chaque isoforme par RTqPCR ne permettent pas de conclure quant à un potentiel déséquilibre de production d'isoformes. En effet, nous observons une augmentation de la quantité d'ARNm

codant BTN3A2 mais seulement sur l'analyse de deux échantillons. Cette étude nécessite donc d'être complétée sur un plus grand nombre d'échantillons.

De plus, nous avons analysé l'expression de ces isoformes en partant de PBMCs totales, et il serait plus précis d'analyser l'expression de ces isoformes par les pDCs et les $T\gamma\delta$ individuellement. BTN3A est également exprimé par les cellules tumorales, comme il a été montré dans le cas de cancer pancréatique (192, 193) et il serait intéressant de compléter notre analyse par l'expression des isoformes de BTN3A par les cellules de mélanome. En effet, Le Page et ses collègues ont notamment montré que l'expression de BTN3A2 par les cellules épithéliales dans le cancer des ovaires était corrélée à une infiltration plus importante et un meilleur pronostic (194).

La famille des butyrophilines regroupe 3 gènes, BTN1, BTN2 et BTN3. Les gènes BTN2 possèdent également 3 isoformes comprenant 95% d'homologie intrafamille et 50% d'homologie avec la famille BTN3A. Une récente étude démontre que BTN2A1, une molécule distincte mais semblable à BTN3A1, s'associe à BTN3A1 et que la fixation du PAg à BTN3A1 remodelerait le complexe BTN2A1/BTN3A1 vers une conformation active (195), permettant l'activation du $TV\gamma9\delta2$ mesurable par une production cytokinique et une prolifération cellulaire (196). Une hypothèse sur l'accumulation de BTN3A en surface peut être un défaut d'expression de BTN2A donc une absence de formation de complexe, qui provoque l'accumulation de BTN3A en conformation non fonctionnelle en surface. Il serait alors intéressant de vérifier l'expression de BTN2A1 sur les $T\gamma\delta$ en contexte sain ou de mélanome et son rôle dans le fonctionnement des lymphocytes $T\gamma\delta$.

Les PAg se lient à la partie B30.2 du domaine intracellulaire de BTN3A1 pour induire une conformation active du récepteur. Une mutation de cette structure rend peut-être la liaison B30.2-PAg impossible. Les banques de données disponibles en ligne (TCGA) montrent que 5 à 10% des patients atteints de mélanome présentent des mutations de la partie intracellulaire de BTNA31, ce qui pourrait expliquer en partie le défaut d'activation des $T\gamma\delta$ et des $T\delta2+$ mais n'explique pas la surexpression du récepteur chez les patients et la non-fonctionnalité du cross-talk dans les 90 à 95% des cas restant.

En parallèle, de façon très intéressante, une étude montre que BTN3A1 est un régulateur de la voie de signalisation des interférons de type I. Son activité serait elle-même contrôlée par le régulateur amont MAP4 (Microtubule-Associated

Protein4). La déplétion d'une de ces deux molécules induirait une altération de la réponse IFN de type I cytosolique médiée par ARN ou ADN (197). Une étude de la corrélation entre expression de BTN3A1 par les pDCs et production d'IFN α en contexte sain et en contexte mélanome, sous stimulation ou non, serait intéressante. En effet, le défaut de réponse aux stimulations via TLR9 par les pDCs en contexte de cancer et la dysfonction de BTN3A sont peut-être liés.

Enfin, les formes solubles de BTN3A (sBTN3A) en grande quantité dans le plasma des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique, sont associées à une survie inférieure à six mois (198). Nous observons une tendance de corrélation positive entre l'expression de BTN3A sur les TIL et la survie. Il serait intéressant d'analyser les sBTN3A dans le plasma des patients mélanome et leur impact sur l'évolution clinique. Ils sont peut-être corrélés à la surexpression de BTN3A observée sur les pDCs et T $\gamma\delta$ en contexte de mélanome et pourraient être des marqueurs pronostiques potentiels.

Maissaia et ses collègues ont démontré que les DCs stimulées par du zolédronate relarguent de l'IPP dans le milieu extracellulaire via la cassette ABCA1 et ils établissent une association potentielle entre ABCA1, ApoA1 et BTN3A pour l'activation de T δ 2+(199). Vérifier ce mécanisme de présentation des PAgS par les pDCs et étudier l'impact potentiel de sBTN3A sur ce mécanisme permettrait de comprendre davantage le mécanisme d'activation des T δ 2+ par les IPP via les pDCs. BTN3A est impliqué dans l'activation spécifique des T δ 2+, dont le rôle majoritaire est l'élimination de cellules tumorales. L'étude de BTN2A et BTN3A en contexte de mélanome paraît nécessaire et vraiment prometteuse pour la compréhension des mécanismes de modulation des pDCs et des lymphocytes T $\gamma\delta$ par la tumeur et le développement d'immunothérapie.

- **Immuno-monitoring**

Les immunothérapies par inhibition de point de contrôle immunitaire utilisées aujourd'hui en clinique apportent un réel bénéfice pour 30 à 40% des patients. Cependant, la majeure partie des patients restent non-répondeurs face à ces thérapies, et de plus, les mécanismes d'actions de ces traitements ne sont pas connus. Nos résultats, ainsi que ceux trouvés dans la littérature actuelle, démontrent la grande variété d'interaction entre cellules du système immunitaire, dont

l'orientation des messages dépend de l'expression d'ICP, et de facteurs solubles. La meilleure caractérisation de chaque effecteur et des liens de communication entre eux est bénéfique pour une optimisation de l'usage des traitements. Parallèlement, notre équipe développe le projet de réaliser un immunomonitoring sur le sang de patients sous immunothérapies, afin de caractériser l'impact du traitement sur les effecteurs. Il permettrait une meilleure caractérisation des patients non-répondeurs et une prise en charge adaptée plus précoce. L'impact des traitements par inhibiteurs de points de contrôle immunitaire sur l'ensemble des effecteurs immunitaires n'a pas été évalué, et les mécanismes conduisant à une réponse du patient ne sont donc pas connus.

Une collaboration avec le CHU de Grenoble a permis d'initier un biobanking de prélèvements de sang de patients atteints de mélanome actuellement sous traitement immunosuppresseur (α PD1). Nous avons pu récolter ces échantillons avant le début du traitement et tout au long de celui-ci. Les études phénotypiques et fonctionnelles des cellules immunitaires, notamment des pDCs et $T\gamma\delta$ issues du sang de patients dans ce contexte, ont pour but d'identifier les impacts des traitements α PD1. Ces travaux de thèse ont apporté la connaissance de l'expression d'un grand nombre d'ICP par les lymphocytes $T\gamma\delta$, notamment PD1 ciblé actuellement en clinique par ces ICB. La réalisation de cet immunomonitoring permettrait de comprendre ces mécanismes et d'identifier les marqueurs prédictifs de réponse au traitement.

- **Exploitation thérapeutique des $T\gamma\delta$ en immunothérapie**

L'ensemble des études montrent l'influence des $T\gamma\delta$ de la tumeur et son environnement : en plus de vecteurs, ils peuvent aussi être cibles d'immunothérapie par ICB. Les pDCs, les $T\gamma\delta$ et la synergie des deux populations immunitaires à travers l'axe pDC/ $T\gamma\delta$ sont donc exploitables et prometteurs pour le développement d'immunothérapies, autant comme cibles que vecteurs. Ils sont notamment déjà testés en clinique.

Les $T\gamma\delta$ sont une population à exploiter comme cible (par ICP) ou vecteur d'immunothérapie (CAR-T ou TEG). La technologie CRISPR/ Cas9 pourrait contribuer à l'optimisation moléculaire des vecteurs et donc au développement du transfert adoptif de $T\gamma\delta$.

Au niveau cellulaire, les essais en cours sur le développement de transfert allogénique de T δ 2+ indiquent une bonne faisabilité avec des résultats thérapeutiques prometteurs, et des toxicités réduites. La stratégie globale de l'injection de T δ 2+ autologues présente de vrais avantages au point de vue sécuritaire. En effet, la non restriction au CMH permet d'éviter l'allo-reactivité ainsi que de contourner un des mécanismes d'évasion tumoral mais rend cette approche moins efficace aux cancers à fort taux de mutation. Cependant, l'efficacité clinique présente pour l'heure des succès modestes. L'optimisation de leur utilisation reste à effectuer pour améliorer significativement les bénéfices cliniques, et pour cela, le développement de modèle préclinique *in vivo* est nécessaire(150).

De manière générale, la complémentarité des approches thérapeutiques est un atout remarquable. Les traitements par inhibition de point de contrôle immunitaire sont les moins efficaces dans les traitements de cancers à faible taux de mutations (200), et l'injection de T δ 2+ autologues ou allogéniques pourrait donc être une bonne alternative.

Les lymphocytes T γ δ semblent être des cibles et des vecteurs d'immunothérapies prometteuses et adaptées. Le mélanome, de par sa forte immunogénicité, est un cas permettant le développement de thérapies utilisant les T γ δ comme vecteurs, ou l'axe pDC-T γ δ pour réactiver une réponse anti tumorale efficace.

Chapitre 7 : Conclusion

Ce travail apporte des données majeures dans la compréhension de l'échappement du mélanome au système immunitaire. Il renforce l'idée que les pDCs et les lymphocytes $T\gamma\delta$ ont une place non négligeable dans la réponse anti-tumorale et que leurs potentiels uniques sont à exploiter pour le développement de thérapies. Ils ont leur place dans la panoplie d'immunothérapies en développement et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Bibliographie

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(4):296-306.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2004;5(10):987-95.
4. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(6):469-78.
5. Kong BY, Bolton H, Kim JW, Silveira PA, Fromm PD, Clark GJ. On the Other Side: Manipulating the Immune Checkpoint Landscape of Dendritic Cells to Enhance Cancer Immunotherapy. *Front Oncol*. 2019;9:50.
6. Zhu Y, Yao S, Chen L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity*. 2011;34(4):466-78.
7. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
8. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(10):715-27.
9. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*. 2011;29:235-71.
10. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(3):899-910.
11. De Guillebon E, Dardenne A, Saldmann A, Segquier S, Tran T, Paolini L, et al. Beyond the concept of cold and hot tumors for the development of novel predictive biomarkers and the rational design of immunotherapy combination. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2020;147(6):1509-18.
12. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer cell*. 2005;8(4):299-309.
13. Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, et al. Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood*. 2010;115(7):1461-71.
14. Sennino B, McDonald DM. Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(10):699-709.
15. Mazziere R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Raghetti A, Berti A, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer cell*. 2011;19(4):512-26.
16. Giraud E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(5):623-33.

17. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
18. Galon J, Fridman WH, Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res*. 2007;67(5):1883-6.
19. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27-47.
20. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature medicine*. 2018;24(5):541-50.
21. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*. 2013;39(1):11-26.
22. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(35):5944-51.
23. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(6):610-8.
24. Teng X, Wei L, Han L, Min D, Du Y. Establishment of a serological molecular model for the early diagnosis and progression monitoring of bone metastasis in lung cancer. *BMC cancer*. 2020;20(1):562.
25. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
26. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buque A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 2014;5(24):12472-508.
27. Ascierto PA, Palmieri G, Gogas H. What is changing in the adjuvant treatment of melanoma? *Oncotarget*. 2017;8(67):110735-6.
28. Smyth MJ, Yagita H, McArthur GA. Combination Anti-CTLA-4 and Anti-RANKL in Metastatic Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(12):e104-6.
29. Tray N, Weber JS, Adams S. Predictive Biomarkers for Checkpoint Immunotherapy: Current Status and Challenges for Clinical Application. *Cancer immunology research*. 2018;6(10):1122-8.
30. Saxena M, Bhardwaj N. Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment. *Trends in cancer*. 2018;4(2):119-37.
31. Garg AD, Coulie PG, Van den Eynde BJ, Agostinis P. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends in immunology*. 2017;38(8):577-93.
32. Vyborova A, Beringer DX, Fasci D, Karaiskaki F, van Diest E, Kramer L, et al. gamma9delta2T cell diversity and the receptor interface with tumor cells. *The Journal of clinical investigation*. 2020;130(9):4637-51.
33. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(6):1161-71.
34. Elwood JM. Melanoma and sun exposure. *Semin Oncol*. 1996;23(6):650-66.

35. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014;28(6):1005-11.
36. Stern RS, Study PFu. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001;44(5):755-61.
37. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*. 2014;15(3):323-32.
38. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
39. Eggermont A, Robert C, Soria JC, Zitvogel L. Harnessing the immune system to provide long-term survival in patients with melanoma and other solid tumors. *Oncoimmunology*. 2014;3(1):e27560.
40. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
41. Monti M, Consoli F, Vescovi R, Bugatti M, Vermi W. Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Cutaneous Melanoma. *Cells*. 2020;9(2).
42. Curry JL, Tetzlaff MT, Nagarajan P, Drucker C, Diab A, Hymes SR, et al. Diverse types of dermatologic toxicities from immune checkpoint blockade therapy. *J Cutan Pathol*. 2017;44(2):158-76.
43. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017;545(7653):175-80.
44. Smylie MG. Use of immuno-oncology in melanoma. *Curr Oncol*. 2020;27(Suppl 2):S51-S8.
45. Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, et al. Next generation of immunotherapy for melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(20):3445-55.
46. Young A, Ngiow SF, Madore J, Reinhardt J, Landsberg J, Chitsazan A, et al. Targeting Adenosine in BRAF-Mutant Melanoma Reduces Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res*. 2017;77(17):4684-96.
47. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol*. 2017;18(3):e143-e52.
48. Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(8):473-86.
49. Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2019;20(9):1239-51.
50. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2019;381(16):1535-46.
51. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2017;377(19):1824-35.

52. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2018;378(19):1789-801.
53. Forsberg EMV, Lindberg MF, Jespersen H, Alsen S, Bagge RO, Donia M, et al. HER2 CAR-T Cells Eradicate Uveal Melanoma and T-cell Therapy-Resistant Human Melanoma in IL2 Transgenic NOD/SCID IL2 Receptor Knockout Mice. *Cancer Res*. 2019;79(5):899-904.
54. Warming "Cold" Melanoma with TLR9 Agonists. *Cancer Discov*. 2018;8(6):670.
55. Koster BD, de Jong TD, van den Hout M, Sluijter BJR, Vuylsteke R, Molenkamp BG, et al. In the mix: the potential benefits of adding GM-CSF to CpG-B in the local treatment of patients with early-stage melanoma. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1708066.
56. Pashenkov M, Goess G, Wagner C, Hormann M, Jandl T, Moser A, et al. Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(36):5716-24.
57. Teulings HE, Tjin EPM, Willemsen KJ, van der Kleij S, Ter Meulen S, Kemp EH, et al. Anti-Melanoma immunity and local regression of cutaneous metastases in melanoma patients treated with monobenzone and imiquimod; a phase 2 a trial. *Oncoimmunology*. 2018;7(4):e1419113.
58. Demaria O, De Gassart A, Coso S, Gestermann N, Di Domizio J, Flatz L, et al. STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(50):15408-13.
59. Marloye M, Lawler SE, Berger G. Current patent and clinical status of stimulator of interferon genes (STING) agonists for cancer immunotherapy. *Pharm Pat Anal*. 2019;8(4):87-90.
60. Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B, Kroemer G. Microbiome and Anticancer Immunosurveillance. *Cell*. 2016;165(2):276-87.
61. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1368-79.
62. Tomela K, Pietrzak B, Schmidt M, Mackiewicz A. The Tumor and Host Immune Signature, and the Gut Microbiota as Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor Response in Melanoma Patients. *Life (Basel)*. 2020;10(10).
63. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(25):2780-8.
64. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of novel therapies. *Eur J Cancer*. 2016;53:125-34.
65. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo AM, Mortier L, et al. Five-Year Outcomes With Nivolumab in Patients With Wild-Type BRAF Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020:JCO2000995.
66. Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell

- responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(5):823-30.
67. Mitchell D, Chintala S, Dey M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *J Neuroimmunol*. 2018;322:63-73.
68. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(8):471-85.
69. Geginat J, Nizzoli G, Paroni M, Maglie S, Larghi P, Pascolo S, et al. Immunity to Pathogens Taught by Specialized Human Dendritic Cell Subsets. *Frontiers in immunology*. 2015;6:527.
70. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(1):155-62.
71. Schulz D, Schwalb B, Kiesel A, Baejen C, Torkler P, Gagneur J, et al. Transcriptome surveillance by selective termination of noncoding RNA synthesis. *Cell*. 2013;155(5):1075-87.
72. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2003;170(9):4465-74.
73. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2008;29(3):352-61.
74. Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *The Journal of pathology*. 2003;200(2):255-68.
75. Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *European journal of immunology*. 2003;33(4):1052-62.
76. Aspod C, Leccia MT, Charles J, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells support melanoma progression by promoting Th2 and regulatory immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer immunology research*. 2013;1(6):402-15.
77. Perrot I, Blanchard D, Freymond N, Isaac S, Guibert B, Pacheco Y, et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol*. 2007;178(5):2763-9.
78. Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, et al. Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(21):7260-9.
79. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity*. 2019;50(1):37-50.
80. Conrad C, Gregorio J, Wang YH, Ito T, Meller S, Hanabuchi S, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res*. 2012;72(20):5240-9.
81. Labidi-Galy SI, Treilleux I, Goddard-Leon S, Combes JD, Blay JY, Ray-Coquard I, et al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncoimmunology*. 2012;1(3):380-2.

82. Monti M, Vescovi R, Consoli F, Farina D, Moratto D, Berruti A, et al. Plasmacytoid Dendritic Cell Impairment in Metastatic Melanoma by Lactic Acidosis. *Cancers*. 2020;12(8).
83. Gai XD, Song Y, Li C, Lei YM, Yang B. Potential role of plasmacytoid dendritic cells for FOXP3+ regulatory T cell development in human colorectal cancer and tumor draining lymph node. *Pathol Res Pract*. 2013;209(12):774-8.
84. Schultz DJ, Muluhngwi P, Alizadeh-Rad N, Green MA, Rouchka EC, Waigel SJ, et al. Genome-wide miRNA response to anacardic acid in breast cancer cells. *PLoS one*. 2017;12(9):e0184471.
85. Sisirak V, Faget J, Gobert M, Goutagny N, Vey N, Treilleux I, et al. Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res*. 2012;72(20):5188-97.
86. Sisirak V, Faget J, Vey N, Blay JY, Menetrier-Caux C, Caux C, et al. Plasmacytoid dendritic cells deficient in IFNalpha production promote the amplification of FOXP3 regulatory T cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(1):e22338.
87. Koucky V, Boucek J, Fialova A. Immunology of Plasmacytoid Dendritic Cells in Solid Tumors: A Brief Review. *Cancers*. 2019;11(4).
88. Kalb ML, Glaser A, Stary G, Koszik F, Stingl G. TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN-alpha-mediated antitumor reactivity. *J Immunol*. 2012;188(4):1583-91.
89. Wu J, Li S, Yang Y, Zhu S, Zhang M, Qiao Y, et al. TLR-activated plasmacytoid dendritic cells inhibit breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(7):11708-18.
90. Le Mercier I, Poujol D, Sanlaville A, Sisirak V, Gobert M, Durand I, et al. Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res*. 2013;73(15):4629-40.
91. Liu C, Lou Y, Lizee G, Qin H, Liu S, Rabinovich B, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(3):1165-75.
92. Palamara F, Meindl S, Holcman M, Luhrs P, Stingl G, Sibilio M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol*. 2004;173(5):3051-61.
93. Molenkamp BG, Sluiter BJ, van Leeuwen PA, Santegoets SJ, Meijer S, Wijnands PG, et al. Local administration of PF-3512676 CpG-B instigates tumor-specific CD8+ T-cell reactivity in melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(14):4532-42.
94. Aspod C, Leccia MT, Charles J, Plumas J. Melanoma hijacks plasmacytoid dendritic cells to promote its own progression. *Oncoimmunology*. 2014;3(1):e27402.
95. Gerlini G, Urso C, Mariotti G, Di Gennaro P, Palli D, Brandani P, et al. Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol*. 2007;125(2):184-93.
96. Charles J, Di Domizio J, Salameire D, Bendriss-Vermare N, Aspod C, Muhammad R, et al. Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(6):1646-56.

97. Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ, Donskov F, Hoyer M, Sjoegren P, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer*. 2012;118(9):2476-85.
98. Chevolet I, Speeckaert R, Schreuer M, Neyns B, Krysko O, Bachert C, et al. Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma. *J Transl Med*. 2015;13:9.
99. Vescovi R, Monti M, Moratto D, Paolini L, Consoli F, Benerini L, et al. Collapse of the Plasmacytoid Dendritic Cell Compartment in Advanced Cutaneous Melanomas by Components of the Tumor Cell Secretome. *Cancer immunology research*. 2019;7(1):12-28.
100. Dabrosin N, Sloth Juul K, Baehr Georgsen J, Andrup S, Schmidt H, Steiniche T, et al. Innate immune cell infiltration in melanoma metastases affects survival and is associated with BRAFV600E mutation status. *Melanoma Res*. 2019;29(1):30-7.
101. Tel J, van der Leun AM, Figdor CG, Torensma R, de Vries IJ. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(8):1279-88.
102. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu CI, Glaser C, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol*. 2009;182(11):6815-23.
103. Drobits B, Holcmann M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(2):575-85.
104. Molenkamp BG, van Leeuwen PA, Meijer S, Sluijter BJ, Wijnands PG, Baars A, et al. Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(10):2961-9.
105. Tel J, Aarntzen EH, Baba T, Schreibelt G, Schulte BM, Benitez-Ribas D, et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res*. 2013;73(3):1063-75.
106. Aspod C, Leccia MT, Salameire D, Laurin D, Chaperot L, Charles J, et al. HLA-A(*)0201(+) plasmacytoid dendritic cells provide a cell-based immunotherapy for melanoma patients. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(10):2395-406.
107. Aspod C, Charles J, Leccia MT, Laurin D, Richard MJ, Chaperot L, et al. A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *PloS one*. 2010;5(5):e10458.
108. Charles J, Chaperot L, Revol B, Baudin M, Mouret S, Hamon A, et al. The avidity of tumor-specific T cells amplified by a plasmacytoid dendritic cell-based assay can predict the clinical evolution of melanoma patients. *Pigment cell & melanoma research*. 2018;31(1):82-94.
109. Charles J, Chaperot L, Hannani D, Bruder Costa J, Templier I, Trabelsi S, et al. An innovative plasmacytoid dendritic cell line-based cancer vaccine primes and expands antitumor T-cells in melanoma patients in a first-in-human trial. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1738812.
110. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, et al. Clonal selection in the human Vdelta1 T cell repertoire indicates gammadelta TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nature communications*. 2017;8:14760.

111. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(2):88-100.
112. Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta (gammadelta) T cells: friend or foe in cancer development? *J Transl Med*. 2018;16(1):3.
113. Xu D, Rivas-Bascon N, Padial NM, Knouse KW, Zheng B, Vantourout JC, et al. Enantiodivergent Formation of C-P Bonds: Synthesis of P-Chiral Phosphines and Methylphosphonate Oligonucleotides. *J Am Chem Soc*. 2020;142(12):5785-92.
114. Hayday AC. gammadelta T Cell Update: Adaptate Orchestrators of Immune Surveillance. *J Immunol*. 2019;203(2):311-20.
115. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):467-78.
116. Boutin L, Scotet E. Towards Deciphering the Hidden Mechanisms That Contribute to the Antigenic Activation Process of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Frontiers in immunology*. 2018;9:828.
117. Sebestyen Z, Prinz I, Dechanet-Merville J, Silva-Santos B, Kuball J. Translating gammadelta (gammadelta) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(3):169-84.
118. Kabelitz D, Glatzel A, Wesch D. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *International archives of allergy and immunology*. 2000;122(1):1-7.
119. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature*. 2001;411(6839):820-4.
120. Chien YH, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunological reviews*. 2007;215:46-58.
121. Kazen AR, Adams EJ. Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(29):E332-40.
122. Vermijlen D, Gatti D, Kouzeli A, Rus T, Eberl M. gammadelta T cell responses: How many ligands will it take till we know? *Seminars in cell & developmental biology*. 2018;84:75-86.
123. Willcox BE, Mohammed F, Willcox CR. gammadelta TCR Recognition of MR1: Adapting to Life on the Flip Side. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(7):551-3.
124. Le Bourhis L, Martin E, Peguillet I, Guihot A, Froux N, Core M, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nature immunology*. 2010;11(8):701-8.
125. Ioannidis M, Cerundolo V, Salio M. The Immune Modulating Properties of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1556.
126. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*. 1994;264(5156):267-70.
127. Harly C, Peigne CM, Scotet E. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Frontiers in immunology*. 2014;5:657.
128. Pauza CD, Cairo C. Evolution and function of the TCR Vgamma9 chain repertoire: It's good to be public. *Cell Immunol*. 2015;296(1):22-30.
129. Arnett HA, Viney JL. Immune modulation by butyrophilins. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(8):559-69.

130. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigne CM, Monkkonen H, Monkkonen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood*. 2012;120(11):2269-79.
131. Blazquez JL, Benyamine A, Pasero C, Olive D. New Insights Into the Regulation of gammadelta T Cells by BTN3A and Other BTN/BTNL in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1601.
132. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity*. 2009;31(2):184-96.
133. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol*. 2005;175(4):2144-51.
134. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. gammadelta T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2019;19(7):392-404.
135. Riond J, Rodriguez S, Nicolau ML, al Saati T, Gairin JE. In vivo major histocompatibility complex class I (MHCI) expression on MHCIIlow tumor cells is regulated by gammadelta T and NK cells during the early steps of tumor growth. *Cancer Immun*. 2009;9:10.
136. Altvater B, Pscherer S, Landmeier S, Kailayangiri S, Savoldo B, Juergens H, et al. Activated human gammadelta T cells induce peptide-specific CD8+ T-cell responses to tumor-associated self-antigens. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(3):385-96.
137. Daley D, Zambirinis CP, Seifert L, Akkad N, Mohan N, Werba G, et al. gammadelta T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining alphabeta T Cell Activation. *Cell*. 2016;166(6):1485-99 e15.
138. Yazdi AS, Morstedt K, Puchta U, Ghoreschi K, Flaig MJ, Rocken M, et al. Heterogeneity of T-cell clones infiltrating primary malignant melanomas. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(2):393-8.
139. Cordova A, Toia F, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Rinaldi G, et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PloS one*. 2012;7(11):e49878.
140. Wistuba-Hamprecht K, Di Benedetto S, Schilling B, Sucker A, Schadendorf D, Garbe C, et al. Phenotypic characterization and prognostic impact of circulating gammadelta and alphabeta T-cells in metastatic malignant melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2016;138(3):698-704.
141. Laggner U, Lopez JS, Perera G, Warbey VS, Sita-Lumsden A, O'Doherty MJ, et al. Regression of melanoma metastases following treatment with the n-bisphosphonate zoledronate and localised radiotherapy. *Clin Immunol*. 2009;131(3):367-73.
142. Argentati K, Re F, Serresi S, Tucci MG, Bartozzi B, Bernardini G, et al. Reduced number and impaired function of circulating gamma delta T cells in patients with cutaneous primary melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(5):829-34.
143. Petrini I, Pacini S, Galimberti S, Taddei MR, Romanini A, Petrini M. Impaired function of gamma-delta lymphocytes in melanoma patients. *European journal of clinical investigation*. 2011;41(11):1186-94.
144. Rei M, Pennington DJ, Silva-Santos B. The emerging Protumor role of gammadelta T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2015;75(5):798-802.

145. Re F, Donnini A, Bartozzi B, Bernardini G, Provinciali M. Circulating gammadelta T cells in young/adult and old patients with cutaneous primary melanoma. *Immunity & ageing : I & A*. 2005;2(1):2.
146. Toia F, Buccheri S, Anfosso A, Moschella F, Dieli F, Meraviglia S, et al. Skewed Differentiation of Circulating Vgamma9Vdelta2 T Lymphocytes in Melanoma and Impact on Clinical Outcome. *PLoS one*. 2016;11(2):e0149570.
147. Campillo JA, Martinez-Escribano JA, Minguela A, Lopez-Alvarez R, Marin LA, Garcia-Alonso AM, et al. Increased number of cytotoxic CD3+ CD28- gammadelta T cells in peripheral blood of patients with cutaneous malignant melanoma. *Dermatology*. 2007;214(4):283-8.
148. Rafia C, Harly C, Scotet E. Beyond CAR T cells: Engineered Vgamma9Vdelta2 T cells to fight solid tumors. *Immunological reviews*. 2020.
149. de Bruin RC, Stam AG, Vangone A, van Bergen En Henegouwen PM, Verheul HM, Sebestyen Z, et al. Prevention of Vgamma9Vdelta2 T Cell Activation by a Vgamma9Vdelta2 TCR Nanobody. *J Immunol*. 2017;198(1):308-17.
150. Joalland N, Scotet E. Emerging Challenges of Preclinical Models of Anti-tumor Immunotherapeutic Strategies Utilizing Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Frontiers in immunology*. 2020;11:992.
151. Zumwalde NA, Sharma A, Xu X, Ma S, Schneider CL, Romero-Masters JC, et al. Adoptively transferred Vgamma9Vdelta2 T cells show potent antitumor effects in a preclinical B cell lymphomagenesis model. *JCI Insight*. 2017;2(13).
152. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Haehnel K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, et al. Proportions of blood-borne Vdelta1+ and Vdelta2+ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer*. 2016;64:116-26.
153. Rozenbaum M, Meir A, Aharony Y, Itzhaki O, Schachter J, Bank I, et al. Gamma-Delta CAR-T Cells Show CAR-Directed and Independent Activity Against Leukemia. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1347.
154. Fiore F, Castella B, Nuschak B, Bertieri R, Mariani S, Bruno B, et al. Enhanced ability of dendritic cells to stimulate innate and adaptive immunity on short-term incubation with zoledronic acid. *Blood*. 2007;110(3):921-7.
155. Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier JF, Scotet E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol*. 2005;175(8):5481-8.
156. Conti L, Casetti R, Cardone M, Varano B, Martino A, Belardelli F, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol*. 2005;174(1):252-60.
157. von Lilienfeld-Toal M, Sievers E, Bodemuller V, Mihailescu C, Marten A, Gorschluter M, et al. Coculture with dendritic cells promotes proliferation but not cytotoxic activity of gamma/delta T cells. *Immunology letters*. 2005;99(1):103-8.
158. Devilder MC, Maillet S, Bouyge-Moreau I, Donnadieu E, Bonneville M, Scotet E. Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol*. 2006;176(3):1386-93.
159. Dunne MR, Madrigal-Estebas L, Tobin LM, Doherty DG. (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2 enyl pyrophosphate-stimulated Vgamma9Vdelta2 T cells possess T helper type 1-promoting adjuvant activity for human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2010;59(7):1109-20.

160. Gruenbacher G, Gander H, Rahm A, Nussbaumer W, Romani N, Thurnher M. CD56+ human blood dendritic cells effectively promote TH1-type gammadelta T-cell responses. *Blood*. 2009;114(20):4422-31.
161. Devilder MC, Allain S, Dousset C, Bonneville M, Scotet E. Early triggering of exclusive IFN-gamma responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2009;183(6):3625-33.
162. Castella B, Kopecka J, Sciancalepore P, Mandili G, Foglietta M, Mitro N, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 regulates phosphoantigen release and Vgamma9Vdelta2 T cell activation by dendritic cells. *Nature communications*. 2017;8:15663.
163. Ismaili J, Olislagers V, Poupot R, Fournie JJ, Goldman M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol*. 2002;103(3 Pt 1):296-302.
164. Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, Das H, Sugita M, Morita CT, et al. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(12):1575-84.
165. Sacchi A, Rinaldi A, Tumino N, Casetti R, Agrati C, Turchi F, et al. HIV infection of monocytes-derived dendritic cells inhibits Vgamma9Vdelta2 T cells functions. *PloS one*. 2014;9(10):e111095.
166. Cabillic F, Toutirais O, Lavoue V, de La Pintiere CT, Daniel P, Rioux-Leclerc N, et al. Aminobisphosphonate-pretreated dendritic cells trigger successful Vgamma9Vdelta2 T cell amplification for immunotherapy in advanced cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2010;59(11):1611-9.
167. Castella B, Riganti C, Fiore F, Pantaleoni F, Canepari ME, Peola S, et al. Immune modulation by zoledronic acid in human myeloma: an advantageous cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T cells, alphabeta CD8+ T cells, regulatory T cells, and dendritic cells. *J Immunol*. 2011;187(4):1578-90.
168. Van Acker HH, Anguille S, Van Tendeloo VF, Lion E. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2015;4(8):e1021538.
169. Fang H, Welte T, Zheng X, Chang GJ, Holbrook MR, Soong L, et al. gammadelta T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2010;59(1):71-80.
170. Marlin R, Pappalardo A, Kaminski H, Willcox CR, Pitard V, Netzer S, et al. Sensing of cell stress by human gammadelta TCR-dependent recognition of annexin A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(12):3163-8.
171. Fleming C, Cai Y, Sun X, Jala VR, Xue F, Morrissey S, et al. Microbiota-activated CD103(+) DCs stemming from microbiota adaptation specifically drive gammadeltaT17 proliferation and activation. *Microbiome*. 2017;5(1):46.
172. Peng G, Wang HY, Peng W, Kiniwa Y, Seo KH, Wang RF. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity*. 2007;27(2):334-48.
173. Lo Presti E, Caccamo N, Orlando V, Dieli F, Meraviglia S. Activation and selective IL-17 response of human Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes by TLR-activated plasmacytoid dendritic cells. *Oncotarget*. 2016;7(38):60896-905.
174. van Beek JJP, Florez-Grau G, Gorris MAJ, Mathan TSM, Schreiber G, Bol KF, et al. Human pDCs Are Superior to cDC2s in Attracting Cytolytic Lymphocytes in Melanoma Patients Receiving DC Vaccination. *Cell reports*. 2020;30(4):1027-38 e4.

175. Cimini E, Bonnafous C, Bordoni V, Lalle E, Sicard H, Sacchi A, et al. Interferon-alpha improves phosphoantigen-induced Vgamma9Vdelta2 T-cells interferon-gamma production during chronic HCV infection. *PloS one*. 2012;7(5):e37014.
176. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature medicine*. 2015;21(8):938-45.
177. Khair DO, Bax HJ, Mele S, Crescioli S, Pellizzari G, Khiabany A, et al. Combining Immune Checkpoint Inhibitors: Established and Emerging Targets and Strategies to Improve Outcomes in Melanoma. *Frontiers in immunology*. 2019;10:453.
178. Schnell A, Bod L, Madi A, Kuchroo VK. The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. *Cell research*. 2020;30(4):285-99.
179. Shemesh A, Brusilovsky M, Kundu K, Ottolenghi A, Campbell KS, Porgador A. Splice variants of human natural cytotoxicity receptors: novel innate immune checkpoints. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2017.
180. Shemesh A, Kundu K, Peleg R, Yossef R, Kaplanov I, Ghosh S, et al. NKp44-Derived Peptide Binds Proliferating Cell Nuclear Antigen and Mediates Tumor Cell Death. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1114.
181. Pazina T, Shemesh A, Brusilovsky M, Porgador A, Campbell KS. Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Frontiers in immunology*. 2017;8:369.
182. Semeraro M, Rusakiewicz S, Minard-Colin V, Delahaye NF, Enot D, Vely F, et al. Clinical impact of the NKp30/B7-H6 axis in high-risk neuroblastoma patients. *Sci Transl Med*. 2015;7(283):283ra55.
183. Almeida AR, Correia DV, Fernandes-Platzgummer A, da Silva CL, da Silva MG, Anjos DR, et al. Delta One T Cells for Immunotherapy of Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical-Grade Expansion/Differentiation and Preclinical Proof of Concept. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(23):5795-804.
184. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, Nishikawa H, Ohkuri T, Chamoto K, et al. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *European journal of immunology*. 2010;40(7):1927-37.
185. Sebestyen Z, Scheper W, Vyborova A, Gu S, Rychnavska Z, Schiffler M, et al. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by Vgamma9Vdelta2 T Cell Receptor. *Cell reports*. 2016;15(9):1973-85.
186. Jin C, Lagoudas GK, Zhao C, Bullman S, Bhutkar A, Hu B, et al. Commensal Microbiota Promote Lung Cancer Development via gammadelta T Cells. *Cell*. 2019;176(5):998-1013 e16.
187. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillere R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018;359(6371):91-7.
188. Alculumbre S, Raieli S, Hoffmann C, Chelbi R, Danlos FX, Soumelis V. Plasmacytoid pre-dendritic cells (pDC): from molecular pathways to function and disease association. *Seminars in cell & developmental biology*. 2019;86:24-35.
189. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology*. 2011;29:163-83.

190. Patil RS, Shah SU, Shrikhande SV, Goel M, Dikshit RP, Chiplunkar SV. IL17 producing gammadeltaT cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2016;139(4):869-81.
191. Sosa Cuevas E, Ouaguia L, Mouret S, Charles J, De Fraipont F, Manches O, et al. BDCA1(+) cDC2s, BDCA2(+) pDCs and BDCA3(+) cDC1s reveal distinct pathophysiologic features and impact on clinical outcomes in melanoma patients. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(11):e1190.
192. Benyamine A, Loncle C, Foucher E, Blazquez JL, Castanier C, Chretien AS, et al. BTN3A is a prognosis marker and a promising target for Vgamma9Vdelta2 T cells based-immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Oncoimmunology*. 2017;7(1):e1372080.
193. Benyamine A, Le Roy A, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Castanier C, Orlanducci F, et al. BTN3A molecules considerably improve Vgamma9Vdelta2T cells-based immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology*. 2016;5(10):e1146843.
194. Le Page C, Marineau A, Bonza PK, Rahimi K, Cyr L, Labouba I, et al. BTN3A2 expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor infiltrating T cells and a better prognosis. *PloS one*. 2012;7(6):e38541.
195. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by gammadelta T cells. *Science*. 2020;367(6478).
196. Messal N, Mamessier E, Sylvain A, Celis-Gutierrez J, Thibult ML, Chetaille B, et al. Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells. *European journal of immunology*. 2011;41(12):3443-54.
197. Seo M, Lee SO, Kim JH, Hong Y, Kim S, Kim Y, et al. MAP4-regulated dynein-dependent trafficking of BTN3A1 controls the TBK1-IRF3 signaling axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(50):14390-5.
198. Bian B, Fanale D, Dusetti N, Roque J, Pastor S, Chretien AS, et al. Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2019;8(4):e1561120.
199. Riganti C, Castella B, Massaia M. ABCA1, apoA-I, and BTN3A1: A Legitimate Menage a Trois in Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1246.
200. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348(6230):69-74.