



HAL
open science

Caractérisation d'une sous-population de LT $\gamma\delta$ régulateurs dans les cancers solides humains

Ghita Chabab

► **To cite this version:**

Ghita Chabab. Caractérisation d'une sous-population de LT $\gamma\delta$ régulateurs dans les cancers solides humains. Médecine humaine et pathologie. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT067 . tel-04507466

HAL Id: tel-04507466

<https://theses.hal.science/tel-04507466>

Submitted on 16 Mar 2024

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'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche INSERM 1194, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM)

Caractérisation d'une sous-population de LT $\gamma\delta$ régulateurs dans les cancers solides humains

Présentée par Ghita CHABAB

Le 16 Novembre 2022

Sous la direction du Dr Virginie LAFONT

Devant le jury composé de

Prof. William Jacot, PR, Institut du Cancer de Montpellier

Dr Julie Déchanet-Merville, DR, ImmunoConcEpT, CNRS UMR 5164

Dr Emmanuel Scotet, DR, CRCI2NA, INSERM UMR1307 / CNRS UMR6075

Dr Valérie Dardalhon, CR, IGMM, CNRS UMR5535

Dr Virginie Lafont, CR, IRCM, Inserm U1994, ICM, UM

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Invitée

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Table des matières

Remerciements	5
Résumé	8
Summary	9
Liste des abréviations	10
Liste des figures et des tables	13
Introduction	15
Chapitre 1 : Le cancer	17
1.1 Généralités	17
1.1.1 Epidémiologie	17
1.1.2 Facteurs de risques	19
1.2 Biologie du cancer	20
1.2.1 La cellule tumorale	20
1.2.2 Le microenvironnement tumoral	22
Chapitre 2 : Rôle du système immunitaire dans les tumeurs	27
2.1 Immunosurveillance, immunoéditing et échappement	27
2.1.1 Phase d'élimination	28
2.1.2 Phase d'équilibre	30
2.1.3 Phase d'échappement	31
2.2 Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale	33
2.2.1 Cellules dendritiques	33
2.2.2 Cellules <i>Natural Killers</i> (NK)	34
2.2.3 Macrophages M1	36
2.2.4 Neutrophiles N1	37
2.2.5 Lymphocytes B	38
2.2.6 Lymphocytes T CD4	40

2.2.7	Lymphocytes T CD8	42
2.3	Les acteurs de la réponse immunitaire pro-tumorale.....	43
2.3.1	Cellules myéloïdes suppressives	43
2.3.2	Lymphocytes T CD4 pro-tumoraux.....	45
2.3.3	Lymphocytes B régulateurs	46
2.3.4	Cellules dendritiques plasmacytoïdes et moDC pro-tumoraux	48
2.3.5	Macrophages M2	48
2.3.6	Molécules immunosuppressives	49
2.3.7	Points de contrôles immunitaires	52
Chapitre 3 : Les lymphocytes T $\gamma\delta$		57
3.1	Développement des LT $\gamma\delta$	57
3.2	Activation TCR spécifique des LT $\gamma\delta$	60
3.2.1	Molécules activant les LT V γ 9V δ 2 via le TCR	60
3.2.2	Molécules activant les nonV δ 2 via leur TCR	64
3.3	Autres récepteurs et voies d'activation des LT $\gamma\delta$	66
3.4.1	Les récepteurs de type NK (NKR)	66
3.4.2	Les Toll-like receptors (TLR)	66
3.4.3	Les récepteurs aux cytokines	67
3.4	Implication des LT $\gamma\delta$ dans la réponse immunitaire aux tumeurs	68
3.4.1	Rôle anti-tumoral des LT $\gamma\delta$	68
3.4.2	Utilisation des LT $\gamma\delta$ en immunothérapie	73
3.4.3	Rôle pro-tumoral des LT $\gamma\delta$	82
Rationnel et objectifs des travaux de thèse		89
Résultats		93
Chapitre 1 : Identification d'une population de LT V δ 1 régulateurs		95
1.1	Résumé des travaux.....	95

1.2	Publication	97
1.3	Résultats complémentaires : Analyse du phénotype et des fonctions biologiques des LT $\gamma\delta$ CD73+ et CD73- infiltrant les tumeurs	115
1.4	Conclusion	119
Chapitre 2 : Étude de l'infiltrat $\gamma\delta$ dans divers cancers solides humains.....		121
2.1	Résumé des travaux.....	121
2.2	Publication	123
2.1	Conclusion	147
Chapitre 3 : Etude du rôle et de l'écosystème des LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux dans les cancers ovariens humains.....		149
	Introduction.....	151
	Materials and methods.....	153
	Results.....	157
	Discussion	161
	Bibliography.....	164
	Figures and legends	169
	Supplemental materials.....	177
	Discussion.....	189
	Bibliographie.....	201
	Annexes.....	227
	Annexe1.....	229
	Annexe2.....	239
	Annexe3.....	251

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie le Dr Julie Dechanet et le Dr Emmanuel Scotet d'avoir bien voulu prendre le temps de lire mon manuscrit et d'évaluer mes travaux. Je remercie également le Pr William Jacot d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens aussi à remercier infiniment les membres de mon comité de thèse, le Dr Jean-Jacques Fournié et le Dr Valérie Dardalhon pour avoir suivi mon travail scientifique durant ces 4 années de thèse, de m'avoir conseillé et guidé. Valérie, je tiens à vous remercier tout particulièrement pour toute la bienveillance et la gentillesse dont vous avez fait preuve durant les années où on a pu échanger ensemble. Vos précieux conseils m'ont énormément aidé. Merci d'avoir accepté de venir à ma soutenance de thèse et de terminer cette aventure avec moi.

A la team immunité et cancer + Orega + CIM, merci ! Vous avez tous été extrêmement gentils, avenants, d'une aide précieuse et indispensable. J'ai commencé à écrire des remerciements individuels, mais c'était impossible de tout écrire sans oublier la moitié des choses pour lesquelles je vous suis reconnaissante. Alors je vous dis à tous : MERCI ! Nathalie, HAlex, Cécile, Yaël, Anne-Sophie, Laure-Agnès, Julien, Laurent, Aurélie, Juliette, Claire, à vous tous merci. Les discussions professionnelles ou personnelles qu'on a pu avoir ont beaucoup compté pour moi. Merci d'avoir fait de ces années de belles années. Il y'a toujours des hauts et des bas pendant une thèse, mais les bons souvenirs prennent largement le dessus et c'est grâce à vous tous. Merci pour les échanges, les conseils, les fous rires et les repas partagés...

Merci aussi à tous les chercheurs de l'institut avec qui j'ai pu échanger pendant ma thèse et qui m'ont tous aidé à avancer à un moment ou à un autre pendant ma thèse. Je pense surtout à toi Florence. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as consacré et pour tous tes conseils avisés. J'ai adoré travailler avec toi.

Virginie, je ne peux pas écrire les remerciements et ne pas te dédier un paragraphe spécial (j'ai déjà les larmes aux yeux ^^). Déjà en stage de M1, Clément et toi avaient été incroyable. Vous m'avez donné l'opportunité de travailler avec vous alors que je n'avais aucune expérience. Vous m'avez fait confiance et m'avez fait découvrir le monde merveilleux et mystérieux des LT gamma delta. Je me souviens encore de ma joie quand tu as accepté que je

revienne en thèse pour travailler avec toi, c'était le must ! Pendant sa soutenance de thèse, Laeti t'as qualifiée de « Maman du labo », et comme elle avait raison ! Tu es quelqu'un d'incroyable, tu m'as guidée et soutenue autant professionnellement que personnellement et je t'en serai à tout jamais reconnaissante (c'est bon, je suis en larmes devant mon ordi). Merci, merci pour tout. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir aidé, guidé, de m'avoir permis de m'épanouir sur un projet et un travail qui me plaît et que j'ai envie de faire depuis toujours. Et surtout, merci de m'avoir fait ressentir que tu étais plus qu'une directrice de thèse, mais une véritable alliée, ou plutôt notre « maman du labo » comme l'a si bien dit Laeti. Je ne l'oublierai jamais !

Au « bureau des jeunes », je pense que si on survit aussi bien à la thèse, c'est parce qu'on est regroupés ensemble dans ce bureau et que la folie de l'un exacerbe systématiquement celle des autres. À Anthony, Naoill et Lucie (les anciens du bureau), je n'oublierai jamais les délires qu'on a pu se faire, que ce soit dans le bureau, au labo pendant les manips ou en salle de culture : j'ai toujours un fou rire quand je repense à la session « test des dragées surprises Bertie Crochue » ou au karaoké « tequilla ». À Aurélie, tu as quitté le labo trop vite, mais les moments passés ensemble étaient géniaux ! Je te souhaite tout le meilleur dans tes aventures à Dijon. Chiara, j'étais tellement contente quand j'ai su que tu revenais faire ta thèse dans l'équipe. Je sais qu'au premier « j'ai faiiiiim », on a 20 min avant l'impact XD. J'ai adoré tous les moments passés ensemble ! J'ai trouvé ma partenaire de crime au labo (hehe). Et je reviendrai JUSTE pour décorer le bureau avec toi ! Courage pour la suite de ta thèse, tu es brillante, tu vas surpasser tous les obstacles ! Sébastien, on s'est tellement vite habitué à ta présence dans le bureau. Merci pour les moments drôles, pour les moments « prise conscience écologique » et pour le soutiens et l'aide que tu m'as apportés en cette fin de thèse.

Aux autres « jeunes » de l'institut, vivez toujours selon notre doctrine (empruntée et légèrement modifiée) « le gras et la boisson, c'est la vie ! ». Nos repas au labo, nos discussions improvisées, et surtout, nos brunch, aprèm et soirée bouffe / jeux font partie des choses qui vont me manquer. On tient grâce à ça et on y arrivera tous ! (Qu'on soit en thèse, ingé, ou post-doc), on survivra !

Sarah, Samira, Saghira Panuklu, Yezza, Rémy, Alex : vous êtes ma famille de cœur. Vous êtes mes plus belles rencontres à Montpellier. C'est grâce à vous que j'ai pu surmonter toutes les

épreuves qui se sont présentées. Vous m'avez acceptée comme je suis, avec mes bizarreries, ma folie et mon stress XD Merci pour tous les moments qu'on a passés ensemble. Vous m'avez aidé à avancer et à m'affirmer ! On ne sera peut-être plus dans les mêmes villes ou pays, mais je sais qu'on trouvera toujours tous un moyen de se retrouver et qu'on sera toujours là les uns pour les autres, malgré la distance. Les filles, vous savez ce que je pense de vous, je n'y serais jamais arrivée sans vous, sans nos échanges de reels (et les fous rires engendrés), sans nos soirées pyjamas, just dance et karaoké, Je vous adore et je vous souhaite tout le bonheur du monde <3. Rémy racoon, on s'est épaulé et aidé pour affronter la thèse ! Entre les discussions et les aprèms jeux, on finit par se recharger et être prêt à affronter une nouvelle semaine. Alex le chat, tu m'as soutenue, aidée, encouragée et souvent (très souvent) poussée à me dépasser ! Merci d'avoir été là, d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir donné confiance en moi. Tu es quelqu'un d'incroyable et tu mérites le meilleur !

A ma famille : même en écrivant un pavé aussi long que ma thèse, je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci de m'avoir soutenue et donné l'opportunité de suivre mes rêves. Merci de m'avoir encouragée à continuer et ne surtout rien lâcher. Papa, maman, merci de m'avoir éduquée et d'avoir veillés à ce que nous ne manquions jamais de rien. Merci de nous avoir donné, aux frérots et à moi les moyens de réussir et d'avancer. Grâce à vous on arrivera à de belles choses. J'espère qu'on vous rendra fiers. A mes mamies qui ont toujours été là pour nous et qui nous ont soutenues quoi qu'on fasse et quoi qu'on décide. Aux frérots : lhmoda coule dans nos veines, on arrivera à conquérir le monde grâce à ça ! Je vous adore et j'espère du plus profond de mon cœur que vous aurez de belles vies, pleines de joie, d'amour, de bonheur, de réussite et bien plus encore. Je vous aime et je vais finir par cette phrase qui est devenu le mantra de notre famille (hmoda once again) : Chabab's 3yakaz est dans la place !

Résumé

Les LT $\gamma\delta$ contribuent à l'immunité anti-tumorale au sein du microenvironnement tumoral dans divers cancers. Malgré leurs fonctions effectrices bien décrites, de récentes études ont corrélé leur présence dans le microenvironnement tumoral à une meilleure progression des tumeurs solides, suggérant que les LT $\gamma\delta$ peuvent présenter des activités pro-tumorales. Mon projet visait à caractériser ces LT $\gamma\delta$ présentant des activités pro-tumorales et à déchiffrer leur rôle dans le cancer.

Nous avons démontré *in vitro* que les signaux inflammatoires favorisent le développement d'une sous-population de LT $\gamma\delta$ régulateurs caractérisée par l'expression de CD73 et affichant des fonctions immunosuppressives par la production de molécules immunosuppressives telles que l'IL-10, l'adénosine et le facteur angiogénique et chimiotactique IL-8. Le défi associé à la caractérisation des LT $\gamma\delta$ CD73+ réside dans l'évaluation de leur existence *in vivo* ainsi que de leur pertinence dans les cancers humains. Nous avons montré dans le cancer du sein que ~20% des lymphocytes $\gamma\delta$ infiltrant la tumeur ($\gamma\delta$ TILs) expriment CD73 et présentent les mêmes fonctions immunosuppressives que celles décrites *in vitro*, suggérant qu'ils pourraient favoriser le développement tumoral via ces mécanismes. En accord avec ces observations, nous avons montré que la présence de $\gamma\delta$ TILs est associée à des tumeurs de haut grade dans le cancer du sein. Nous avons étendu ces observations au cancer ovarien et montré que la densité des CD73+ $\gamma\delta$ TILs est négativement corrélée à la survie des patients, suggérant que la densité des $\gamma\delta$ TILs CD73+ pourrait être utilisée comme facteur pronostic en clinique. En utilisant l'imagerie par cytométrie de masse, nous avons étudié les réseaux cellulaires des $\gamma\delta$ TILs régulateurs (CD73+) et de leurs homologues effecteurs (CD73-) dans les tumeurs d'ovaire afin de mieux comprendre leur rôle dans le cancer. Nos données montrent des écosystèmes immédiats différents pour les $\gamma\delta$ TILs CD73+ par rapport aux CD73- renforçant l'idée que les LT $\gamma\delta$ CD73+ et CD73- sont fonctionnellement différents.

Ces données améliorent nos connaissances sur l'immunobiologie des LT $\gamma\delta$ dans le développement du cancer chez l'Homme, avec notamment la caractérisation approfondie de ce nouveau sous-ensemble de LT $\gamma\delta$ régulateurs, leur localisation et leurs fonctions au sein du microenvironnement tumoral.

Summary

$\gamma\delta$ T cells contribute to the anti-tumor immunity in various cancers. Despite their well-described effector functions, recent studies correlated their presence in the tumor microenvironment with solid tumor progression suggesting that $\gamma\delta$ T cells may display pro-tumor activities. My project aimed to characterize those regulatory $\gamma\delta$ T cells and decipher their role in cancer.

We demonstrated *in vitro* that inflammatory signals promote the development of a regulatory $\gamma\delta$ T cell sub-population characterized by the expression of CD73 and displaying immunosuppressive functions through the production of immunosuppressive molecules such as IL-10, adenosine and the angiogenic and chemotactic factor IL-8. The challenge associated with the characterization of CD73+ $\gamma\delta$ T cells resides in assessing their existence *in vivo* as well as their relevance in human cancers. We showed in human breast cancer that ~20% of tumor infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes (TILs) expressed CD73 and displayed the same immunosuppressive functions as described *in vitro*, suggesting that they could promote tumor development via these mechanisms. In line with these observations, we showed that the presence of $\gamma\delta$ TILs is associated with high-grade tumors in breast cancer. We extended such observations to ovarian cancer and showed that the density of CD73+ $\gamma\delta$ TILs negatively correlates with patient survival, suggesting that CD73+ $\gamma\delta$ TILs density could be used as a prognosis factor. Using Imaging by Mass Cytometry, we investigated the cellular networks of regulatory $\gamma\delta$ TILs (CD73+) and their effector counterpart (CD73-) in breast and ovarian tumors to better understand their role in cancer. Our data show different ecosystems for CD73+ compared to CD73- $\gamma\delta$ TILs reinforcing the idea that CD73+ and CD73- $\gamma\delta$ T cells are functionally different.

Altogether, these data improve our knowledge on human $\gamma\delta$ T cell biology during cancer development, with the in-depth characterization of the new regulatory $\gamma\delta$ T cell subset, their localization and their functions within the tumor microenvironment.

Liste des abréviations

A2A	Adenosine receptor A
A2B	Adenosine receptor B
AA	Acide aminé
ABP	Aminobisphosphonate
Ac	Anticorps
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADCP	Antibody-dependent cellular phagocytosis
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ado	Adénosine
ADP	Adénosine DiPhosphate
Ag	Antigène
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
Apo-A1	Apolipoprotéine A-1
ARG	Arginase
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Breg	Regulatory B cell
BrHPP	Bromohydrin Pyrophosphate
BTN	Butyrophiline
CAF	Cancer associated fibroblasts
CD	Cluster de différenciation
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
CEACAM-1	Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CRC	Colorectal cancer
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Cellule dendritique
DED	Death effector domaine
DMAPP	diméthylallyl-pyrophosphate
DOXP	1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate
EGF	Epidermal growth factor
ENTPD1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
EPCR	Endothelial protein C receptor
EphA2	Ephrine type-A recpetor 2
FADD	Fas-associated dead domain

FAS	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 6
FAS-L	FAS-Ligand
FGF	Fibroblast growth factor
FGL1	Fibrinogen-like protein 1
FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
GATA3	GATA binding protein 3
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
G-MDSC	Granulocytic-Myeloid-derived suppressor cells
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor-1
HLA	Human leukocyte antigen
HMBPP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
HMGB1	High mobility group box 1
HSPC	Hematopoietic stem and progenitor cells
IC	Immune Checkpoint
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
ICOS	Inducible T-cell COStimulator
ICOS-L	ICOS-Ligand
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukine
infDC	inflammatory DC
IPP	isopentenyl pyrophosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
MART-1	Melanoma Antigen Recognized By T-Cells 1
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microenvironnement tumoral
MMP-9	Matrix metallopeptidase 9
moDC	monocyte derived DC
NCR	Natural cytotoxicity receptors
NK	Natural killer
NKG2D/A	Natural killer group 2D/A
NKR	NK cell receptors
NTE5	Ecto-5'-Nucleotidase
OX40	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4
OX40-L	OX40-ligand
P2X	Purinoreceptor P2X
P2Y	Purinoreceptor P2Y
PAg	Phosphoantigène
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PD-1	Programmed cell death 1

pDC	plasmacytoid DC
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD-L2	Programmed death-ligand 2
PE	Phycoérythrine
PGE1	Prostaglandine E1
PGE2	Prostaglandine E2
PMN-MDSC	Polymorphonucler myeloid-derived suppressor cells
PRR	Pattern recognition receptors
PVR	Polio virus receptor
Rc	Récepteur
RLR	RIG-I-Like Receptors
ROR γ T	RAR-related orphan receptor γ
ROS	Reactive oxygen species
SARS-Cov2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SI	Système immunitaire
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAM	Tumor associated macrophages
TAN	Tumor associated neutrophils
T-bet	T-box expressed in T cells / T-box transcription factor TBX21
TCR	T cell receptor
TEG	T cells engineered with defined $\gamma\delta$ TCR
TGF- β	Transforming growth factor β
Th	T helper ou T auxiliaires
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL	Tumor infiltrating lymphocytes
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
TKI	Tyrosin kinase inhibitor
TLR	Toll-like receptors
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRAIL	Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-receptor
T _{RM}	Lymphocyte T résident mémoire
TRPM2	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
UV	Ultra-violets
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Liste des figures et des tables

Figures :

Figure 1 : Estimations de l'incidence et de la mortalité par cancer en 2020 dans le monde

Figure 2 : Incidence et mortalité dans les pays développés versus les pays en voie de développement parmi les hommes (A) et les femmes (B) en 2020

Figure 3 : Évolution des « hallmarks » du cancer

Figure 4 : Résumé des fonctions des CAFs et des mécanismes par lesquels ils exercent leurs fonctions

Figure 5 : Acteurs de l'immunité innée et adaptative

Figure 6 : Les trois phases de l'immunoédition

Figure 7 : Illustration des étapes de la phase d'élimination *ou* cycle de la réponse immunitaire anti-tumorale

Figure 8 : Activation des Lymphocytes T

Figure 9 : Mécanismes d'échappement des tumeurs

Figure 10 : Les différentes cellules dendritiques chez l'Homme et leurs fonctions anti- ou pro-tumorales

Figure 11 : **a.** Les principaux récepteurs des NK **b.** Les fonctions anti-tumorales des NK

Figure 12 : Résumé des fonctions anti-tumorales des TIL-B

Figure 13 : Résumé des fonctions pro-tumorales des TIL-B

Figure 14 : La voie ATP/AMP/adénosine

Figure 15 : Les modes d'action de TIGIT

Figure 16 : Les différents IC et leurs ligands

Figure 17 : Développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ dans le thymus

Figure 18 : Loci des gènes codant les chaînes γ et δ du TCR et mécanismes de recombinaison

Figure 19 : Voie de biosynthèse des isoprénoïdes

Figure 20 : Structure des butyrophilines

Figure 21 : Modèle d'activation des LT V γ 9V δ 2

Figure 22 : Ligands et récepteurs activateurs des LT $\gamma\delta$

Figure 23 : Résumé des différentes activités anti-tumorales des LT $\gamma\delta$

Figure 24 : Polarisation des LT $\gamma\delta$ en cellules immunosuppressives

Figure 25 : Résumé des différentes activités pro-tumorales des LT $\gamma\delta$

Figure 26 : Mécanisme d'immunosuppression proposé

Tables :

Table 1 : Liste non-exhaustive des premiers essais cliniques utilisant les LT $\gamma\delta$

Table 2 : Liste non-exhaustive des essais cliniques actuels utilisant les LT $\gamma\delta$

Introduction

Chapitre 1 : Le cancer

1.1 Généralités

1.1.1 Epidémiologie

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde. On estime à 19,3 millions le nombre de nouveaux cas et à 10 millions de morts dus au cancer dans le monde en 2020. Le cancer du sein représente la majeure partie des nouveaux cas diagnostiqués en 2020 avec 11,7% de cas. C'est d'ailleurs la première fois qu'un cancer féminin prend la tête du classement des diagnostics, tous sexes confondus. On trouve ensuite le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer de la prostate et le cancer gastrique, représentant respectivement 11,4%, 10%, 7,3% et 5,6% des nouveaux diagnostiqués. Le cancer du poumon reste la première cause de décès due au cancer (18% des morts dues au cancer), suivi par le cancer colorectal (9,4%), le cancer du foie (8,3%), le cancer gastrique (7,7%) et le cancer du sein (6,9%)^{1,2}.

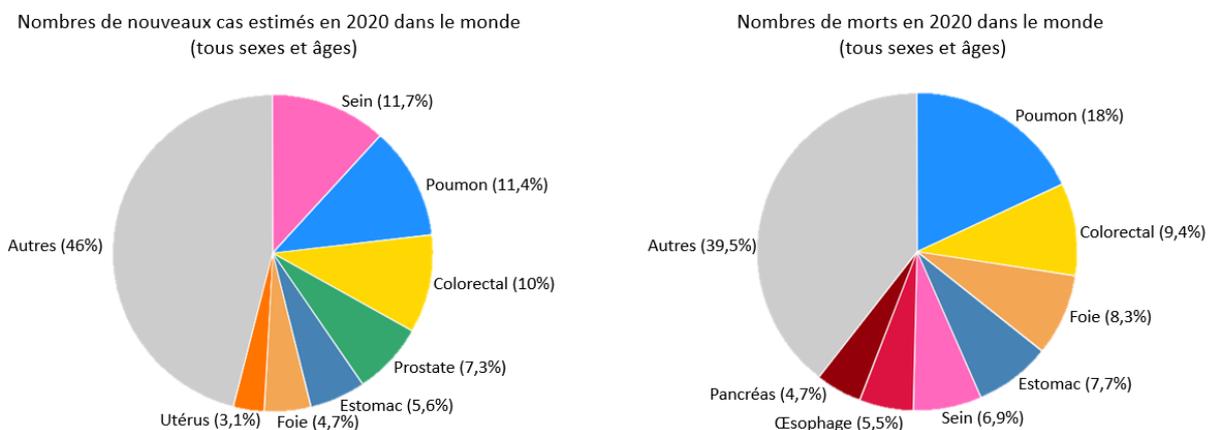
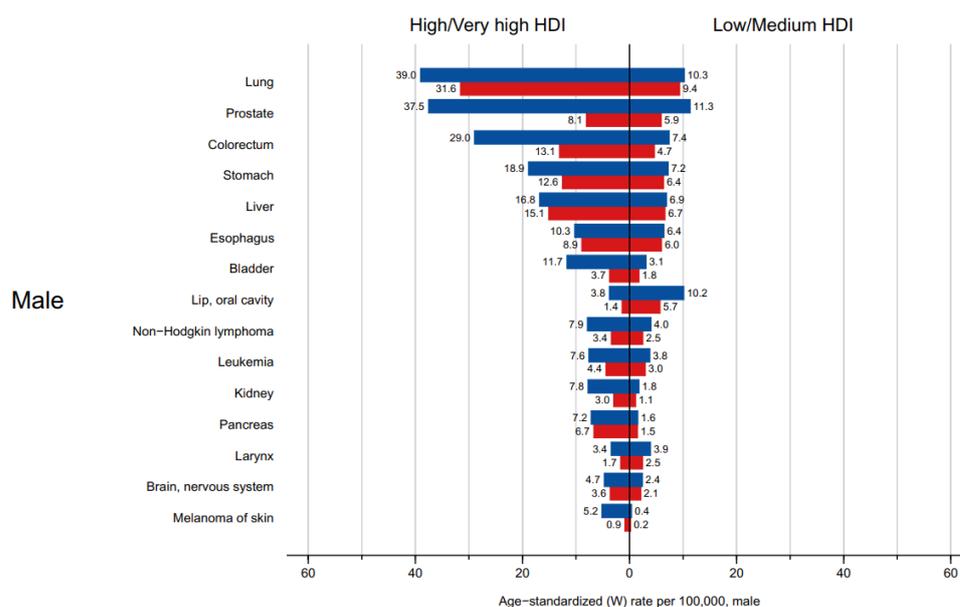


Figure 1 : Estimations de l'incidence et de la mortalité par cancer en 2020 dans le monde (adapter de²). Répartition des nouveaux cas et des décès pour les 10 cancers les plus fréquents en 2020 pour les deux sexes. Les cancers de la peau autres que le mélanome sont inclus dans la catégorie "autres".

Bien entendu, les données présentées ici ne tiennent pas compte de la crise sanitaire engendrée par le SARS-CoV2, puisque celles-ci datent de la dernière mise à jour de la base de données GLOBOCAN faite en 2020, avant que l'épidémie ne devienne une pandémie. Cette base de données est produite par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer), agence de l'Organisation Mondiale de la Santé spécialisée en recherche en cancérologie. GLOBOCAN 2020 ne prend donc pas en compte les retards de diagnostic et de traitement des cancers dus aux divers confinements et fermetures des établissements de santé, ces retards pouvant engendrer un biais dans les chiffres relatifs à l'incidence (plus faible car moins de diagnostics) et à la mortalité (plus forte car le diagnostic des cancers est réalisé à des stades plus avancés et sont donc plus difficilement soignables)³⁻⁶.

Globalement, l'incidence du cancer et la mortalité liée à celui-ci augmentent dans le monde, reflétant à la fois le vieillissement et la croissance de la population, et les changements dans la prévalence des principaux facteurs de risque du cancer, dont plusieurs sont associés au développement socio-économique. En effet, il a été montré que le taux d'incidence des cancers est en moyenne 2 à 3 fois plus élevé dans les pays développés en comparaison avec les pays en voie de développement ; et qu'il augmente avec l'indice de développement humain, un indice qui prends en compte l'espérance et le niveau de vie¹.



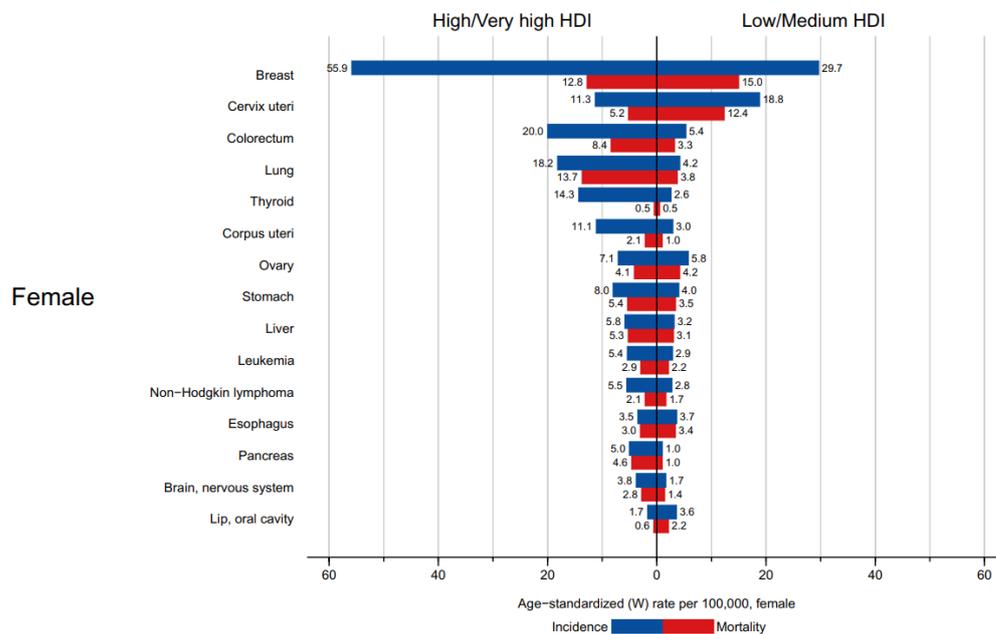


Figure 2 : Incidence et mortalité dans les pays développés versus les pays en voie de développement parmi les hommes (A) et les femmes (B) en 2020¹

1.1.2 Facteurs de risques

Par son caractère multifactoriel, les facteurs de risques associés à l'apparition de cancers sont compliqués à estimer. Néanmoins il y a des facteurs de risques que l'on qualifie d'évitables et des facteurs de risques non évitables. Les facteurs de risques évitables se réfèrent à notre comportement, nos habitudes de vie et notre environnement. On sait par exemple que 80% des cancers du poumon sont dus au tabagisme ; que le risque de développer un mélanome est accru par l'exposition aux UVs ; et que le surpoids ou l'obésité engendrés par de mauvaises habitudes alimentaires et une forte sédentarité, sont des facteurs de risques des cancers du pancréas, du sein et de l'ovaire (non exhaustif). Agir sur ces facteurs de risques est possible et même vivement encouragé par les professionnels de santé afin d'augmenter les chances de survie des patients (par exemple, arrêter de fumer permet de réduire le risque de récurrence et l'apparition de tumeurs secondaires chez les patients atteints de cancers pulmonaires). A l'inverse, les facteurs de risque non évitables ne peuvent être influencés. Parmi ces facteurs, on retrouve : l'âge (50% des cancers du sein sont diagnostiqués après 50 ans), les mutations

généétiques héréditaires et/ou spontanées (des formes familiales de cancers de la prostate sont retrouvés dans 20% des cas ; 20 % des cancers colorectaux correspondent à des formes héréditaires), et les antécédents personnels (exemple : une infection à *Helicobacter pylori* favorise l'apparition de cancers gastriques ; ...) ^{7,8}.

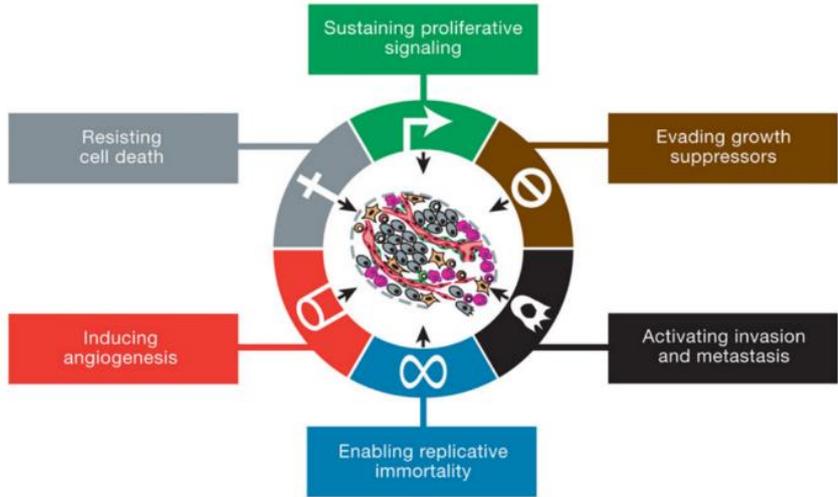
Agir sur ces divers facteurs permettrait de mieux lutter contre les cancers et augmenterait les chances de survie et la qualité de vie des patients, en adoptant par exemple un mode de vie plus sain ou en réalisant plus de dépistages à partir d'un certain âge pour les cancers colorectaux et cancers du sein. Les traitements anti-cancéreux restent néanmoins la première et principale ligne de défense contre les cancers, et une bonne compréhension de la biologie du cancer est nécessaire afin de développer des traitements de plus en plus efficaces.

1.2 Biologie du cancer

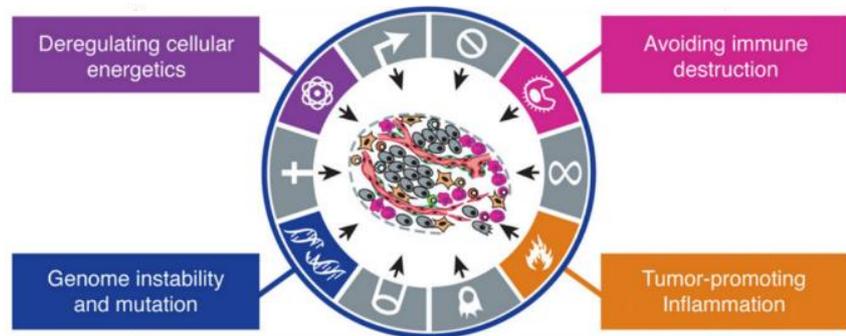
1.2.1 La cellule tumorale

Le cancer, tel que défini par l'OMS, est une « prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent envahir des parties adjacentes de l'organisme ». Le terme « cancer » est très générique : en effet, différents types de cancers existent, ayant pour origine différents types cellulaires, et touchant différents organes. Malgré cette hétérogénéité, les tumeurs présentent des caractéristiques communes qui ont été décrites pour la première fois par Hanahan et Weinberg en 2002⁹. Ces caractéristiques correspondent à des capacités biologiques que doivent acquérir les cellules tumorales pour permettre le développement d'une tumeur. Elles comprennent le maintien de signaux prolifératifs, la résistance à des signaux suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, une capacité répliquative infinie, la capacité à induire l'angiogenèse et la capacité à envahir d'autres tissus et à former ainsi des métastases. Dans les tissus sains, les cellules ont une capacité de division limitée puisqu'elles sont dépendantes de la longueur de leurs télomères (extrémités des chromosomes). En effet, à chaque division, les télomères se raccourcissent, jusqu'à créer un signal de dommage à l'ADN. La cellule va alors enclencher l'arrêt du cycle cellulaire pour entrer en sénescence répliquative avant d'entrer ensuite en apoptose. Les cellules tumorales vont pouvoir éviter cet état de sénescence répliquative en réactivant une enzyme capable d'allonger

2002



2011



2022

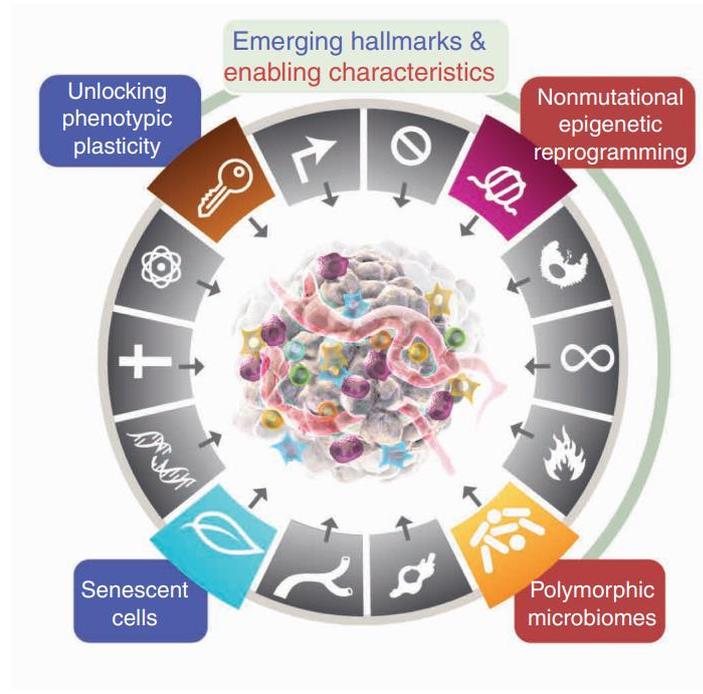


Figure 3 : Évolution des « hallmarks » du cancer⁹⁻¹¹

et de maintenir la taille des télomères, la télomérase, et ainsi d'acquérir une capacité de prolifération infinie, une des caractéristiques décrites par Hanahan et Weinberg en 2002. Les auteurs ont ensuite implémenté d'autres caractéristiques en 2011, avec notamment l'échappement au système immunitaire¹⁰. En effet, les cellules tumorales vont pouvoir moduler et détourner la réponse immunitaire à leur profit, favorisant ainsi la croissance tumorale. Les mécanismes de cet échappement seront développés plus tard dans l'introduction. Récemment, en 2022, Hanahan a complété la liste de ces « hallmarks » en y ajoutant notamment l'impact du microbiome¹¹. En effet, il a été montré dans le cadre du mélanome, qu'une dysbiose (ou déséquilibre) du microbiote intestinale est associée à un meilleur développement de ce type de tumeur¹². De plus, la transplantation d'un microbiote intestinal « sain » permet de surmonter la résistance aux immunothérapies ciblant PD-1 chez les patients atteints de mélanome¹³.

1.2.2 Le microenvironnement tumoral

Il est aujourd'hui admis qu'une tumeur solide n'est pas uniquement composée de cellules tumorales. Une tumeur est un tissu complexe (ou pseudo-organe) dans lequel diverses populations cellulaires coexistent et constituent ce que l'on appelle le microenvironnement tumoral. Les composantes de ce microenvironnement évoluent et interagissent constamment (soit par contact direct, soit par libération de molécules solubles dans la matrice extracellulaire) et vont influencer, positivement ou négativement, le développement et la croissance tumorale.

Outre les cellules tumorales, on va retrouver :

a. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau tridimensionnel de macromolécules présent dans tous les tissus. Elle est composée de divers protéines, glycoprotéines, glycosaminoglycanes et de fibres de collagène. Physiologiquement, le remodelage constant et dynamique de la MEC joue un rôle important dans l'intégrité tissulaire. Dans un contexte tumoral, la MEC subit une réorganisation biochimique et biomécanique pouvant réguler l'infiltration des cellules immunitaires au sein de la tumeur, faciliter la migration des cellules tumorales et donc la formation de métastases¹⁴. La dérégulation de l'organisation de la matrice extracellulaire est donc une caractéristique commune à de nombreux cancers. La

rigidification et la fibrose qui en résultent sont par ailleurs associés à un mauvais pronostic dans certains cancers solides¹⁵.

b. Les fibroblastes associés au cancer ou CAF

Les fibroblastes sont des cellules retrouvées dans tous les tissus et qui jouent un rôle dans la constitution de la matrice extracellulaire, la réparation tissulaire et la structuration du tissu¹⁶. Les CAF sont des fibroblastes associés au cancer qui proviennent de fibroblastes « normaux » détournés par la cellule tumorale et son microenvironnement¹⁷. En effet, les cellules tumorales vont induire la « transformation » des fibroblastes en CAF soit par la production de molécules telles que le TGF β ^{18,19} ou l'IL-6²⁰, soit par contact direct avec le fibroblaste dans le cancer du sein par exemple. En effet, l'engagement de molécules d'adhésion suite au contact entre les CAF et les cellules tumorales induit l'activation de la voie Notch dans les CAF, régulant ainsi l'expression de différents gènes.

Les CAFs ont plusieurs fonctions/rôles dans le développement du cancer, résumés dans la figure 4. Ils favorisent à la fois la colonisation, par les cellules tumorales, des tissus sains environnant la tumeur primaire mais aussi la formation de métastases en participant au

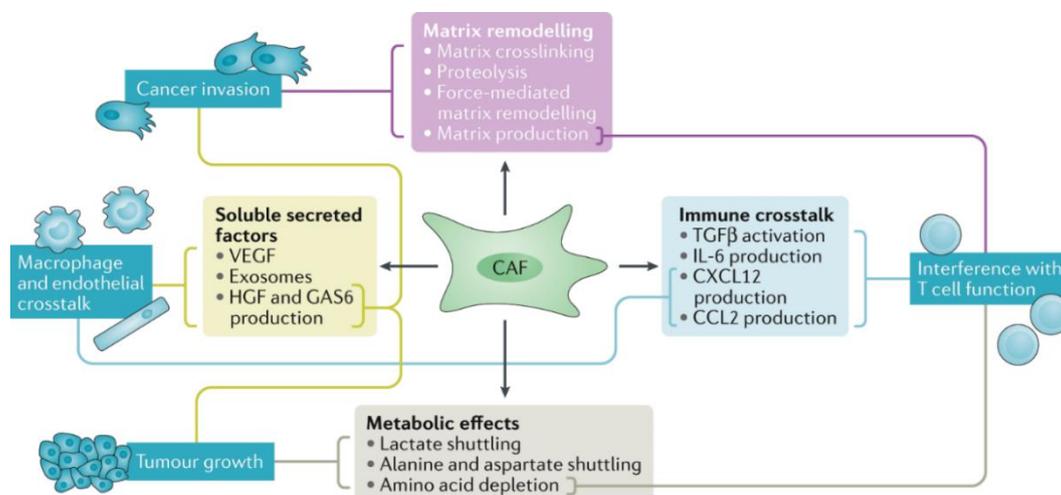


Figure 4 : Résumé des fonctions des CAFs et des mécanismes par lesquels ils exercent leurs fonctions¹⁶.

remodelage de la matrice extracellulaire (production de protéases par exemple)¹⁴ et en activant ou favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales²¹. Ils participent également à l'angiogenèse via la production de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)²² et peuvent participer à l'échappement immunitaire des tumeurs (voir chapitre 2) en

modulant le système immunitaire. En effet, les CAFs exercent des fonctions immunosuppressives notamment via la production de cytokines telles que le TGF β , une molécule suppressive connue pour réduire la réponse des Lymphocytes T ; et le recrutement et promotion de la différenciation des LT CD4 en LT régulateur (expression de FOXP3)²³. Les divers fonctions/rôles des CAFs dans le développement tumoral en font d'intéressantes cibles thérapeutiques, mais une meilleure compréhension de cette population cellulaire est nécessaire afin de pouvoir les cibler efficacement puisque l'on sait aujourd'hui que les CAFs représentent une population très hétérogène. L'identification d'un marqueur spécifique aux CAFs et l'étude des sous-populations de CAFs ayant des fonctions pro- ou anti-tumorales, apporterait un nouvel éclairage sur la biologie et le rôle de ces cellules dans le développement tumoral, et permettrait de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques^{16,23}.

c. Les cellules endothéliales

La croissance tumorale et la formation de métastases dépendent de la capacité des tumeurs à former de nouveaux vaisseaux sanguins, mécanisme appelé angiogenèse. Cette néovascularisation permet à la fois l'apport en nutriments et oxygène nécessaire à la croissance tumorale, mais aussi à la dissémination des cellules tumorales vers d'autres organes.

Les vaisseaux sanguins tumoraux diffèrent des vaisseaux sanguins classiques de par leur composition et leur morphologie. En effet, ils sont irréguliers et désorganisés et ne contiennent pas ou peu de péricytes contrairement aux vaisseaux normaux. De plus, les cellules endothéliales composant la néovasculature tumorale, appelées TECs pour « cellules endothéliales tumorales », diffèrent totalement (fonctionnellement et morphologiquement) des cellules endothéliales normales (ou NECs, *Normal Endothelial Cells*). En effet, des études ont montré que les TECs ont un profil d'expression génique différent des NECs^{24,25}. Plus intéressant encore, il existe une hétérogénéité au sein des TECs. Celles-ci présentent des profils d'expression génique différents en fonction du type et du stade tumoral^{26,27}.

Les TECs participent au développement tumoral en produisant divers facteurs tels que l'EGF (facteur de croissance épidermique), l'œstrogène, le FGF (facteur de croissance des fibroblastes), l'IL-8, les prostaglandines 1 et 2 (PGE1 et PGE2), le *Tumor necrosis factor* (TNF)- α et le VEGF. Elles impactent également la réponse immunitaire anti-tumorale. Les cellules

endothéliales expriment moins de gènes impliqués dans le « homing » des cellules immunitaires (ICAM1 ou des chimiokines comme le CXCL10 par exemple). Elles expriment également plus de PD-L1, PD-L2 et IDO, participant ainsi à l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur^{25,28}. Toutes ces caractéristiques font des TECs et des vaisseaux sanguins tumoraux des cibles thérapeutiques attrayantes. L'utilisation de petites molécules inhibitrices de l'angiogenèse ainsi que d'anticorps monoclonaux sont les principales thérapies utilisées en clinique pour le traitement des cancers. Par exemple, le bevacizumab est un anticorps monoclonal qui inhibe l'angiogenèse tumorale en bloquant le VEGF avant que celui-ci ne se lie à son récepteur²⁹. Cet anticorps, couplé à une chimiothérapie, a montré son efficacité dans le traitement de première intention du cancer colorectal métastatique, puisqu'il améliore la survie des patients ayant reçu cette combinaison. Les petites molécules inhibitrices de l'angiogenèse agissent en ciblant une variété de molécules impliquées dans le processus d'angiogenèse. Elles sont généralement des inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI) et ciblent les récepteurs du VEGF et du PDGF, deux molécules impliquées dans l'angiogenèse. Le sorafenib (Nexavar) et le sunitinib, deux inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI - *tyrosine kinase inhibitor*) ciblant respectivement les récepteurs VEGFR1-3 et PDGFR β , sont d'ailleurs utilisés en clinique pour le traitement des tumeurs gastro-intestinales, pancréatiques et rénales³⁰.

d. Les cellules immunitaires

Le système immunitaire (SI) a pour rôle de maintenir l'intégrité de l'organisme en participant notamment à la lutte contre les infections, mais aussi à la reconnaissance et à l'élimination de toute cellule anormale telles que les cellules tumorales. En effet, les cellules de l'immunité innée telles que les *Natural Killers* (NK), les neutrophiles et les macrophages constituent la première ligne de défense de l'organisme, le temps que la réponse adaptative (réponse immunitaire « spécifique ») se mette en place (figure 5). Ensuite, les Lymphocytes T (LT) CD4 et LT CD8, cellules de l'immunité adaptative, renforcent cette élimination et permettent la mise en place d'une réponse mémoire.

Malgré cela, les cellules tumorales parviennent à échapper à cette immunosurveillance, se développent et forment des tumeurs cliniquement détectables. Cela peut s'expliquer, en partie, par l'interconnexion et l'évolution simultanée du SI et des cellules tumorales. En effet, la composition du microenvironnement immunitaire tumoral (TIME) va évoluer sous l'influence des cellules tumorales et autres composantes du MET.

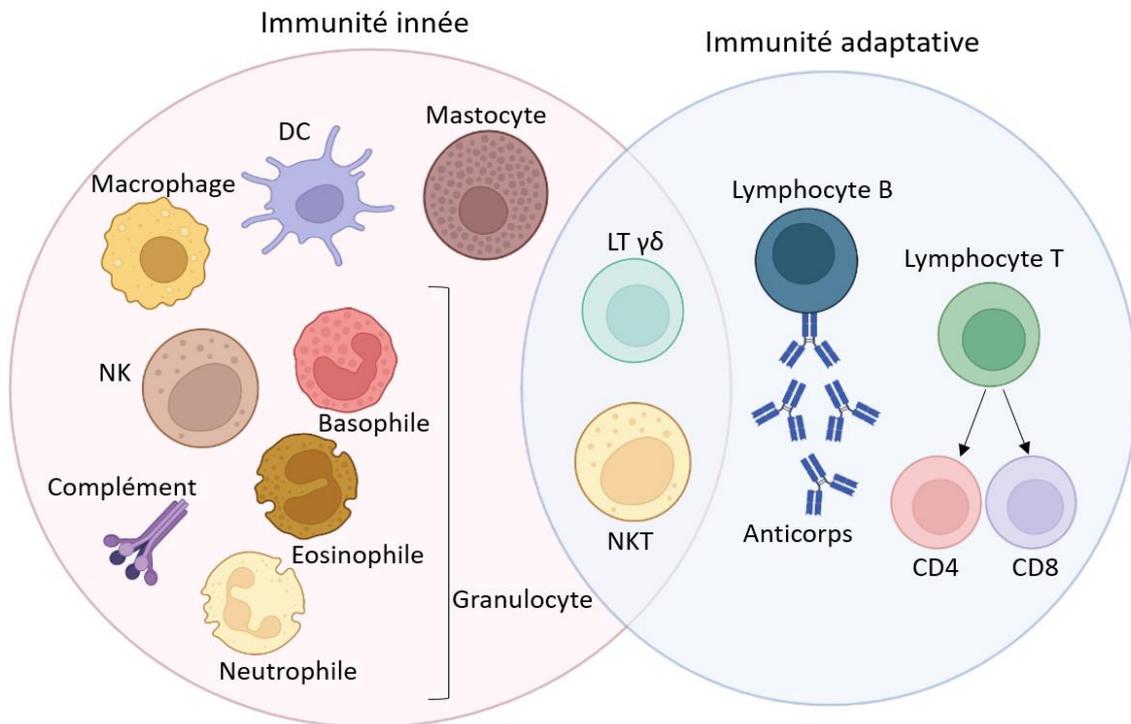


Figure 5 : Acteurs de l'immunité innée et adaptative (adapté de ³¹). La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense de l'organisme. Elle se compose de facteurs solubles, tels que les molécules du complément, et de diverses cellules, notamment les granulocytes, les mastocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules *natural killers*. La réponse immunitaire adaptative se compose d'anticorps, de lymphocytes B et de lymphocytes T CD4 et CD8. Les cellules NKT et les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des cellules qui se situent à l'interface de l'immunité innée et adaptative.

Les types cellulaires, leur fonction, localisation et densité vont considérablement changer, avec notamment l'inactivation des cellules cytotoxiques (NK et LT CD8 par exemple) et le recrutement de populations immunitaires suppressives. Les mécanismes d'évolution et d'échappement conduisant à l'inefficacité de la réponse immunitaire dans le contexte tumoral seront plus amplement détaillés dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 : Rôle du système immunitaire dans les tumeurs

Cette partie de l'introduction présente les interconnexions et échanges entre SI et cellules tumorales, ainsi que les différentes cellules de l'immunité innée et adaptative impliquées dans la réponse anti-tumorale au cours du développement de la tumeur.

2.1 Immunosurveillance, immunoédition et échappement

Comme mentionné précédemment, le système immunitaire est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales avant que celles-ci n'aboutissent à une tumeur cliniquement détectable. C'est le concept d'immunosurveillance. Cependant, on sait aujourd'hui que la relation entre le SI et la tumeur est plus complexe, et notamment que le SI peut favoriser la croissance tumorale. Le concept d'immunosurveillance a donc évolué vers le concept d'immunoediting ou « révision immunologique »^{32,33}. Ce concept redéfinit la relation entre SI et cellules tumorales selon trois phases : Elimination, Equilibre et Echappement.

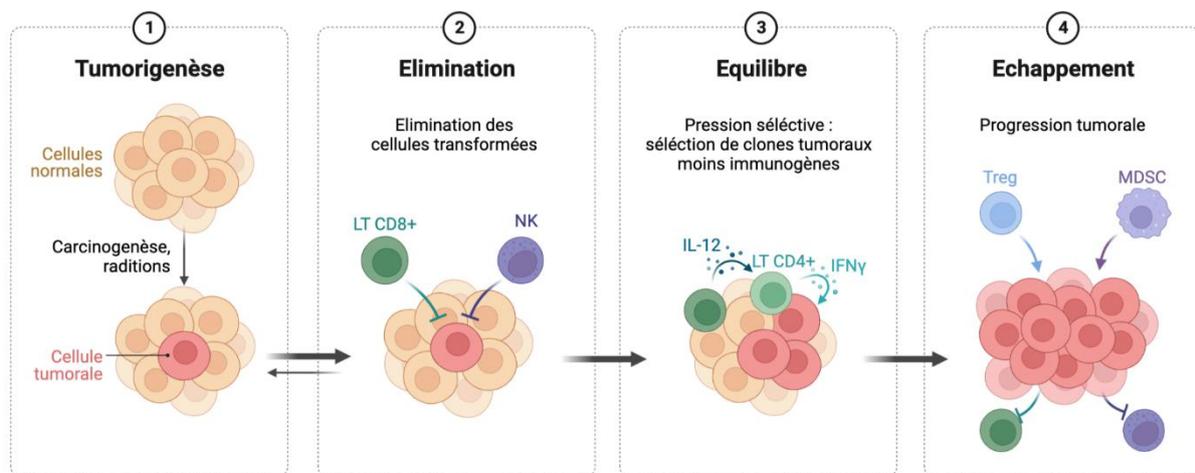


Figure 6 : Les trois phases de l'immunoédition. Suite à l'initiation de la tumorigenèse (étape 1), une réponse immunitaire anti-tumorale se met en place et permet d'éliminer les cellules tumorales (phase 2). Ensuite s'installe une phase d'équilibre (phase 3) où les cellules immunitaires continuent à éliminer les cellules tumorales tout en exerçant une pression de sélection qui va conduire à l'échappement tumoral par la mise en place de divers mécanismes d'immunosuppression et à la croissance tumorale (phase 4).

2.1.1 Phase d'élimination

La phase d'élimination correspond au concept initial d'immunosurveillance introduit pour la première fois par Thomas et Burnet dans les années 50^{34,35}. Ce concept a longtemps été controversé avant que diverses études, à la fois chez la souris et chez l'Homme, ne viennent le valider. La phase d'élimination fait intervenir à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative. Le cycle de la réponse immunitaire anti-tumorale (présenté en figure 7) se déroule comme suit :

Les cellules en cours de transformation tumorale subissent un stress important induisant la libération de signaux de danger ou DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) tels que l'HMGB1 et l'ATP³⁶. Ces DAMPs vont activer les cellules de l'immunité innée, comme les DC et les cellules NK. Les NK vont reconnaître les molécules de stress MICA et MICB exprimé à la

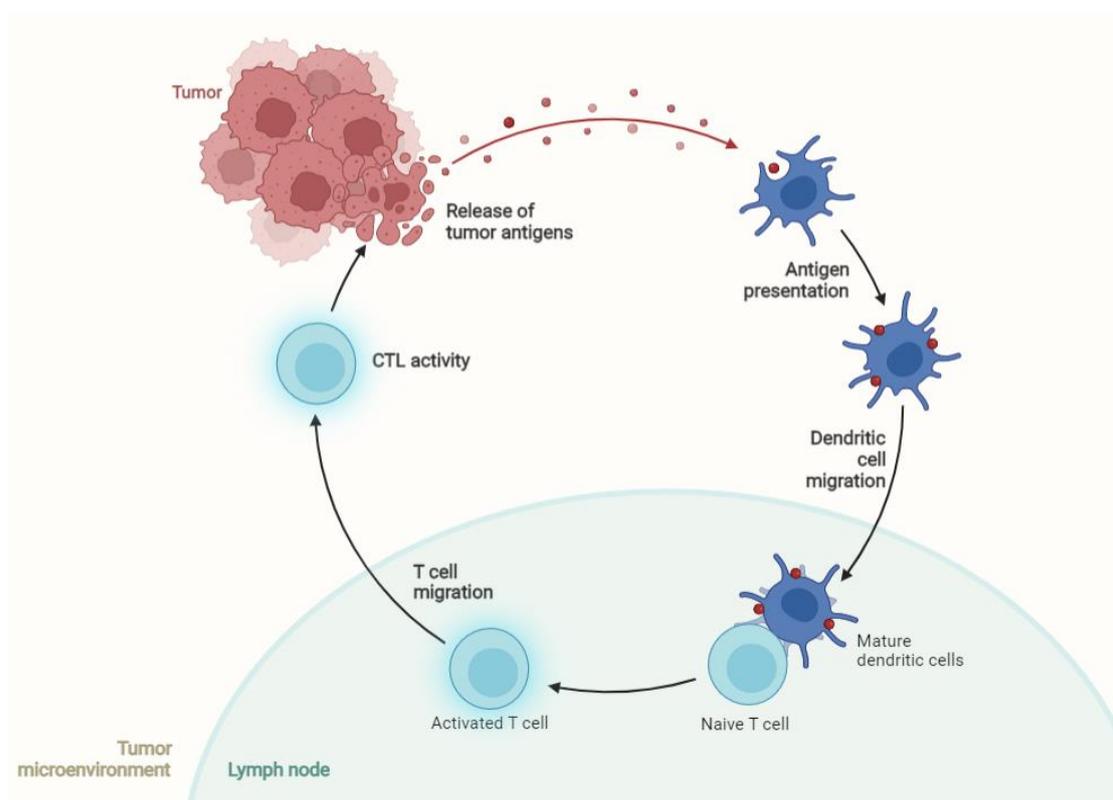


Figure 7 : Illustration des étapes de la phase d'élimination ou cycle de la réponse immunitaire anti-tumorale.

surface des cellules tumorales par leur récepteur activateur NKG2D, et enclencher une réponse cytotoxique (libération de perforine). Cette réponse entrainera la libération d'antigènes (Ags) tumoraux qui vont être endocytés par les cellules dendritiques (DC) présentes sur le site tumoral.

Les DC, initialement immatures, vont être activées par la reconnaissance des DAMPs par leur TLR (*toll-like receptor*), et leur maturation sera induite par les diverses cytokines produites, entre autres, par les NK. Les DC matures vont alors perdre leur capacité à endocyter les antigènes tumoraux et gagner les fonctions de présentation antigénique (augmentation de l'expression de CMH couplés aux Ags tumoraux ; expression de molécules de co-stimulation CD80/86). La maturation des DC va également permettre à celles-ci de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques afin de présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes présents dans les ganglions^{32,33}.

L'activation des LT (CD4 ou CD8) par les DC (ou autres cellules présentatrices d'antigènes, CPA) nécessite la réception de trois signaux par les LT (figure 8). Le premier signal consiste en la formation d'un complexe ternaire entre le TCR (T cell receptor) et le complexe CMH/Ag, ainsi que la liaison entre les corécepteurs CD4 et CD8 avec le CMH de classe II et CMH de classe I respectivement. Le second signal, dit signal de co-stimulation, consiste en la liaison des molécules CD80/86 exprimées par les CPA avec le CD28 exprimé par les LT. De ces interactions (signal 1 et signal 2) résultent l'expression de diverses molécules à la fois par les LT et par les DC. Les LT vont exprimer le CD40L, le CD25 et produiront de l'IL-2, alors que les DC exprimeront le CD40 (récepteur du CD40L) et produiront (suite à l'interaction CD40/CD40L) les cytokines nécessaires à l'orientation fonctionnelle de la réponse T. Cette libération de cytokines par les CPA constitue le signal 3. A l'issue de ces événements, les LT et CPA se séparent et les LT prolifèrent, se différencient et sont alors capables de migrer à travers les vaisseaux lymphatiques et sanguins jusqu'au site tumoral^{32,33,37}.

Les LT activés ayant infiltrés les tumeurs pourront exercer leurs fonctions anti-tumorales. Les LT CD8 vont induire la lyse tumorale via leur activité cytotoxique (libération du contenu des granules lytiques : granzyme, perforine...), permettant à la fois l'élimination des cellules tumorales mais aussi la libération d'antigènes tumoraux, ce qui permettra d'amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale (début d'un nouveau cycle immunitaire). Les LT CD4 participent également à la phase d'élimination et à la réponse immunitaire anti-tumorale en produisant des molécules induisant la prolifération et la différenciation des Lymphocytes B (LB) en plasmocytes producteurs d'anticorps ciblant les tumeurs. Ces anticorps vont participer à la réponse anti-tumorale via la "cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps" ou ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). Les LT CD4 vont

également activer les macrophages grâce à la production de cytokines, comme l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-4, et le GM-CSF, un facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages. Ces macrophages vont alors pouvoir phagocyter les cellules tumorales et/ou devenir des cellules présentatrices d'antigènes³⁸.

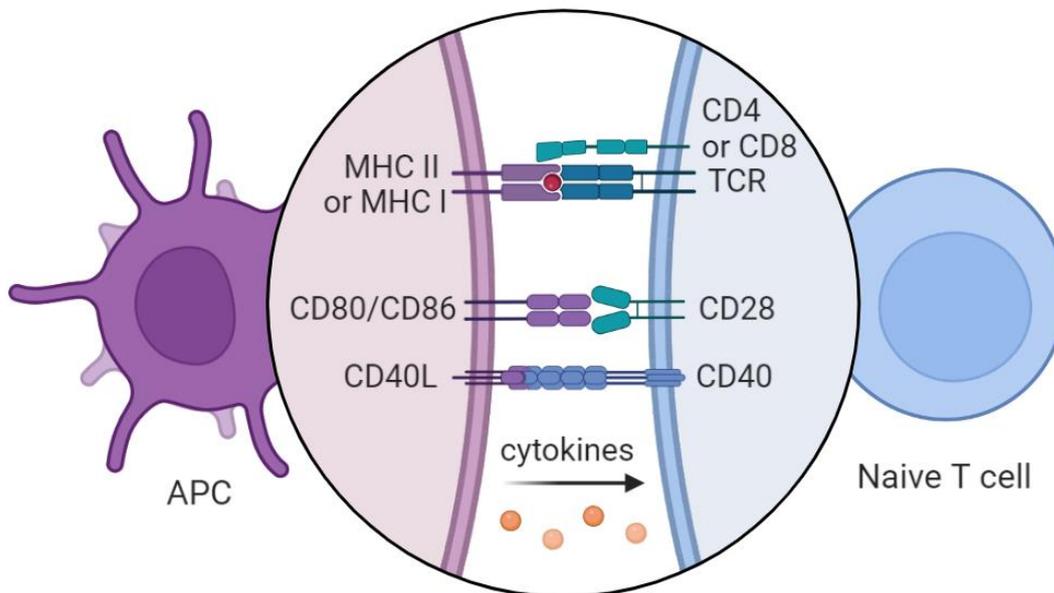


Figure 8 : Activation des Lymphocytes T. La mise en place d'une synapse immunologique entre les cellules présentatrices d'antigènes (APC) et les LT naïfs dans le ganglion lymphatique permettra l'activation des LT. Le dialogue entre ces deux partenaires fait intervenir des interactions entre diverses molécules détaillées en partie 2.1.1

La phase d'élimination fait donc intervenir des cellules immunitaires présentant un profil anti-tumoral. Dans la majeure partie des cas, les cellules tumorales sont toutes éliminées, et il n'y a pas de développement de cancer. Cependant, si l'élimination n'est pas complète, la dynamique « croissance tumorale » et « élimination » entre dans une seconde phase : la phase d'équilibre^{32,33}.

2.1.2 Phase d'équilibre

La phase d'équilibre est la phase la plus longue de l'immunoédition. C'est une période de latence où les cellules tumorales sont cliniquement invisibles et où le SI arrive à contrôler la croissance tumorale, mais ne peut éradiquer tous les clones tumoraux présents. Durant cette phase, le SI façonne l'immunogénicité de la tumeur en exerçant une forte pression de sélection sur les cellules tumorales. Les clones les moins résistants et qui sont aussi les plus immunogènes sont éliminés alors que des clones plus résistants et capables d'induire de

rapides modifications génétiques et épigénétiques survivent. La survie à cette pression de sélection se traduit par l'émergence de variants tumoraux moins immunogènes et ayant acquis des capacités d'immunoévasion. Durant cette étape, les cellules du système immunitaire évoluent également. Les cellules cancéreuses, mais aussi les autres composantes du MET, vont induire le détournement des fonctions du SI au profit de la tumeur, via la production de molécules solubles. Il y aura donc attraction de cellules immunitaires immunosuppressives (ou pro-tumorales), mais aussi la subversion de cellules de l'immunité, c'est-à-dire l'inactivation de leur fonctions anti-tumorales. Petit à petit, le système tend vers un équilibre entre élimination des cellules tumorales et prolifération de celles-ci. Cet équilibre précaire peut rester stable durant plusieurs années, avant d'être rompu. S'amorce alors la phase d'échappement^{32,33,37,39}.

2.1.3 Phase d'échappement

L'échappement se caractérise par la capacité des cellules tumorales à moduler la réponse immunitaire anti-tumorale. Ceci se fait par divers mécanismes résumés en figure 9.

Les cellules tumorales sélectionnées pendant la phase d'équilibre ont une faible immunogénicité, ce qui veut dire qu'elles vont pouvoir éviter la reconnaissance par le SI et l'activation de celui-ci. Par exemple, la perte de l'expression des molécules de CMH de classe I par les cellules tumorales, ainsi que l'absence de molécules de co-stimulation empêchent l'activation des LT. Également, l'instabilité génomique des cellules tumorales entraîne la perte des antigènes tumoraux initiaux, qui ne sont donc plus détectés par LT CD8 spécifiques de l'antigène. Les tumeurs peuvent également sécréter des molécules qui vont soit empêcher l'accès des cellules du SI au site tumoral (production de collagène augmentée induisant une barrière physique entre le SI et les cellules tumorales), soit induire la subversion du SI, c'est-à-dire l'induction d'une tolérance vis-à-vis de la tumeur. Les cellules tumorales vont donc sécréter des facteurs solubles comme le TGF β , et/ou exprimer les molécules membranaires que sont les points de contrôles immunitaires et induire ainsi l'inhibition des fonctions anti-tumorales du SI. De plus, et comme dit précédemment, les cellules tumorales vont également permettre le recrutement et la prolifération de cellules immunitaires suppressives telles que les cellules myéloïdes suppressives (*myeloid derived suppressive cells* ou MDSCs), les lymphocytes T régulateurs (Treg), macrophages M2, et autres. Celles-ci vont participer à

l'inhibition des fonctions effectrices/anti-tumorales des autres acteurs de l'immunité présents sur le site tumoral mais vont également favoriser la mise en place d'un microenvironnement tumoral supprimeur via la production de diverses molécules dans le MET. Tous ces mécanismes d'échappement favorisent le développement tumoral et conduisent *in fine* à une tumeur cliniquement détectable^{32,33,37,39}.

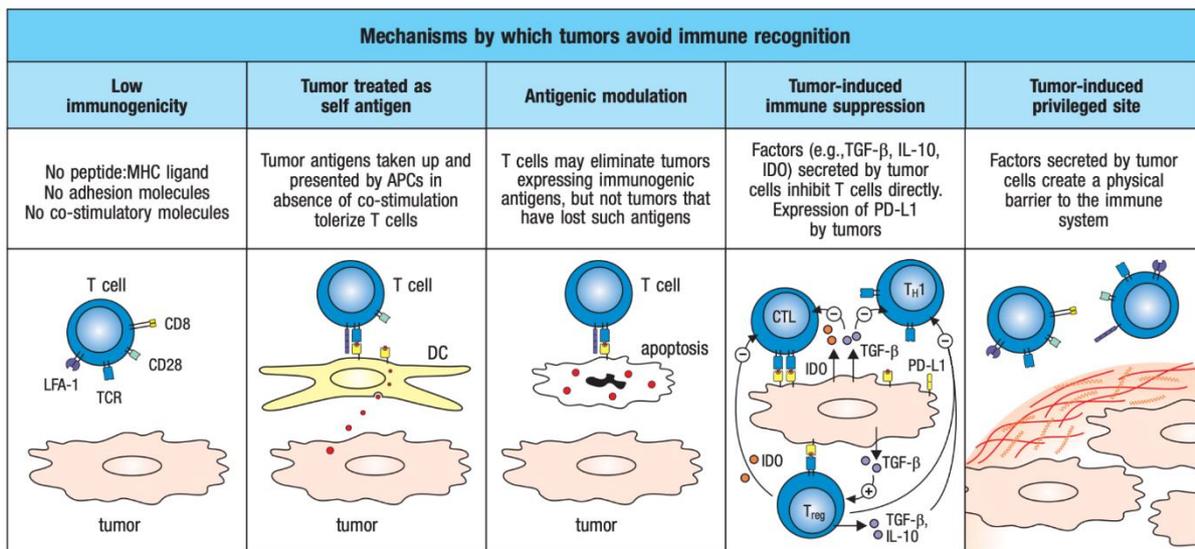


Figure 9 : Mécanismes d'échappement des tumeurs⁴⁰ . Colonne 1 : les tumeurs présentent une faible immunogénicité. Elles ne présentent pas de complexe CMH/peptide qui puisse être reconnu par les cellules du SI. Colonne 2 : une présentation antigénique sans présence de molécules de co-stimulation induit une tolérance des LT. Colonne 3 : la pression de sélection exercée par le SI ainsi que l'instabilité génomique des cellules tumorales entraîne la perte des antigènes tumoraux. Les cellules tumorales ne seront alors plus reconnues par le SI spécifique de cet antigène. Colonne 4 : des facteurs sécrétés par la tumeur inhibent les cellules immunitaires anti-tumorales et recrutent/induisent des cellules régulatrices ou immunosuppressives. Colonne 5 : Les cellules tumorales secrètent des molécules qui vont créer une barrière physique autour de la tumeur, empêchant l'accès aux cellules du SI.

Le système immunitaire intervient donc à toutes les étapes du développement tumoral et évolue au cours des différentes phases avec l'intervention de cellules immunitaires à profil anti-tumoral au début du développement, puis, le recrutement et/ou la polarisation de cellules immunitaires vers un profil pro-tumoral. La suite de ce chapitre présentera ces deux versants de l'immunité des tumeurs.

2.2 Les acteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale

2.2.1 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont un groupe hétérogène de cellules appartenant à l'immunité innée. Chez l'Homme, on retrouve 3 types de DC : les DC conventionnelles, également qualifiées de classiques (cDC), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et les DC dérivées de monocytes, également appelées DC inflammatoires (moDC ou infDC). La principale fonction des DC est d'endosser les fonctions de cellules présentatrices d'antigènes comme décrit en 2.1.1.

Les cDC sont constituées de 3 sous-groupes selon leurs fonctions : cDC1, cDC2 et le sous-groupe récemment découvert DC3 (retrouvé également dans certaines publications comme cDC2b)⁴¹ (figure 10). Les cDC1 ont la capacité de présenter des antigènes via les molécules de CMH de classe I et II aux LT CD8 et LT CD4 respectivement, mais sont plus décrites et efficaces dans la cross-présentation d'Ag tumoraux et l'activation des LT CD8 naïfs présents dans les ganglions lymphatiques, ainsi que dans le recrutement de ces LT CD8 activés via la production de chimiokines. Les cDC1 participent également à la régulation de l'activité des cellules NK. En effet, via la production d'IL-12, les cDC1 vont favoriser la production d'IFN- γ , cytokine inflammatoire et anti-tumorale, par les NK. L'IL-12 produite par les cDC1 potentialise également la réponse des LT CD8 cytotoxiques (CTL), et participe donc au renforcement de la réponse immunitaire anti-tumorale. Il a également été montré que la fréquence de cDC1, ainsi que la signature transcriptomique de cette population est associée à une meilleure survie des patients, ainsi qu'à une meilleure réponse aux traitements dans divers cancers^{42,43}. Les cDC2 ont été récemment subdivisés en 2 sous-groupes : les cDC2 ou cDC2a, et les cDC2b ou DC3. Pour la suite du chapitre et pour plus de clarté, on ne gardera que la nomenclature cDC2 et DC3. Bien que les cDC2 puissent faire de la cross-présentation également, elles sont connues pour « primer » (ou éduquer) les LT CD4 et mettre en place une réponse T auxiliaire (ou Th pour *T helper*)⁴⁴. De plus, ces cellules peuvent également produire de l'IL-12 et potentialiser, comme les cDC1, les activités cytotoxiques des NK et des CTL. Les DC3 sont également capables de présenter les Ag aux LT CD4 et LT CD8, mais sont moins efficaces que les cDC2.

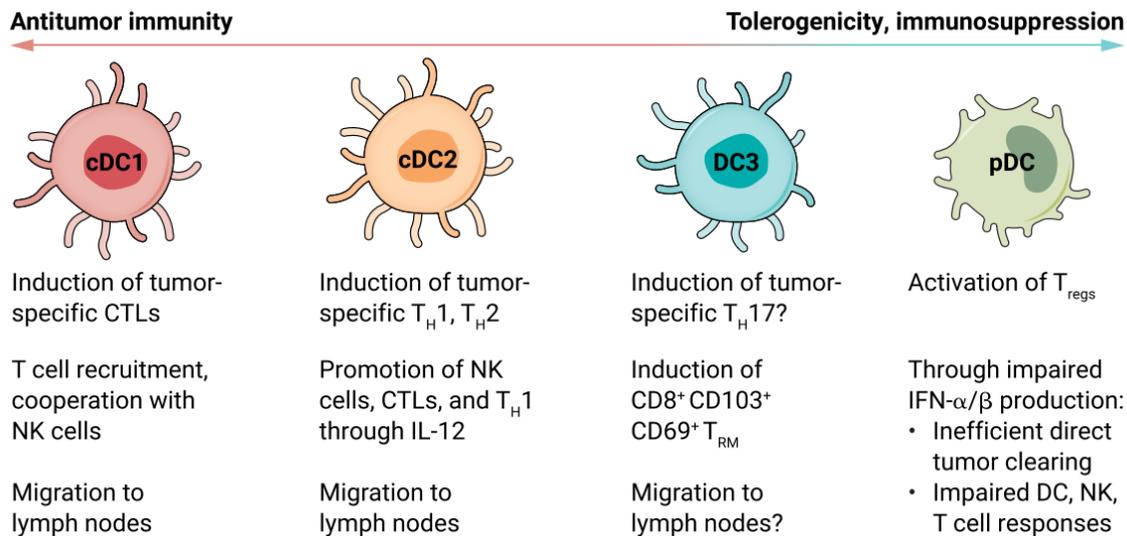


Figure 10 : Les différentes cellules dendritiques chez l'Homme et leurs fonctions anti- ou pro-tumorales⁴⁵. Les cDC1 présentent la plus forte activité anti-tumorale, suivi des cDC2 et DC3. Les pDC, quant à elles, sont principalement connues pour leurs réponses immunosuppressives dans le cancer.

Néanmoins, elles induisent l'expression de CD103 par les LT CD8 dans les tumeurs, marqueur de Lymphocytes T résidents mémoires (T_{RM}), cellules connues pour être de bon pronostic dans divers cancers tel que le cancer du sein⁴⁶. Les DC inflammatoires (infDC) sont l'équivalent *in vivo* des DC dérivés de monocytes *in vitro* (moDC). Les monocytes infiltrants les tumeurs peuvent, sous l'effet de facteurs présents dans le microenvironnement tumoral, se transformer en cellules dendritiques, avec les mêmes fonctions de cellules présentatrices d'antigènes que les cDC, et les mêmes capacités de productions de cytokines promouvant l'activité des CTL dans le microenvironnement tumoral. Cependant, et contrairement aux cDC, les moDC peuvent développer des fonctions immunosuppressives sous l'influence du MET. Ces fonctions, ainsi que les fonctions pro-tumorales de pDC seront décrites dans la partie dédiée aux acteurs de l'immunité pro-tumorale de ce chapitre.

2.2.2 Cellules *Natural Killers* (NK)

Les NK sont les cellules cytotoxiques de l'immunité innée. On retrouve deux populations majoritaires de NK dans le sang selon l'expression du CD16 et CD56 : CD56^{high}CD16^{neg} (représentant 10 % des cellules NK circulants) dont la fonction principale est la production de

cytokines ; et les CD56^{dim}CD16^{high} qui représentent 90% des NKs présents en périphérie et présentent principalement des fonctions cytotoxiques^{47,48}. Les proportions de ces sous-populations dans les tissus, et notamment dans les tumeurs sont différentes de celles du sang, mais aucun consensus n'est validé pour l'instant.

L'activation des NK dépend de la balance entre les signaux perçus par les récepteurs activateurs et inhibiteurs présents à leur surface (figure 11a). Si la balance penche en faveur des récepteurs (Rc) activateurs (soit plus de ligands des Rc activateurs, soit moins de ligands des Rc inhibiteurs), alors il y a activation des NK et élimination des cellules cibles. Les récepteurs inhibiteurs les plus étudiés sont les KIR pour *Killer Immunoglobulin Receptors* et le CD94/NKG2A. Ces récepteurs reconnaissent respectivement les molécules de CMH de classe I classiques et le HLA-E, une des molécules de CMH de classe I non classiques. Ces molécules sont exprimées par les cellules normales et au début de la tumorigenèse, mais la pression de sélection exercée par les LT CD8 conduit à la sélection de clones tumoraux n'exprimant pas ces molécules et pouvant donc lever l'inhibition des cellules NK et les activer⁴⁹⁻⁵¹.

À l'opposé, le recrutement des récepteurs activateurs via la liaison de leurs ligands va activer les fonctions des NK. Parmi les récepteurs activateurs, on retrouve le NKG2D qui reconnaît des molécules de stress exprimées à la surface des cellules tumorales : les protéines MICA et MICB (*MHC class I chain-related protein A et MHC class I chain-related protein B*) ; et les NCR (*Natural Cytotoxicity Receptors*) tel que NKp30 qui reconnaît les molécules de la famille B7-H6 à la surface des cellules tumorales. Les fonctions des NK sont aussi modulées par diverses cytokines. Par exemple, l'IL-2 et l'IL-15 permettent l'activation des NK et promeuvent également leur survie et leur prolifération⁴⁹⁻⁵¹.

Les NK peuvent exercer leurs fonctions anti-tumorales de diverses manières (figure 11b). Elles vont présenter une activité cytotoxique via le relargage du contenu des granules lytiques (dégranulation), avec la libération de perforine, granzymes et granulysine qui vont induire l'apoptose des cellules tumorales. Elles expriment également à leur surface des ligands des récepteurs Fas (FAS-L) et TRAIL (TRAIL-R). L'interaction entre ces ligands et leur récepteurs présents à la surface des cellules tumorales induit l'apoptose caspase-dépendante de ces dernières⁵². Ils vont également pouvoir exercer leur activité cytotoxique via l'ADCC, c'est-à-dire la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) via l'expression du CD16, aussi connu sous le nom de Fc-γRIII, récepteur

de faible affinité⁵³. Enfin, les NK vont participer à la modulation de la réponse immunitaire en produisant diverses cytokines et chimiokines qui promouvoir les fonctions anti-tumorales des autres cellules de l'immunité.

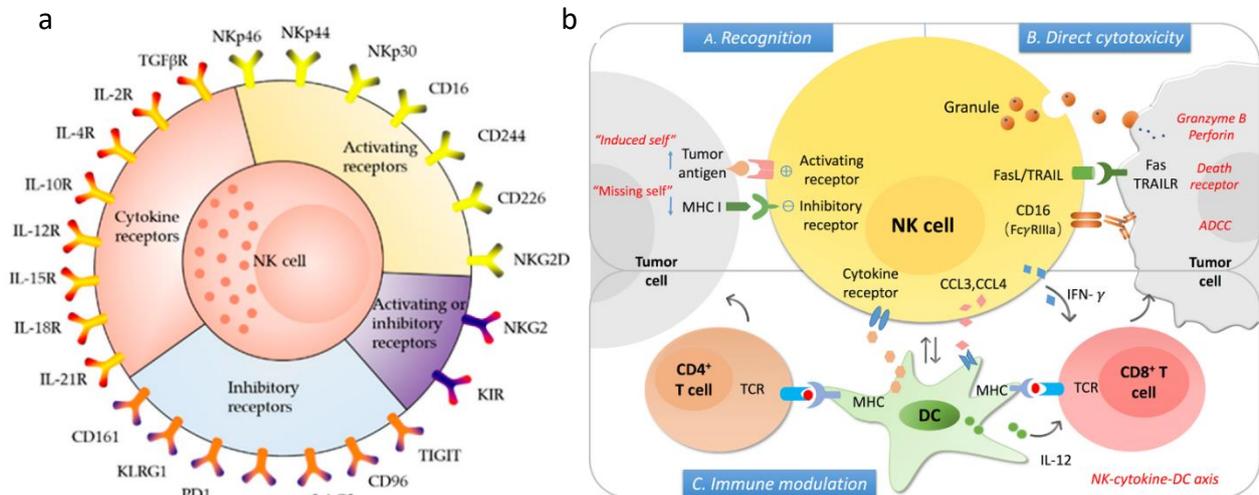


Figure 11 : a. Les principaux récepteurs des NK⁵⁴ b. Les fonctions anti-tumorales des NK⁵⁵.

Les NK peuvent fonctionner comme un effecteur cytotoxique inné ainsi que comme un régulateur des réponses innées et adaptatives. A : En tant que cellules cytotoxiques innées, les ligands induits par le stress et la diminution de l'expression du CMH I peuvent être reconnus respectivement par les récepteurs activateurs et inhibiteurs des NK. B : Après activation, les NK peuvent induire la lyse des cellules cibles par la sécrétion de granules contenant du granzyme B et de la perforine, par l'interaction des récepteurs de mort avec leurs ligands et via l'ADCC. C : Les NK activées sécrètent des cytokines et des chimiokines qui favorisent la maturation et le recrutement des DC, ce qui peut moduler davantage la réponse T.

2.2.3 Macrophages M1

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont une autre composante de l'immunité innée dérivant soit des monocytes circulants, soit des macrophages tissulaires (déjà présents avant le début de la tumorigenèse). Leur activation dépend de la reconnaissance de molécules de stress (HMGB1 ou ATP) par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors, PRR) tels que les TLR ou les RLR (*RIG-I-Like Receptors*). En fonction des cytokines présentes dans le MET, les macrophages seront polarisés en macrophages M1 (anti-tumoraux) ou M2 (pro-tumoraux, abordés plus tard dans l'introduction)^{56,57}. Le phénotype des

macrophages M1 se caractérise, chez l'Homme, par l'expression de CD68, HLA-DR et CCR7 ; et est favorisé en présence d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-12. Les macrophages M1 vont participer à la réponse immunitaire anti-tumorale soit directement en lysant et phagocytant les cellules cancéreuses ; soit indirectement en acquérant des fonctions de cellules présentatrices d'antigènes permettant ainsi le recrutement et l'activation de CTL, ou en produisant des cytokines qui vont potentialiser les fonctions effectrices des cellules cytotoxiques présentes sur le site tumoral (production d'IL-12 et impact sur les CTL et NK) et favoriser des réponses de types Th1^{56,57}.

2.2.4 Neutrophiles N1

Les neutrophiles sont les polynucléaires les plus abondants. Ils sont présents dans la circulation et sont généralement les premières cellules à infiltrer les tissus enflammés. Ils sont activés, comme les macrophages, par des récepteurs de l'immunité innée (PRR) et vont impacter les autres cellules de l'immunité grâce aux cytokines et chimiokines qu'ils peuvent produire, et vont influencer le développement tumoral selon leur polarisation. De la même façon qu'on retrouve deux profils de macrophages, les neutrophiles associés aux cancers (TANs) présentent deux orientations fonctionnelles selon s'ils ont un profil immunostimulateur (on parle alors de neutrophiles N1), ou un profil immunosuppresseur (on parle alors de neutrophiles N2, aussi appelés dans certaines études PMN-MDSC ou G-MDSC pour *granulocytic/polymorphonuclear myeloid derived suppressive cells*)⁵⁸. La majorité des études réalisées sur les TANs démontrent que les TANs ont principalement des fonctions pro-tumorales. Cependant, quelques études décrivent quelques fonctions anti-tumorales des TANs N1 résumées ci-après. Les TANs N1 vont pouvoir éliminer les cellules tumorales soit en induisant l'apoptose dépendante des caspases suite à l'interaction du FAS-L avec son récepteur FAS (FAS/FAS-L)⁵⁹. Les neutrophiles sont également connus pour produire des espèces réactives de l'oxygène ou ROS. Après contact avec les cellules tumorales, les TANs N1 vont produire des ROS (H₂O₂ ou peroxyde d'oxygène) et activer le canal calcique TRPM2 exprimé à la surface des cellules. L'activation de ce canal va induire une augmentation de l'influx de calcium dans la cellule tumorale. Cette surcharge en Ca²⁺ déclenchera alors la mort cellulaire programmée ou la nécrose des cellules tumorales⁶⁰. Les neutrophiles N1 peuvent

également exercer leur activité anti-tumorale via la production de cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- α .

2.2.5 Lymphocytes B

La dualité de la réponse immunitaire observée chez les cellules de l'immunité innée est également retrouvée dans les cellules de l'immunité adaptative, à commencer par les lymphocytes B infiltrants les tumeurs ou TIL-B. Les TIL-B (*Tumor infiltrating B lymphocytes*) font référence à la fois aux lymphocytes B et aux cellules plasmacytoïdes, et on peut à nouveau retrouver des TIL-B pro- et anti-tumoraux. Plusieurs études tendent à montrer que les fonctions pro- ou anti-tumorales des TIL-B dépendent de leur localisation dans les tumeurs. En effet, il est maintenant établi que les TIL-B ont deux localisations principales au sein du tissu tumoral : ils sont retrouvés au sein ou en périphérie directe de structures lymphoïdes tertiaires (TLS), structures lymphoïdes ectopiques organisées sous forme de ganglion et composées de cellules T et B ; et en intra-épithélial / intra-tumoral (hors des TLS). Il semblerait qu'en dehors des TLS, les TIL-B développent diverses fonctions immunosuppressives qui seront détaillées dans la section 2.3.3, alors que dans les TLS, ceux-ci auront diverses activités anti-tumorales⁶¹. Cette hypothèse est confortée par l'observation selon laquelle la présence de TLS, et plus particulièrement une forte densité en TLS, au sein du MET dans divers cancers solides est associée à un bon pronostic avec une meilleure survie des patients atteints de cancers pulmonaires⁶², mammaires⁶³, colorectaux⁶⁴, sarcomes⁶⁵ et mélanomes⁶⁶, ...

Les TIL-B vont pouvoir participer à la réponse anti-tumorale grâce à leur fonction de cellule présentatrice d'antigène. Ces cellules expriment à leur surface les molécules de CMH de classe I et II, les molécules de co-stimulations (CD40, CD80/86) et peuvent donc activer les LT CD8 et LT CD4. Contrairement aux macrophages et DC, elles n'utilisent pas la phagocytose ou la pinocytose pour capter les antigènes tumoraux, mais plutôt les immunoglobulines (Ig) présentes à leur surface, ce qui leur permet de présenter aux LT des antigènes tumoraux peu représentés dans le MET. De plus, ce sont les seules CPA capables de proliférer (expansion clonale), ce qui permet d'amplifier la réponse antigène-spécifique⁶⁷. Les TIL-B peuvent également éliminer directement les cellules tumorales via la production de Granzyme-B et l'expression de TRAIL à leur surface. Elles peuvent aussi potentialiser la réponse anti-tumorale d'autres cellules immunitaires via la production de cytokines immunostimulatrices comme

l'IL-12, l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-2 et le GM-CSF qui vont pouvoir stimuler les macrophages, DC, LT et NK.

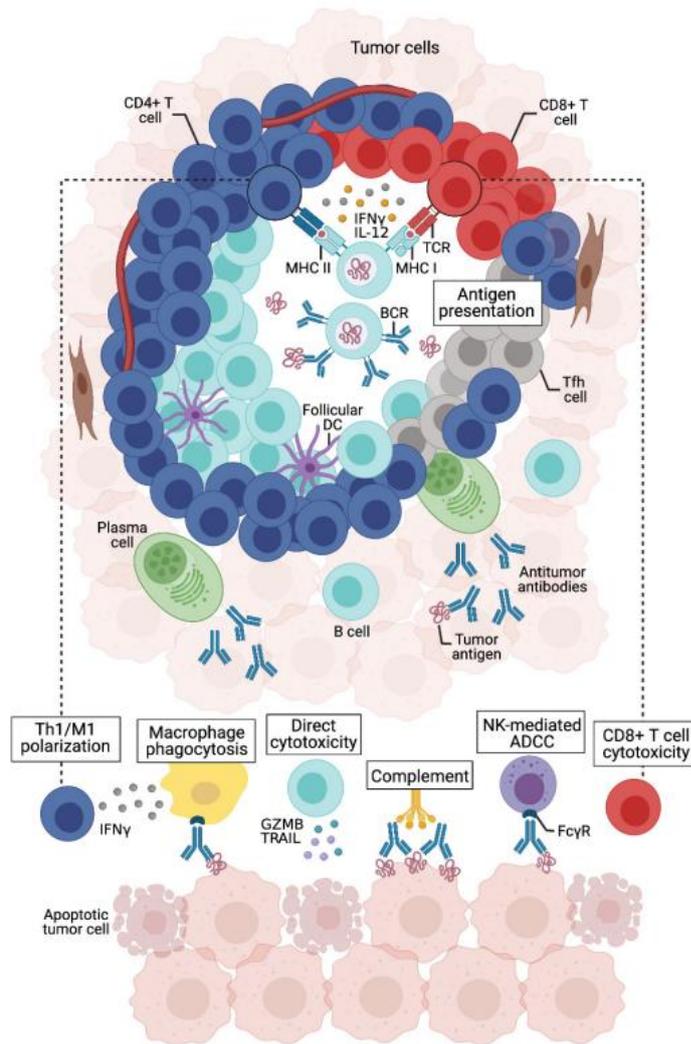


Figure 12 : Résumé des fonctions anti-tumorales des TIL-B⁶⁷ . Les LB infiltrant les tumeurs organisés en TLS bien structurés coordonnent les réponses immunitaires anti-tumorales par de multiples mécanismes. Ils peuvent présenter des antigènes dérivés de la tumeur aux LT et sécréter des cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-12 qui favorisent la polarisation Th1/M1 et la cytotoxicité des LT CD8+. Les anticorps spécifiques des tumeurs sécrétés par les plasmocytes peuvent déclencher la cascade du complément, médier la phagocytose des cellules tumorales et l'ADCC par les cellules NK. Les LB activés peuvent également lyser directement les cellules tumorales du granzyme B.

Les TIL-B activent également d'autres mécanismes de l'immunité via la production d'anticorps. Les IgG produites par les cellules plasmatoïdes au sein du MET vont favoriser la présentation antigénique par les DC, mais aussi déclencher l'ADCC par les NK, la phagocytose dépendante des anticorps (ADCP) par les cellules myéloïdes suite à l'interaction entre le Fc- γ récepteur et

le complexe antigène/anticorps ; et la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), des mécanismes qui vont aboutir *in fine* à l'élimination des tumeurs⁶⁷⁻⁶⁹.

2.2.6 Lymphocytes T CD4

L'activation des Lymphocytes T nécessite 3 signaux : la reconnaissance du complexe CMH/antigène par le TCR, le signal de co-stimulation et enfin, la réponse aux cytokines produites par les CPA. En fonction des cytokines présentes, les LT CD4 ou T helper vont pouvoir se différencier en diverses sous-populations à fonctions spécifiques dans la réponse immunitaire.

La différenciation ou polarisation des LT CD4 en Th1 est induite par l'IL-12 qui va promouvoir l'expression du facteur de transcription T-bet. Les Th1 sont impliqués dans la réponse contre les pathogènes intracellulaires et favorisent la mise en place d'une immunité cellulaire (activation des cellules cytotoxiques, LT CD8 et NK). La différenciation Th2 est médiée par l'IL-4 et est caractérisée par l'expression du facteur de transcription GATA-3. Les Th2 sont connus pour favoriser l'élimination des micro-organismes pluricellulaires et pour privilégier la réponse humorale. L'IL-6 et le TGF- β permettent la différenciation en Th17. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription ROR γ T et sont impliquées dans la réponse contre des micro-organismes extracellulaires en recrutant et activant les neutrophiles par exemple. La polarisation en Th9 est médiée en présence de TGF- β et d'IL-4. Ils sont caractérisés par la production d'IL-9 et interviennent dans les maladies atopiques, auto-immunes et dans la défense contre les parasites. Bien qu'il n'existe pas de facteur de transcription spécifique de cette population, l'implication des facteurs PU.1 et GATA-3 a été démontrée. Les Th22 se différencient en présence d'IL-6 et de TNF- α et sont caractérisés par la production d'IL-22. Les Th22 ont un rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires et semblent partager avec les Th17 le facteur de transcription ROR γ T. Les Tfh ou Lymphocytes T auxiliaires folliculaires participent à la différenciation des LB en plasmocytes. Leur différenciation est induite en présence d'IL-21 et est médiée par le facteur de transcription Bcl-6. Les Tfh sont majoritairement retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires. Enfin, les LT régulateurs ou Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3. Ils sont essentiels au maintien de la tolérance du soi en contribuant à l'inhibition des cellules auto-immunes et en prévenant la mise en place de réponses immunitaires excessives^{70,71}.

Il a initialement été pensé que la différenciation des LT CD4 en différentes population de LT auxiliaires était définitive, mais de récentes études ont invalidés ce paradigme. En effet, les LT CD4 présentent une grande plasticité et restent sensibles aux facteurs présents dans leur environnement. Ils peuvent donc passer d'une polarisation à une autre en fonction des cytokines présentes. Il a par exemple été montré que les Treg FOXP3+ et les Th17 pouvaient se trans-différencier, et que les Th17 peuvent acquérir un phénotype Th1 en présence d'IL-1 β , d'IL-23 et d'IL-12⁷².

Au cours des années, le rôle des LT CD4 dans les diverses réponses immunitaires a pu être étudié, que ce soit dans un contexte infectieux, auto-immun, ou cancéreux. Les études réalisées sur les cancers solides ont permis de classer les Th dans la catégorie des cellules à fonctions anti- ou pro-tumorales. Les Th1, Tfh et Th9 sont considérés comme des cellules à activités anti-tumorales, alors que les Th2, Th22 et Treg sont considérés comme ayant des fonctions pro-tumorales. Le rôle des Th17 reste ambigu puisqu'ils peuvent exercer à la fois des fonctions anti- et pro-tumorales en fonction des cancers et des stades tumoraux.

Les Th1 participent à la réponse immunitaire anti-tumorale en produisant du TNF- α et de l'IFN- γ . Le TNF- α va directement agir sur les tumeurs et l'IFN- γ va permettre de moduler l'activité d'autres acteurs de l'immunité (recrutement et activation des CD8 CTL ; amplification des fonctions cytotoxiques des NK et des LT CD8 CTL ; activation des macrophages M1). Les fonctions anti-tumorales des Th9 reposent principalement sur l'IL-9 et l'IL-21, deux cytokines produites par ces cellules. L'IL-9 va pouvoir activer les mastocytes et favoriser leurs fonctions cytotoxiques (production de ROS, de TNF- α et de granzyme B entre autres). L'IL-9 va également permettre (indirectement) le recrutement de cellules dendritiques et des LT CD8 au site tumoral, et va impacter directement la survie des DC et des LT CD8 (augmentation de la durée de vie de ces cellules). L'IL-21 produite par les Th9 va promouvoir la prolifération des LT CD8 et les fonctions cytotoxiques des NK⁷³. Les Tfh infiltrants les tumeurs participent à la réponse anti-tumorale en permettant la formation des TLS dont la présence, comme discuté précédemment, est de bon pronostic pour les patients.

Enfin, il a été démontré que les LT CD4 peuvent également directement éliminer les tumeurs. On parle de LT CD4 cytotoxiques (LT CD4 CTL). Ces cellules peuvent dériver de tous les Th, mais semblent majoritairement être des Th1. Ils sont capables de sécréter perforine, granulysine et granzyme B comme les NK et les LT CD8 CTL et ainsi induire la lyse des cellules

tumorales de façon CMH-II dépendante⁷⁴. Un rôle de FAS/FAS-L et TRAIL est suspecté mais non prouvé chez l'Homme pour l'instant.

2.2.7 Lymphocytes T CD8

L'implication des LT CD8 dans l'immunité anti-tumorale est aujourd'hui largement établie. Leur activité anti-tumorale est médiée par la lyse directe des cellules tumorales ainsi que par la production de cytokines. Suite à la reconnaissance par le TCR des antigènes tumoraux présentés par le CMH de classe I, une synapse entre les LT CD8 CTL et les cellules tumorales est mise en place. Les LT CD8 CTL peuvent alors libérer le contenu des granules lytiques : la perforine forme des pores membranaires qui vont permettre le passage en intracellulaire des granzymes et de la granulysine et induisent la mort des cellules tumorales en activant les voies caspase-dépendantes. Les LT CD8 activés produisent également de l'IFN- γ et du TNF- α . L'IFN- γ est connu pour induire des modifications d'expression de gènes dans les tumeurs et augmenter notamment la présentation d'Ag tumoraux et la production de chimiokines permettant le recrutement de cellules immunitaires. La présence de LT CD8 au sein du MET est d'ailleurs associée à un meilleur pronostic et à une meilleure survie des patients atteints de différents cancers solides, dont les cancers mammaires, ovariens, pulmonaires et colorectaux^{75,76}.

2.3 Les acteurs de la réponse immunitaire pro-tumorale

Certaines cellules de l'immunité, comme les Treg et les MDSCs, sont connues pour être immunosuppressives, et ce, qu'elle que soit le contexte pathologique (infectieux, auto-immuns ou cancéreux). A l'inverse, d'autres présentent des fonctions anti-tumorales lorsqu'elles sont recrutées au site tumoral et y sont détournées. Elles présentent alors des fonctions immunosuppressives qui favoriseront le développement de la tumeur.

2.3.1 Cellules myéloïdes suppressives

Il existe deux grands groupes de MDSC chez l'homme et la souris : les MDSC dérivés de granulocytes/polymorphonucléaires (PMN-MDSC ou G-MDSC) et les MDSC dérivés de monocytes (M-MDSC).

Les PMN-MDSC ont longtemps été pensés comme étant une population distincte des neutrophiles N2. On sait aujourd'hui que les TAN-N2 et les PMN-MDSC sont en réalité les mêmes cellules, et que leur distinction vient tout simplement d'un « problème » de nomenclature. La différence est que le nom TAN-N2 est donné aux neutrophiles pro-tumoraux générés *in vitro*, tandis que le nom PMN-MDSCs est « réservé » aux cellules *in vivo*. Bien que des études aient suggéré une distinction entre PMN-MDSC et neutrophiles suite à l'observation selon laquelle les PMN-MDSCs et les TAN-N2 sont purifiées à différentes densités lors de la séparation des PBMC par gradient de densité, les PMN-MDSCs « sortant » à un gradient de faible densité (1,077 g/ml) et les neutrophiles à un gradient de densité plus élevé (1,1-1,2 g/ml)^{77,78}. D'autres études ont invalidé cette observation puisque ces deux « types cellulaires » aux fonctions pro-tumorales peuvent être trouvés dans des gradients de densité faibles et élevés. Les analyses moléculaires ne permettent pas non plus de distinguer les PMN-MDSC des TAN-N2, et les deux présentent exactement les mêmes mécanismes d'immunosuppression, laissant penser que ces cellules sont tous simplement les mêmes, mais nommées différemment^{79,80}.

A l'inverse, les M-MDSC et les macrophages M2 sont deux populations totalement différentes, comme l'ont montré Song et al : une analyse de trajectoire a permis de montrer que les M-MDSC sont moléculairement distinctes des TAM, qu'ils soient M1 ou M2⁷⁹.

Les deux groupes de MDSC ont été associés à un mauvais pronostic dans divers types de cancer. Une fréquence plus élevée de M-MDSC circulants chez les patients atteints de mélanome est associée à un mauvais pronostic, ainsi qu'à une mauvaise réponse aux traitements. En utilisant plus de 5000 cas de 25 types de cancer différents, Gentles et al. ont montré qu'une infiltration plus élevée de cellules polymorphonucléaires, incluant les PMN-MDSC est corrélée à une baisse de la survie globale⁸¹.

La principale caractéristique qui définit les MDSC est leur capacité à inhiber les réponses immunitaires, y compris celles médiées par les LT, les LB et les NK. Les M-MDSC et les PMN-MDSC partagent des caractéristiques biochimiques clés qui leur permettent de supprimer les réponses immunitaires, avec notamment la surexpression de STAT3 suite à leur activation par diverses molécules (G-CSF, VEGF, TGF- β , etc). L'activation du facteur de transcription STAT3 induit l'expression de gènes codant l'IL-10, les enzymes IDO (Indoléamine 2,3-dioxygénase) et ARG (Arginase) et des espèces réactives à l'oxygène (ROS). Pour exemple, l'exposition des LT CD8 à des MDSC produisant des ROS induit une tolérance spécifique à l'antigène de ces cellules. Les MDSC peuvent également libérer dans le MET des enzymes telles que l'arginase et IDO qui vont induire une « carence » en métabolites nécessaires à la prolifération et à la survie des LT. L'expression de points de contrôles immunitaires par les MDSC est un autre mécanisme d'immunosuppression utilisé par celles-ci. Enfin, la libération de cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF- β) va permettre l'inhibition des fonctions des cellules cytotoxiques ainsi que le recrutement d'autres cellules immunosuppressives telles que les Treg^{78,80}.

Les MDSC vont également participer au développement tumoral en agissant sur la composante non-immunitaire du MET. En effet, elles peuvent produire divers facteurs qui vont favoriser l'angiogenèse et la dissémination des cellules tumorales à d'autres sites (formation de métastases). Par exemple, dans le cancer du sein, la production de ROS par les MDSC va permettre de stabiliser le facteur de transcription HIF-1 α , ce qui favorise une production accrue de VEGF, facteur promouvant l'angiogenèse. Les PMN-MDSC peuvent également sécréter la métalloprotéase MMP-9 qui va permettre le remodelage de la matrice extracellulaire par dégradation des protéines comme le collagène de type IV, ce qui facilitera la migration des cellules tumorales à d'autres localisations dans l'organisme^{80,82-84}.

2.3.2 Lymphocytes T CD4 pro-tumoraux

Comme mentionné précédemment, plusieurs sous-populations de LT CD4 (Treg, Th2, ou encore Th22) sont considérés comme étant des cellules immunitaires à propriétés ou fonctions pro-tumorales.

Les Treg sont caractérisés par l'expression de FOXP3 et du CD25, qui est la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Ils peuvent être produits dans le thymus, on parle alors de tTreg ou nTreg (Treg naturels) ou être induits en périphérie notamment sur le site tumoral par le TGF- β (en présence d'IL-2 et en absence d'IL-6), on parle alors de iTreg. L'IL-10, le TGF- β et l'adénosine produites dans le MET participent à l'expansion des nTreg et à la différenciation des LT CD4 en iTreg. Les fonctions immunosuppressives des Treg passent par de nombreux mécanismes. Ils expriment une forte densité de récepteur à l'IL-2 de haute affinité (CD25) et entrent en compétition avec les LT effecteurs pour cette cytokine. La déprivation en IL-2 des LT effecteurs (utilisée par les Treg) impacte négativement leur survie, prolifération et fonctions. Les Treg vont également impacter la prolifération et les fonctions des LT effecteurs via la production de molécules immunosuppressives comme l'IL-10, le TGF- β et l'adénosine. En effet, les Treg expriment à leur surface les ectonucléotidases CD39 et CD73 impliquées dans la transformation de l'ATP, molécule immunostimulatrice, en adénosine, molécule immunosuppressive. Enfin, les Treg peuvent exprimer des récepteurs inhibiteurs à leur surface, appelés points de contrôle immunitaire, comme PD-L1 et CTLA-4⁸⁵. Via l'expression de PD-L1, les Treg vont pouvoir directement inhiber la fonction des LT effecteurs. CTLA-4 et CD28 (molécule de co-stimulation) sont en compétition pour le CD80/86 exprimé par les DC. CTLA-4 ayant une affinité supérieure à CD28 pour CD80/86, il va s'y lier et priver ainsi les LT du signal 2, empêchant ainsi leur activation. De plus, l'interaction entre CTLA-4 et CD80/86 va induire la production d'IL-10 et de TGF- β par les DC, amplifiant le recrutement et la réponse des Treg, ainsi que le recrutement d'autres cellules immunosuppressives.

Dans le contexte tumoral, les Th2, bien que favorisant le recrutement d'éosinophiles et de macrophages sur le site tumoral grâce à la production d'IL-4, vont aussi avoir des fonctions pro-tumorales. En effet, la présence de Th2 dans le MET semble plutôt associée à un mauvais pronostic (par exemple dans le cancer du sein et le glioblastome). Ceci est principalement dû aux cytokines produites par les Th2 activés, à savoir IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et IL-17. L'IL-4 va par exemple inhiber la différenciation Th1 des LT CD4 et augmenter la résistance des cellules

tumorales à l'apoptose⁸⁶. L'IL-10, une des principales cytokines immunosuppressives, va inhiber les fonctions des CTL et favoriser les fonctions des Treg et autres cellules suppressives.

Une autre sous-population de LT CD4 possède des fonctions pro-tumorales. En effet, le rôle crucial des Th22 dans la carcinogenèse a été démontré par plusieurs équipes dans différents types de cancers (colorectaux, gastriques, ovariens et pulmonaires)⁸⁷⁻⁹⁰. Cet effet pro-tumoral est dû à leur capacité à produire l'IL-22. L'IL-22 est connue pour favoriser la survie et la prolifération des cellules tumorales via l'activation de STAT3 et l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Toujours par un mécanisme STAT3-dépendant, l'IL-22 va induire la production de VEGF par les cellules tumorales, facteur d'angiogenèse, mais aussi de recrutement/d'activation de cellules immunitaires suppressives (MDSC, TAM-M2, Treg...). Elle va également induire la production de métalloprotéases qui favorisent la formation de métastases.

2.3.3 Lymphocytes B régulateurs

Contrairement aux Treg, les lymphocytes B régulateurs (Breg) n'ont pas de facteur de transcription spécifique qui permette leur identification spécifique. La différenciation des LB en Breg peut se faire à n'importe quel stade du développement des LB (LB immature, LB mature, LB mémoire, plasmocytes...). Elle est induite suite à l'activation de molécules de surface telles que le BCR, les TLR et le CD40, les trois signaux d'activation utilisés *in vitro* dans diverses études sur les Breg⁹¹⁻⁹⁴; ou suite à l'exposition à certaines cytokines : IL-1 β , IL-6, IL-21, et IL-35^{73,92,93,95}. Les Breg favorisent la progression tumorale et la formation de métastases en participant à la mise en place d'un microenvironnement suppresseur via la production d'IL-10, de TGF- β et d'IL-35. Les Breg produisant de l'IL-10 (aussi appelés B10) vont impacter les fonctions des DC qui vont produire plus d'IL-4 et moins d'IL-12, favorisant la différenciation des LT CD4 en Th2 (population pro-tumorale) et inhibant la différenciation en Th1 (population anti-tumorale).

Les Breg induisent également la polarisation des LT CD4 en Treg via la production de TGF- β et favorisent de même la différenciation des TAM en macrophages M2. Toutes ces cellules inhiberont *in fine* la réponse des NK et CD8 CTL et favoriseront ainsi la progression tumorale.

Les Breg peuvent également lyser les cellules immunitaires anti-tumorales par la production de granzyme B (induite en présence d'IL-21) ou par un mécanisme FAS dépendant^{91,96-98}. Enfin, les Breg vont inhiber les fonctions des cellules immunitaires anti-tumorales grâce à l'expression de divers points de contrôles immunitaires (PD-L1 par exemple) et à la production d'adénosine.

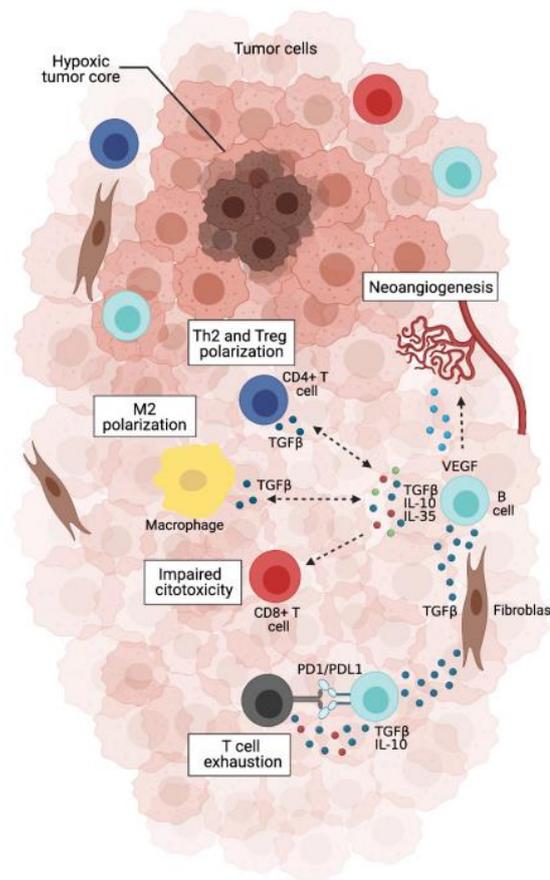


Figure 13 : Résumé des fonctions pro-tumorales des TIL-B⁶⁷. Les LB distribués de manière dispersée dans la masse tumorale peuvent acquérir un phénotype immunosuppresseur en réponse à une stimulation par le TGF- β sécrété par les fibroblastes, les Tregs ou les macrophages M2. Ils peuvent libérer de l'IL-10, de l'IL-35 et du TGF- β qui favorisent l'expansion des Tregs et la polarisation Th2/M2, tout en supprimant l'activité des LT effecteurs. Cette action est également potentialisée par l'expression de PD-L1 par les LB. Enfin, les LB producteurs de VEGF peuvent également favoriser la progression tumorale par le biais de la néoangiogenèse.

2.3.4 Cellules dendritiques plasmacytoïdes et moDC pro-tumoraux

Bien que les moDC puissent posséder un phénotype anti-tumoral, la présence de certains facteurs dans le MET induit leur différenciation en cellules à propriétés immunosuppressives. Le TGF β et l'IL-6 produites par les CAF par exemple induisent l'expression de PD-L1 par les moDC, ce qui entraîne l'inactivation des fonctions des LT CD8 CTL⁹⁹. Les moDC pro-tumoraux présentent également un changement dans leur production de cytokines : elles produisent plus d'IL-10 et moins d'IL-12, favorisant ainsi les Treg et empêchant la différenciation en Th1. Ils perdent également leur capacité de présentation antigénique ou ne co-expriment plus ou pas les molécules de co-stimulation, induisant ainsi l'anergie des LT.

Les pDC sont caractérisées par une sécrétion rapide et massive d'IFN de type I en réponse à l'activation des TLR par des agents pathogènes ou des signaux de danger. L'IFN- α étant une molécule à fort potentiel anti-tumoral (induction de l'apoptose des cellules tumorales, inhibition de l'angiogenèse, ...), il a initialement été pensé que les pDC étaient des cellules anti-tumorales. En effet, la présence de pDC en périphérie semble être de bon pronostic chez les patients atteints de cancer du pancréas, cependant, de plus en plus d'études suggèrent que de fortes densités de pDC dans le MET sont associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints de divers cancers (exemple : cancer ovarien, oro-pharyngé, mélanome), suggérant que la périphérie ne fait pas écho à ce qui se déroule au sein du site tumoral. Ces mêmes études montrent que les pDC recrutées au site tumoral présentent souvent un phénotype non activé, ne produisent pas d'IFN- α et participent au maintien de l'immunosuppression en favorisant notamment les fonctions des Treg par l'expression de molécules telles qu'ICOS-L et OX40-L^{45,100,101}.

2.3.5 Macrophages M2

Les macrophages associés aux tumeurs M2 (TAM-M2 ou M2) sont induits en présence d'IL-4, IL-10, et TGF- β . Ils sont caractérisés, chez l'Homme, par l'expression de CD163, CD209 et CD206.

La participation des M2 au développement tumoral se fait grâce à divers mécanismes impliquant l'immunosuppression, l'angiogenèse, ainsi que l'activation et le remodelage du stroma, favorisant ainsi la formation de métastases. De récentes études ont montré que le

« choix » des fonctions pro-tumorales exercées par les M2 dépend de leur localisation dans la tumeur, suggérant donc que les M2 présentent une forte plasticité. En effet, en intra-tumoral, ils sécrètent des facteurs de croissance comme le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et le TGF- β , qui favorisent la prolifération des cellules tumorales. Dans les régions péri-nécrotiques et/ou à proximité de régions vascularisées, les M2 produisent diverses cytokines (IL-8, TNF- α), facteurs (VEGF), et enzymes (MMP) qui participent à l'angiogenèse. Concernant la modulation de la réponse immunitaire, les TAM-M2 perdent leur capacité à phagocyter les cellules tumorales et donc à présenter les antigènes tumoraux aux LT, activant moins les LT au niveau du site tumoral. De plus, ils inhibent la prolifération et les fonctions effectrices des cellules anti-tumorales par la production d'IL-10, de TGF- β et d'arginase-1, et par l'expression de PD-L1 par exemple. L'arginase (ARG) va diminuer la quantité d'arginine disponible dans le MET, un acide aminé nécessaire au métabolisme des LT, ce qui induira l'arrêt du cycle cellulaire des LT effecteurs^{56,57}.

2.3.6 Molécules immunosuppressives

Comme discuté tout au long de cette partie, la promotion du développement tumoral passe par l'action de divers facteurs solubles produits par les cellules tumorales ainsi que les cellules du MET (immunitaires et non immunitaires). Ces molécules immunosuppressives, présentées brièvement ci-dessous, comprennent le VEGF, le TGF- β , l'arginase (ARG), l'IDO et l'adénosine.

a. VEGF

Le VEGF a été initialement décrit comme un facteur pro-angiogénique. Il est produit par différents types cellulaires, incluant les cellules tumorales, les macrophages, et les cellules endothéliales. Il est établi que la production de VEGF est gouvernée par le facteur de transcription HIF- α , facteur exprimé en cas d'environnement hypoxique. En plus de son activité angiogénique, le VEGF va participer à l'immunosuppression de diverses façons. Il inhibe la maturation des DC, induisant ainsi un défaut de présentation des Ag aux LT. Il va permettre le recrutement des MDSC au site tumoral ; participer (conjointement avec l'IL-4 et l'IL-10) à la polarisation des macrophages en TAM-M2 ; et favoriser le recrutement des Treg dans le MET soit indirectement via le défaut de maturation des DC, qui vont induire une polarisation des LT CD4 en Treg, soit directement en promouvant la prolifération des Treg exprimant le récepteur au VEGF à leur surface. L'accumulation de cellules suppressives induite

par le VEGF permettra d'amplifier l'immunosuppression sur le site tumoral. Enfin, le VEGF peut impacter directement les fonctions des LT effecteurs en induisant l'expression de PD-1 et TIM-3 par ces derniers, deux points de contrôles immunitaires qui conduisent à ou indiquent un état d'exhaustion ou d'épuisement des LT^{102,103}.

b. TGF- β

Dans les tumeurs, le TGF- β est produit par les cellules tumorales, les Treg, les TAM-M2 et les CAF ; et participe à l'échappement immunitaire et à la progression tumorale en impactant le système immunitaire. Il va bloquer les fonctions CPA des DC et inhiber leur maturation ; il inhibe la différenciation des LT CD4 en Th1 et favorise au contraire la polarisation des LT CD4 en LT régulateurs. Il va également inhiber l'activité cytotoxique des LT CD8 CTL en bloquant notamment la production des molécules lytiques (perforine, granzyme et granulysine) et l'expression de FAS-L par les CTL. Il inhibe également leur prolifération en bloquant l'expression du récepteur à l'IL-2 par les CTL. Enfin, il va favoriser la polarisation des macrophages en TAM-M2 et favoriser les fonctions pro-tumorales des MDSCs¹⁰⁴.

c. Arginase et Indoléamine 2,3-dioxygénase

La progression tumorale est associée à des altérations des voies métaboliques à la fois dans les cellules tumorales et dans les cellules du MET. C'est d'ailleurs l'un des hallmarks du cancer. De nombreuses études ont montré que dans le microenvironnement tumoral, deux acides aminés sont particulièrement importants pour les fonctions effectrices des LT : l'arginine et le tryptophane. Ces deux acides aminés sont dégradés respectivement par l'arginase (ARG) et l'indoléamine 2,3-dioxygénase, et de nombreuses études montrent une augmentation importante de ces deux enzymes dans le MET. De même, divers auteurs ont pu associer la présence de ces enzymes à un mauvais pronostic chez des patients atteints de mélanome, cancer du sein, cancer colorectal...

L'ARG est produite majoritairement par les cellules myéloïdes dans le MET (DC, MDSC, TAM-M2), ainsi que par les Treg. Deux isoformes d'ARG ont été identifiées, ARG1 et ARG2, et les quantités de ces deux isoformes augmentent significativement dans le MET de divers cancers solides. L'ARG1/2 va donc dégrader l'arginine, entraînant ainsi une déprivation des LT de cet acide aminé, ce qui conduira à l'inhibition de leurs fonctions effectrices (cytotoxicité des CTL, production de cytokines par les LT helper...), ainsi qu'à l'inhibition de leur prolifération. La présence d'ARG induit une diminution d'expression de la chaîne ζ du CD3 (CD3 ζ), ce qui

empêcher la transduction du signal d'activation des LT suite à l'engagement du TCR. En revanche, l'ARG favorise le développement des Treg et augmente leurs capacités suppressives, suggérant qu'un environnement pauvre en arginine est favorable aux Treg et donc à la mise en place d'un environnement immunosuppresseur. Les NK sont moins sensibles que les LT effecteurs à de faibles concentrations en arginine, mais la déprivation en cet AA impacte quand même leur prolifération et leur fonction cytotoxique. Des études ont montré que la déprivation en arginine induit une baisse de l'expression de NKp46 et NKp30, deux récepteurs activateurs des NK, et induit aussi une baisse de production d'IFN- γ par ces cellules¹⁰⁵.

IDO dégrade le tryptophane présent dans le MET, un autre AA essentiel au développement et aux fonctions effectrices des LT. IDO est produite par différentes cellules du MET, incluant les cellules tumorales, les DC et les MDSCs. Elle exerce ses fonctions immunosuppressives avec des mécanismes similaires à ceux de l'ARG. En effet, elle bloque les fonctions effectrices et la prolifération des LT effecteurs en inhibant le CD3 ζ et favorise au contraire, le développement et les fonctions des Treg. Elle favorise la différenciation des monocytes en TAM-M2 et inhibe les fonctions CPA des DC en diminuant l'expression des molécules de co-stimulation CD40 et CD80/86¹⁰⁶.

d. Adénosine

L'adénosine (Ado) est un nucléoside connu pour ces puissantes activités immunosuppressives. Elle est produite à partir de l'ATP relarguée en extracellulaire par les cellules tumorales en cours de mort cellulaire. L'ATP est normalement une molécule immunostimulatrice qui, après fixation sur son récepteur, le récepteur puriginique de type 2 (P2X et P2Y), va favoriser la maturation des DC, et donc l'activation des LT spécifiques des tumeurs. Cette ATP peut cependant être pris en charge par le CD39 (ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase 1, ENTPD1) et être transformée en ADP puis en AMP. L'AMP est ensuite transformée en Adénosine par le CD73 (ecto-5'-nucléotidase, NTE5), l'autre enzyme impliquée dans la voie de l'adénosine¹⁰⁷. Il est important de noter que les deux ectonucléotidases CD39 et CD73 peuvent être exprimées par tous les types cellulaires, et que la présence de ces deux enzymes sur la même cellule n'est pas nécessaire à la transformation de l'ATP en Ado. En effet, la présence de ces deux enzymes dans le même environnement est suffisante.

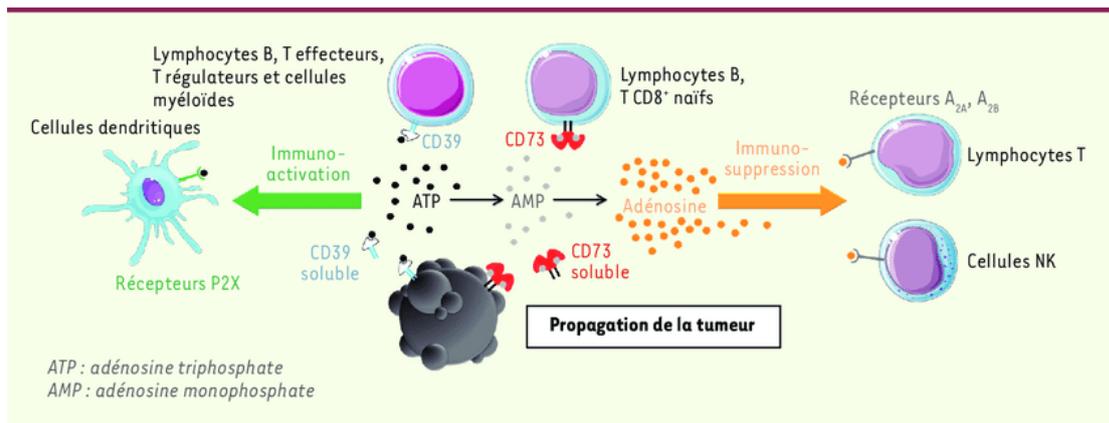


Figure 14 : La voie ATP/AMP/adénosine¹⁰⁸. Les ectonucléotidases CD39 et CD73 produisent de l'adénosine dans le microenvironnement tumoral en transformant l'ATP extracellulaire, une molécule immunostimulatrice relarguée par les cellules tumorales lysées, en AMP, puis en adénosine. L'adénosine inhibe les fonctions effectrices des LT CD8 et des NK. La diminution de la quantité d'ATP, quant à elle, diminue l'activation des cellules dendritiques.

L'adénosine se fixe sur les récepteurs puriniques de type 1 (A_{2A} et A_{2B}) exprimés par diverses cellules immunitaires¹⁰⁹. La fixation d'Ado sur son récepteur va inhiber les fonctions effectrices des LT CD8 et NK. Elle augmente également l'expression des points de contrôles immunitaires par les LT et induit leur anergie. L'Ado va, au contraire, activer et favoriser les fonctions suppressives des Treg, des MDSCs et des TAM-M2¹¹⁰. La diminution de la quantité d'ATP, quant à elle, diminue l'activation des cellules dendritiques via les récepteurs P2X, empêchant l'activation de nouveaux LT spécifiques des tumeurs.

2.3.7 Points de contrôles immunitaires

L'immunosuppression et l'échappement tumoral peuvent être médiés, en plus des facteurs solubles, par des récepteurs membranaires exprimés à la surface des cellules effectrices : les points de contrôles immunitaires. La découverte de ces points de contrôle immunitaires a révolutionné la prise en charge thérapeutique des patients, à tel point qu'elle a été récompensée par un prix Nobel en 2018, attribué aux chercheurs à Tasuku Honjo et James P Allison. Ces deux chercheurs ont, dès le milieu des années 1990, commencé à mettre en évidence la possibilité d'utiliser le système immunitaire pour détruire des tumeurs, en levant notamment les freins de la réponse immunitaire.

En condition physiologique, les points de contrôles immunitaires (immune checkpoint, IC) maintiennent la tolérance au soi et contrôlent l'intensité de la réponse immunitaire, empêchant ainsi le développement de maladies auto-immunes et une exacerbation de l'inflammation qui serait délétère à l'organisme. Dans le cancer, ceux-ci participent à l'inhibition des fonctions effectrices des cellules immunitaires anti-tumorales, participant donc à l'échappement et au développement tumoral^{111,112}.

a. PD-1

Programmed cell death protein 1 (PD-1), aussi connu comme CD279, est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé sur les LT activés, les Treg, les LB, les NK, macrophages et certaines DC. PD-1 interagit avec deux ligands : PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), aussi appelé CD274 ou B7-H1, et PD-L2 (*programmed death-ligand 2*), aussi appelé CD273 ou B7-DC. Ces ligands sont exprimés constitutivement par toutes les cellules présentatrices d'antigènes, et peuvent être induits par les cytokines pro-inflammatoires sur d'autres types cellulaires (il est par exemple connu que suite à une exposition à l'IFN- γ , les cellules tumorales surexpriment PD-L1). L'interaction de PD-1 avec ses ligands provoque l'inhibition de la prolifération et des fonctions effectrices des LT (cytotoxicité et production de cytokines) et provoque leur exhaustion. A l'inverse, il favorise la prolifération des Treg, et soutient leurs fonctions immunosuppressives. L'expression de PD-1 par les macrophages est associée à une diminution de leur capacité phagocytaire, bloquant leur fonction de CPA^{112,113}.

b. CTLA-4

CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) est un autre point de contrôle immunitaire de la superfamille des immunoglobulines. Il présente des similitudes structurelles et biochimiques avec CD28. Ils partagent d'ailleurs les mêmes ligands, à savoir CD80/86, à la différence que CTLA-4 présente une meilleure affinité et une plus grande avidité pour ses ligands. Il entre donc en compétition avec le CD28 pour la liaison aux CD80/86 présents sur les APC. Il induit d'ailleurs l'internalisation de CD80/86, les rendant moins disponibles pour CD28 et empêchant ainsi l'activation des LT puisqu'il n'y aura pas de signal de co-stimulation. L'expression de CTLA-4 est induite après activation des LT effecteurs et inhibent les fonctions effectrices de celles-ci. A l'inverse, CTLA-4 est constitutivement exprimés par les Treg (puisque son expression est contrôlée par FOXP3) auxquels il confère un « outil » supplémentaire pour médier l'immunosuppression dans le MET^{112,114}.

c. TIGIT

TIGIT (*T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains*) est également un récepteur appartenant à la superfamille des immunoglobulines, et appartient à la sous-famille des *poliovirus receptors-like* (PVR-like). Il possède un motif ITIM intracellulaire, c'est-à-dire un motif d'inhibition des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (par opposition aux ITAM, motifs activateurs). Son expression est retrouvée sur les LT (effecteurs et régulateurs) et les NK. Il possède deux ligands connus, CD105 et CD112, qui sont exprimés par les cellules tumorales et les cellules dendritiques.

De même que CTLA-4 entre en compétition avec CD28 pour la liaison à leurs ligands communs, TIGIT entre en compétition avec le CD226 pour la liaison de CD155 et CD112 (nommée PVR en figure 15 pour *poliovirus receptors*). CD226 est exprimé par les lymphocytes naïfs ou non activés, et l'expression de TIGIT est induite après l'activation des LT et des NK. En se liant aux PVR, TIGIT va induire, via ces motifs ITIM, l'inhibition de l'activation des LT et des NK.

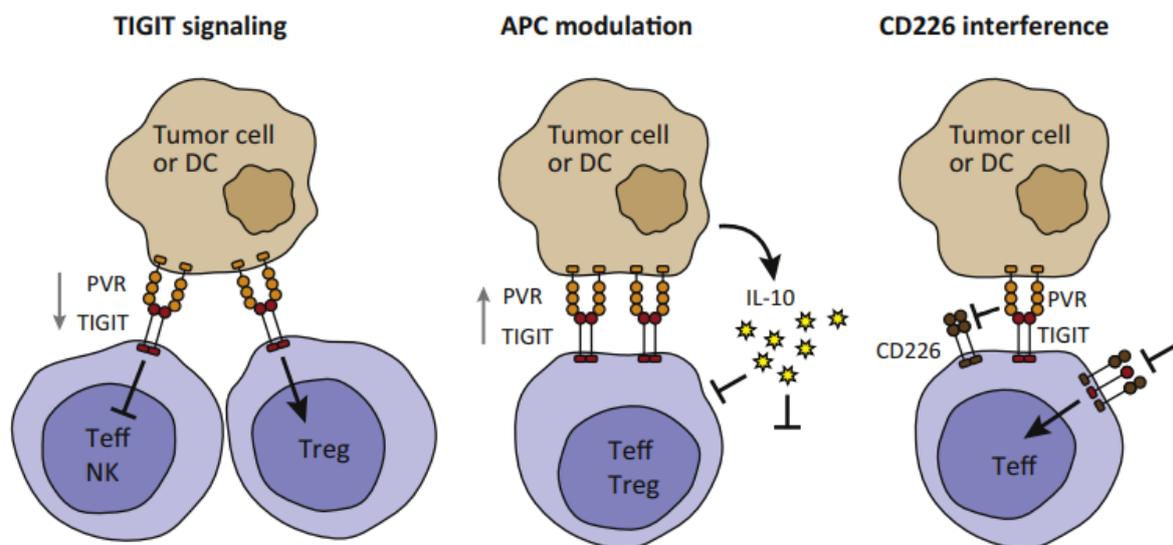


Figure 15 : Les modes d'action de TIGIT¹¹⁵. TIGIT impacte les fonctions des LT par trois mécanismes d'action distincts. En se liant au PVR exprimé par les LT effecteurs et NK, TIGIT déclenche un signal inhibant leurs fonctions. A l'inverse, son expression par les Treg est plutôt associée à une augmentation de leurs activités immunosuppressives (panneau de gauche). Dans les cellules dendritiques ou les cellules tumorales, TIGIT induit la sécrétion de molécules immunosuppressives (panneau central). Enfin, TIGIT peut inhiber la signalisation du CD226 en se liant à PVR avec une affinité plus élevée, ce qui induit une inhibition des fonctions des LT effecteurs (panneau de droite).

La liaison de TIGIT aux PVRs exprimés par les DC favorise l'induction de DC tolérogènes produisant plus d'IL-10 et moins d'IL-12, ce qui aura pour effet d'augmenter la différenciation des LT CD4 en Treg et diminuer la différenciation en Th1. La compétition avec le CD226 (exprimés par les LT et les NK) pour les PVR inhibe leur activation (de la même façon que CTLA-4 empêche l'interaction de CD28 avec CD80/86). Comme pour PD-1 et CTLA-4, l'expression de TIGIT par les Treg renforce les fonctions immunosuppressives de ces dernières. En effet, des études ont montré que les Treg exprimant TIGIT présentent des fonctions immunosuppressives plus fortes que les Treg qui ne l'expriment pas. Enfin, des études ont démontré l'implication de cet IC dans la polarisation des macrophages en TAM-M2^{114,115}.

d. TIM-3

Tim-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain 3*) est exprimée par de nombreuses cellules du MET, incluant les LT mémoires ou LT activées, LB, DC, NK, mais aussi les macrophages et les MDSCs et les cellules tumorales.

Le premier ligand de Tim-3 identifié est la galectine-9 (Gal-9). L'interaction Tim-3/Gal-9, qui peut être exprimée par les cellules tumorales, permet de réguler les fonctions des Th1 et des LT CD8 en inhibant la signalisation du TCR ainsi que la production d'IL-2. Tim-3 reconnaît 2 autres types de ligands : la phosphatidylsérine exprimée par les cellules apoptotiques et le signal de danger HMGB1 (*high mobility group protein B1*). Son activation conduit à l'interruption de l'activation des DC, participant donc à l'induction de DC tolérogènes. Au contraire, l'expression et l'engagement de TIM-3 par les Treg accroît l'activité suppressive des cellules via une augmentation d'expression d'IL-10, de granzyme B et de perforine. L'axe TIM-3/Gal-9 intervient également dans la différenciation des cellules myéloïdes suppressives MDSC. Récemment, CEACAM-1 (*carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1*) a été identifié comme ligand de TIM-3. La co-expression de TIM-3 et de CEACAM-1 par la même cellule T induit la formation d'un hétérodimère en *trans* et inhibe la réponse T. L'interaction entre CEACAM-1 et TIM-3 peut également se faire en *cis*, chaque molécule étant exprimée par une cellule différente, mais dans les deux cas, la signalisation en *cis* ou en *trans* induit systématiquement une inhibition des fonctions des LT et une tolérance^{112,116}.

a. LAG-3

LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*) ou CD223 est un autre récepteur de la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé à la surface des LT activés, NK, LB et des pDC. LAG-3 est un

homologue du CD4 et il se lie, comme ce dernier, aux molécules de CMH de classe II exprimées par les CPA et les cellules tumorales. Son affinité pour le CMH de classe II est plus élevée que le CD4, mais des études ont démontré que l'inhibition de l'activation des LT CD4 induite par LAG-3 n'est pas due (en tout cas pas majoritairement) à la compétition entre ces deux molécules pour le CMH II. Celle-ci passe plutôt par la génération de signaux intracellulaires inhibiteurs suite à l'engagement de LAG-3. L'expression de LAG-3 par les Treg est, encore une fois, synonyme de Treg à fortes capacités immunosuppressives. En effet, il a été montré que les Treg exprimant LAG-3 produisent plus d'IL-10 et de TGF- β . L'expression de LAG-3 par les LT CD8 est associée à un phénotype d'épuisement de ces cellules ; les NK exprimant LAG-3 ont une capacité de production de cytokines réduite. Trois autres ligands de LAG-3 ont été identifiés : Galectin-3, LSECtin et *fibrinogen-like protein 1* ou FGL1. Ces trois molécules sont exprimées à la surface des cellules tumorales et sont capables d'inhiber la réponse T anti-tumorale, cependant, l'importance de la participation de chaque ligand à cette inhibition n'est aujourd'hui pas clairement définie^{117,118}.

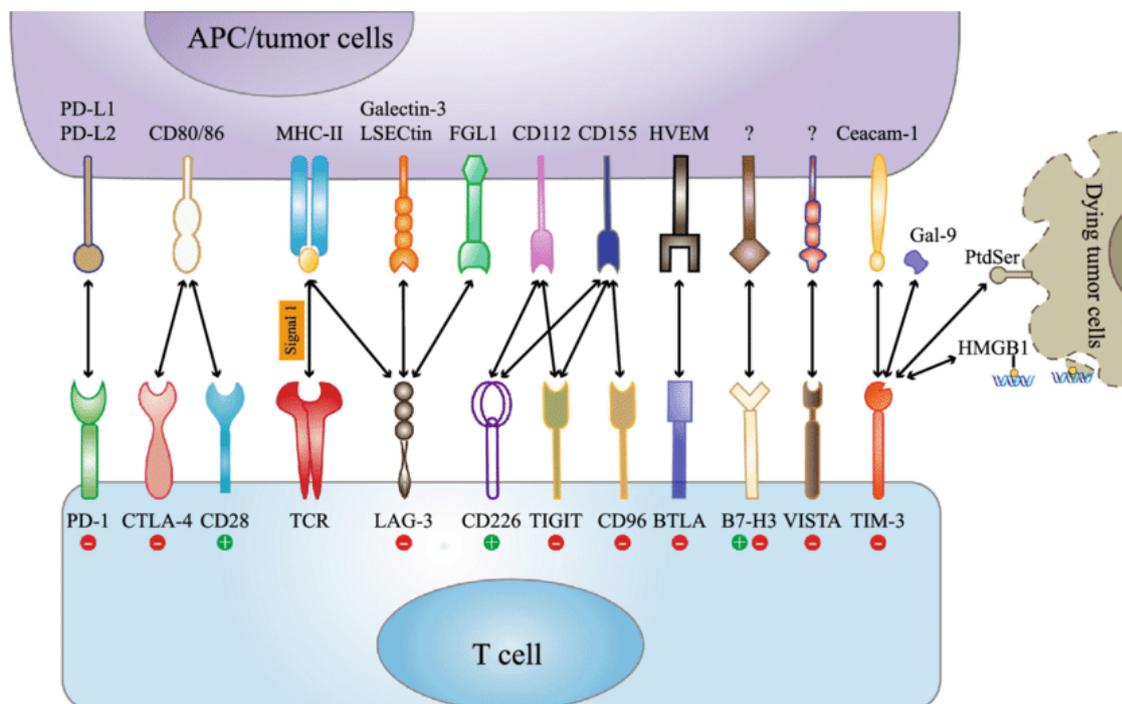


Figure 16 : Les différents IC et leurs ligands¹¹⁹. La liaison des points de contrôle immunitaires tels que PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT avec leurs ligands respectifs exprimés par les CPA et/ou sur les cellules tumorales, déclenche un signal activateur ou inhibiteur.

Chapitre 3 : Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) sont une population de lymphocytes T rares mais jouant un rôle important dans les réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-tumorales¹²⁰. Ce sont des lymphocytes T non conventionnels, par opposition aux LT $\alpha\beta$, à savoir les LT CD4 et LT CD8, caractérisés, en partie, par leur capacité à reconnaître des antigènes non présentés par les molécules de CMH. Les LT $\gamma\delta$ présentent un TCR composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ , alors que les LT $\alpha\beta$ présentent un TCR composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Bien que les LT $\gamma\delta$ représentent une faible proportion des LT totaux (5% des LT du sang), leur rôle dans la réponse immunitaire est important puisqu'ils font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, et partagent des caractéristiques et des fonctions communes avec les NK et les LT $\alpha\beta$ ¹²¹. Les LT $\gamma\delta$ sont uniquement retrouvés chez les vertébrés, et sont particulièrement abondant chez les ovins et bovins, mais peu représentés chez les souris et les primates (humains et non humains). Bien que l'on retrouve des LT $\gamma\delta$ chez l'Homme et la souris, modèle d'étude incontournable en immunologie, les sous-populations de LT $\gamma\delta$ diffèrent complètement, que ce soit phénotypiquement ou fonctionnellement, rendant la transposition des découvertes de la souris à l'Homme difficile. Dans la mesure du possible, cette partie de l'introduction sera focalisée sur les LT $\gamma\delta$ humains ainsi que leur implication dans l'immunité tumorale, mais des références aux études faites avec des modèles murins seront citées également.

3.1 Développement des LT $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ et les LT $\alpha\beta$ se développent dans le thymus à partir d'un progéniteur commun. Ce progéniteur provient de la moelle osseuse et est dit double négatif (DN) car il n'exprime ni CD4, ni CD8 à sa surface. A ce stade, les gènes codant pour le TCR ne sont pas encore fonctionnels, le DN n'exprime donc pas de TCR à ce stade.

En fonction de l'expression différentielle de deux molécules, CD44 et CD25, on va pouvoir distinguer 4 stades du progéniteur DN. Le premier, DN1, est CD44+ et CD25-, suivi par le stade DN2 (CD44+ CD25+). A ce stade, le réarrangement du TCR est amorcé et le progéniteur voit l'expression du CD44 diminuer (CD44^{low}) mais maintient l'expression du CD25 (CD25+), on

parle alors de stade DN3. C'est lors de ce stade que se fera la différenciation du thymocyte DN3 en LT $\alpha\beta$ ou LT $\gamma\delta$ ^{40,122}.

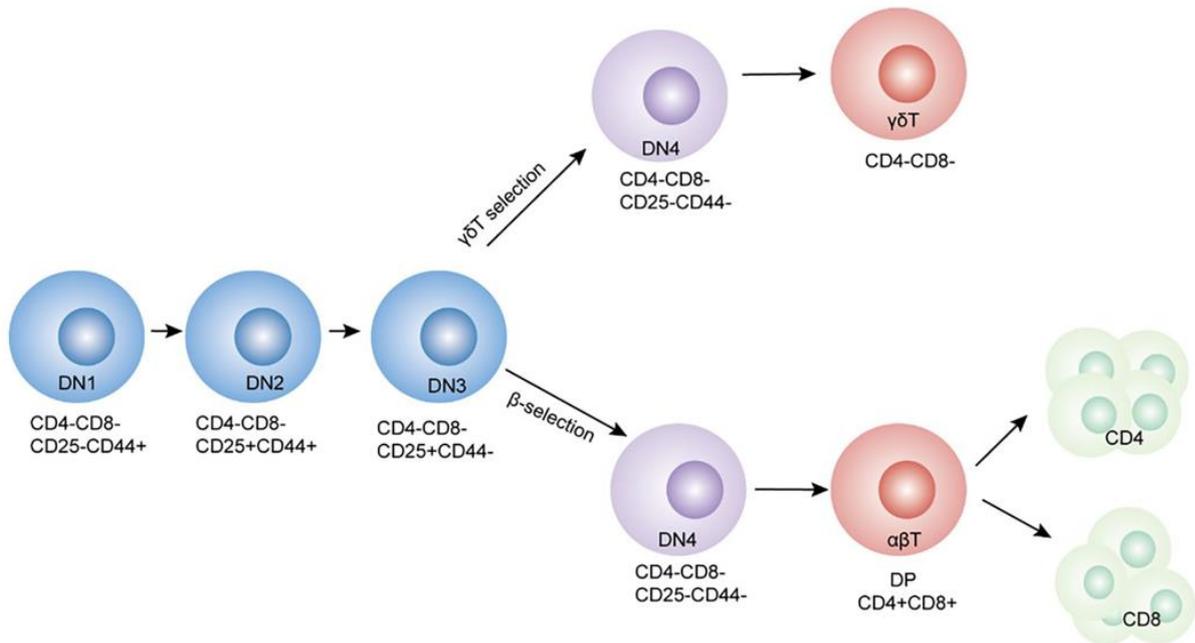


Figure 17 : Développement des lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ dans le thymus (adapté de ¹²²). Les LT $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ se développent à partir du même progéniteur commun double négatif (DN : CD4-CD8-). L'engagement des cellules vers une lignée $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$ se produit au stade DN3.

Les gènes codant pour les chaînes constituant les TCR sont situés sur le chromosome 7 pour les chaînes β et γ , et sur le chromosome 14 pour les chaînes α et δ , avec la particularité que le locus codant pour la chaîne δ est inséré dans le locus codant la chaîne α . Les loci codant pour ces différentes chaînes sont composés de gènes V (variables), D (diversité) et J (jonction) qui vont subir des réarrangements qui participeront à la diversité des TCR ; et un unique gène C (constant). Les chaînes β et δ sont formées par recombinaison VDJ, tandis que les chaînes α et γ sont formées par une recombinaison VJ. Le segment C est ajouté à ces gènes lors de l'épissage post-transcriptionnel. Les recombinaisons des segments V(D)J se font grâce aux enzymes RAG-1 et RAG-2 (*Recombining Activating Gene*) exprimées par tous les thymocytes^{123,124}.

Les thymocytes doubles négatifs commencent par réarranger simultanément les loci codant pour les chaînes γ , δ et β . Dans le cas où la formation d'un TCR $\gamma\delta$ fonctionnel abouti avant que le préTCR ne soit formé, le thymocyte recevra, via le TCR $\gamma\delta$ formé, des signaux qui arrêteront les réarrangements géniques de la chaîne β . Cette cellule s'engage alors définitivement vers une lignée $\gamma\delta$. A l'inverse, si le réarrangement des gènes codant pour la

chaîne β aboutit, celle-ci s'associe à une pré-chaîne α pour former un pré-TCR dont la signalisation bloquera le réarrangement des chaînes γ et δ , engageant le thymocyte vers la lignée $\alpha\beta$. Dans ce cas-ci, le thymocyte double négatif passe au stade DN4, c'est-à-dire CD44-CD25- avec l'expression d'un pré-TCR. Les cellules passent ensuite au stade double positif avec l'expression de CD4 et de CD8 par la même cellule. Lors de ce stade, le thymocyte amorce le réarrangement des gènes codant la chaîne α du TCR et sont alors prêtes à être sélectionnées pour devenir des LT simples positifs CD4 ou CD8 (figure 17)^{40,122}.

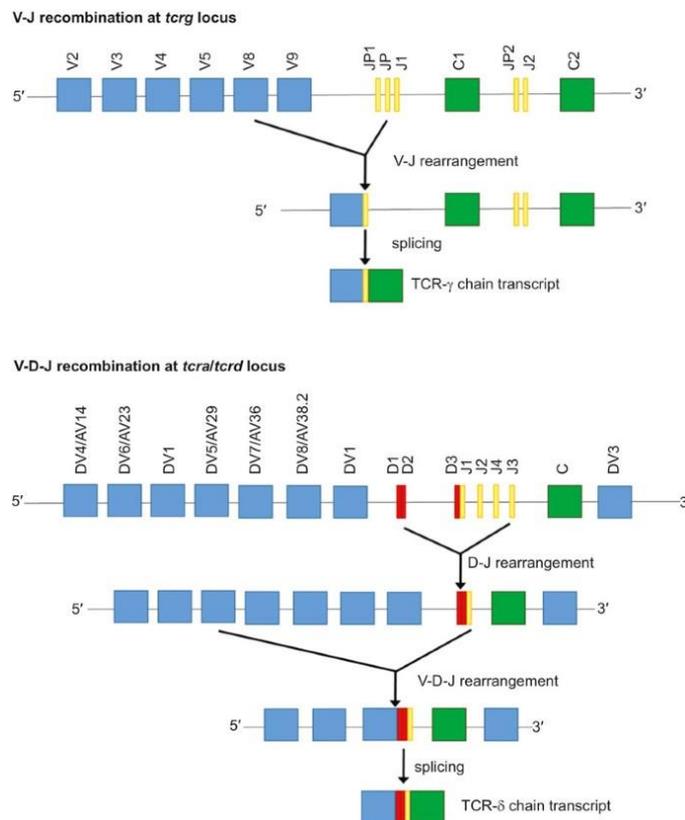


Figure 18 : Loci des gènes codant les chaînes γ et δ du TCR et mécanismes de recombinaison¹²⁵. Présentation de la recombinaison V(D)J au locus *tcrγ* (panneau supérieur) et *tcrα/δ* (panneau inférieur). Seuls les segments de gènes fonctionnels sont représentés. La chaîne TCR- γ est produite en utilisant seulement une seule recombinaison V-J. La chaîne TCR- δ est produite en utilisant des recombinaisons V-D-J.

Les LT $\gamma\delta$ sont les premiers LT à apparaître chez l'Homme et interviennent lors du développement embryonnaire. On retrouve plusieurs sous-populations de LT $\gamma\delta$ chez l'Homme en fonction de la chaîne δ exprimée par leur TCR. Ils sont généralement classifiés en deux populations : les V δ 2 et les nonV δ 2, parmi lesquels les plus étudiés sont les V δ 1 et les

V δ 3. Les réarrangements des gènes codant le TCR $\gamma\delta$ sont détectés dès la 8e semaine du développement fœtal : une première vague de migration du thymus vers le sang et le foie à lieu et implique les V δ 2. Après la naissance, les réarrangements impliquent d'autres segments géniques et aboutissent à la formation de LT $\gamma\delta$ V δ 1 et plus rarement V δ 3. Au stade adulte, la sous-population sanguine majoritaire est de type V γ 9V δ 2, et les V δ 1 et V δ 3 sont plutôt retrouvés dans les tissus et les muqueuses¹²⁵.

3.2 Activation TCR spécifique des LT $\gamma\delta$

Comme mentionné précédemment, les LT $\gamma\delta$ ne présentent pas de restriction aux molécules de CMH, c'est-à-dire qu'ils reconnaissent leurs antigènes sans que ceux-ci ne soient présentés ou apprêtés par les molécules de CMH classiques. A l'inverse des LT $\alpha\beta$ qui reconnaissent des antigènes peptidiques, les antigènes reconnus par les LT $\gamma\delta$ peuvent être de nature protéique, lipidique ou glucidique^{126,127}.

L'identification des antigènes des LT $\gamma\delta$ est cependant un véritable challenge puisque :

- Aucune restriction à une molécule n'est décrite (comme la restriction au CMH), suggérant que différents types de molécules (solubles ou non) peuvent être reconnues
- L'affinité des TCR $\gamma\delta$ pour leurs antigènes est, de manière générale, faible (1 à 100microM), ce qui rend leur étude par les méthodes biochimiques classiques impossible
- Du fait de la divergence des LT $\gamma\delta$ entre les souris et les humains, la transposition des découvertes faites chez la souris à l'Homme sont impossibles (et vice-versa) et l'utilisation de modèles murins transgéniques pour valider les découvertes faites chez l'Homme est également difficile.

3.2.1 Molécules activant les LT V γ 9V δ 2 via le TCR

Chez l'Homme, les LT $\gamma\delta$ exprimant une chaîne V δ 2 présentent le plus souvent une association avec la chaîne V γ 9. Les LT V γ 9V δ 2 représentent 80% des LT $\gamma\delta$ du sang. Ils reconnaissent de petites molécules non-peptidiques associées à un groupement phosphate : les phosphoantigènes (PAG). Ces PAG peuvent être produits par les procaryotes et eucaryotes lors de la biosynthèse des isoprénoïdes. Chez les micro-organismes, la voie DOXP (1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate) permet la production de (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl

pyrophosphate (HMBPP), le plus puissant PAg des LT V γ 9V δ 2. Chez les vertébrés, la voie du mévalonate est la principale source de PAg, avec la production d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP)^{128,129}. L'HMBPP reste le meilleur activateur des LT V γ 9V δ 2, puisque sa bioactivité est 10 000 fois plus élevée que celle de l'IPP. Il faut donc de fortes concentrations en IPP pour activer les LT V γ 9V δ 2. En conditions physiologiques, les quantités d'IPP sont faibles, cependant, lors de la tumorigenèse, le métabolisme des cellules tumorales est fortement perturbé, induisant une accumulation d'IPP jusqu'à atteindre une concentration suffisante pour l'activation des LT V γ 9V δ 2.

Des PAg synthétiques ont depuis été produit comme le c-HDMAPP ou le BrHPP (Picostim et Phosphostim respectivement) et ont prouvé leur efficacité à activer et amplifier les V γ 9V δ 2. Ces molécules ont d'ailleurs été employées dans des essais cliniques utilisant les LT V γ 9V δ 2. D'autres ont également été utilisées : ce sont les aminobisphosphonates (zolétronate ou le pamidronate par exemple). Ces molécules possèdent déjà une autorisation de mise sur le marché (AMM) et constituent un traitement de l'ostéoporose comme inhibiteurs de la résorption osseuse. Ces aminobisphosphonates n'activent pas directement les LT V γ 9V δ 2, mais bloque l'enzyme agissant en aval de l'IPP, la farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS), induisant ainsi une accumulation d'IPP en intracellulaire, ce qui entraîne l'activation des LT V γ 9V δ 2^{130,131}.

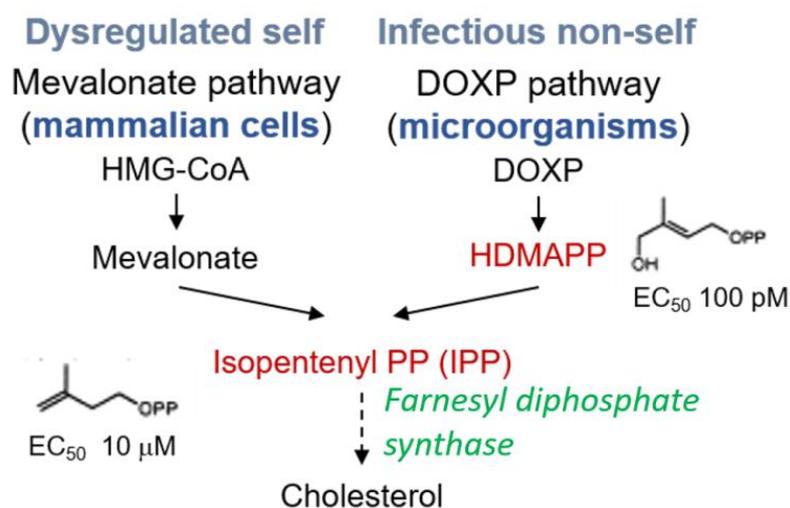


Figure 19 : Voie de biosynthèse des isoprénoïdes¹³².

Bien que les PAg soient nécessaires à l'activation de ces cellules, et que cette activation soit dépendante du TCR, il est maintenant admis qu'une interaction directe entre le TCR V γ 9V δ 2

et le PAg est exclue, suggérant la nécessité de l'intervention d'un ou plusieurs partenaires moléculaires exprimés par les cellules cibles. Puisque la reconnaissance des PAg est indépendante des molécules du CMH, de nombreuses études ont porté sur l'identification de partenaires potentiels qui seraient impliqués dans la reconnaissance et/ou la présentation de ces molécules.

Il a été montré que la protéine butyrophiline 3 A1 (BTN3A1) est essentielle à la reconnaissance de PAg médiée par le TCR $\gamma\delta$. Les butyrophilines appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (famille des récepteurs B7), composé de 6 membres fonctionnels : BTN1A1, BTN2 présentant 3 isoformes et BTN3, présentant 3 isoformes également (figure 20). Ces molécules se composent de deux domaines extracellulaires IgV et IgC (domaine de type immunoglobuline variable et constant), de domaines transmembranaires et juxtamembranaires et d'un domaine intracellulaire B30.2 (à l'exception de l'isoforme BTN3A2)¹³³.

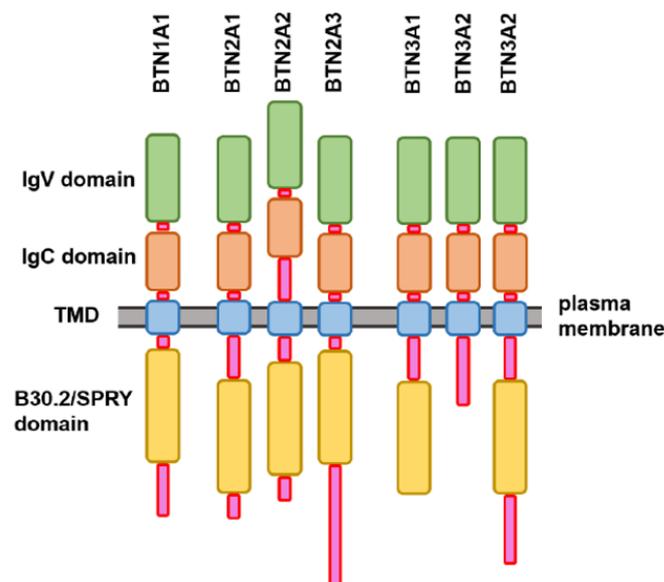


Figure 20 : Structure des butyrophilines¹³³. Représentation des membres de la famille des butyrophilines humaines. Les positions des différents domaines fonctionnels de ces protéines par rapport à la membrane plasmique sont indiquées.

Le domaine B30.2 est très important pour la transduction du signal. Celui-ci étant absent de l'isoforme BTN3A2, la signalisation ne peut passer que par les deux autres isoformes. Des études ont montré que les domaines B30.2 des isoformes 3A1 et 3A3 diffèrent quelque peu, et que seule BTN3A1 est capable d'induire l'activation des LT $V\gamma9V\delta2$. Lorsque le PAg se fixe à ce domaine, il induit le recrutement de la GTPase Rho, induisant des modifications du

cytosquelette, ainsi que des changements de conformation de BTN3A1 dans les cellules. C'est ce changement de conformation qui est détecté par les LT V γ 9V δ 2 et induit leur activation. En effet, les travaux de Sandstrom et al¹³⁴ ont montré que les PAg se lient avec des résidus basiques d'une poche du domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1, cependant aucune interaction directe entre le domaine extracellulaire IgV de BTN3A1 et le TCR V γ 9V δ 2 n'a été détectée, suggérant qu'un autre partenaire est impliqué dans cette reconnaissance.

Récemment, BTN2A1 a été identifiée par deux approches différentes comme étant ce partenaire. Le rôle de ligand direct du TCR V γ 9V δ 2 de BTN2A1 a été démontré par deux équipes en 2020. Rigau et al ont réalisé un criblage CRISPR à l'échelle du génome pour identifier des candidats se liant au TCR V γ 9V δ 2¹³⁵. Parallèlement, Karunakaran et al ont utilisé une approche génomique impliquant la génération d'hybrides de radiation entre des cellules CHO-Chr6 (portant le chromosome 6 humain) et des partenaires de fusion de rongeurs transduits par BTN3A1¹³⁶. L'analyse de la capacité de l'hybride à stimuler la détection de PAg par les LT V γ 9V δ 2 a conduit à l'identification du gène codant pour BTN2A1. Les deux publications suggèrent une liaison directe de la chaîne V γ 9 à BTN2A1 avec une affinité d'environ 45-50 μ M. BTN2A1 lui-même semble former des homodimères liés par des ponts disulfures et s'associe à BTN3A1 à la surface des cellules. Une étude publiée en 2021 montre que la BTN2A1 est nécessaire à la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 contre les cellules cancéreuses médiée par BTN3A, et que l'expression du complexe BTN2A1/BTN3A1 est suffisante pour déclencher l'activation du TCR V γ 9V δ 2¹³⁷. Ils montrent également que BTN2A1 peut interagir avec tous les isoformes de BTN3A. Enfin, l'interaction BTN2A1/BTN3A1 est renforcée par les PAg et, contrairement à ce qui était pensé, les domaines B30.2 des deux protéines sont requis pour la réactivité aux PAg. Des résultats récents du groupe de J. Kuball ont ajouté une plus grande complexité aux mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance tumorale dépendante du BTN par les LT V γ 9V δ 2. Selon cette étude, la liaison des régions γ 9 du TCR au BTN2A1 est suivie par la liaison de la chaîne δ à un ligand non encore identifié, selon un processus PAg indépendant (figure 21)¹³⁸.

D'autres molécules activant les LT V γ 9V δ 2 par leur TCR ont été identifiés, mais les mécanismes de reconnaissance de celles-ci par le TCR ne sont pas encore bien compris. La F1-ATPase, une ATP-synthase de type F exprimée à la surface des cellules tumorales en cours de lyse en est un exemple. Cette protéine interagit avec l'apolipoprotéine A-1 (Apo-A1) et forme un

complexe permettant la présentation des pAg¹³⁹. Ils reconnaissent également d'autres molécules tels que la phycoérythrine ou PE¹⁴⁰, cependant les mécanismes de cette reconnaissance ne sont pas encore élucidés.

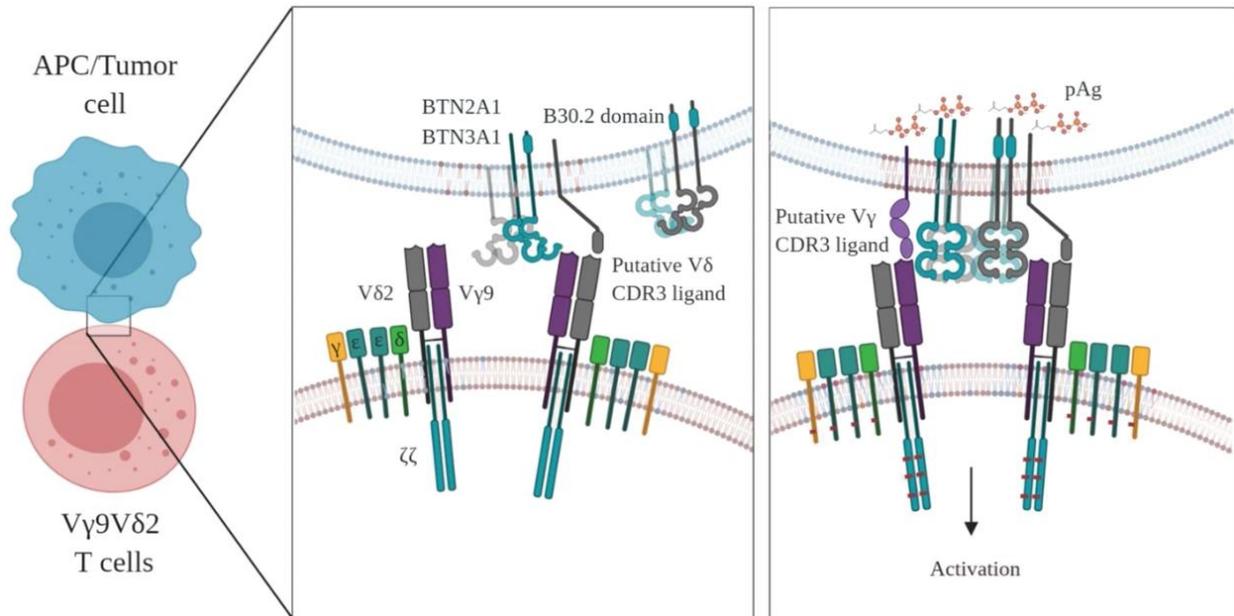


Figure 21 : Modèle d'activation des LT Vγ9Vδ2 (adapté de ¹⁴¹). En condition physiologique (à gauche), le domaine de signalisation B30.2 n'est pas associé aux pAg, cependant, BTN2A1 se lie à la chaîne Vγ9. Lorsque les cellules sont infectées ou sont transformées (à droite), les pAg intracellulaires se lient au domaine B30.2 et induisent ainsi un changement de conformation du complexe BTN2A1-BTN3A1, ce qui entraîne une activation TCR-dépendante des LT Vγ9Vδ2. Cette étape peut impliquer d'autres ligands de la chaîne Vδ ou partenaires encore non identifiés.

3.2.2 Molécules activant les nonVδ2 via leur TCR

Les nonVδ2 regroupent tous les LT γδ exprimant les chaînes δ1 et δ3 à 8. Les LT γδ les plus représentés et les plus étudiés parmi ce sous-groupe sont les Vδ1 suivi des Vδ3, même si peu de choses sont connues sur ces derniers. Ces populations sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie tissulaire de par leur localisation dans les tissus et les muqueuses, bien que de faibles proportions soient détectées dans le sang d'adultes sains. Les Vδ1 et les Vδ3 semblent jouer un rôle important dans la réponse immunitaire au cytomégalovirus (CMV)¹⁴². Il a en effet été montré que la proportion de LT γδ parmi les LT totaux augmente significativement en cas d'infection et que cette augmentation était principalement due à une amplification et

activation des V δ 1 et V δ 3. Cependant, de récentes études montrent que les LT V γ 9neg V δ 2pos étaient aussi impliqués dans la réponse au CMV¹⁴³. Le rôle des V δ 1 dans les cancers commence à être décrypté, à commencer par les ligands TCR spécifiques des V δ 1.

Il a récemment été démontré que les LT $\gamma\delta$ exprimant le TCR V γ 5V δ 1 reconnaissent un variant de CMH de classe I, le HLA-A*24:02 sur les cellules cancéreuses. Cette interaction dépend de la charge en peptides du complexe HLA et non de la présentation d'un peptide spécifique, ce qui reste cohérent avec l'idée que les LT $\gamma\delta$ ne reconnaissent pas d'antigènes présentés par les molécules de CMH classique¹⁴⁴. Une exception a pu être identifiée cependant. En effet, des LT V δ 1 dérivées *in vitro* de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques humaines (HSPC) sont activées suite à la présentation peptidique restreinte par le CMH HLA-A2 de l'antigène de mélanome MART-1¹⁴⁵. Cependant, des analyses de biochimie structurale suggèrent que la liaison des TCR $\gamma\delta$ au CMH présentant MART-1 est moins centrée sur le peptide que l'interaction avec un TCR $\alpha\beta$ spécifique de MART-1.

Outre la reconnaissance classique du CMH, certains TCR $\gamma\delta$ sont réactifs vis-à-vis du CMH de classe Ib¹⁴⁶. Les molécules de présentation des antigènes lipidiques CD1c et CD1d sont parmi les exemples les mieux étudiés de ce groupe. Les TCR $\gamma\delta$ humains reconnaissant les molécules CD1 sont V δ 1+ ou V δ 3+ et peuvent réagir à plusieurs phospho- et glycolipides présentés^{147,148}. Cependant, le CD1d non chargé est également capable de se lier aux TCR $\gamma\delta$ V δ 1+, bien qu'avec une affinité plus faible que s'il présente des lipides. D'autres études ont permis d'identifier l'annexine A2, une protéine exprimée par les cellules tumorales en réponse aux ROS, comme ligand des LT V γ 8V δ 3. L'annexine A2 agit donc comme un signal de stress cellulaire et induit une réponse immunitaire anti-tumorale¹⁴⁹. L'EPCR (*endothelial protein C receptor*) est un autre ligand capable d'activer les LT $\gamma\delta$ nonV δ 2 et qui est exprimé par les cellules infectées au CMV et les cellules transformées. C'est une molécule CMH-like qui peut se lier et présenter des antigènes lipidiques comme le CD1d, cependant, la liaison aux LT $\gamma\delta$ (particulièrement aux V δ 5) est indépendante de la présence d'un lipide. Plus récemment, Harly et al ont décrit le rôle de l'EphA2 (*ephrine type-A receptor 2*) en tant que ligand des V δ 1. L'EphA2 est surexprimé par les cellules cancéreuses suite aux changements métaboliques induits par l'activité de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*)^{127,150}.

L'activation des LT $\gamma\delta$ (que ce soit les V δ 2pos ou les V δ 2neg) est également contrôlée par d'autres récepteurs que le TCR.

3.3 Autres récepteurs et voies d'activation des LT $\gamma\delta$

3.4.1 Les récepteurs de type NK (NKR)

Les LT $\gamma\delta$ partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules NK, que ce soit leurs fonctions effectrices ou les récepteurs exprimés à leur surface. En effet, les LT V δ 2 et V δ 1 expriment à leur surface des NKR^{151,152}. Le principal NKR activateur exprimé par ces cellules est le NKG2D. Il se lie aux molécules de stress MICA, MICB et ULBPs, molécules surexprimées par les cellules infectées ou transformées. L'interaction de NKG2D avec l'un de ses ligands peut agir en tant que signal de co-stimulation à l'activation par le TCR et amplifier les fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$ (cytotoxicité directe et production de cytokines), mais il peut également agir seul et induire l'activation des LT $\gamma\delta$ en absence d'engagement du TCR¹⁵³. Ceci a notamment été démontré dans le mélanome pour les LT V γ 9V δ 2 et pour les leucémies lymphoïdes chroniques à cellules B pour les V δ 1. Les LT $\gamma\delta$ peuvent également exprimer le complexe CD94/NKG2A, un NKR inhibiteur¹⁵⁴. L'expression de CD94/NKG2A par les LT V γ 9V δ 2 est associée à une diminution de l'expression du TCR, ainsi qu'à l'inhibition de la prolifération et des fonctions effectrices de ces cellules. Le ligand de NKG2A est le HLA-E, une molécule CMH de classe I non classique faiblement exprimée par les cellules tumorales au début de la tumorigenèse. Son expression est induite suite à l'exposition des cellules tumorales à l'IFN- γ produit par les NK, LT $\gamma\delta$ et LT $\alpha\beta$. Les LT $\gamma\delta$ (V δ 2 ou V δ 1) expriment également des récepteurs NKp, comme le NKp30 et le NKp44, qui vont reconnaître des molécules de la famille des B7 et le NKp44L respectivement exprimés à la surface des cellules tumorales^{155,156}.

Enfin, et bien que ce ne soient pas des récepteurs de type NK, les LT $\gamma\delta$ partagent avec les NK l'expression du Fc- γ récepteurs III ou CD16, un récepteur impliqué dans l'ADCC un mécanisme de la réponse immunitaire anti-tumorale utilisé par les LT $\gamma\delta$ (et sur lequel nous reviendrons plus tard dans cette introduction).

3.4.2 Les Toll-like receptors (TLR)

Les récepteurs TLR (Toll-like receptors) sont des récepteurs multiligands qui reconnaissent les ligands associés à la paroi cellulaire microbienne et d'autres motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP), mais aussi les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) comme la protéine B1 du groupe de haute mobilité (HMBG1). Les TLR sont exprimés

par certaines sous-populations de LT, parmi lesquelles on retrouve les LT $\gamma\delta$, et leur engagement permet de moduler leurs fonctions effectrices. La liaison des TLR1/2/6, 3 et 5 à leurs ligands, en combinaison / en parallèle de la stimulation du TCR $\gamma\delta$, permet d'augmenter la production de cytokines et de chimiokines par ces cellules *in vitro*. Les TLR peuvent également avoir des effets indirects sur l'activité des LT $\gamma\delta$. En effet, l'activation TLR-dépendante des DC et des monocytes permet de favoriser la production de cytokines par les LT $\gamma\delta$. En outre, des études ont montré que l'engagement des TLR3 et 7 augmente la lyse des cellules tumorales par les LT $\gamma\delta$ chez l'Homme, tandis que la liaison du TLR8 à son ligand abolit l'activité suppressive des LT $V\delta 1$ infiltrant les tumeurs humaines. Les TLR semblent donc améliorer les réponses anti-tumorales des LT $\gamma\delta$ et régulent également leurs fonctions immunosuppressives¹⁵⁷.

3.4.3 Les récepteurs aux cytokines

Tout comme les LT CD4 helper présentent une forte plasticité, les LT $\gamma\delta$ sont eux aussi très plastiques et présentent des fonctions différentes. Cette plasticité est en partie due ou régulée par les cytokines présentes dans leur environnement¹⁵⁸.

Plusieurs études ont montré qu'après une activation par les PAg, les LT $V\gamma 9V\delta 2$ du sang favorisent une réponse immunitaire Th1-like caractérisée par une forte production de TNF- α et d'IFN- γ , ainsi que des réponses cytotoxiques (dégranulation par exemple)¹⁵⁹. Cependant, *in vitro*, en fonction des cytokines présentes, les LT $V\gamma 9V\delta 2$ activés peuvent être polarisés en cellules présentant des caractéristiques associées aux Th2, Th17, Tfh ou cellules Treg. En présence d'IL-2 et d'IL-12, les LT $\gamma\delta$ sont polarisés en Th1-like. En présence d'IL-4, ce sont les LT $\gamma\delta$ Th2-like qui sont favorisées¹⁶⁰. L'IL-21 est impliquée dans la différenciation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ en Tfh-like et favorise également leurs fonctions anti-tumorales¹⁶¹ (augmentation de leur activité cytotoxique), cependant, des études de notre équipe ont montré que cette cytokine peut aussi induire le développement d'une sous-population de LT $V\gamma 9V\delta 2$ présentant des propriétés régulatrices sur lesquelles nous reviendrons plus tard dans l'introduction^{162,163}. Ainsi, en fonction des stimuli, des récepteurs engagés, et des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral, les LT $\gamma\delta$ vont présenter des fonctions anti- ou pro-tumorale.

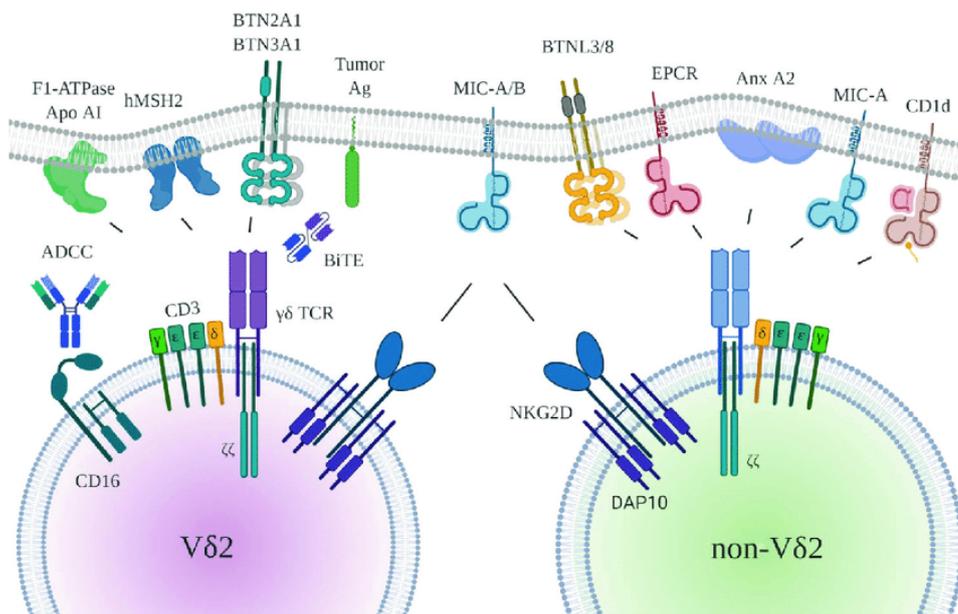


Figure 22 : Ligands et récepteurs activateurs des LT $\gamma\delta$. Ne sont pas présentés ici les TLR, NCR et récepteurs aux cytokines¹⁴¹. A gauche : Les ligands les mieux caractérisés pour le TCR humain $V\gamma9V\delta2$ sont les phosphoantigènes (pAgs), qui sont reconnus de manière dépendante de BTN2A1/BTN3A1. Un autre ligand du TCR est la F1-ATPase exprimée de manière ectopique avec l'apolipoprotéine A-I. Les anticorps utilisés à des fins thérapeutiques contre les antigènes tumoraux peuvent activer les LT $\gamma\delta$ via le CD16. A droite : présentation des ligands des LT $\gamma\delta$ non $V\delta2$. Certains ligands pour des sous-ensembles spécifiques de LT $\gamma\delta$ non- $V\delta2$ humaines ont été identifiés tels que le récepteur de la protéine C endothéliale (EPCR) présentes sur les cellules infectées par le CMV et les cellules tumorales intestinales, l'Annexin A2 (Anx A2), MICA et les lipides liés au CD1d. Les molécules MICA/B et ULBP sont des ligands pour le récepteur NKG2D activateur exprimé sur les LT $V\delta2$ et non $V\delta2$. En plus de NKG2D, d'autres récepteurs NK (NKp30, Nkp44, NKp46) peuvent aussi être exprimés.

3.4 Implication des LT $\gamma\delta$ dans la réponse immunitaire aux tumeurs

3.4.1 Rôle anti-tumoral des LT $\gamma\delta$

Les observations cliniques du rôle anti-tumoral des LT $\gamma\delta$ chez l'Homme ont été démontrées par de nombreuses équipes en employant différentes méthodes (analyses *in silico*, immunohistochimie, ...). En particulier, l'analyse du transcriptome de 18000 échantillons tumoraux de 39 types de cancers différents par Gentles et al⁸¹ a permis l'identification des LT $\gamma\delta$ comme marqueur de bon pronostic dans ces pathologies. Ils seraient même le facteur

pronostic le plus favorable parmi les 22 populations immunitaires étudiées. Cependant, leur approche présentait des limites surlignées par la suite par une autre équipe : elle ne permettait pas de différencier correctement les LT $\gamma\delta$ des LT CD8 et des NK. Tosolini et al¹⁶⁴ ont amélioré l'identification informatique CIBERSORT des LT V γ 9V δ 2 infiltrant les tumeurs, révélant une plus grande variabilité interindividuelle et inter-cancer, mais validant tout de même les observations de Gentles et al dans certains cancers solides et hématologiques.

Suite à leur activation (TCR dépendante ou non), les LT $\gamma\delta$ peuvent participer à la réponse anti-tumorale directement grâce à leurs activités cytotoxiques, ou indirectement en modulant les réponses d'autres acteurs de l'immunité.

a. Les LT $\gamma\delta$ peuvent lyser directement les cellules tumorales

Les LT $\gamma\delta$ partagent les mêmes fonctions cytotoxiques que les NK et les LT CD8 CTL, ils possèdent des granules lytiques contenant des perforines, granzyme et de la granulysine. Ces activités cytotoxiques ont d'abord été identifiées dans le cadre de réponses anti-infectieuses (bactériennes, parasitaire ou virale) avant d'être ensuite transposées aux réponses anti-cancéreuses. En utilisant des modèles d'infections animaux ou *in vitro* pour l'Homme, diverses études ont révélé un rôle protecteur des LT $\gamma\delta$ dans la réaction immunitaire de l'hôte. Ils présentent une activité cytotoxique accrue, avec notamment la libération de granzymes et une expression accrue de FAS-L, entraînant l'élimination des cellules cibles. Ils participent également à la modulation de la réponse immunitaire en produisant certaines cytokines^{152,165-167}.

Suite à la reconnaissance de la cellule tumorale et à leur activation, les LT $\gamma\delta$ libèrent leurs granules lytiques conduisant à l'apoptose caspase-dépendante des cellules cibles. L'utilisation d'un inhibiteur de la perforine et du granzyme B réduit considérablement la capacité des LT V γ 9V δ 2 à lyser les cellules du cancer du sein *in vitro*¹⁶⁸. De plus, chez des patients atteints de carcinome rénal, les LT V γ 9V δ 2 activés montrent une forte cytotoxicité dirigée contre les cellules tumorales autologues médiée par la dégranulation¹⁶⁹.

L'élimination des cellules tumorales par les LT $\gamma\delta$ peut aussi être médiée par les récepteurs de morts : Fas-L et TRAIL. Fas-L est exprimé sur les LT $\gamma\delta$ et peut se lier à Fas, exprimé sur les cellules tumorales. Ceci entraîne la liaison du domaine intracellulaire de Fas, le *death effector domaine* ou DED, à la protéine FADD (*Fas-associated dead domain*), ce qui entraîne l'activation

des caspases et l'apoptose des cellules cibles. Comme Fas/FasL, TRAIL active également les caspases par l'intermédiaire de FADD et entraîne l'apoptose des cellules cibles¹⁷⁰.

Comme les LT V γ 9V δ 2, les LT V δ 1 expriment ces différentes molécules (perforine-granzyme B, de Fas/FasL et de TRAIL) déclenchant la mort des cellules cibles. Chez les patients atteints de mélanome par exemple, les LT V δ 1 peuvent sécréter de la perforine. Les LT V δ 1 produisant du granzyme B ou exprimant TRAIL présentent une forte cytotoxicité dirigée contre les cellules de leucémie lymphoïde chronique (*chronic lymphocytic leukemia* ou CLL)^{171,172}.

b. L'activité d'ADCC des LT $\gamma\delta$

Comme mentionné plus haut, les LT $\gamma\delta$ peuvent également exprimer le CD16 à leur surface. Ils peuvent donc exercer leur fonction cytotoxique via un mécanisme d'ADCC. Les anticorps anti-tumoraux produits par les plasmocytes ou les anticorps monoclonaux thérapeutiques se lient à l'antigène tumoral par le Fab et au CD16 présent sur les LT $\gamma\delta$ par le Fc. Ceci induit leur activation, ainsi que la libération du contenu des granules lytiques et l'élimination des cellules tumorales. Chez des patients atteints de CLL et de cancer du sein, la cytotoxicité des LT $\gamma\delta$ est augmentée par un traitement avec des anticorps monoclonaux comme le rituximab ou le trastuzumab, dirigés respectivement contre le CD20 et récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2)¹⁷³.

c. Les LT $\gamma\delta$ présentent des fonctions de CPA

En plus de partager des caractéristiques communes avec les cellules NK et les LT conventionnels, les LT $\gamma\delta$ présentent des fonctions similaires à celles des cellules présentatrices d'antigènes. En effet, les LT V γ 9V δ 2 sont capables de répondre aux signaux provenant de microorganismes et de tumeurs et d'activer des LT CD4 et LT CD8. Ces LT « $\gamma\delta$ -APC » présentent une surexpression de molécules de CMH de classe I et II, ainsi qu'une surexpression des molécules de co-stimulation CD40 et CD80/86. Ils expriment également les récepteurs d'adressage aux ganglions lymphatiques (*homing receptors*), ce qui leur confère les mêmes capacités de migration que les DC. De plus, les $\gamma\delta$ -APC ont été décrits pour présenter de manière croisée des antigènes aux LT CD8⁺¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Dans un contexte tumoral, les LT V γ 9V δ 2 cultivés en présence de cellules tumorales lysées présentent une augmentation d'expression de CD40, CD80/86 et des molécules de CMH de classe I et II. Ceux-ci sont donc capables de présenter les antigènes captés aux LT $\alpha\beta$. La

capture des antigènes tumoraux par les LT $\gamma\delta$ se fait, entre autres, par phagocytose. D'autres auteurs (Himoudi et al) ont montré que l'acquisition de ces fonctions CPA passe par le CD16¹⁷⁷. En effet, il semblerait que l'interaction entre les LT $\gamma\delta$ et les cellules tumorales via le CD16 favorise l'absorption des antigènes tumoraux par les LT $\gamma\delta$. Ce mécanisme est appelé « *licensing* ». De façon intéressante, ceux-ci sont tout de même capables d'effectuer l'ADCC. Enfin, Brandes et al ont montré que la présentation antigénique par les LT $\gamma\delta$ induit l'activation et prolifération des LT CD4 et LT CD8 naïfs à un degré équivalent à celui des DC^{174,176}.

d. Les LT $\gamma\delta$ favorisent les fonctions anti-tumorales d'autres acteurs de l'immunité

En plus d'exercer des fonctions de cellules présentatrices d'antigènes, les LT $\gamma\delta$ sont également capables de favoriser la maturation des cellules dendritiques¹⁷⁸. En effet, des DC cultivées en présence de LT V γ 9V δ 2 expriment plus de molécules de co-stimulations et des molécules de CMH classiques, une meilleure capacité de présentation antigénique et activent efficacement les LT naïfs. Ces DC produisent également plus de cytokines impliquées dans la différenciation des LT CD4 en Th1^{178,179}. Une autre étude montre que les LT V γ 9V δ 2 favorisent aussi les fonctions présentatrices d'antigènes des lymphocytes B, en induisant l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation (CD80/86 et CD40) par les LB¹⁸⁰. L'IFN- γ et le TNF- α produits par les LT $\gamma\delta$ participent à la différenciation des monocytes en DC inflammatoires¹⁷⁹. Les LT δ 1 peuvent également participer à la maturation des DC, mais cette maturation est dépendante de l'interaction entre le TCR V δ 1 et le CD1c exprimé par les DC, ainsi que de la présence de TNF- α ¹⁸¹. Les DC matures induites sont capables de produire de l'IL-12 et de présenter efficacement les antigènes aux LT $\alpha\beta$.

Les LT $\gamma\delta$ permettent également l'activation des cellules NK. Maniar et al¹⁸² ont montré que des LT V γ 9V δ 2 activés par l'IPP et mis en co-culture avec des NK augmentent la cytotoxicité des NK contre des tumeurs précédemment résistantes à la cytolyse. Cette activation se fait par le biais d'interactions co-stimulatrices notamment entre le CD137L, exprimé par les LT $\gamma\delta$ activés, et le CD137 exprimé par les NK. L'interaction CD137/CD137L augmente l'expression du récepteur activateur NKG2D par les NK permettant donc leur activation et la promotion de leur activité cytotoxique à l'encontre des cellules tumorales.

Enfin, il a également été montré que les LT $\gamma\delta$, via une activité Tfh-like, sont capables de moduler l'activité des LB et de favoriser leur activation et la sécrétion d'anticorps. Ils sont

également impliqués dans la formation de centres germinatifs, lieu de sélection et de maturation des LB¹⁸³.

e. Sécrétion de cytokines

Les LT $\gamma\delta$ participent aussi à la réponse immunitaire anti-tumorale via la production de diverses cytokines. Ils sont une source précoce et importante d'IFN- γ et de TNF α dans de nombreuses pathologies. Cette production de cytokines est induite suite à la stimulation des LT $\gamma\delta$ par leur TCR, les Rc NK ou à la présence de cytokines comme IL-12 ou IL-15. L'IFN- γ et le TNF- α sont des cytokines jouant un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale en inhibant par exemple la croissance tumorale, en renforçant les fonctions des autres acteurs de l'immunité anti-tumorale et en induisant l'inhibition de l'angiogénèse. Les LT $\gamma\delta$ peuvent également produire des chimiokines, comme le CCL2 et le CCL8, qui permettront le recrutement de monocytes et autres cellules de l'immunité.

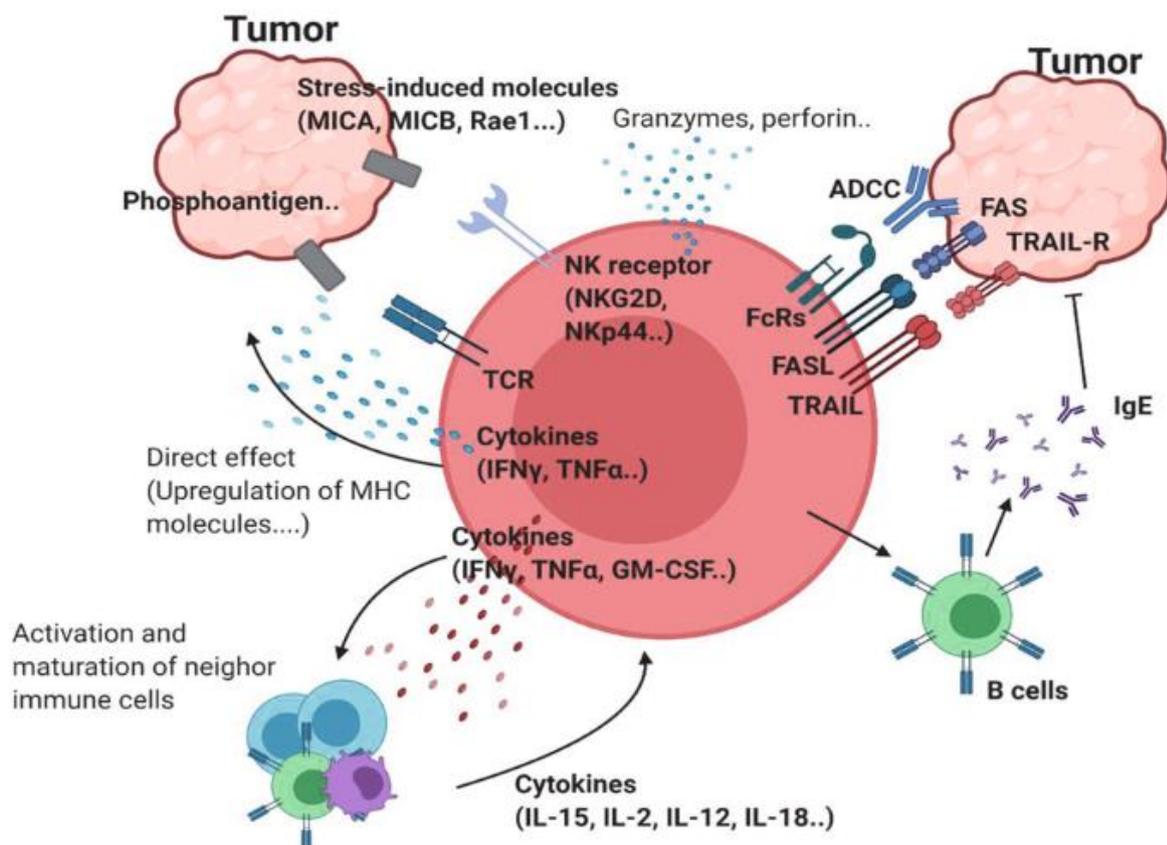


Figure 23 : Résumé des différentes activités anti-tumorales des LT $\gamma\delta$ ¹⁸⁴. Suite à leur activation, les LT $\gamma\delta$ vont produire des cytokines pro-inflammatoires, tel que l'IFN- γ et le TNF, participant ainsi à la modulation de la réponse immunitaire en activant l'immunité anti-tumorale et/ou en induisant

l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules tumorales. La production de molécules cytotoxiques telles que les granzymes et la perforine par les LT $\gamma\delta$ va permettre la lyse directe des cellules tumorales. En plus de ces activités, l'ADCC, l'interaction de FAS-FASL et TRAIL peuvent également déclencher une cytotoxicité directe contre les cellules tumorales. Enfin, les LT $\gamma\delta$ peuvent induire la production d'IgE par les LB, qui ont un effet anti-tumoral.

3.4.2 Utilisation des LT $\gamma\delta$ en immunothérapie

Bien que les sous populations V δ 1, V δ 2 et V δ 3 présentent une forte réactivité contre les cellules tumorales, les immunothérapies basées sur les LT $\gamma\delta$ ciblent principalement les V δ 2 puisqu'elles sont facilement isolables à partir du sang de donneurs sains ou de patients, et spécifiquement activables par des phosphoantigènes synthétiques de grade clinique comme le BrHPP (Phosphostim), ou par des aminobisphosphonates (ABP), comme le Zolédronate ou le Pamidronate, dont l'utilisation est déjà approuvée en clinique pour d'autres pathologies (inhibition de la résorption osseuse provoquée par l'ostéoporose).

Les premiers essais cliniques (table 1), réalisés à partir de 2003, ont testé soit l'activation de LT $\gamma\delta$ *in vivo* en injectant aux patients des ABP ou des PAg synthétiques en présence ou non d'IL-2, soit l'expansion de LT $\gamma\delta$ autologues *ex vivo* par ces mêmes molécules, puis leur réinjection (transfert adoptif) aux patients. Globalement, les essais réalisés sur des patients présentant des myélomes multiples, lymphomes non-Hodgkinien, cancer de la prostate, cancer du sein, carcinome rénal et autres, montrent que, bien qu'il y ait quelques effets indésirables dus à l'IL-2 ou à l'ABP/PAg utilisé (érythème ou symptômes grippaux), le traitement reste bien toléré, et ce quel que soit le mode d'activation des LT $\gamma\delta$ (*in vivo* ou *ex vivo*). Cependant, la majeure partie des essais ont résulté en une réponse seulement partielle des patients aux traitements. Bien que les LT $\gamma\delta$ prolifèrent chez certains patients en périphérie et montrent une cytotoxicité accrue (expression augmentée de TRAIL et perforine, ainsi que production d'IFN- γ), seuls 10 à 30% des patients répondent positivement, avec soit une réponse partielle au traitement, soit une stabilisation de la pathologie¹⁸⁵⁻¹⁸⁸.

Les avancées technologiques réalisées ces dernières années, ainsi que la meilleure compréhension des fonctions et des modes d'activation des LT $\gamma\delta$ (V γ 9V δ 2 ou V δ 1) ont créé un regain d'intérêt pour leur utilisation en immunothérapie anti-cancéreuse. Plusieurs essais

cliniques basés sur différentes stratégies développées dans la suite de ce manuscrit, sont en cours d'étude (table 2).

a. Transfert adoptif de LT $\gamma\delta$ allogéniques

La particularité des LT $\gamma\delta$ à reconnaître les cellules cibles indépendamment de la présentation de l'antigène par les molécules de CMH suggère que le transfert adoptif de LT $\gamma\delta$ dérivés de donneurs allogéniques pourrait être utilisé, puisqu'il y'aurait un faible risque de développer une réaction du greffon contre l'hôte (GvHD). De ce fait, de nombreuses stratégies explorent l'utilisation de perfusion de LT $\gamma\delta$ allogéniques amplifiés *ex vivo*. Dans une étude pilote faite en 2014 sur quatre patients atteints d'hémopathies malignes avancées et réfractaires aux traitements classiques, Wilhelm et al¹⁸⁹ ont sélectionné des donneurs HLA-haploidentiques (présentant 50% de correspondance HLA) faisant parti de la famille de ces patients. Après déplétion des lymphocytes, les patients ont reçu une injection de LT V γ 9V δ 2 pures à 99% avec du zolédronate à J-0, suivi d'injections répétées d'IL-2. Aucun patient n'a déclaré de GvHD, et tous ont vu le taux de LT V γ 9V δ 2 augmenter (68 fois plus de cellules comparé à l'injection initiale) et persister pendant 28 jours dans l'organisme.

Des études plus récentes (2019 et 2020) ont montré que l'utilisation de LT $\gamma\delta$ issus de donneurs non apparentés n'altère ni la sureté, ni l'efficacité de la thérapie par LT $\gamma\delta$ allogéniques. Une étude de cas réalisée sur un patient atteint de cholangiocarcinome recevant 8 injections de LT $\gamma\delta$ amplifiés *ex vivo* à partir d'un donneur sain n'a montré aucun effet indésirable chez ce patient. De plus, une réduction de la taille de la tumeur ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie du patient a été observée. Ces études montrent que les patients recevant une perfusion de LT V γ 9V δ 2 ont une meilleure survie globale que les patients témoins, et l'injection répétée des LT V γ 9V δ 2 donne de meilleurs résultats que les injections uniques^{190,191}.

L'utilisation de LT nonV δ 2 est une autre approche actuellement étudiée. Almeida et al ont proposé en 2016 un protocole permettant l'amplification en 3 semaines de LT V δ 1 et leur utilisation¹⁹². Les LT $\gamma\delta$ de donneurs sains ou de patients atteints de CLL sont stimulés par un anti-CD3 et mis en présence d'un cocktail de cytokines spécifique (IL-4, IFN- γ , IL-21, et IL1- β). Cette activation conduit à l'amplification des LT $\gamma\delta$ (2000 fois plus de cellules après 3 semaines de culture) ainsi qu'à un enrichissement des LT V δ 1 (représentant 60 à 80% des LT $\gamma\delta$ amplifiés). Plus intéressant encore, ces LT V δ 1 présentent de fortes activités cytotoxiques,

produisent de l'IFN- γ et du TNF- α , et régulent positivement l'expression de NKp30 et NKp44, deux récepteurs activant les LT V δ 1. Ce protocole de génération des DOT (V δ 1 T cells) est en cours d'essai clinique de phase I chez des patients atteints de leucémie myéloïdes aigues (AML)¹⁹².

Année	Auteurs ou boîte	Phase	Numéro de l'étude	Type de cancer	Informations	Résultats
Activation de LT $\gamma\delta$ in vivo						
2003	Wilhelm et al	Etude pilote	-	Myélome multiple, CLL et Lymphome de la zone marginale	Injection de pamidronate et IL-2 Cohorte A (10 patients) : pas de pré-sélection basée sur la réponse des LT $\gamma\delta$ aux PAg <i>ex vivo</i> Cohorte B (9 patients) : pré-sélection des patients	Cohorte A : pas de prolifération des LT $\gamma\delta$ observée Cohorte B : prolifération des LT $\gamma\delta$ observée chez 5 patients dont les LT $\gamma\delta$ avaient préalablement proliféré <i>in vitro</i> 4 ont progressé ; 2 présentent une stabilisation de la pathologie ; 3 présentent une réponse partielle
2007	Dieli et al	Phase I	-	Cancer de la prostate	Injection de zolédronate seul ou en combinaison avec l'IL-2	Meilleure réponse observée chez le groupe traité en combinaison avec l'IL-2 comparé à l'autre groupe
Transfert adoptif de LT $\gamma\delta$ autologues amplifiés ex vivo						
2007	Kobayashi et al	Etude pilote	-	Carcinome Rénal	Injection de LTy962 et d'IL-2	5 patients sur 7 présentent une prolifération de LT $\gamma\delta$ Peu d'effets secondaires (fatigue)
2011	Kobayashi et al	Phase I/II	NCT00588913	Carcinome Rénal	Injection de LTy962, de zolédronate et d'IL-2	Recrutement de 20 patients prévus initialement, au final, seuls 11 patients ont été recrutés 5 patients sur 11 ont vu leur pathologie progresser 5 patients sur 11 ont une pathologie contrôlée 1 patient est en complète rémission
Transfert adoptif de LT $\gamma\delta$ allogéniques amplifiés ex vivo						
2014	Wilhelm et al	Etude pilote	-	Myélome multiple, Leucémies et Lymphomes	Injection de LTy962 avec zolédronate et IL-2	3 patients sur 4 présentent une réponse complète Amplification accrue des LT $\gamma\delta$ chez les patients

Table 1 : Liste non-exhaustive des premiers essais cliniques utilisant les LT $\gamma\delta$

Les approches futures seront donc basées sur des LT $\gamma\delta$ allogéniques dérivés de donneurs sains qui peuvent être utilisés directement (non modifiés) ou alors être modifiés (production de CAR- $\gamma\delta$ et autres).

b. CAR- $\gamma\delta$ T

Les CAR sont des récepteurs chimériques constitués de plusieurs modules distincts : un module extracellulaire qui se lie spécifiquement à la cellule tumorale, un module d'ancrage transmembranaire ; et un ou plusieurs modules intracellulaires qui sont impliqués dans la signalisation lymphocytaire T (CD3 ζ en combinaison avec des domaines de molécules co-stimulatrices comme le CD28, ou ICOS par exemple)¹⁹³.

Ces dernières années, la thérapie par cellules CAR-T a fait l'objet de nombreuses études cliniques, principalement axées sur les lymphocytes T $\alpha\beta$ et ont montré des taux de rémission encourageants chez des patients réfractaires aux traitements standards. Cependant, la thérapie par CAR-T présentent certains inconvénients, avec notamment une forte toxicité chez les patients, et peu, voir aucun effet dans le cas des tumeurs solides. L'utilisation des LT $\gamma\delta$ comme CAR-T pourraient pallier certains de ces inconvénients.

Plusieurs études précliniques utilisant des LT V γ 9V δ 2 modifiés avec des CAR basés sur le CD19 ou le domaine extracellulaire de NKG2D par exemple montrent que ces CAR-T $\gamma\delta$ sont capables de lyser les cellules tumorales *in vitro*. Le transfert de ces CAR-T $\gamma\delta$ à des souris xénotreffées avec de leucémies à cellules B (CD19 CAR-T $\gamma\delta$) ou de tumeurs colorectales ou ovariennes (NKG2D CAR-T $\gamma\delta$) montrent que ceux-ci induisent la régression des tumeurs, ainsi qu'une meilleure survie des souris. En 2020 Rozenbaum et al¹⁹⁴ ont même montré que l'utilisation combinée d'aminobisphosphonates et de CAR-T $\gamma\delta$ permet d'accroître significativement l'activité cytotoxique des CAR-T $\gamma\delta$. De plus, Les CAR-T $\gamma\delta$ conservent *in vitro* leur capacité à présenter les antigènes tumoraux aux LT $\alpha\beta$, ce qui pourrait prolonger l'efficacité anti-tumorale déclenchée par ces cellules.

Un essai clinique de phase I visant à évaluer la sûreté et l'efficacité des CD19 CAR-T $\gamma\delta$ pour le traitement de lymphomes et de leucémies a été mené par Beijing Doing Biomedical. Un autre essai clinique de phase I réalisé par CytoMed Therapeutics a évalué la sûreté et la tolérabilité des NKG2D CAR-T $\gamma\delta$ chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires à tout traitement ou ayant rechutés (cancer colorectal, le cancer du sein triple négatif, sarcome,

cancer nasopharyngé, cancer de la prostate et cancer gastrique). Bien que les deux études soient terminées, aucun rapport officiel sur leurs résultats n'a été publié pour l'instant. Pour les mêmes raisons qu'énoncées précédemment (abondance dans le sang et activation spécifique), les recherches sur les CAR-T $\gamma\delta$ ont principalement été réalisées sur les LT V γ 9V δ 2¹⁹⁵.

Makkouk et al¹⁹⁶ ont développé le premier modèle de CAR-T utilisant des LT V δ 1 à partir de PBMC de donneurs sains négatifs au CMV (virus pour lequel V δ 1 répondent particulièrement). Les V δ 1 sont génétiquement modifiées pour exprimer le 4-1BB/CD3zeta CAR ciblant le glypican-3 (GPC-3), un antigène surexprimé par différentes tumeurs solides, et en particulier par les carcinomes hépatocellulaires (cancer du foie). La construction génique du CAR code également pour de l'IL-15 soluble, cytokine impliquée dans la réponse anti-tumorale des lymphocytes T. L'utilisation de ces cellules dans un modèle préclinique de cancer du foie a permis d'observer une accumulation de ces GPC-3 CAR-T δ 1 au site tumoral, ainsi qu'un contrôle de la croissance de la tumeur chez les souris.

Dans une autre étude clinique de phase I, des CD20 CAR-T δ 1 (appelés ADI-001) ont été testés et des résultats intermédiaires obtenus chez 4 patients évaluable ont été communiqués. Trois des patients ont reçu de faibles doses d'ADI-001 (30 millions de cellules). Parmi ceux-ci, deux présentent une rémission partielle ou complète de la pathologie, alors que le dernier patient présente à l'inverse une progression de la pathologie. Le quatrième patient de l'étude a reçu une forte dose d'ADI-001 (100 millions de cellules) et est complètement guéri. Les résultats sont très encourageants, mais il faudra attendre la fin de l'essai pour avoir une meilleure vue sur l'efficacité des CD20 CAR-T δ 1¹⁹⁷.

c. Anticorps ciblant les LT $\gamma\delta$

L'anticorps ICT01, développé par Imcheck, est une IgG1 humanisée qui se lie aux 3 isoformes de BTN3A et permet d'activer les LT V γ 9V δ 2¹⁹⁸. Cet anticorps présente la particularité d'avoir une fraction Fc qualifiée de « silencieuse », c'est-à-dire que l'anticorps n'induit pas d'ADCC ou de CDC, limitant les effets adverses des thérapies utilisant des Ac monoclonaux (à savoir la possibilité d'induire un orage cytokinique). Cependant, cette approche n'est pas spécifique de la tumeur car BTN3A est exprimé par divers types cellulaires. Néanmoins les résultats précliniques et les premiers essais cliniques réalisés avec l'Ac ICT01 sont encourageants. Le traitement par ICT01 de souris présentant une AML humaine induit une forte activation des

LT V γ 9V δ 2 injectés et un retard de la croissance des cellules tumorales. EVICTION est un essai clinique de phase I/IIa qui teste actuellement l'effet d'ICT01 sur cancers solides et hématologiques récidivants/réfractaires en monothérapie ou en combinaison avec le pembrolizumab (anti-PD-1). Les résultats préliminaires sont encourageants et montrent une forte activation et infiltration des LT V γ 9V δ 2 dans le mélanome. Également, une stabilisation de la pathologie est observée chez 31% des patients traités en monothérapie et chez 62% des patients traités par la combinaison thérapeutique¹⁹⁸.

Une autre approche consiste en l'utilisation et le développement d'anticorps bispécifiques ciblant les LT $\gamma\delta$ et une cible tumorale. Un anticorps bispécifique liant la chaîne V γ 9 et l'antigène tumoral HER2 a prouvé son efficacité *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de cancers pancréatiques¹⁹⁹ et cancer ovarien²⁰⁰. La cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 induite par l'Ac bispécifique est supérieure à celle induite par les PAg ou un bispécifique ciblant le CD3 et HER-2. Une autre étude rapporte l'efficacité d'un anticorps bispécifique V γ 9/CD123 dans les leucémies myéloïdes aiguës. CD123 est la chaîne α du récepteur à l'IL-3 et son expression est fortement augmentée dans divers cancers hématologiques. Cet anticorps bispécifique stimule les LT V γ 9+, et la production d'IL-6 et d'IL-10 associée aux orages de cytokines (délétère pour le patient) est plus faible comparée à l'utilisation d'un Ac CD3/CD123¹⁹⁵.

d. Autres stratégies

Les efforts déployés pour optimiser les immunothérapies à base de LT $\gamma\delta$ ont permis le développement de nouvelles approches permettant de compléter les propriétés des LT $\gamma\delta$ et d'augmenter l'efficacité anti-tumorale de ces cellules. L'une de ces approches consiste à exploiter la reconnaissance spécifique des tumeurs par le TCR V γ 9V δ 2 en induisant la surexpression de ce TCR par les LT $\alpha\beta$ et d'utiliser les fonctions anti-tumorales des LT. Ces cellules modifiées, aussi appelées TEGs (T cells engineered with defined $\gamma\delta$ TCR) possèdent les propriétés de prolifération et de survie des LT $\alpha\beta$, ainsi que les capacités de reconnaissance des BTN exprimés par les cellules tumorales. Un essai clinique de phase I est d'ailleurs en cours avec pour but l'évaluation du TEG001²⁰¹ chez des patients atteints de cancers à cellules B réfractaires à tout autre traitement.

La génération de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) présentant des réarrangements des régions génétiques des chaînes γ et δ du TCR ($\gamma\delta$ T-iPSCs) est une autre approche développée par quelques équipes. Le but de cette manœuvre est de surmonter les

problèmes d'anergie ou d'exhaustion des LT V γ 9V δ 2 rencontrés lors du transfert adoptif de LT V γ 9V δ 2 préalablement amplifiés, en se basant sur les capacités prolifératives illimitées des iPSCs. Bien qu'ayant obtenu des $\gamma\delta$ T-iPSCs, Watanabe et al²⁰² n'ont pas étudié le potentiel de ces cellules à générer des LT $\gamma\delta$ fonctionnels. Des études fonctionnelles sont donc nécessaires pour évaluer les fonctions anti-tumorales des LT $\gamma\delta$ générés à partir de ces clones d'iPSC.

Année	Auteurs ou boîte	Phase	Numéro de l'étude	Type de cancer	Informations	Résultats
Transfert adoptif de LT $\gamma\delta$ allogéniques amplifiés ex vivo						
2019	Alnaggar et al	Etude de cas	-	Cholangiocarcinome	Injections répétées de LT $\gamma\delta$ 2	Pas d'effets secondaires chez le patient Réduction de la taille tumorale
2020	Lin et al	Phase I/II	NCT03180437	Cancer du pancréas	Chirurgie seule ou combinée à une injection (unique ou répétée) de LT $\gamma\delta$ 2	Les injections de LT $\gamma\delta$ répétées donnent les meilleurs résultats Essai terminé en Juin 2019 Recrutement de 30 patients prévus initialement, au final, 62 patients ont été recrutés
Utilisation de CAR-$\gamma\delta$T						
2017	Beijing Doing Biomedical	Phase I	NCT02656147	Lymphome à cellules B, ALL et CLL	CD19 CAR- $\gamma\delta$ T	Aucune information sur le recrutement des patients ou sur la complétion de l'étude n'est disponible (date de fin initiale de l'étude : 01/04/2020) Recrutement de 48 patients prévus
2019	CytoMed Therapeutics	Phase I	NCT04107142	Tumeurs solides récurrentes/réfractaires	NKG2D CAR- δ 2T en utilisant des Lty δ haplogéniques ou allogéniques	La date de fin initiale était le 01/03/2021, cependant aucun patient n'a été recruté pour l'instant Recrutement de 10 patients prévus
2021	Adicet Bio	Phase I	NCT04735471	Cancers à cellules B	CD20 CAR- δ 1T seuls ou en combinaison avec de l'IL-2	Recrutement de 78 patients attendus avant la fin de l'étude (prévue pour le 24/03/2024) Les résultats intermédiaires annoncent des effets chez 4 patients recrutés La dernière mise à jour de cet essai date de Juin 2022, et 8 patients sont aujourd'hui recrutés
2021	PersonGen BioTherapeutics	Phase I	NCT04702841	ALL récurrentes/réfractaires à LT CD7+	CD7 CAR- $\gamma\delta$ T	Fin d'étude prévue le 01/12/2022 Recrutement de 8 patients prévus
Stratégies basées sur l'utilisation d'anticorps						
2020	ImCheck Therapeutics	Phase I/II	NCT04243499	Cancers hématologiques et solides récurrentes/récurrentes	Utilisation de l'ICT01 (Ac monoclonal ciblant les isoformes de BTN3A) seul ou en combinaison avec un anti-PD-1	Les premiers résultats montrent une bonne efficacité de l'ICT01 et celle-ci est augmentée en combinaison thérapeutique Fin d'étude prévue pour le 12/2022 Recrutement de 150 patients prévus
2021	Lava Therapeutics	Phase I/II	NCT04887259	Cancers hématologiques (MM, CLL, AML) récurrentes/récurrentes	LAVA-051 : anticorps bi-spécifique ciblant CD1d et les V δ 2	Fin d'étude prévue pour le 30/12/2023 Recrutement de 55 patients prévus initialement, à ce jour, 102 patients ont été recrutés
2022	Lava Therapeutics	Phase I/II	NCT05369000	Cancer de la prostate métastatique/réfractaire	LAVA-1207 : anticorps bi-spécifique ciblant PSMA (Ag tumoral) et les LT V δ 2	Fin d'étude prévue pour le 03/2024 Recrutement de 66 patients prévus

Table 2 : Liste non-exhaustive des essais cliniques actuels utilisant les LT

3.4.3 Rôle pro-tumoral des LT $\gamma\delta$

Bien que présentant de puissantes fonctions anti-tumorales, la première utilisation des LT $\gamma\delta$ en thérapie n'a donné que peu de réponse. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette faible réponse : soit il n'y a pas eu prolifération des LT $\gamma\delta$ suite à la stimulation par les PAg ou ABP, soit ces cellules sont rapidement entrées en exhaustion après injection chez le patient. Une autre hypothèse de la non ou faible réponse à ces thérapies serait l'existence de sous-populations de LT $\gamma\delta$ régulatrices qui seraient activées à la place des effecteurs. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'on sait que les LT $\gamma\delta$ sont des cellules plastiques qui peuvent présenter des activités variables selon les signaux présents dans le microenvironnement¹⁵⁸.

En accord avec cette hypothèse, les données générées par CIBERSORT par Tossolini et al montrent que la présence de LT $\gamma\delta$ n'est pas toujours associée à un bon pronostic dans les cancers¹⁶⁴. D'autres études ont également montré que la présence de LT $\gamma\delta$ dans le microenvironnement tumoral (MET) pouvait être associée à un mauvais pronostic notamment dans le cancer du sein^{203,204}, du côlon²⁰⁵ et du pancréas²⁰⁶, suggérant que les LT $\gamma\delta$ peuvent également présenter des activités pro-tumorales.

Une forte infiltration en LT $V\delta 1$ dans le cancer du sein est associée à des fonctions immunosuppressives, avec notamment l'inhibition de la prolifération des LT et une baisse de la maturation des DC²⁰⁷. Dans le cancer du côlon, l'activité pro-tumorale des LT $\gamma\delta$ se traduit par la production d'IL-17 et d'IL-8²⁰⁵. L'IL-17 participe à la mise en place d'une inflammation dans le MET et favorise la tumorigenèse dans ce type de cancer ; et l'IL-8 favorise quant à elle le recrutement de populations myéloïdes immunosuppressives qui vont inhiber les autres acteurs de la réponse anti-tumorale. Dans le cancer du pancréas murin, Daley et al ont constaté que les T $\gamma\delta$ infiltrant la tumeur régulent à la hausse l'expression de CD39 et favorisent la progression tumorale en limitant l'activation des LT $\alpha\beta$ ²⁰⁶. CD39 étant une enzyme impliquée dans la voie de production de l'adénosine, on peut supposer que c'est via cette molécule immunosuppressive que se fait l'inhibition des fonctions des LT effecteurs. Des LT $\gamma\delta$ régulateurs exprimant le CD39 sont également retrouvés dans les cancers colorectaux humains et produisent de grandes quantités d'adénosine²⁰⁸. Outre le cancer du sein, du

pancréas et le cancer colorectal, plusieurs études ont montré un rôle potentiellement délétère des LT $\gamma\delta$ dans les cancers des ovaires, de la vésicule biliaire et du rein^{209,210}.

Il est évident que le contexte tumoral favorise le recrutement et/ou l'amplification de sous-populations pro-tumorales via notamment l'environnement cytokinique et/ou chimiokinique. Reste à savoir maintenant si les LT $\gamma\delta$ présentant des fonctions pro-tumorales dérivent de sous-populations préexistantes amplifiées dans le MET sous l'action des cytokines, ou si elles se différencient/re-polarisent à partir des cellules déjà présentes dans le MET (capacité de plasticité des LT $\gamma\delta$).

a. Polarisation des LT $\gamma\delta$ en cellules immunosuppressives

Plusieurs études *ex vivo/in vitro* ont montré que la combinaison d'un signal d'activation via le TCR en présence de cytokines peut induire une polarisation différente des LT $\gamma\delta$ naïfs et notamment les orienter vers un profil immunosuppresseur ou régulateur. En effet, le TGF- β et l'IL-21 favorisent l'acquisition de propriétés pro-tumorales de certaines sous-populations de LT $\gamma\delta$ chez l'Homme et la souris. Des combinaisons spécifiques de cytokines peuvent polariser les LT $\gamma\delta$ en cellules de type Th17 avec des effets pro-tumoraux.

LT $\gamma\delta$ Foxp3+ : L'activation de LT V γ 9V δ 2 en présence d'IL-2 et de TGF- β induit l'expression de FOXP3 par ces cellules^{211,212}. Les LT $\gamma\delta$ FOXP3+ sont capables, comme les Treg classiques, d'inhiber la prolifération de LT $\alpha\beta$ activés. Une autre équipe a montré qu'une stimulation TCR dépendante des LT V δ 1 en présence d'IL-2 et de TGF- β permet également la polarisation de ces cellules vers un phénotype immunosuppresseur²¹³. Ces cellules expriment FOXP3 et peuvent également inhiber la prolifération et les fonctions des LT $\alpha\beta$. Dans le cancer colorectal humain, les LT $\gamma\delta$ CD39+ infiltrant les tumeurs expriment FOXP3 et sont décrits comme des LT régulateurs. Ce phénotype régulateur dépend de l'adénosine. Les LT $\gamma\delta$ CD39+ des tissus normaux incubés avec le surnageant de la tumeur acquièrent de puissantes capacités de suppression grâce à une production accrue d'adénosine²⁰⁸. Le développement ou la polarisation des LT $\gamma\delta$ en LT $\gamma\delta$ FOXP3+ régulateurs est due à la présence de TGF- β dans les surnageants tumoraux. Cette polarisation induite par le TGF- β a été également démontrée dans des modèles de cancer de colon chez la souris.

LT $\gamma\delta$ Th17-like : La présence d'une combinaison d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-23, et de TGF- β favorise la polarisation des LT $\gamma\delta$ en Th17-like (LT $\gamma\delta$ Th17)²¹⁴. Comme les LT Th17 conventionnels, ces

LT $\gamma\delta$ présentent des fonctions pro-tumorales. D'autres études ont pu montrer que l'IL-7 favorise fortement la polarisation et la prolifération des LT $\gamma\delta$ Th17²¹⁵. Les LT $\gamma\delta$ peuvent également présenter dans certains cas un phénotype mixte Th1/Th17, et produire à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-17. Wu et al ont été les premiers à démontrer le rôle pro-tumoral des LT $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 dans le cancer colorectal humain²⁰⁵. La différenciation et l'activation des LT $\gamma\delta$ Th17 sont déclenchées par l'IL-23 produite par les DCs activées présentes sur le site tumoral. Les LT $\gamma\delta$ Th17 infiltrant les tumeurs produisent, en plus de l'IL-17, de l'IL-8 qui participe aussi à la progression tumorale par son rôle dans l'angiogenèse et dans le recrutement des MDSC. Ces MDSCs contribuent à établir un microenvironnement immunosuppresseur favorisant ainsi le développement de la tumeur. De plus, une corrélation positive entre les LT $\gamma\delta$ Th17 infiltrants les tumeurs et le stade TNM (taille de la tumeur, invasion lymphatique et métastases) renforce l'idée selon laquelle les LT $\gamma\delta$ Th17 sont des cellules à activités pro-tumorales. Des études menées chez des patients atteints de cancer de la vésicule biliaire ont montré une augmentation de LT $\gamma\delta$ Th17 dans le sang des patients et leur présence au sein de la tumeur²¹⁰. L'implication des LT $\gamma\delta$ Th17 dans la promotion de l'angiogenèse a également été démontrée : ils induisent la production de VEGF par les cellules tumorales qui favorise la progression tumorale. Enfin, la présence de LT $\gamma\delta$ Th17 dans le sang des patients est associée à une mauvaise survie par rapport aux patients ayant peu ou pas de LT $\gamma\delta$ Th17. Dans un modèle de cancer du sein, il a été rapporté que les LT $\gamma\delta$ Th17 augmentent l'infiltration des neutrophiles suite à l'induction de la production du G-CSF. Ces neutrophiles vont ensuite inhiber les réponses des LT CD8 CTL et favoriser la propagation des métastases²⁰³. Les LT $\gamma\delta$ Th17 favorisent donc la progression tumorale en participant à la mise en place d'un MET immunosuppresseur (recrutement de MDSC) et en favorisant l'angiogenèse et le développement de métastases.

LT $\gamma\delta$ CD73+ : L'IL-21 est une cytokine immunomodulatrice produite par les LT CD4 et les cellules NK⁷³. Dans sa forme mature, l'IL-21 est une protéine de 162 acides aminés (aa) et qui agit par l'intermédiaire de trois voies de signalisation différentes : la voie *Janus kinase-signal transducers and activator of transcription* (JAK-STAT), la voie phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-sérine/thréonine kinase (AKT) et la voie de la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK). STAT3 est le principal contributeur aux effets biologiques de l'IL-21. L'IL-21R est exprimé par différents types de cellules immunitaires, telles que les LT, les LB, les

cellules NK, les cellules NKT, les cellules dendritiques, ainsi que les cellules non immunitaires (cellules épithéliales de l'intestin). Par conséquent, l'IL-21 a des effets pléiotropiques et impacte les fonctions de nombreux types cellulaires dans la TME. Elle va par exemple induire la différenciation des LT $\gamma\delta$ en LT auxiliaires folliculaires (Tfh-like) qui vont activer et induire la maturation des LB. Elle renforce également les effets cytotoxiques des NK, des LT $\gamma\delta$ et de LT CD8, en augmentant la production de perforine et de granzyme ainsi que la production de cytokines et favoriser aussi les mécanismes d'ADCC des cellules NK et des LT $\gamma\delta$. Le rôle de l'IL-21 dans le microenvironnement tumoral a été détaillé dans un chapitre de livre publié en 2020 dont je suis premier auteur (annexe 1⁷³).

Bien qu'ayant initialement été décrite comme une cytokine favorisant les fonctions cytotoxiques des LT $\gamma\delta$ ¹⁶¹, mon équipe d'accueil a montré que l'IL-21 participe aussi au développement de sous-populations de LT $\gamma\delta$ avec des fonctions suppressives¹⁶².

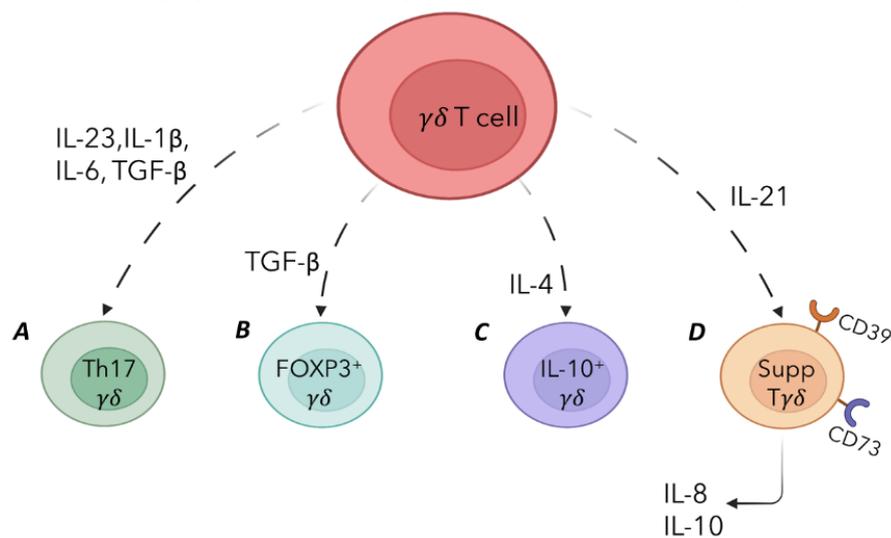


Figure 24 : Polarisation des LT $\gamma\delta$ en cellules immunosuppressives. Les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral induisent la différenciation des LT $\gamma\delta$ en cellules pro-tumorales : (A) LT $\gamma\delta$ de type Th17 (Th17 $\gamma\delta$), (B) LT FOXP3+ $\gamma\delta$ (FOXP3+ $\gamma\delta$), (C) LT $\gamma\delta$ productrices d'IL-10 (IL-10+ $\gamma\delta$), et (D) cLT $\gamma\delta$ régulatrices qui expriment CD39 et/ou CD73 (Supp $\gamma\delta$).

En effet, mon équipe a isolé et identifié à partir de LT V γ 9V δ 2 du sang de donneurs sains activés puis amplifiés en présence d'IL-21, une sous-population qui présente des fonctions régulatrices. Cette sous-population exprime l'ectonucléotidase CD73, une enzyme impliquée dans la voie de synthèse de l'adénosine. Les LT V γ 9V δ 2 CD73+ produisent de l'adénosine ainsi que de l'IL-10, deux molécules aux fortes propriétés immunosuppressives. Cette population de LT V γ 9V δ 2 est capable d'inhiber la prolifération des LT $\alpha\beta$ et la maturation des DC ainsi que

leur capacité à activer les lymphocytes T naïfs. Il est important de noter que l'IL-21 est retrouvée dans l'environnement de diverses tumeurs solides (sein, côlon, ovaire) et que son implication dans la tumorigenèse colique a clairement été démontrée. Sa présence dans l'environnement tumoral pourrait donc favoriser le recrutement et/ou l'amplification de populations de LT $\gamma\delta$ suppressives caractérisées par l'expression de CD73¹⁶².

b. Fonctions immunosuppressives des LT $\gamma\delta$

Comme décrit précédemment, les fonctions immunosuppressives des LT $\gamma\delta$ impliquent la production d'adénosine et/ou la production d'IL-10. Quelques études ont aussi décrit l'intervention d'autres molécules dans les fonctions immunosuppressives des LT $\gamma\delta$, notamment le TGF- β . L'expression de TGF- β est étroitement régulée, notamment au niveau post-traductionnel. Pour être active, la partie mature de la protéine doit être libérée du peptide latent (LAP) par interaction avec l'intégrine $\alpha\beta 6$ ou $\alpha\beta 8$, les principaux partenaires activateurs du TGF- β ²¹⁶. *In vitro*, le niveau d'ARNm du TGF- β et l'expression de surface de LAP sont augmentés dans les LT $V\delta 1$ isolés à partir de PBMCs et activés par une combinaison d'anticorps anti-CD3 anti-CD28²¹⁷. Un niveau élevé de TGF- β a également été détecté dans le surnageant de PBMCs stimulées par un anticorps anti-TCR $V\delta 1$. Ce TGF- β va permettre le recrutement d'autres cellules immunosuppressives (Treg, MDSC), mais va également favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse et donc la migration des cellules tumorales à d'autres sites de l'organisme (métastases).

Expression de points de contrôles immunitaires : Les LT $\gamma\delta$ peuvent également exercer leurs fonctions régulatrices par l'expression de points de contrôles immunitaires. En effet, les LT $V\delta 2$ obtenus à partir de sang de donneurs sains peuvent exprimer PD-L1 suite à leur activation, et inhiber la prolifération des LT $\alpha\beta$ via l'axe PD1/PD-L1²¹⁸. L'expression de PD-L1 par les LT $\gamma\delta$ est d'ailleurs plus élevée chez les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique comparé aux donneurs sains²⁰⁶. De même, 50% des LT $\gamma\delta$ infiltrants les tumeurs expriment PD-L1, suggérant qu'ils peuvent participer au développement tumoral via l'axe PD-1/PD-L1.

Récemment, l'expression d'autres points de contrôles immunitaires par les LT $\gamma\delta$ a été décrite. En effet, les LT $\gamma\delta$ exprimant Gal-9 ont montré une activité suppressive accrue à l'encontre des LT $\alpha\beta$ exprimant TIM-3 à leur surface. L'expression de Gal-9 par les LT $\gamma\delta$ est fortement augmentée dans le tissu tumoral et en périphérie chez les patients atteints de cancers

pancréatiques²⁰⁶. La galectine-9 peut polariser les macrophages vers un profil M2 et inhiber la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les LT $\alpha\beta$.

Modulation des activités des cellules immunitaires : De par l'expression des points de contrôles immunitaires et la production de cytokines et autres molécules, les LT $\gamma\delta$ vont pouvoir moduler les fonctions des autres cellules de l'immunité. En plus d'inhiber la prolifération et les fonctions des LT (par l'IL-10 ou par l'axe PD-1/PD-L1 par exemple), les LT $\gamma\delta$ immunosuppresseurs inhibent la maturation des DCs (perte de la capacité à présenter les antigènes aux LT) et permettent le recrutement de MDSC notamment par la production du facteur chimiotactique IL-8. Le TGF- β produit par les LT $\gamma\delta$ favorisera la polarisation des TAM en TAM-M2, et favorisera les fonctions des MDSC. *In fine*, les LT $\gamma\delta$ à activités pro-tumorales vont, via divers mécanismes, à la fois inhiber les fonctions des cellules immunitaires anti-tumorales, mais également participer au recrutement d'autres cellules immunosuppresseurs, générant un MET favorisant le développement tumoral.

Je suis premier auteur dans une revue portant sur les LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux (annexe 2²¹⁹).

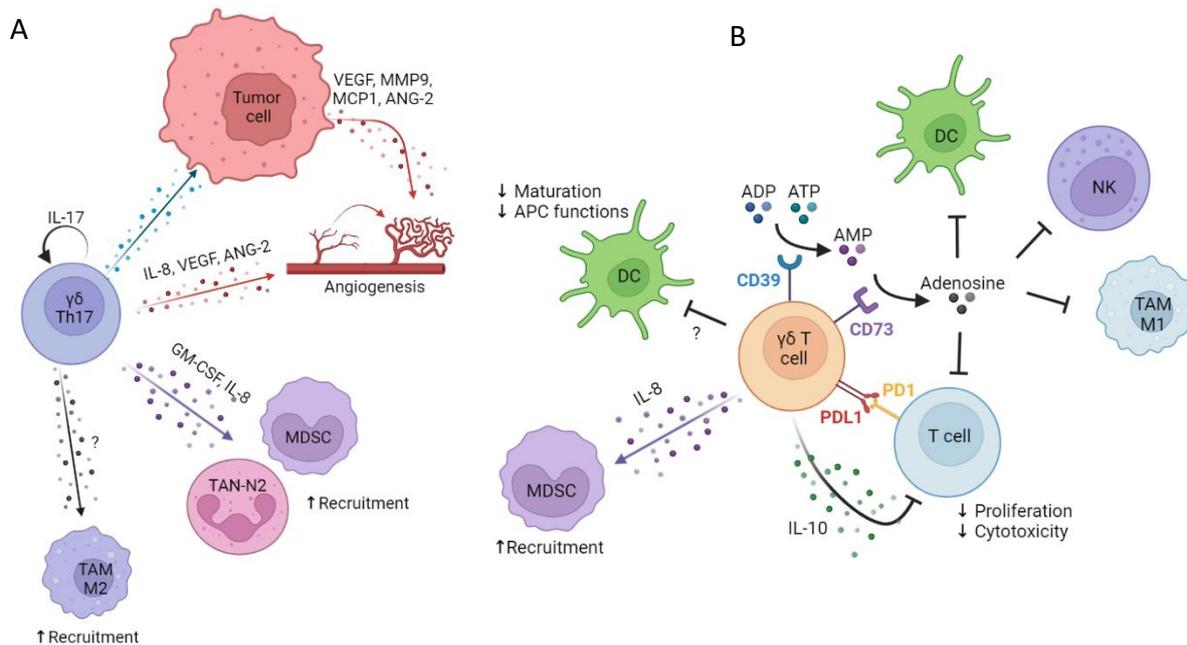


Figure 25 : Résumé des différentes activités pro-tumorales des LT $\gamma\delta$ ²¹⁹. (A) Les Th17 $\gamma\delta$ favorisent l'angiogenèse indirectement en induisant la production de facteurs angiogéniques par les cellules cancéreuses, ou directement en produisant elles-mêmes des facteurs angiogéniques. Elles induisent également le recrutement des MDSC par la production de GM-CSF et d'IL-8, et recrutent ou polarisent les TAM-M2 et TAN-N2. (B) Les LT $\gamma\delta$ CD39+/CD73+ produisent de l'adénosine qui inhibe la prolifération des LT $\alpha\beta$ ainsi que leurs fonctions anti-tumorales. Les LT $\gamma\delta$ peuvent exprimer PD-L1 et inhiber la fonction des cellules exprimant PD1, telles que les LT CD8. L'IL-10 produite par les LT $\gamma\delta$ inhibe la prolifération et la cytotoxicité des LT CD8. Ils favorisent également le recrutement des MDSC via IL-8 et inhibent la maturation et les fonctions des DC

Rationnel et objectifs des travaux de thèse

De nombreux acteurs de l'immunité sont présents dans l'environnement tumoral et sont impliqués dans le contrôle et/ou le développement des tumeurs. Les LT $\gamma\delta$ sont retrouvés dans le MET de nombreuses tumeurs (ovaire, sein, colon, mélanome) et contribuent à la réponse anti-tumorale par leur activité cytotoxique directe sur les cellules tumorales et en favorisant le recrutement et la stimulation d'autres effecteurs immunitaires. Cependant la contribution réelle des LT $\gamma\delta$ à la réponse anti-tumorale est encore mal comprise car leur présence dans le microenvironnement tumoral a aussi été associée à un mauvais pronostic dans divers cancers (seins, colons, pancréas) ce qui suggère l'existence de populations de LT $\gamma\delta$ régulateurs /pro-tumoraux. Par exemple, il a été démontré dans le cancer du sein que les LT $\gamma\delta$ infiltrant la tumeur peuvent inhiber la maturation des DC ; ainsi que la maturation des LT $\alpha\beta$ en bloquant leur cycle cellulaire. Dans le cancer du côlon, les LT $\gamma\delta$ infiltrant produisent de l'IL-17 et de l'IL-8 et sont impliqués dans le recrutement des cellules myéloïdes suppressives. Enfin, dans le cancer du pancréas, du sein et du poumon, les LT $\gamma\delta$ inhibent l'activation des LT $\alpha\beta$ via l'axe PD1/PDL1. De plus, les LT $\gamma\delta$ possèdent une grande plasticité dépendante des signaux qu'ils reçoivent de leur environnement, en particulier des cytokines présentes. Dans ce contexte, mon équipe d'accueil avait montré qu'une sous-population de LT V γ 9V δ 2 présentant des propriétés régulatrices est favorisée en présence d'IL-21, soulevant la question de la présence d'autres sous-populations de LT $\gamma\delta$ régulatrices, de la pertinence de ces populations et de leur rôle *in vivo*.

C'est à ce stade de l'étude que j'ai rejoint l'équipe « Immunité et Cancer » pour réaliser ma thèse. Mon travail de thèse, a consisté à caractériser et comprendre le rôle des LT $\gamma\delta$ dans les cancers solides et s'articule autour de trois objectifs majeurs :

1/ mieux définir la ou les sous-population(s) T $\gamma\delta$ dotée(s) de fonctions suppressives avec un intérêt particulier pour la population LT V δ 1, population retrouvée majoritairement dans les tissus.

2/ rechercher la présence de ces populations suppressives dans le MET et établir la relevance physiologique de leur présence (impact sur l'évolution de la pathologie)

3/ identifier les principaux partenaires cellulaires des LT $\gamma\delta$ régulateurs et leurs réseaux d'interaction dans le MET afin de mieux comprendre leur rôle dans l'évolution de la pathologie.

En combinant des approches expérimentales (cytométrie et imagerie par cytométrie de masse) et des analyses computationnelles innovantes, ce travail apporte un nouvel éclairage sur l'existence, la génération et le rôle physiopathologique des sous-populations de LT $\gamma\delta$ régulateurs au sein du microenvironnement tumoral.

Résultats

Chapitre 1 : Identification d'une population de LT V δ 1 régulateurs

1.1 Résumé des travaux

Sachant que les LT V δ 1 sont également impliqués dans la réponse anti-tumorale chez l'Homme, nous nous sommes demandés si le phénotype induit par l'IL-21 sur les LTV γ 9V δ 2 ne pouvait pas être retrouvé dans cette sous-population. Cette question est d'autant plus importante que les LT V δ 1 sont majoritairement retrouvés dans les tissus et que plusieurs études suggèrent que les LT V δ 1 sont les LT $\gamma\delta$ majoritaires dans le MET de divers cancers solides (comparé aux LT V γ 9V δ 2).

Dans cette étude, nous avons identifié dans le sang de donneurs sains une sous-population de LT V δ 1 qui expriment le CD73 (environ 20 % de l'ensemble de la population) et présentent un phénotype et des fonctions immunosuppressives, notamment via la production de molécules immunosuppressives, telles que l'IL-10, l'adénosine et le facteur chimiotactique IL-8. Celles-ci sont capables d'inhiber la prolifération des LT $\alpha\beta$, comme le montre les expériences de co-culture réalisées. Comme pour les LT γ 9 δ 2, l'exposition à l'IL-21 favorise le développement et l'amplification d'une sous-population exprimant CD73 et présentant des fonctions immunosuppressives.

La présence de LT $\gamma\delta$ dans le MET cancer du sein étant associée à un mauvais pronostic, et l'IL-21 étant une cytokine retrouvée de le MET de tumeurs mammaires, nous avons choisi d'étudier la pertinence physiologique de ces LT $\gamma\delta$ CD73 dans ce type de cancer. Nous avons d'abord étudié l'infiltrat $\gamma\delta$ par immunohistochimie (IHC) d'un TMA (*tissu microarray*) regroupant des échantillons tumoraux de 52 patientes atteintes de cancer du sein. Nous avons observé une forte infiltration de LT $\gamma\delta$ dans le MET des tumeurs de stade avancé. L'étude de l'infiltrat immunitaire de 16 échantillons tumoraux frais obtenus après chirurgie a révélé la présence de LT $\gamma\delta$ CD73+ dans le MET. Bien que les LT V δ 1 soient les populations tissulaires majoritaires, nous avons retrouvé dans le MET de ces tumeurs à la fois des LT V δ 1 et des LT V δ 2. Ces résultats ont été publiés en 2020 dans *Journal of Leukocyte Biology*. Nous avons par la suite étudié le phénotype et les fonctions biologiques de ces LT $\gamma\delta$ infiltrants les tumeurs sans distinguer les LT V δ 1 des LT V δ 2 puisque les deux expriment CD73 dans le MET (données non publiées encore). Les LT $\gamma\delta$ CD73+ diffèrent phénotypiquement des LT $\gamma\delta$ CD73-

notamment avec une forte expression de PD-L2 et TIGIT. Les LT $\gamma\delta$ CD73+ infiltrant les tumeurs présentent de plus une forte expression d'IL-8 et d'IL-10, suggérant qu'ils peuvent exercer leurs fonctions pro-tumorales par les mêmes mécanismes que ceux identifiés *in vitro*.

1.2 Publication

DOI: 10.1002/JLB.3MA0420-278RR

JLB JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY

ARTICLE

Identification of a regulatory V δ 1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer

Ghita Chabab¹ | Clément Barjon^{1,2} | Naoill Abdellaoui¹ | Lucie Salvador-Prince¹ |
Cécile Dejou¹ | Henri-Alexandre Michaud¹ | Florence Boissière-Michot³ |
Evelyne Lopez-Crapez^{1,3} | William Jacot^{1,4} | Didier Pourquier⁵ | Nathalie Bonnefoy¹ |
Virginie Lafont¹ 

¹IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

²Current address: Duve Institute, UCLouvain, Brussels, Belgium

³Translational Research Department, Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

⁴Medical Oncology Department, Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

⁵Anatomopathology Department, Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

Correspondence

Dr Virginie Lafont, IRCM, INSERM U1194, 208 rue des Apothicaires, 34298 Montpellier cedex 5 France.

Email: virginie.lafont@inserm.fr

Abstract

$\gamma\delta$ T cells contribute to the immune response against many cancers, notably through their powerful effector functions that lead to the elimination of tumor cells and the recruitment of other immune cells. However, their presence in the tumor microenvironment has been associated with poor prognosis in breast, colon, and pancreatic cancer, suggesting that $\gamma\delta$ T cells may also display pro-tumor activities. Here, we identified in blood from healthy donors a subpopulation of V δ 1T cells that represents around 20% of the whole V δ 1 population, expresses CD73, and displays immunosuppressive phenotype and functions (i.e., production of immunosuppressive molecules, such as IL-10, adenosine, and the chemotactic factor IL-8, and inhibition of $\alpha\beta$ T cell proliferation). We then found that in human breast tumors, $\gamma\delta$ T cells were present particularly in late stage breast cancer samples, and that ~20% of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells expressed CD73. Taken together, these results suggest that regulatory $\gamma\delta$ T cells are present in the breast cancer microenvironment and may display immunosuppressive functions through the production of immunosuppressive molecules, such as IL-10, IL-8, and adenosine, thus promoting tumor growth.

KEYWORDS

immunosuppression, non-conventional T cells, tumor microenvironment

1 | INTRODUCTION

$\gamma\delta$ T cells are nonconventional lymphocytes defined by the expression of a specific receptor composed of the V γ and V δ chains. In humans, there are 2 main subtypes of $\gamma\delta$ T cells, according to the expressed V δ chain: (i) V δ 2 T cells, mainly represented by the innate V γ 9V δ 2 T cell subset that is predominant in blood and recognizes phosphorylated non-peptide Ags called phosphoantigens; and (ii) non-V δ 2 T cells (mainly represented by the V δ 1 subset) that are predominant in tissues

and recognize stress-induced Ags.¹⁻³ $\gamma\delta$ T cells are also found in the tumor environment and are involved in the immune response against many cancers (e.g., myeloma, melanoma, breast, colon, lung, ovary, and prostate).⁴⁻⁸ Their antitumor effect relies directly on their cytolytic activity against transformed cells and indirectly on their ability to stimulate/regulate the biological functions of other cell types, such as dendritic cells (DC), IFN- γ -producing CD8-positive $\alpha\beta$ T cells, and NK cells that are required for the initiation and the establishment of an efficient antitumor immune response.⁹⁻¹²

Unlike conventional $\alpha\beta$ T cells, $\gamma\delta$ T cells: (i) display potent major histocompatibility complex (MHC)-independent reactivity against a broad panel of tumors; (ii) show limited, if any, alloreactivity; and (iii) can be massively and specifically expanded from samples (e.g., peripheral blood). For all these reasons, $\gamma\delta$ T cells are considered as highly attractive therapeutic targets for antitumor immunotherapies. Although human V δ 1, V δ 2, and V δ 3 T cells display a strong reactivity

Abbreviations: APCP, adenosine 5'-(α,β -methylene)-diphosphate; BrHPP, bromohydrin pyrophosphate; CD, cluster of differentiation; DC, dendritic cells; EFS, Etablissement Français du Sang; ENTPD1, ectonucleoside triphosphate diphosphorylase 1; IHC, immunohistochemistry; LT, T lymphocyte; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; PD-L1, program death ligand 1; PFA, paraformaldehyde; rhIL, human recombinant IL; SBR, Scarff-Bloom and Richardson grade; TCM, central memory T cell; TEM, effector memory T cell; TIL, tumor-infiltrating lymphocytes; TMA, tumor microarray; TME, tumor microenvironment; TNBC, triple-negative breast cancer; Treg, regulatory T cell.

Received: 16 December 2019 | Revised: 3 April 2020 | Accepted: 7 April 2020

J Leukoc Biol. 2020;107:1057-1067.

www.jleukbio.org

©2020 Society for Leukocyte Biology | 1057

against tumor cells, $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapies primarily target the V δ 2 subset due to the facility to expand and activate them with synthetic clinical-grade phosphoantigens (e.g., bromohydrin pyrophosphate) or pharmacological inhibitors (e.g., zoledronate, pamidronate) of the mevalonate pathway that produces these metabolites. Clinical trials using V γ 9V δ 2 T cells have been carried out in patients with solid cancers or hematological malignancies and the most significant results showed objective responses in 10–33% of patients.^{9–14} Importantly, many patients who did not respond to treatments exhibited significant and sustained V γ 9V δ 2 T cell proliferation, which raised issues about the presence of mechanisms that inhibit/divert V γ 9V δ 2 T cell functions and/or their ability to infiltrate tumors.

In line with these observations, and unlike $\alpha\beta$ T cells, the tumor-infiltrating V γ 9V δ 2 T cell abundance is variably associated with the disease outcome.¹⁵ This suggests that mobilization of V γ 9V δ 2 and $\alpha\beta$ T cells is differentially regulated, or that other T cell subsets are involved, such as V δ 1 T cells. V δ 1 T cells recognize the stress-inducible proteins MICA and MICB, which are expressed by some tumor and virus-infected cells,¹⁶ glycolipid Ags presented by the CD1c¹⁷ and CD1d proteins,^{18,19} and the algal protein PE.²⁰ Additionally, V δ 1 T cells can be activated independently of their TCR, via ligation of stimulatory receptors, including NKG2C, NKG2D, NKp30, TLRs, and the β -glucan receptor, dectin 1.^{21–25} Upon activation, V δ 1 T cells proliferate, release cytokines, such as IFN- γ , TNF- α , and IL-17, and chemokines, such as CCL3, CCL4, and CCL5.^{21,22,24,27} Moreover, V δ 1 T cells are usually predominant (over V δ 2) in tumor infiltrates, and efficiently react (e.g., cytotoxicity) against tumor cells.^{5,28} Recently, Silva-Santos' team developed a new and robust clinical-grade method for selective and large-scale expansion and differentiation of cytotoxic V δ 1 T cells, and demonstrated (proof of concept) their activity in preclinical models of chronic lymphocytic leukemia.²⁹

Interestingly, recent *in vitro* and *in vivo* data highlighted some degree of $\gamma\delta$ T cell polarization driven by environmental signals that can affect their antitumor functions. Indeed, some cytokines present in the tumor microenvironment (e.g., IL-21) can affect or modify the effector functions of $\gamma\delta$ T cells.³⁰ IL-21 also potentiates the cytolytic activity and pro-inflammatory responses of V γ 9V δ 2 T cells.³¹ It also favors the differentiation of a V γ 9V δ 2 T cell subpopulation into B-helper T cells.^{32,33}

Besides their antitumor functions, $\gamma\delta$ T cells have been recently associated with pro-tumoral functions in some cancers. Specifically, IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells have pro-tumoral functions in murine breast, ovarian, and hepatocellular cancer models and in human colorectal cancer.^{34–37} In human breast cancer, $\gamma\delta$ T cell immunosuppressive functions have been associated with DC senescence induction.³⁸ Moreover, in murine and human pancreatic ductal adenocarcinoma, $\gamma\delta$ T cells inhibit $\alpha\beta$ T cell activation and infiltration via PDL-1 ligation, thereby allowing tumor progression.³⁹ Overall, these data support the hypothesis that some $\gamma\delta$ T cell subsets can be immunosuppressive and favor tumor progression in selected solid tumor types. In agreement, we recently identified a subset of V γ 9V δ 2 T cells that express the ectonucleotidase CD73 and can produce adenosine, an immunosuppressive molecule. This cell subset also produces IL-10 and IL-8

and inhibits conventional T cell proliferation in a CD73/adenosine-dependent manner.⁴⁰

In this study, we extended these observations to V δ 1 T cells. We identified in blood from healthy donors a subpopulation of V δ 1 T cells that expresses CD73 (around 20% of the whole V δ 1 population) and displays immunosuppressive phenotype and functions (i.e., production of immunosuppressive molecules, such as IL-10, adenosine, and the chemotactic factor IL-8, inhibition of $\alpha\beta$ T cell proliferation). As shown for V γ 9V δ 2 T cells, exposure to IL-21 favors the development and amplification of this V δ 1 subset. Then, we performed immunohistochemical (IHC) analysis of a breast tumor tissue microarray (TMA), and observed high $\gamma\delta$ T cell infiltration in the tumor microenvironment only of advanced stage tumors. Furthermore, we detected the presence of CD73-positive $\gamma\delta$ T cells in immune infiltrates of freshly resected breast cancer specimens. Altogether, these data suggest that part of $\gamma\delta$ T cells infiltrated in the breast cancer microenvironment might display pro-tumor functions, thus favoring an immunosuppressive microenvironment that will promote tumor growth.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ags, Abs, and reagents

Phytohemagglutinin (PHA) was purchased from ThermoFisher Scientific. The anti-human CD3 (UCHT1), and the anti-human TCR $\gamma\delta$ and TCR V δ 1 Abs were purchased from Beckman Coulter (Brea, CA, USA). Anti-human CD3, CD73, CD39 and their isotypically matched control mouse Abs were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). The anti-human TCR $\gamma\delta$ Ab used for IHC was from Santa Cruz Biotechnology (USA). Recombinant human IL-2 (rhIL-2) was from Novartis Pharma (Rueil-Malmaison, France), and recombinant IL-21 (rhIL-21) was from Miltenyi Biotec (Paris, France). ELISA kits for detecting human IL-10 and IL-8 were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). The ELISA kit for the detection of human TGF- β was from RD Systems. All the Abs used for this study are listed in Supporting Information Table S1.

2.2 | Cell culture

PBMCs were obtained by density centrifugation on Ficoll-Paque (Eurobio, Les Ulis, France) of blood samples from healthy donors and patients with breast cancer. Healthy donor and patient blood samples were provided by the Etablissement Français du Sang (EFS) (Convention EFS-OCPM n° 21PLER2018-0069) and the Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM) (Authorization BCB-EC-1-FR-ICM-ENR-269-004-CRB), respectively. To analyze comparable patients and healthy donors' cohorts, EFS blood samples from healthy women with an age ranging from 18 to 70 years were used. V δ 1 T cells were isolated from PBMCs by positive immunoselection using the anti-human V δ 1 Ab (Beckman Coulter) and anti-IgG1 magnetic beads (Miltenyi Biotec). Briefly, 300×10^6 cells were incubated with 10 μ g of anti-human V δ 1 Ab in 5 ml of PBS supplemented with 2% fetal calf serum (FCS) and EDTA (2 mM) at 4°C for 1 h. Cells were then washed and incubated with 200 μ l of anti-IgG1 magnetic beads at 4°C for 1 h, washed, and

collected on columns according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). This protocol allows the efficient isolation of V δ 1 T cells (purity > 90%). Purified V δ 1 T cells (2×10^6 cells/ml) were stimulated with 2 μ g/ml of PHA in the presence of syngeneic M ϕ s isolated using their adherence properties. Briefly, PBMCs (2×10^6 /ml) were incubated in RPMI/10% FCS for 1 h at 37°C in 96-well plates to allow monocytes to adhere and differentiate into M ϕ s. Non-adherent cells were removed by 2 washes with RPMI medium. Purified V δ 1 T cells were added to M ϕ s, activated by addition of PHA, and expanded in complete medium in the presence of rhIL-2 (control) or rhIL-2 + rhIL-21 (experimental condition) at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO₂. Complete medium was RPMI 1640/Glutamax medium supplemented with 5% human AB serum and 5% FCS. Every 2 days, fresh medium was added, and after 1 week V δ 1 T cells were separated from adherent M ϕ s and amplified in complete medium with cytokines for 2 more weeks before phenotyping or sorting by flow cytometry.

2.3 | Flow cytometry analysis

Cells were first incubated with Fc-block solution at 4°C for 30 min to minimize nonspecific binding of Abs to Fc receptors, then incubated with a cell viability dye and the panel of Abs in staining buffer (PBS-2% FCS) at 4°C for 30 min. Cells were then washed and fixed in 1% paraformaldehyde. Data were acquired with a Cytoflex cytometer (Beckman-Coulter) and analyzed with the FlowJo software.

2.4 | Cell sorting

Fresh or expanded V δ 1 T cells were incubated with anti-V δ 1 and anti-CD73 mAbs in PBS/2%FCS/2 mM EDTA at 4°C for 30 min. Cells were then washed and resuspended (20×10^6 cells/ml) in PBS/2%FCS/2 mM EDTA and sorted with a FACS Aria II apparatus (BD). Sorted cells were collected in PBS/50%FCS, washed, and resuspended in complete medium to be used for ELISA and proliferation assays, or lysed for mRNA extraction.

2.5 | Enzyme-linked immunosorbent assay

Sorted CD73-negative and CD73-positive cell subsets from expanded V δ 1 T cells (2×10^6 cells/ml) were incubated in fresh medium without cytokines in wells coated or not with the anti-CD3 Ab (UCHT1) for 6 h, and then supernatants were collected. IL-8 and IL-10 protein levels were assessed using the relevant BD Biosciences Opteia Kits. Each experiment was performed in duplicate. Results are expressed as the mean \pm SEM.

2.6 | Adenosine measurement by MALDI TOF spectrometry

Expanded V δ 1 T cells (2×10^6 cells/ml) were washed in cold PBS and resuspended in PBS supplemented with 50 mM of AMP (Sigma) and with or without 50 mM of adenosine 5'-(α,β -methylene)-diphosphate sodium salt (APCP, Sigma) at 4°C for 30 min. After centrifugation,

adenosine levels in supernatants were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry, as previously described by Bastid et al.⁴¹

2.7 | T cell proliferation assay

Peripheral blood from healthy donors was obtained from the EFS and mononuclear cells were isolated on a Ficoll gradient. PBMCs were stained with 2.5 μ M CFSE at 37°C for 11 min. A total of 4×10^4 CFSE-stained PBMCs were distributed in 96-well flat-bottom plates coated or not with the anti-CD3 Ab (UCHT1 10 μ g/ml). IL-21-expanded V δ 1 T cells were sorted based on CD73 expression and then CD73-negative and CD73-positive V δ 1 T cells were added to PBMCs (1:1 ratio). Each experiment was performed in duplicate. The proliferation of $\alpha\beta$ T cells was analyzed by flow cytometry at day 5.

2.8 | Tumor dissociation

Freshly resected tumors from patients were cut into small pieces (around 1 mm³). Tissues were resuspended in digestion solution (10 mg/ml collagenase IV from Sigma and 10 mg/ml DNase I from Roche) in HBSS, followed by 3 rounds of enzymatic digestion (15 min at 37°C) and mechanical dissociation with the gentle MACS dissociator (Miltenyi Biotec). The obtained single-cell suspensions were washed in PBS/2%FCS, and resuspended in PBS/2%FCS with FcBlock (Miltenyi Biotec) at 4°C in the dark for 30 min. Then, cells were washed and incubated with a panel of conjugated Abs (list in Supporting Information Table S1) and results analyzed, as described in the previous sections. The use of fresh tumor samples was approved by the Montpellier Cancer Institute Review Board (ICM-CORT-2018-34).

2.9 | Breast tumor tissue microarray

A TMA that included breast tumors from 52 patients was constructed using 2 malignant tissue cores (1 mm diameter) per tumor. Tissue samples were from patients who underwent surgery at our institution between 2001 and 2011 and received no neoadjuvant treatment. They were informed and gave their consent for using their tissue samples for biological research. Tumor samples were collected following the French laws under the supervision of an investigator and declared to the French Ministry of Higher Education and Research (declaration number DC-2008-695). The study was approved by the Montpellier Cancer Institute Review Board (ICM-CORT-2015-32). Two samples were excluded because of tissue degradation on the TMA. Only 1 tissue core could be analyzed for 11 tumor samples, whereas both tissue cores were assessable for 39 samples.

2.10 | Immunohistochemistry

After epitope retrieval in EDTA buffer (pH 9) and neutralization of endogenous peroxidase, 3 μ m TMA sections were incubated with the mouse monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ Ab (Clone H-41, Santa Cruz Biotechnology) at room temperature for 30 min. This was followed by an amplification step with a mouse linker and the standard detection system (Flex, Dako), consisting of a dextran backbone to which a

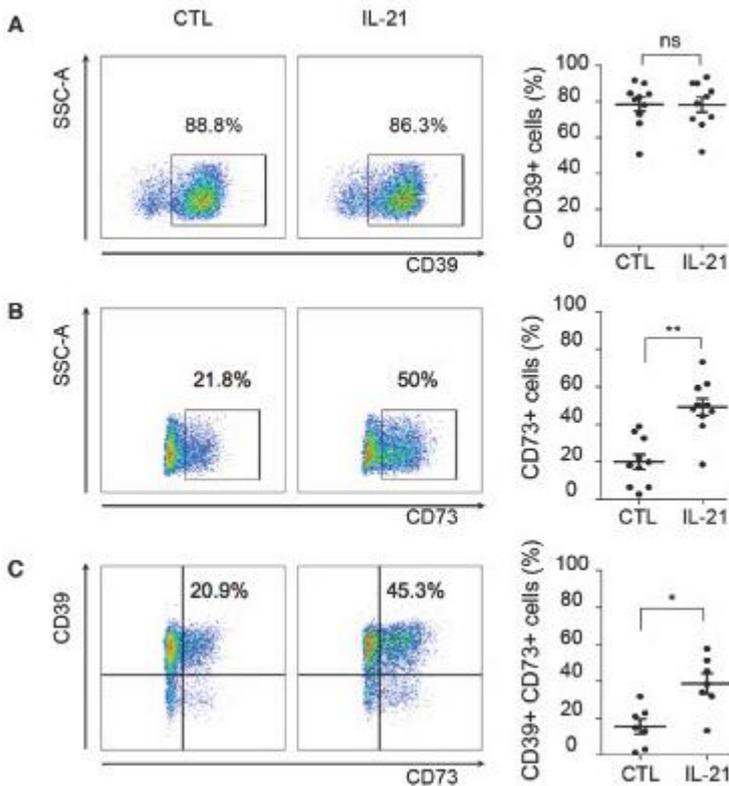


FIGURE 1 Expression of CD39 and CD73 in expanded V δ 1 T cells. Representative flow cytometry dot plots and cumulative data for control (CTL; only rhIL-2) and V δ 1 T cells expanded in the presence of rhIL-2 and rhIL-21 (IL-21) showing the percentage of (A) CD39⁺, (B) CD73⁺, and (C) CD39⁺/CD73⁺ cells. Cumulative data are from (A and B) 10 and (C) 7 healthy individuals; ns, not significant, * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ (paired Wilcoxon test)

large number of peroxidase molecules and secondary anti-mouse and anti-rabbit Abs were coupled. 3,30-Diaminobenzidine was used as substrate. The NanoZoomer slide scanner system (Hamamatsu Photonics) was used to digitalize the stained TMA sections with a $\times 40$ objective. Immunoreactive cells were manually identified and counted on the digitalized slides with the NDPview software. When both samples from the same tumor were assessable (39 out of 50), the mean value was calculated and used for statistical analysis and the data expressed as the number of TCR $\gamma\delta$ -positive cells per spot. The mean and SEM were then calculated from the 50 assessed tumors, by using the mean value of the 2 spots for 39 tumors and the raw density (value of the single spot) for the 11 tumor samples with only 1 assessable core. Salgado's method was used to determine the immune infiltrate in TMA spots.⁴²

2.11 | Statistical analysis

Results were compared using the paired Wilcoxon, Mann-Whitney, or chi-squared test depending on the experiment. A P -value < 0.05 was considered as statistically significant. Analyses were performed using the GraphPad Prism software, version 6.

3 | RESULTS

3.1 | A subset of V δ 1 T cells expresses the CD39 and CD73 ectonucleotidases

Extracellular ATP and adenosine act as positive and negative regulators of the immune response, respectively. We previously reported

that ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ENTPD1 or CD39), which catalyzes the phosphohydrolysis of extracellular ATP into ADP and of ADP into AMP, is expressed by V γ 9V δ 2 T cells after TCR activation.⁴⁰ Conversely, the ecto-5'-nucleotidase CD73, which completes AMP conversion into adenosine, is only expressed by a subset of activated V γ 9V δ 2 T cells, a phenotype that can be amplified in the presence of IL-21.⁴⁰ Here, we investigated CD39 and CD73 expression in the V δ 1 T cell subpopulation. To this aim, we isolated V δ 1 T cells from the blood of healthy donors, and activated and amplified them in vitro in the presence of rhIL-2 (control) or rhIL-2+rhIL21 (experimental condition). As expected, after activation and expansion, the majority of V δ 1 T cells differentiated into central memory (TCM) or effector memory (TEM) T cells as indicated by the expression of CD27 and CD45RA (Supplementary Fig. S1A, left panel). We observed that most of the expanded V δ 1 T cells (>85%) expressed CD39. However, exposure to rhIL-21 did not modify the percentage of CD39-positive cells, suggesting that IL-21 does not influence its expression (Fig. 1A). Conversely, rhIL-21 significantly increased the fraction of CD73-positive V δ 1 T cells to 50% (vs. 20% in the control condition), although results were heterogeneous among donors (Fig. 1B). The fraction of CD39/CD73-positive V δ 1 T cells also was significantly higher in cells exposed to rhIL-21 compared with control cells (40% vs. 18%; Fig. 1C).

3.2 | Adenosine production by V δ 1 T cells

Around 60–70% of CD73-positive V δ 1 T cells expressed also CD39 (Supplementary Fig. S1B), suggesting that these cells could produce

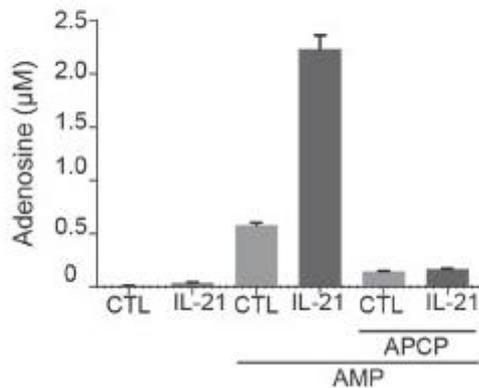


FIGURE 2 Adenosine production by expanded V δ 1 T cells. Adenosine production was assessed by MALDI-TOF mass spectrometry in supernatants of control (CTL) and IL-21-expanded (IL-21) V δ 1 T cells in the presence or not of AMP and APCP. Results are expressed as the mean \pm SEM of triplicates from 1 experiment representative of 5 experiments done with V δ 1 T cells from different donors

adenosine in an autonomous manner in an ATP-rich environment. As the percentage of CD39-positive V δ 1 T cells was identical in the presence/absence of rhIL-21, we hypothesized that CD73 expression was the only parameter influencing adenosine production. Therefore, we quantified adenosine levels in the supernatants of V δ 1 T cells by MALDI-TOF mass spectrometry, as previously described.⁴¹ IL-21-amplified V δ 1 T cells generated higher amounts of adenosine in the presence of AMP compared with control cells (only rhIL-2) (\sim 1.4 μ M vs. \sim 0.4 μ M) (Fig. 2). Incubation with APCP, a pharmacological inhibitor of CD73, strongly impaired adenosine production by control and IL-21-amplified V δ 1 T cells (Fig. 2), confirming that adenosine synthesis by these cells depends on CD73 activity. Taken together, these results suggest that CD73-positive V δ 1 T cells display an immunosuppressive function through adenosine production. Moreover, the presence of some CD73-positive cells in control cells suggests that rhIL-21 promotes the development of a preexisting immunosuppressive population, rather than just inducing CD73 expression.

3.3 | CD73-positive V δ 1 T cells produce IL-10 and IL-8

Conventional regulatory T cells inhibit the immune response by producing adenosine and also by secreting immunoregulatory cytokines, such as IL-10 and TGF- β .⁴³ Although naive V δ 1 T cells did not express IL-10 and IL-8 mRNA (data not shown), we analyzed whether expanded V δ 1 T cells produced these regulatory cytokines. In absence of activation, we detected basal level of IL-10 in the supernatants of IL-21-amplified V δ 1 T cells whether they expressed or not CD73, but not of control cells. TCR/CD3 activation strongly increased IL-10 production by IL-21-amplified CD73-positive but not by CD73-negative V δ 1 T cells (Fig. 3A). Conversely, we did not detect TGF- β secretion in any of the tested conditions (Supplementary Fig. S2A). As conventional Tregs express the FOXP3 transcription factor, we analyzed FOXP3 expression in expanded V δ 1 T cells. We observed FOXP3 expression in 10% of CD4+ T cells from healthy donors (Supplementary Fig. S2B).

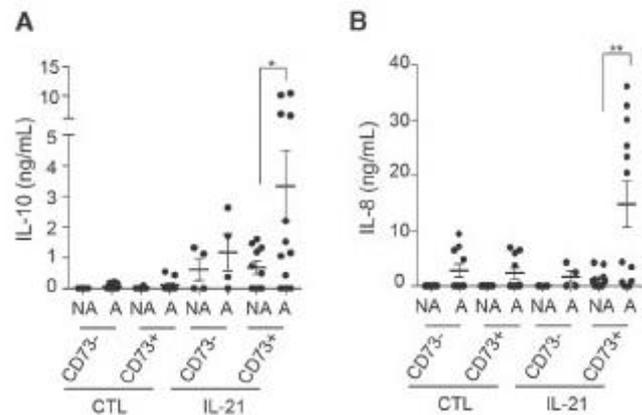


FIGURE 3 Production of IL-10 and IL-8 by expanded V δ 1 T cells. Quantification of (A) IL-10 and (B) IL-8 by ELISA in the supernatants of sorted CD73-negative and CD73-positive from control (CTL) and IL-21-expanded (IL-21) V δ 1 T cells activated (A) or not (NA) with an anti-CD3 mAb for 6 h. Data (mean \pm SEM) were from an experiments performed in duplicate using cells from 2 different donors (CD73-negative subset from IL-21-expanded V δ 1 T cells) and 6 different donors (all other conditions); ns, not significant; * P < 0.05 (paired Wilcoxon test)

Conversely, control (data not shown) and IL-21-amplified V δ 1 T cells (Supplementary Fig. S2B) did not express FOXP3. Furthermore, several studies, both in mice and humans, reported that $\gamma\delta$ T cells display pro-tumoral activity in an IL-17A-dependent manner.³⁴⁻³⁶ Therefore, we used flow cytometry to determine whether expanded V δ 1 T cells express IL-17A. We never detected IL-17A mRNA (data not shown) or protein expression (Supplementary Fig. S2C) in control and IL-21-amplified human V δ 1 T cells. Finally, as many studies showed that immunosuppressive T cells produce CXCL8 or IL-8, a chemokine implicated in angiogenesis and the recruitment of neutrophils and MDSCs in the tumor microenvironment, we investigated IL-8 production by V δ 1 T cells.^{37,44,45} As observed for IL-10, IL-8 production was high only in activated IL-21-amplified CD73-positive V δ 1 T cells (Fig. 3B). Thus, the CD73-positive V δ 1 T cell subset amplified in the presence of IL-21 was the main producer of IL-10 and IL-8.

These results suggest that through IL-10 and IL-8 secretion, V δ 1 T cells could contribute to create a tumor microenvironment rich in suppressive factors that favor tumor development and growth.

3.4 | CD73-positive V δ 1 T cells inhibit $\alpha\beta$ T cell proliferation

To determine whether CD73-positive V δ 1 T cells display regulatory functions, we analyzed their capacity to inhibit $\alpha\beta$ T cell proliferation. We compared proliferation of CFSE-labeled $\alpha\beta$ T cells grown in the presence or not of immobilized anti-CD3 monoclonal Abs and co-cultured with CD73-negative or CD73-positive V δ 1 T cells (sorted from IL-21-expanded V δ 1 T cell cultures). Around 90% and 60% of $\alpha\beta$ T cells proliferated when co-cultured with CD73-negative and CD73-positive V δ 1 T cells, respectively (Fig. 4). Overall, these results suggested that CD73-positive V δ 1 T cells display regulatory functions

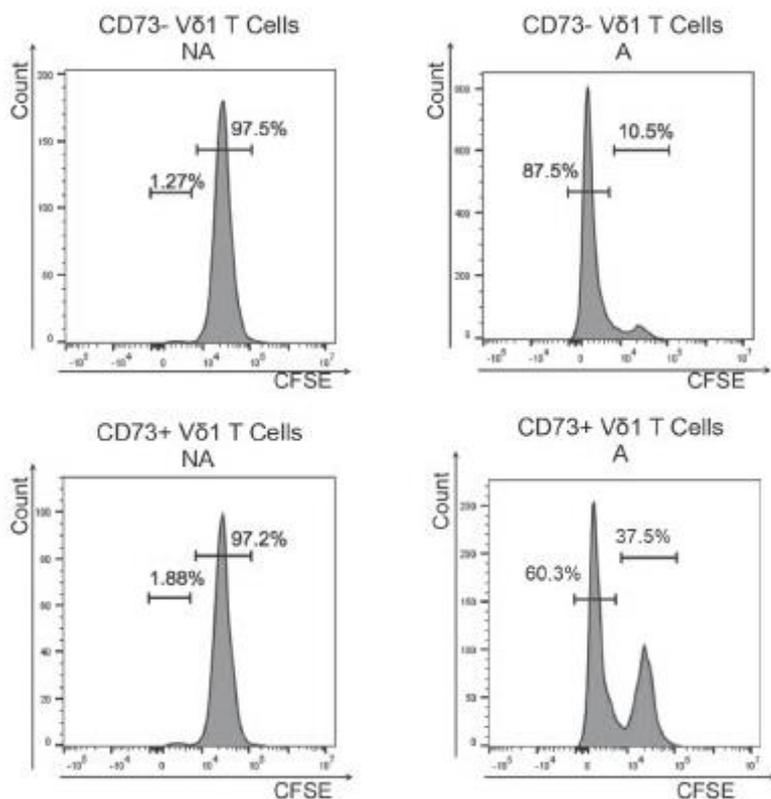


FIGURE 4 Inhibition of $\alpha\beta$ T cell proliferation by expanded CD73-positive V δ 1 T cells. Sorted CD73-negative or CD73-positive subsets from IL-21 expanded V δ 1 T cells were co-cultured in the presence of PBMCs for 5 days. Representative flow cytometry histograms showing CFSE staining of $\alpha\beta$ T cells activated or not with an immobilized anti-CD3 monoclonal Ab in the presence of CD73-negative or CD73-positive V δ 1 T cells after 5 days of culture. Representative histograms of 3 experiments performed with V δ 1 T cells from different donors

that can affect the proliferative capacity of other immune cells, such as $\alpha\beta$ T cells.

3.5 | Identification of $\gamma\delta$ T cells in human breast cancer samples

To evaluate the *in vivo* relevance of our findings in human solid cancers, we first assessed by IHC $\gamma\delta$ TCR expression in a TMA that included 52 human breast samples with different SBR grades and phenotypes based on HER2 and hormone receptor expression status (see details in Supplementary Table S2). All tumor samples used to build the TMA were collected at surgery from patients who did not receive any neoadjuvant treatment. Among the 52 tumors, 50 could be analyzed and 41 showed at least 1 $\gamma\delta$ T lymphocyte per mm^2 . Although $\gamma\delta$ T lymphocyte density was highly heterogeneous among samples (from 1 to >500 $\gamma\delta$ T cells/ mm^2 , Fig. 5A) their density progressively increased from grade I to grade II and III (Fig. 5B). This suggests, as previously reported by others,⁴⁶ that in breast cancer, the presence of $\gamma\delta$ T cells is associated with late tumor grade and/or poor prognosis. The concomitant analysis of the immune infiltrate using Salgado's method showed that lower $\gamma\delta$ cell density was associated with lower immune infiltrate (Supplementary Table S3). Moreover, although the difference was not significant, the density of $\gamma\delta$ T cells was higher in triple-negative breast cancer (TNBC) than in HER2- or hormone receptor-positive breast cancer samples (data not shown). TNBCs comprise a very heterogeneous group of cancers that require more aggressive treatment due to the inefficacy of hormone- or HER2-targeting therapies. Some TNBC types are more aggressive with poor prognosis, while other types

display similar or better prognosis than hormone receptor-positive breast cancers. This suggests that other parameters must intervene in the prognosis and evolution of breast cancer.

3.6 | Presence of CD73-positive $\gamma\delta$ T cells in human breast cancer

Then, to characterize the phenotype of infiltrated $\gamma\delta$ T cells in human breast tumors, we dissociated fresh breast cancer biopsies and analyzed the phenotype of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells by flow cytometry using the gating protocol described in Fig. 6A. Tumor samples ($n = 16$) were from patients with grade I, II, and III breast cancer who did not receive any neoadjuvant treatment (details in Supplementary Table S4). Unfortunately, due to the use of neoadjuvant chemotherapy in the TNBC population, no TNBC sample could be included. Although the fraction of CD45-positive cells in the breast cancer samples was very heterogeneous (0.75–25%), the proportion of CD3-positive cells in the CD45-positive subset was homogenous (around ~80%); $\gamma\delta$ T cells were always present and represented 3% to 13% of all CD3-positive cells (Fig. 6B). Moreover, 17% and 20% of $\gamma\delta$ T cells expressed CD39 and CD73, respectively (Fig. 6B), suggesting that $\gamma\delta$ T cells with potential suppressive functions are present in breast cancer. To better characterize the $\gamma\delta$ T cell phenotype, we analyzed the V δ 1 and V δ 2 subsets within the total $\gamma\delta$ T cell population in 12 of these 16 tumor samples. Overall, the percentage of V δ 2 cells tended to be higher than that of V δ 1 T cells (not significant), whereas the percentage of CD73-positive cells (about 20%) was similar in both populations (Fig. 6C and D).

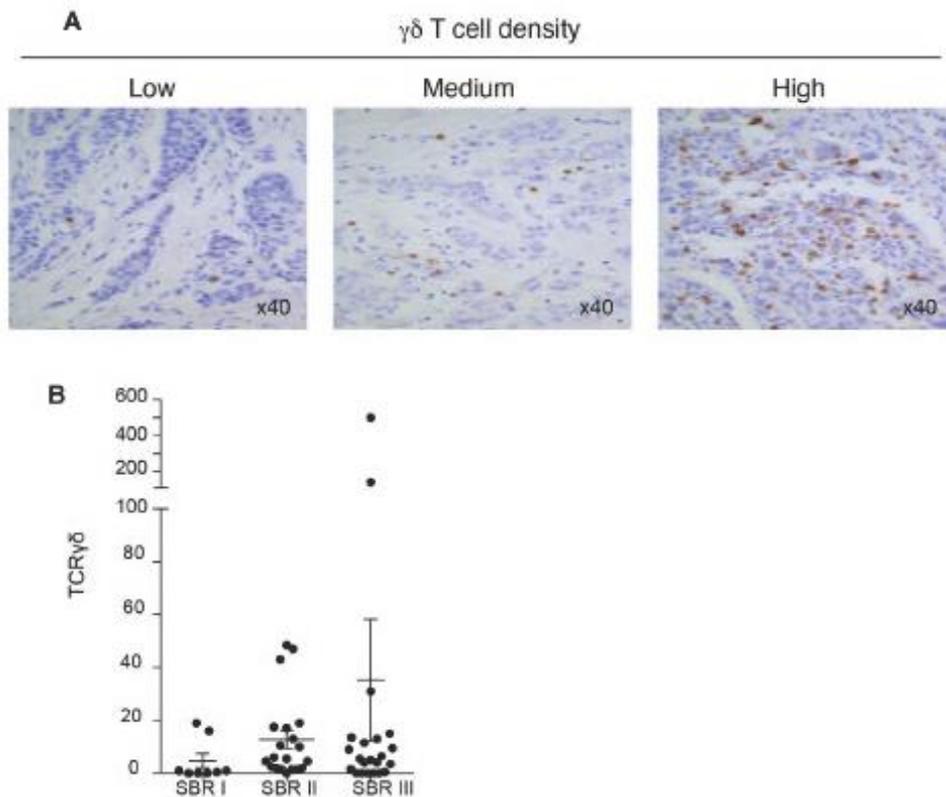


FIGURE 5 Detection of $\gamma\delta$ T cells in a human breast cancer TMA. (A) Detection by immunohistochemistry of $\gamma\delta$ T cells in 52 human breast cancer specimens. Two samples were not evaluable due to tissue degradation. The figure shows 3 representative tumors with low (patient 13), medium (patient 24) and high (patient 37) $\gamma\delta$ T cell density. (B) Scatter plot showing TCR $\gamma\delta$ expression in the 50 assessable human breast cancer samples from the TMA in function of the tumor grade. The means \pm SEM were calculated, as described in Section 2

4 | DISCUSSION

Following our previous report on regulatory CD73-positive V γ 9V δ 2 T cells,⁴⁰ we now investigated the possible existence of a similar suppressive subset within the V δ 1 T cell population and the role of IL-21 in its amplification. We identified CD73-expressing V δ 1 T cells in peripheral blood and found that rhIL-21 promotes their development. Importantly, in co-culture experiments, we demonstrated that CD73-positive V δ 1 T cells reduced the proliferative capacity of $\alpha\beta$ T cells. As most CD73-positive V δ 1 T cells also expressed CD39, we hypothesized that CD39/CD73-positive V δ 1 T cells may contribute to controlling the ATP/adenosine ratio in tissues, especially within tumors where they might participate in the degradation of extracellular ATP into adenosine, an immunosuppressive molecule. Indeed, we showed that upon activation, IL-21-amplified cells produce higher amount of adenosine compared with control cells, and that this mechanism is CD73-dependent. Extracellular ATP and adenosine are among the most potent modulators of tumor cells and immune responses in tumors. Apoptotic cells release ATP that acts as a major signal for the recruitment of phagocytes,⁴⁷ and is essential for the immunogenicity of dying cancer cells.⁴⁸ Extracellular ATP favors DC recruitment and maturation, 2 essential steps for the priming of the specific antitumor immune response.⁴⁹ ATP also inhibits the proliferation of tumor cells, but not of healthy cells, and promotes

the death of cancer cells.⁵⁰ Conversely, adenosine attenuates the immune response by suppressing effector cell functions and by stabilizing immunosuppressive regulatory T cells. Adenosine inhibits DC activation,⁵¹ Th1/Th2 cytokine production, T cell proliferation and activation,⁵² NK cell activation and cytotoxicity,⁵³ and enhances the suppressive functions of regulatory T cells⁵⁴ and M ϕ s.⁵⁵ Thus, through adenosine production, V δ 1 T cells may participate in the establishment of an immunosuppressive microenvironment. These data bring a molecular rationale to the recent work by Hu and colleagues who reported an important infiltration of CD39-positive $\gamma\delta$ T lymphocytes in human colorectal cancer tissues and highlighted their regulatory activity through adenosine production. As IL-21 level is high in the microenvironment of colorectal cancers, it could favor the recruitment and/or amplification of CD73-positive $\gamma\delta$ T cells.

In addition to their potential contribution to immunosuppression through the adenosine pathway, CD73-positive V δ 1 T cells may also participate in the establishment of an immunosuppressive microenvironment through production of IL-10. Indeed, we observed that IL-21-amplified CD73-positive (but not CD73-negative) V δ 1 T cells secreted high levels of IL-10 upon activation. IL-10 is an immunomodulatory cytokine that is frequently upregulated in various cancer types.⁵⁶ IL-10 directly affects the functions of APCs by inhibiting the expression of MHC and co-stimulatory molecules, which in turn induce immune suppression or tolerance. IL-10 also downregulates Th1 cytokine

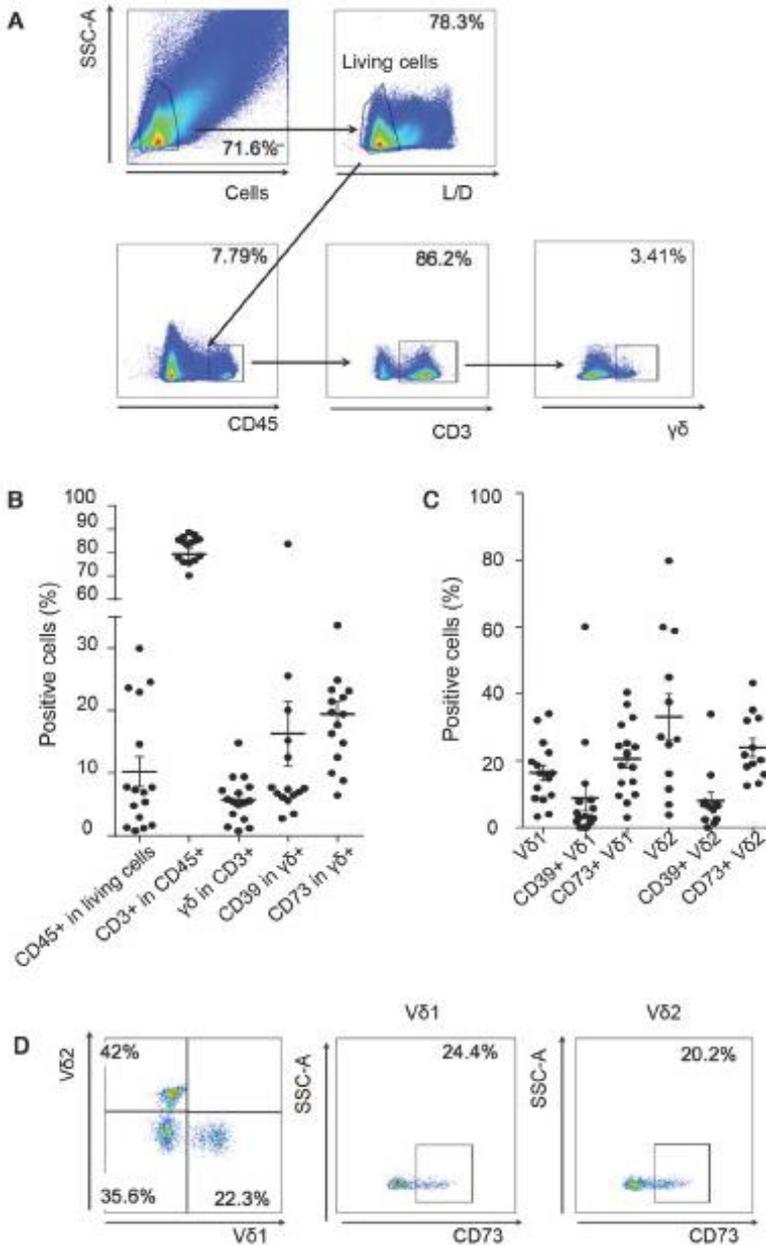


FIGURE 6 Analysis of $\gamma\delta$ T cell populations in fresh human breast cancer samples. (A) Gating strategy for human breast cancer analysis. Representative flow cytometry plots showing the gating strategy to identify $\gamma\delta$ T cell subsets from human breast tumors. Lymphocytes were gated on size and scatter, followed by a live-dead gate, singlet gate, CD45⁺ gate, CD3⁺ gate, and $\gamma\delta$ TCR⁺ gate. (B) Summary dot plot (mean \pm SEM of 16 tumor samples) showing the percentage of live CD45⁺ cells in tumors, CD3⁺ lymphocytes among the CD45⁺ cells, $\gamma\delta$ T cells among the CD3⁺ cells, CD39⁺ $\gamma\delta$ T cells among all $\gamma\delta$ T cells, and CD73⁺ $\gamma\delta$ T cells among all $\gamma\delta$ T cells. (C) Summary dot plot (mean \pm SEM of 12 tumor samples) showing the percentage of V δ 1 and V δ 2 cells (in the total $\gamma\delta$ T population), of CD39⁺ cells and of CD73⁺ cells in each subpopulation. (D) Representative flow cytometry plots showing the percentage of $\gamma\delta$ T cell subsets and of CD73⁺ V δ 1 and V δ 2 cells. The clinical data are in Supplementary Table S3

expression and induces regulatory T cell-mediated responses. Furthermore, it has been shown that there is a direct correlation between IL-10 presence in breast cancer and inhibition of tumor cell apoptosis, suggesting that beside its immunosuppressive functions, IL-10 may directly favor tumor growth. Although IL-10 pro-tumoral role as an immunosuppressive factor is well documented, it might also have an antitumor function in specific contexts. For instance, in murine tumor models, IL-10 acts as an immunostimulatory cytokine, leading to tumor regression and metastasis inhibition.^{57,58} Nevertheless, the molecular mechanisms of this effect have not been fully characterized yet.

We did not detect the expression in V δ 1 T cells of other main suppressive molecules or factors, such as TGF- β or the regulatory T cell-associated FOXP3 (Supplementary Fig. S2A and B). Several studies in mouse and human cancer models reported that $\gamma\delta$ T cells display pro-tumoral activity in an IL-17A-dependent manner.³⁴⁻³⁶ For

example, in a hepatocellular carcinoma mouse model, $\gamma\delta$ T cells are involved, through IL-17A production, in MDSC recruitment to the tumor site via a CXCL5/CXCR2-dependent pathway.³⁵ In another murine model, IL-17A-producing V γ 6 T cells promoted ovarian cancer growth by mobilizing small peritoneal pro-tumoral M ϕ s.³⁶ On the other hand, Janssen et al. recently reported that in various type of breast cancers $\alpha\beta$, but not $\gamma\delta$ T cells, are the main producers of IL-17.⁵⁹ In our experimental conditions, we never detected IL-17A mRNA (data not shown) or protein expression (Supplementary Fig. S2C) in control and IL-21-amplified human V δ 1 T cells. However, IL-21-amplified CD73-positive V δ 1 T cells produced high levels of IL-8, a chemokine involved in the recruitment of MDSCs and neutrophils and implicated in angiogenesis. Interestingly, in human colorectal cancer, $\gamma\delta$ T cells are the main source of IL-17A, and also secrete other cytokines, including IL-8 that attracts MDSCs into the tumor and induces

epithelial-mesenchymal transition.³⁷ Thus, IL-8 could also be part of V δ 1 T cell immunosuppressive arsenal to promote tumor development by sustaining the local immunosuppression and tumor promoting functions.

Combined with our previous study, these results show that IL-21 favors the emergence of regulatory $\gamma\delta$ T cell populations (V γ 9V δ 2 or V δ 1) characterized by CD73 expression and with regulatory functions through the production of immunosuppressive molecules, such as adenosine, IL-10, and IL-8.

One of the major challenges associated with the characterization of CD73-positive $\gamma\delta$ T cell subpopulations resides in assessing their existence *in vivo* as well as their relevance in human pathologies, such as cancer. Here, we demonstrated that high $\gamma\delta$ T cell infiltration is present mainly in breast cancer samples at advanced grades. This is in agreement with previous studies showing that the presence of $\gamma\delta$ T cells is associated with poor prognosis in breast cancer.⁴⁶ Moreover, we found that tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells express CD73, supporting the hypothesis of the presence of regulatory/immunosuppressive $\gamma\delta$ T cells in breast tumors. This also suggests that such cells could promote tumor development via the mechanisms described above. It should be noted that CD73 was similarly expressed in the V δ 1 and V δ 2 subsets, and that the frequencies of these subsets were comparable in our breast tumor samples (different grades and immunophenotypes). On the other hand, Wu and colleagues found that in TNBC samples (not included in our fresh tissue cohort) the V δ 1 subpopulation was predominant.⁶⁰ Additional studies should determine whether the subpopulations of infiltrating $\gamma\delta$ T cells differ among breast cancer subtypes.

One limitation of this study was the difficulty to collect sufficient $\gamma\delta$ T cells from fresh breast tumor samples to perform the functional assay. To palliate to this limitation, several options could be envisaged, for example, the *ex vivo* amplification of $\gamma\delta$ TILs after their isolation, as done in A. Hayday's laboratory,⁶⁰ or using single-cell analysis to detect the transcriptomic signature of CD73-positive $\gamma\delta$ tumor-infiltrating lymphocytes, as already done for V γ 9V δ 2 T and V δ 1 cells from blood.⁶¹

Moreover, CD73 is required, but not sufficient to identify suppressive $\gamma\delta$ T cells. Indeed, as observed in CD8 T cells,⁶² CD73 is expressed also by naive $\gamma\delta$ T cells that do not express IL-10 or IL-8 mRNA (data not shown). Thus, functional activity analysis (IL-10, IL-8, adenosine) is necessary to confirm the regulatory phenotype of CD73-positive cells. Regulatory functions might be a specific feature of a more differentiated $\gamma\delta$ T cell subpopulation that is not present at detectable levels in the blood of healthy donors (Supplementary Fig. S3A). Indeed, analysis of CD27 and CD45RA expression on expanded V δ 1 T cells indicated that most of these cells were TEM and TCM (Supplementary Fig. S1A, left panel). This corroborates our conclusion that CD73 might be considered as a regulatory marker only of differentiated V δ 1 T cells.

Furthermore, in an independent cohort of patients with breast cancer, we found that the percentage of V δ 1 cells was higher and that of V δ 2 cells was lower in the blood from patients than in healthy controls (V δ 1: 25% vs. 17%, V δ 2: 55% vs. 65%; Supplementary Fig. S3). Although not significant, these differences are in accordance with data

obtained in melanoma cancer.⁶³ Finally, comparison of CD73 expression in V δ 1 T cells from healthy donors and patients with breast cancer showed a significant lower proportion of CD73-positive V δ 1 T cells and a significant higher proportion of CD39-positive V δ 1 T cells in patients (Supplementary Fig. S3C). This could suggest a modification of the V δ 1 T cell differentiation status in the blood of patients, in agreement with the differentiated phenotypes of activated expanded V δ 1 T cells (Supplementary Fig. S1A). V δ 1 T cells could be activated within the tumor microenvironment, leading to a modification of their proportion and their differentiation status. Altogether, these results suggest that CD73-positive V δ 1 T cells are present in blood, but that additional signals from the inflammatory environment are required for their differentiation into immunosuppressive cells. IL-21 could be one of these additional signals in patients with breast cancer. Indeed, IL-21 has been detected in the microenvironment of different tumor types, particularly in breast cancer.^{30,64}

To conclude, it remains essential to further characterize the regulatory $\gamma\delta$ T cell subpopulations present in breast cancer to better understand their interactions with other cell components of the tumor microenvironment, especially CD8 effectors and nonregulatory $\gamma\delta$ T cells, and to evaluate their variations in different breast cancer subgroups.

AUTHORSHIP

N.B. and V.L. are the co-last authors of the study. V.L., G.C., and N.B. conceived the experiments. V.L. supervised the experiments. G.C., N.A., C.B., C.D., H.-A.M., and L.S.-P. performed experiments. W.J. and D.P. provided access to surgical tissues and clinical data. F.B. and E.C. performed the IHC experiments. G.C. analyzed the results, wrote the initial draft, and prepared figures. G.C., V.L., and N.B. reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Université de Montpellier; the Institut Régional du Cancer de Montpellier (ICM), the SIRIC Montpellier Cancer (Grant INCa_Inserm_DGOS_12553), and the Ligue contre le Cancer. G.C. is supported by a PhD studentship from the Fondation pour la Recherche Médicale. We acknowledge the Clinical Resources Center of the Montpellier Cancer Institute (CRB-ICM, n°BB-033-00059). We acknowledge the imaging facility MRI, member of the national infrastructure France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, Investments for the future).

DISCLOSURE

The authors have no conflict of interest to declare.

ORCID

Virginie Lafont  <https://orcid.org/0000-0001-9612-3934>

REFERENCES

- Adams EJ, Gu S, Luoma AM. Human gamma delta T cells: evolution and ligand recognition. *Cell Immunol.* 2015;296:31-40.
- Kabelitz D. gammadelta T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2011;68:2331-2333.
- Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:88-100.
- Bouet-Toussaint F, Cabillic F, Toutirais O, et al. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:531-539.
- Cordova A, Toia F, La Mendola C, et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One.* 2012;7:e49878.
- Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol.* 2005;175:5481-5488.
- Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, 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.
- Raspolini MR, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, et al. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol.* 2005;16:590-596.
- Lo Presti E, Pizzolato G, Gulotta E, et al. Current advances in gammadelta T Cell-Based Tumor Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017;8:1401.
- Marquez-Medina D, Salla-Fortuny J, Salud-Salvia A. Role of gamma-delta T-cells in cancer: another opening door to immunotherapy. *Clin Transl Oncol.* 2012;14:891-895.
- Pauza CD, Liou ML, Lahusen T, et al. Gamma delta T cell therapy for cancer: it is good to be local. *Front Immunol.* 2018;9:1305.
- Pressey JG, Adams J, Harkins L, Kelly D, You Z. In vivo expansion and activation of gammadelta T cells as immunotherapy for refractory neuroblastoma: a phase 1 study. *Medicine.* 2016;95:e4909.
- Buccheri S, Guggino G, Caccamo N, Li Donni P, Dieli F. Efficacy and safety of gammadelta T cell-based tumor immunotherapy: a meta-analysis. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014;28:81-90.
- Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B. Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res.* 2010;70:10024-10027.
- Tosolini M, Pont F, Poupot M, et al. Assessment of tumor-infiltrating TCRVgamma9Vdelta2 gammadelta lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology.* 2017;6:e1284723.
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science.* 1998;279:1737-1740.
- Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med.* 2000;191:937-948.
- Bai L, Picard D, Anderson B, et al. The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR. *Eur J Immunol.* 2012;42:2505-2510.
- Uldrich AP, Le Nours J, Pellizzi DG, et al. CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol.* 2013;14:1137-1145.
- Zeng X, Wei YL, Huang J, et al. gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity.* 2012;37:524-534.
- Fausther-Bovendo H, Wauquier N, Cherfils-Vicini J, Cremer I, Debre P, Vieillard V. NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *AIDS.* 2008;22:217-226.
- Hudspeth K, Fogli M, Correia DV, et al. Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood.* 2012;119:4013-4016.
- Kuroda H, Saito H, Ikeguchi M. Decreased number and reduced NKG2D expression of Vdelta1 gammadelta T cells are involved in the impaired function of Vdelta1 gammadelta T cells in the tissue of gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2012;15:433-439.
- Maher CO, Dunne K, Comerford R, et al. Candida albicans stimulates IL-23 release by human dendritic cells and downstream IL-17 secretion by Vdelta1 T cells. *J Immunol.* 2015;194:5953-5960.
- Wesch D, Peters C, Oberg HH, Pietschmann K, Kabelitz D. Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2011;68:2357-2370.
- Boullier S, Dadaglio G, Lefeuvre A, Debord T, Gougeon ML. V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and IFN-gamma production but are not selected in lymph nodes. *J Immunol.* 1997;159:3629-3637.
- Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, et al. Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to Candida albicans. *Blood.* 2009;113:6611-6618.
- Lo Presti E, Dieli F, Meraviglia S. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes: pathogenic role, clinical significance, and differential programming in the tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2014;5:607.
- Almeida AR, Correia DV, Fernandes-Platzgummer A, et al. Delta one T cells for immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia: clinical-grade expansion/differentiation and preclinical proof of concept. *Clin Cancer Res.* 2016;22:5795-5804.
- Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 2013;73:2468-2479.
- Theirez A, Harly C, Morice A, Salot S, Bonneville M, Scotet E. IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol.* 2009;182:3423-3431.
- Eberl M, Engel R, Beck E, Jomaa H. Differentiation of human gammadelta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol.* 2002;218:1-6.
- Caccamo N, Todaro M, La Manna MP, Sireci G, Stassi G, Dieli F. IL-21 regulates the differentiation of a human gammadelta T cell subset equipped with B cell helper activity. *PLoS One.* 2012;7:e41940.
- Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2015;522:345-348.
- Ma S, Cheng Q, Cai Y, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2014;74:1969-1982.
- Rei M, Goncalves-Sousa N, Lanca T, et al. Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E3562-70.
- Wu P, Wu D, Ni C, et al. gammadelta T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity.* 2014;40:785-800.
- Peng G, Wang HY, Peng W, Kuniwa 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.
- Daley D, Zambirinis CP, Seifert L, et al. gammadelta T cells support pancreatic oncogenesis by restraining alphabeta T cell activation. *Cell.* 2016;166:1485-1499. e15.
- Barjon C, Michaud HA, Fages A, et al. IL-21 promotes the development of a CD73-positive Vgamma9Vdelta2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology.* 2017;7:e1379642.

41. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res.* 2015;3:254-265.
42. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26:259-271.
43. Yano H, Andrews LP, Workman CJ, Vignali DAA. Intratumoral regulatory T cells: markers, subsets and their impact on anti-tumor immunity. *Immunology.* 2019;157:232-247.
44. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6735-6741.
45. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:375-391.
46. Ma C, Zhang Q, Ye J, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol.* 2012;189:5029-5036.
47. Elliott MR, Chekeni FB, Tramont PC, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 2009;461:282-286.
48. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res.* 2010;70:855-858.
49. Silva-Vilches C, Ring S, Mahnke K. ATP and its metabolite adenosine as regulators of dendritic cell activity. *Front Immunol.* 2018;9:2581.
50. White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:211-217.
51. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* 2008;112:1822-1831.
52. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008;111:251-259.
53. Cekic C, Day YJ, Sag D, Linden J. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2014;74:7250-7259.
54. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol.* 2012;3:190.
55. de Andrade Mello P, Coutinho-Silva R, Savio LEB. Multifaceted effects of extracellular adenosine triphosphate and adenosine in the tumor-host interaction and therapeutic perspectives. *Front Immunol.* 2017;8:1526.
56. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 2015;367:103-107.
57. Emmerich J, Mumm JB, Chan IH, et al. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res.* 2012;72:3570-3581.
58. Oft M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:194-199.
59. Janssen A, Villacorta Hidalgo J, Beringer DX, et al. gammadelta T-cell receptors derived from breast cancer-infiltrating T lymphocytes mediate antitumor reactivity. *Cancer Immunol Res.* 2020;8:530-543.
60. Wu Y, Kyle-Cezar F, Woolf RT, et al. An innate-like Vdelta1(+) gammadelta T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Sci Transl Med.* 2019;11:eaax9364.
61. Pizzolato G, Kaminski H, Tosolini M, et al. Single-cell RNA sequencing unveils the shared and the distinct cytotoxic hallmarks of human TCRVdelta1 and TCRVdelta2 gammadelta T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116:11906-11915.
62. Bono MR, Fernandez D, Flores-Santibanez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 2015;589:3454-3460.
63. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Haehnel K, 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.
64. Wang LN, Cui YX, Ruge F, Jiang WG. Interleukin 21 and its receptor play a role in proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics.* 2015;12:211-221.

SUPPORTING INFORMATION

Additional information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Chabab G, Barjon C, Abdellaoui N, et al. Identification of a regulatory Vδ1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J Leukoc Biol.* 2020;107:1057-1067. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0420-278RR>

Supplemental material

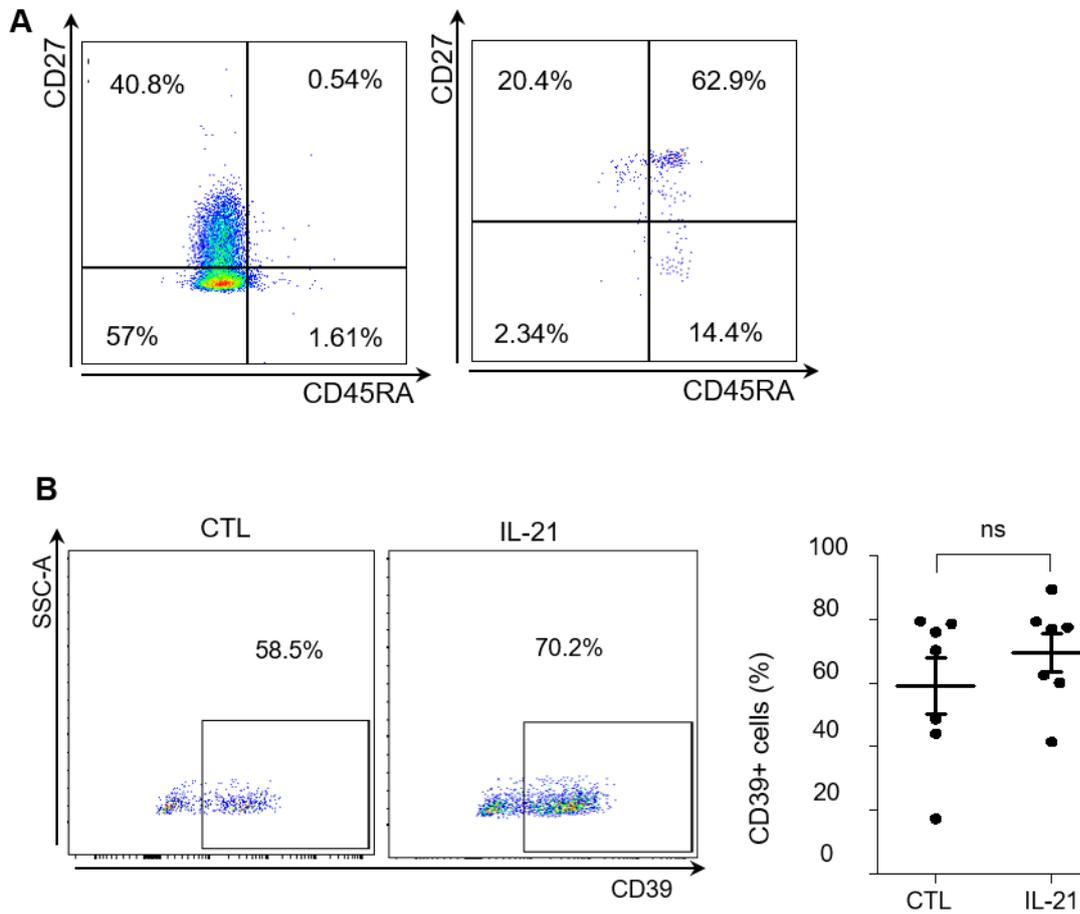


Figure S1. Expression of CD27 and CD45RA in expanded V δ 1 T cells and expression of CD39 in CD73-positive V δ 1 T cells. (A) Representative dot plot showing the percentages of CD45RA- and CD27-positive cells among IL-21-expanded V δ 1 cells or from fresh PBMCs of healthy donors, assessed by flow cytometry. The experiment was performed using 6 samples from healthy donors and 6 samples of expanded V δ 1 cells. (B) Representative flow cytometry dot plots and cumulative data showing the percentage of CD39-positive among the CD73-positive V δ 1 cells in control (CTL) and IL-21-cultured (IL-21) V δ 1 T cells. ns, non-significant (paired Wilcoxon test; samples from 7 donors).

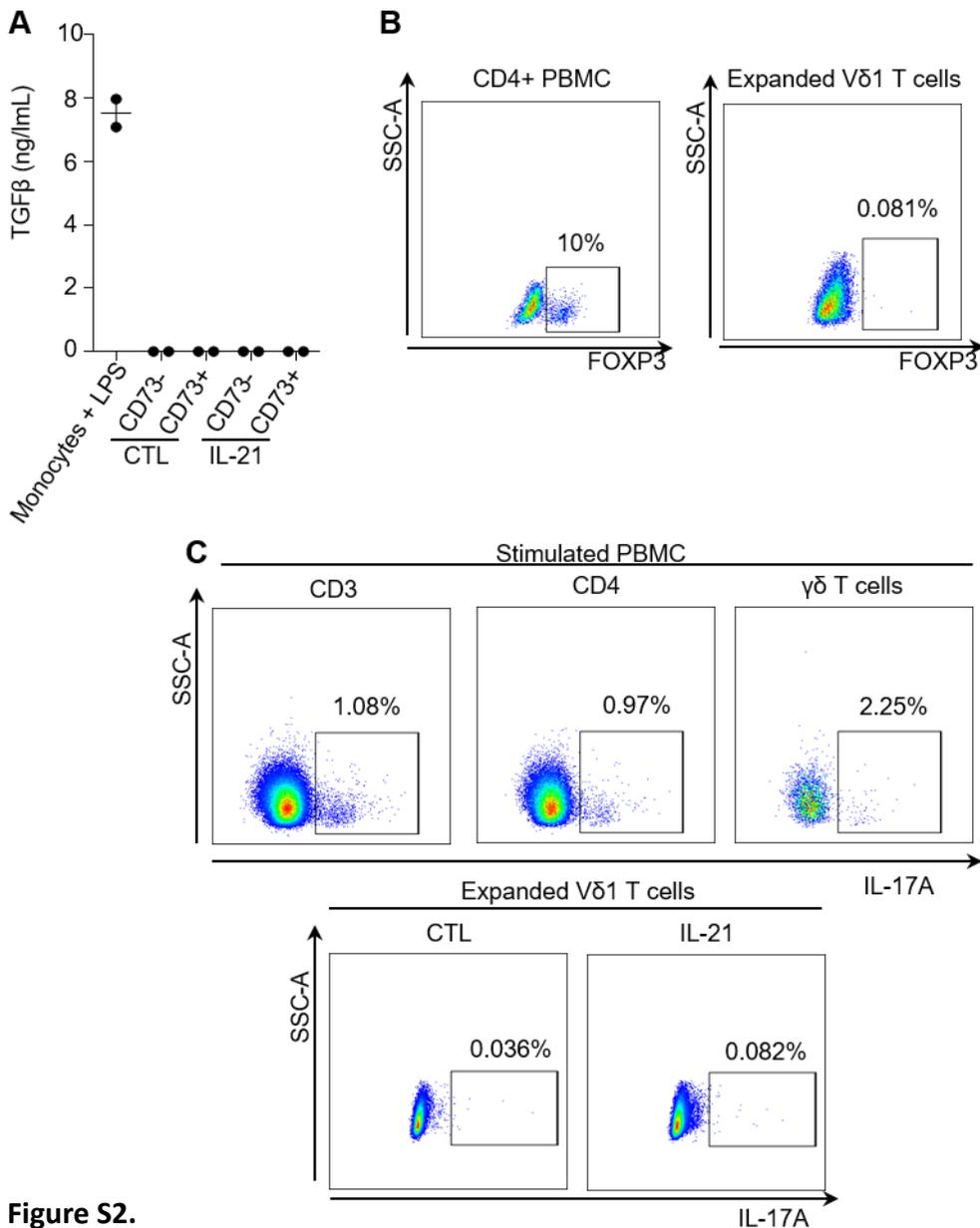


Figure S2.

Figure S2A: TGF-β production. TGF-β quantification in supernatants of sorted CD73-negative/CD73-positive cells from expanded Vδ1 T cells by ELISA. Supernatants from LPS- stimulated monocytes were used as a positive control. The experiment was performed in duplicate using cells from 2 donors.

Figure S2B: FOXP3 expression. Intracellular FOXP3 staining was performed in CD4-positive T cells from PBMCs from healthy donors (positive control) (left panel) and in IL-21-expanded Vδ1 T cells (right panel). Plots are representative of three experiments performed with cells from three donors using the permeabilization kit from Thermo Fisher Scientific (eBioscience™ FOXP3 / Transcription Factor Staining Buffer Set).

Figure S2C: IL-17A expression. IL-17A expression was analyzed by intracellular staining in stimulated PBMCs (gated on CD3, CD4 and γδ T cells) of healthy donors (positive control) and in stimulated control (CTL) or IL-21-expanded (IL-21) Vδ1 T cells. These plots are representative of three experiments performed with cells from three donors.

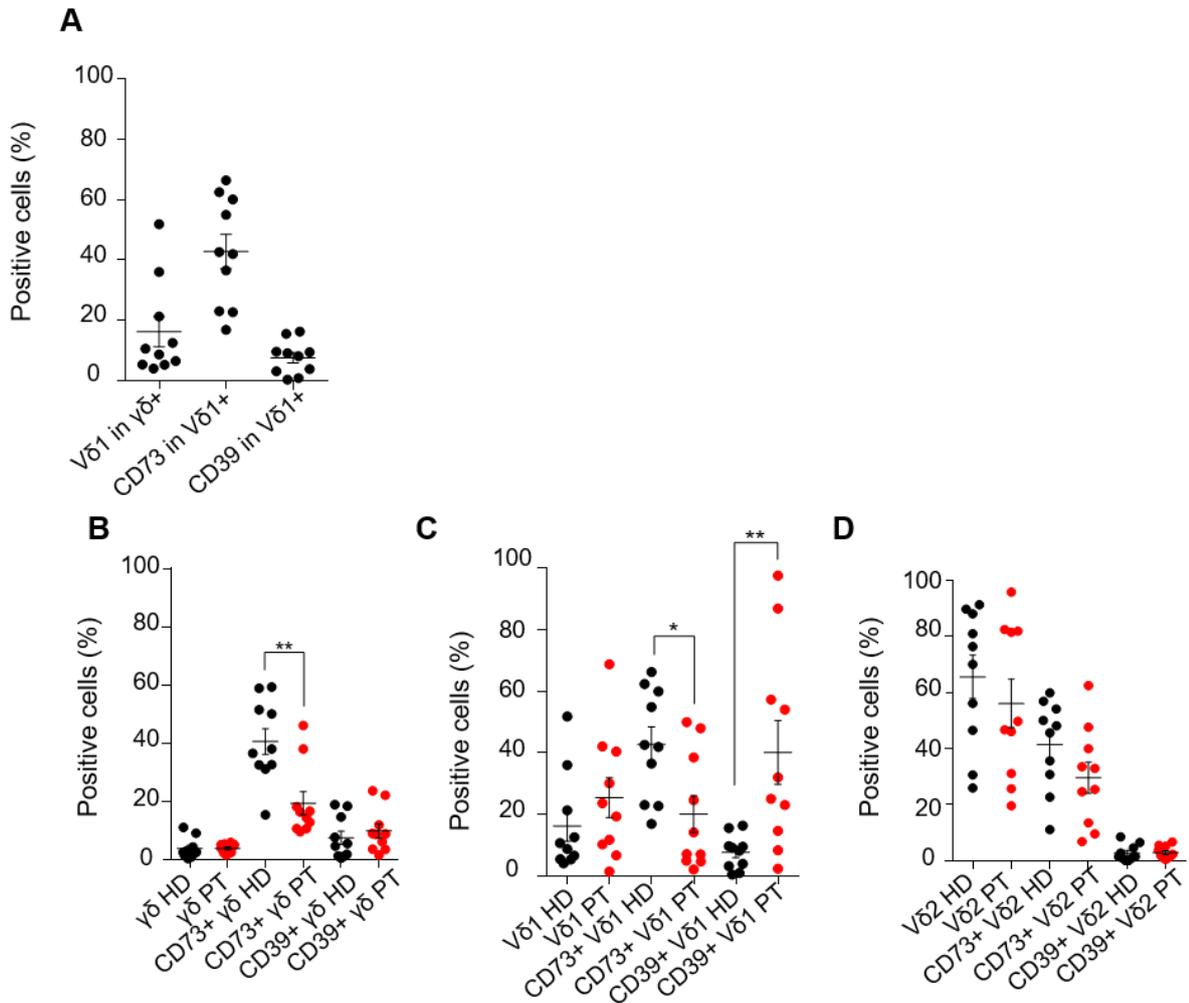


Figure S3. Phenotyping of fresh PBMCs of healthy donors and patients with breast cancer (A) Cumulative data from 10 healthy donors showing the percentage of V δ 1 cells and the percentage of CD39-positive and CD73-positive cells in V δ 1 cells from fresh PBMCs assessed by flow cytometry. (B) Percentages of $\gamma\delta$, CD73-positive $\gamma\delta$, and CD39-positive $\gamma\delta$ T cells, (C) V δ 1, CD73-positive V δ 1, and CD39-positive V δ 1 T cells, and (D) V δ 2, CD73-positive V δ 2, and CD39-positive V δ 2 T cells in the PBMCs of 10 healthy donors (HD; black dots) and 10 patients with breast cancer (PT; red dots) assessed by flow cytometry. All significant differences are shown in the plots. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ (Mann-Whitney test)

Use	Target	Fluorochrome	Supplier	Clone
FACS panel for tumor phenotyping	Viability™ 405/520 Fixable Dye	AmCyan	Miltenyi	-
	CD45	APC Cy7	BD	2D1
	CD3	BV786	BD	SK7
	Pan $\gamma\delta$	PC5.5	Beckman Coulter	IMMU510
	TCR V delta1	PC7	Beckman Coulter	R9.12
	TCR V delta2	FITC	BD	B6
	CD39	PE	BD	TU66
	CD73	BV421	BD	AD2
FACS panel for fresh PBMC (healthy donors and patients)	Viability™ 405/520 Fixable Dye	AmCyan	Miltenyi	-
	CD3	BV786	BD	SK7
	Pan $\gamma\delta$	PC5.5	Beckman Coulter	IMMU510
	TCR V delta1	PC7	Beckman Coulter	R9.12
	TCR V delta2	FITC	BD	B6
	CD39	PE	BD	TU66
	CD73	BV421	BD	AD2
	CD45RA	FITC	BD	HI100
	CD27	APC	BD	M-T271
FACS panel for expanded V δ 1 T cells	Viability™ 405/520 Fixable Dye	AmCyan	Miltenyi	-
	CD3	BV786	BD	SK7
	Pan $\gamma\delta$	PC5.5	Beckman Coulter	IMMU510
	TCR V delta1	PC7	Beckman Coulter	R9.12
	CD39	PE	BD	TU66
	CD73	BV421	BD	AD2
	CD45RA	FITC	BD	HI100
	CD27	APC	BD	M-T271
Intracellular staining	FOXP3	AF488	ebiosciences	PCH101
	IL-17A	PE	BD	N49-653
Other antibodies used	TCR $\alpha\beta$	PC7	Miltenyi	BW242/412
	CD4	BV650	BD	SK3
Sorting	TCR V delta1	PC7	Beckman Coulter	R9.12
	CD73	BV421	BD	AD2
T cell activation	CD3	purified	Beckman Coulter	UCHT1
IHC	TCR $\gamma\delta$	purified	Santa Cruz Biotechnology	H-41

Table S1. Panels and antibodies used in the study

Age	Grade	HR	Cerb-B2 (Score)	Treatment	Histology
64	I	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
57	I	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
68	I	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
55	I	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
50	I	HR+ HER-	0	none	Lobulare Carcinoma
41	II	HR+ HER-	0	none	Lobulare Carcinoma
49	II	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
85	II	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
49	II	HR+ HER-	1+	none	Ductal Carcinoma
60	III	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
62	III	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
59	III	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
72	III	HR+ HER-	0	none	Ductal Carcinoma
60	I	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
72	II	HR+ HER+	3+	none	Lobulare Carcinoma
74	II	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
63	II	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
55	III	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
62	III	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
65	III	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
43	III	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
30	III	HR+ HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
62	I	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
59	I	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
61	II	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
87	II	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
79	II	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
61	II	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
53	II	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
49	II	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
78	II	HR- HER-	0	none	Apocrine
83	III	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
86	III	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
77	III	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
58	III	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
53	III	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
65	III	HR- HER-	0	none	Ductal Carcinoma
61	II	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
53	II	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
73	II	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
61	II	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
55	II	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
66	II	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
66	III	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
52	III	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
31	III	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
79	III	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
88	III	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
65	III	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
66	III	HR- HER+	3+	none	Ductal Carcinoma
<i>79^a</i>	<i>II</i>	<i>HR+ HER-</i>	<i>0</i>	<i>none</i>	<i>Ductal Carcinoma</i>
<i>41^a</i>	<i>II</i>	<i>HR+ HER+</i>	<i>3+</i>	<i>none</i>	<i>Ductal Carcinoma</i>

median age = 62

a : excluded patients

Table S2. Clinical data of the 52 patients with breast cancer included in the TMA. Among the 52 human breast tumors in the TMA, 2 could not be analyzed. Data concerning these 2 patients are in italics in the table.

	TCR $\gamma\delta$ \leq median	TCR $\gamma\delta$ $>$ median
TILs \leq median	28	15
TILs $>$ median	14	25

Table S3. Significant association between TILs and TCR $\gamma\delta$ in the TMA. $p=0.008$ (Pearson Chi2 test)

Age	SBR biopsy	SBR tumor	RE (%)	RP (%)	Cerb-B2 (score)	Ki 67 biopsy (%)	Treatment	Histology
75	III	III	100	20	0	60	none	Invasive Ductal Carcinoma
78	II	II	100	60	0	30	none	Mucinous and Invasive Carcinoma
68	II	II	70	40	1+	10	none	Mucinous and Invasive Carcinoma
68	III	III	90	0	3+	40	none	Invasive Ductal Carcinoma
50	II	III	100	90	0	30	none	Invasif Ductal Carcinoma + Pleomorphic Invasif Lobular Carcinoma
76	III	III	100	70	2+	30	none	Invasive Ductal Carcinoma
68	II	III	100	100	2+	40	none	Invasive Ductal Carcinoma
39	II	I	90	90	0	26	none	Invasive Ductal Carcinoma
46	II	III	100	60	0	15	none	Mucinous and Invasive Carcinoma
81	II	III	80	40	0	20	none	Invasive Ductal Carcinoma
71	II	II	100	50	0	15	none	Invasive Ductal Carcinoma
58	I	I	100	0	0	11	none	Invasive Ductal Carcinoma
68	II	II	100	60	0	15	none	Invasive Ductal Carcinoma
66	I	II	100	100	0	18	none	Invasive Ductal Carcinoma
45	II	II	100	100	0	3	none	Invasive Ductal Carcinoma
65	II	II	90	0	0	15	none	Invasive Lobular Carcinoma

Median age = 68

Table S4. Clinical patient's information. 16 freshly resected human breast tumor samples were analyzed by flow cytometry.

1.3 Résultats complémentaires : Analyse du phénotype et des fonctions biologiques des LT $\gamma\delta$ CD73+ et CD73- infiltrant les tumeurs

Matériel et méthode

Après dissociation des tumeurs telle que décrite dans le papier, la suspension cellulaire est incubée pendant 3 heures avec du GolgiStop afin de bloquer le trafic intracellulaire et d'induire l'accumulation des cytokines que l'on souhaite quantifier, à savoir IL-8 et IL-10. Les cellules sont ensuite lavées dans du tampon FACS (PBS 1X-2% SVF), puis incubées pendant 30min à 4°C avec une solution de FcBlock. Après lavage, les cellules sont incubées avec les anticorps ciblant les protéines membranaires (anti-CD45, -CD3, $\gamma\delta$ TCR, -CD73) pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière. Ensuite, les cellules sont lavées avant d'être perméabilisées et fixées suivant les instructions données par le fournisseur (BD FixPerm Kit). Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps ciblant l'IL-8 et l'IL-10 pendant 40min à 4°C. Enfin, la suspension cellulaire est lavée deux fois avant d'être fixée dans une solution de 1% de paraformaldéhyde en attendant l'acquisition et l'analyse des données par cytométrie en flux (Cytotflex de Beckman Coulter et Flow Jo software).

L'analyse de l'expression de divers points de contrôles immunitaires par les LT $\gamma\delta$ a été faite par cytométrie en flux selon le protocole décrit dans le papier. Les résultats présentés ici ont été analysés en utilisant le logiciel d'analyse Flow Jo ainsi que les plug-ins proposés par ce logiciel (réduction de dimension, clustering,...)

Résultats

Étude de la production de cytokines par les LT $\gamma\delta$ CD73+ et CD73- infiltrant les tumeurs

Nous avons étudié, *ex vivo* par cytométrie en flux, l'expression d'IL-10 et d'IL-8 dans les LT $\gamma\delta$ infiltrés dans les tumeurs mammaires humaines (n=8 pour les analyses de l'IL-8 et n=7 pour les analyses de l'IL-10). Nous avons évalué l'expression de l'IL-10 et de l'IL-8 dans les sous population de LT $\gamma\delta$ CD73- et CD73+, sans différencier les LT $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2 et les LT V δ 1. La proportion de cellules produisant / exprimant de l'IL-8 et de l'IL-10 est significativement plus élevée dans les LT $\gamma\delta$ CD73+ comparée aux LT $\gamma\delta$ CD73- (20% vs 60% pour l'IL-8 et 37% vs 50%

pour l'IL-10 ; figure 1). Ces résultats montrent que des LT $\gamma\delta$ CD73+ sont fonctionnels dans les tumeurs de sein et présentent bien un phénotype régulateur.

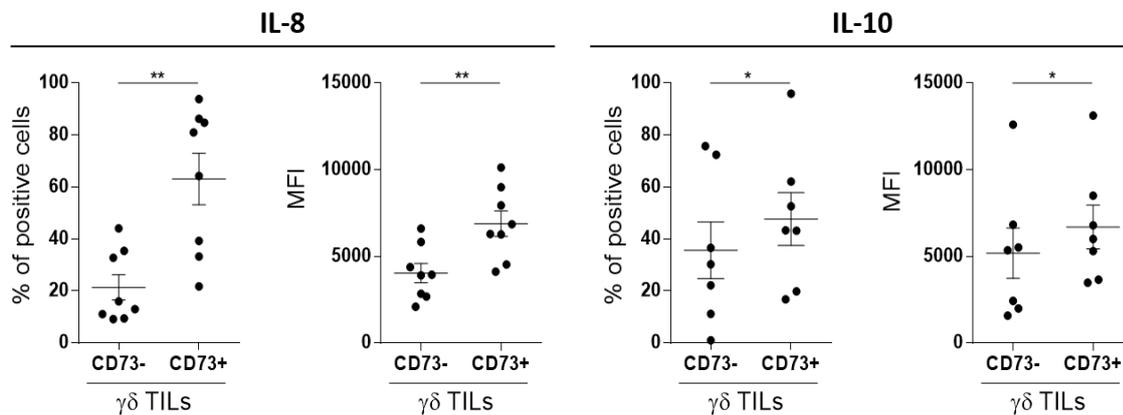


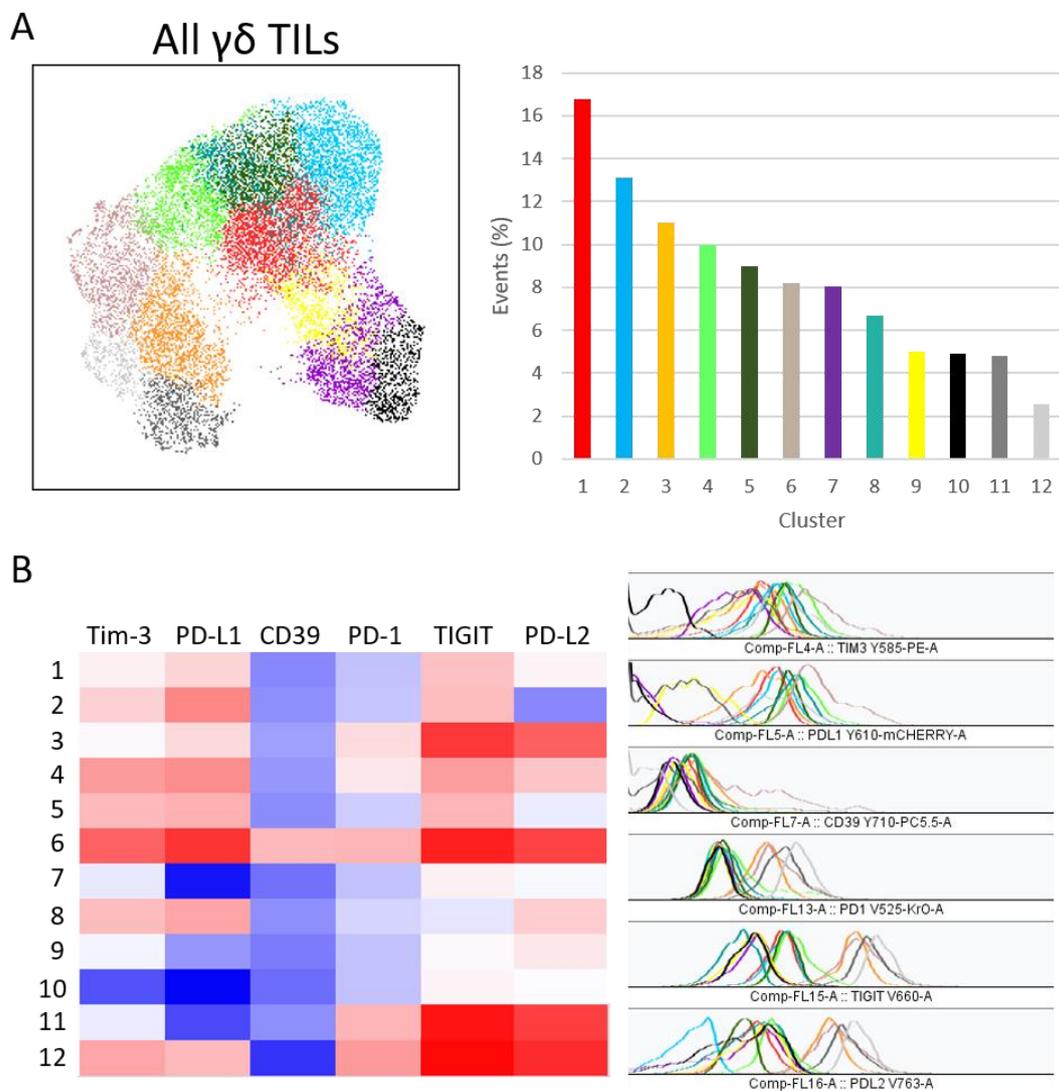
Figure 1 : Expression d'IL-10 et d'IL-8 par les TIL $\gamma\delta$ dans le cancer du sein.

Présentation des données cumulatives de patientes atteintes de cancer du sein montrant la proportion de cellules exprimant l'IL-8 (n=8) et IL-10 (n=7) ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour ces deux paramètres par les TIL $\gamma\delta$ CD73- et CD73+. *p<0.05; **p<0.005 (t test païré, Wilcoxon).

Étude du phénotype des LT $\gamma\delta$ CD73+ et CD73- infiltrant les tumeurs

Afin d'avoir une vue globale des différentes sous-populations de LT $\gamma\delta$ infiltrants les tumeurs, nous avons identifié par cytométrie en flux l'ensemble des LT $\gamma\delta$ présents dans 4 tumeurs fraîches de seins. L'étude de la co-expression de multiples marqueurs par une population d'intérêt est délicate, surtout quand le nombre de cellules à étudier est réduit, ce qui est le cas des LT $\gamma\delta$ et des sous-populations CD73+ et CD73-. Une solution pour visualiser ces données qualifiées de hautement dimensionnelles en 2D est la réduction de la dimension. Plusieurs algorithmes ou fonctions de réduction sont disponibles (PCA, tSNE et UMAP). Dans notre cas, nous avons utilisé la visualisation en UMAP. Nous avons poolé l'ensemble des LT $\gamma\delta$ et réalisé un clustering basé sur l'expression des points de contrôle immunitaire tels que CD39, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIGIT, Tim-3. Le clustering ainsi que la représentation en UMAP sont présentés en figure 2A. 12 clusters sont identifiés par l'algorithme (figure 2A). La heatmap ainsi que les graphiques multiparamétriques présentés en figure 2B représente les niveaux d'expression des divers marqueurs observés par chacun des clusters. Enfin, la déconvolution

de ce clustering aux LT $\gamma\delta$ CD73+ et LT $\gamma\delta$ CD73- permet de voir s'il y a des différences d'expression de ces marqueurs entre les LT $\gamma\delta$ effecteurs et LT $\gamma\delta$ régulateurs (figure 2C). On observe des clusters spécifiques aux LT $\gamma\delta$ CD73+ caractérisés par l'expression de PD-1, PD-L2, TIGIT (cluster 3, 6, 11 et 12). Les autres clusters sont partagés entre les LT $\gamma\delta$ CD73- et CD73+, bien que les clusters 1, 2, 4 et 5 semblent plus représentés par les LT $\gamma\delta$ CD73-. Ceux-ci expriment Tim-3 et PD-L1. Enfin, les clusters 7, 9 et 10 ne semblent pas ou peu exprimer les marqueurs étudiés. *In fine*, il semblerait que les LT $\gamma\delta$ CD73+ expriment plus de points de contrôles immunitaires exprimés que les LT $\gamma\delta$ CD73-, suggérant qu'ils pourraient médier l'immunosuppression via les divers points de contrôles immunitaires exprimés (PD-L1, PD-L2, TIGIT).



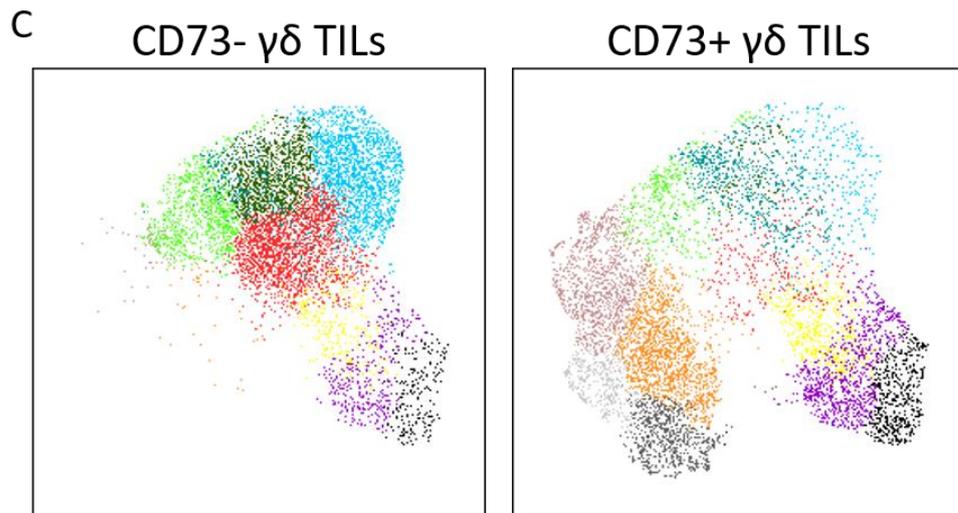


Figure 2 : Phénotype des TIL $\gamma\delta$ dans le cancer du sein. (A) Visualisation des clusters et répartition des divers clusters au sein des LT $\gamma\delta$. (B) Heatmap représentant l'expression des marqueurs Tim-3, PD-L1, CD39, PD-1, TIGIT, et PD-L2. (C) Déconvolution et visualisation des clusters en fonctions de l'expression de CD73 par les LT $\gamma\delta$.

1.4 Conclusion

En continuité avec les résultats précédemment obtenus par l'équipe sur les LT V γ 9V δ 2, les résultats générés pendant ma thèse montrent que l'IL-21 favorise également l'émergence de populations de LT régulatrices V δ 1. Ces LT $\gamma\delta$ régulateurs, qu'ils soient V γ 9V δ 2 ou V δ 1, sont caractérisés par l'expression de CD73 et exercent des fonctions régulatrices via la production de molécules immunosuppressives, telles que l'adénosine, l'IL-10 et l'IL-8. L'un des principaux défis associés à la caractérisation des sous-populations de LT $\gamma\delta$ CD73+ réside dans l'évaluation de leur existence *in vivo* ainsi que de leur pertinence dans les pathologies humaines, telles que le cancer. Ici, nous avons démontré qu'une forte infiltration de LT $\gamma\delta$ est présente principalement chez les patients présentant un cancer du sein de haut grade. Cette observation est en accord avec des études précédentes montrant que la présence de LT $\gamma\delta$ est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein. Nous avons observé qu'une proportion de ces LT $\gamma\delta$ infiltrant la tumeur exprime CD73 et qu'ils produisent IL-10 et IL-8, ce qui soutient l'hypothèse du rôle LT $\gamma\delta$ régulateurs/immunosuppresseurs dans les tumeurs du sein et que ces cellules pourraient favoriser le développement tumoral via les mécanismes décrits ci-dessus. De plus, l'analyse du phénotype des LT $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs montre que les LT $\gamma\delta$ peuvent exprimer des points de contrôles immunitaires. Les LT $\gamma\delta$ CD73+ expriment d'ailleurs PD-L2, PD-L1, PD-1 et TIGIT suggérant qu'ils peuvent également médier l'immunosuppression via ces divers points de contrôles immunitaires.

Chapitre 2 : Étude de l'infiltrat $\gamma\delta$ dans divers cancers solides humains

2.1 Résumé des travaux

La présence de LT $\gamma\delta$ dans le MET de divers cancers solides, en plus de cancer du sein, a été décrite par de nombreuses équipes. Cependant, l'évaluation de leur abondance dans le microenvironnement tumoral n'est pas évaluée en routine chez les patients atteints de cancer. Ceci est principalement dû au fait qu'il n'y a pas d'outils robustes et reproductibles permettant leur détection et leur quantification par IHC.

Ici, nous avons validé un anticorps anti-TCR δ (H-41) qui permet la détection de toutes les sous-populations de LT $\gamma\delta$ par IHC dans les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Une fois l'anticorps validé, nous avons analysé et comparé la densité de LT $\gamma\delta$ dans les tissus sains et dans le microenvironnement tumoral de différents types de cancer. Pour cela, nous avons utilisés des TMA de cancers du sein, du côlon, de l'ovaire et du pancréas, regroupant à la fois des échantillons tumoraux et des échantillons de tissus normaux quand ceux-ci étaient disponibles. Les résultats obtenus sont regroupés dans la publication présentée ci-après.

2.2 Publication



Article

Diversity of Tumor-Infiltrating, $\gamma\delta$ T-Cell Abundance in Solid Cancers

Ghita Chabab ^{1,†}, Florence Boissière-Michot ^{2,†}, Caroline Mollevi ³, Jeanne Ramos ²,
Evelyne Lopez-Crapez ^{1,2}, Pierre-Emmanuel Colombo ^{1,3} , William Jacot ^{1,3} ,
Nathalie Bonnefoy ^{1,‡} and Virginie Lafont ^{1,*}

¹ IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut régional du Cancer de Montpellier, 34298 Montpellier, France; ghita.chabab@inserm.fr (G.C.); Evelyne.Crapez@icm.unicancer.fr (E.L.-C.); Pierre-Emmanuel.Colombo@icm.unicancer.fr (P.-E.C.); william.jacot@icm.unicancer.fr (W.J.); nathalie.bonnefoy@inserm.fr (N.B.)

² Translational Research Department, Institut régional du Cancer de Montpellier, 34298 Montpellier, France; Florence.Boissiere@icm.unicancer.fr (F.B.-M.); Jeanne.Ramos@icm.unicancer.fr (J.R.)

³ Institut régional du Cancer de Montpellier, 34298 Montpellier, France; Caroline.Mollevi@icm.unicancer.fr

* Correspondence: virginie.lafont@inserm.fr; Tel.: +33-467-61-2428

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

Received: 6 May 2020; Accepted: 22 June 2020; Published: 24 June 2020



Abstract: $\gamma\delta$ T-cells contribute to the immune response against many tumor types through their direct cytolytic functions and their capacity to recruit and regulate the biological functions of other immune cells. As potent effectors of the anti-tumor immune response, they are considered an attractive therapeutic target for immunotherapies, but their presence and abundance in the tumor microenvironment are not routinely assessed in patients with cancer. Here, we validated an antibody for immunohistochemistry analysis that specifically detects all $\gamma\delta$ T-cell subpopulations in healthy tissues and in the microenvironment of different cancer types. Tissue microarray analysis of breast, colon, ovarian, and pancreatic tumors showed that $\gamma\delta$ T-cell density varies among cancer types. Moreover, the abundance of $\gamma\delta$ tumor-infiltrating lymphocytes was variably associated with the outcome depending on the cancer type, suggesting that $\gamma\delta$ T-cell recruitment is influenced by the context. These findings also suggest that $\gamma\delta$ T-cell detection and analysis might represent a new and interesting diagnostic or prognostic marker.

Keywords: $\gamma\delta$ T-cell; cancer; tumor microenvironment; immune infiltrate; immunohistochemistry; TNM staging

1. Introduction

The malignant features of cancer cells are tightly regulated by their local environment and by the network they form with host cells, such as immune cells, angiogenic vascular cells, endothelial cells, and cancer-associated fibroblasts (cancer ecosystem). The ability of tumor cells to overcome immune surveillance is an essential step in tumor progression. In this context, the nature and frequency of tumor infiltrating immune cells, particularly cytotoxic CD8 T-cells, are considered to be prognostically significant in many cancer types. Indeed, stronger CD8 T-cell infiltration in the tumor is generally associated with better prognosis. This has been demonstrated in various cancers, such as melanoma [1], ovarian [2], colorectal [3], bladder [4], breast [5], and pancreatic cancer [6]. Besides CD8 T-cells, other immune cell types are involved in tumor control or progression as regulatory T-cells (Treg), macrophages, and $\gamma\delta$ T-cells.

$\gamma\delta$ T-cells are non-conventional T lymphocytes, with a T-cell receptor (TCR) composed of a γ and a δ chain. Depending on the TCR structure, human $\gamma\delta$ T-cells can be divided in three main subpopulations: V δ 1, V δ 2, and V δ 3 T-cells [7,8]. V δ 2 T-cells are the main subtype (90%) of $\gamma\delta$ T-cells in peripheral blood. The V δ 1 and V δ 3 subsets are mostly found in tissues and mucosa, respectively. $\gamma\delta$ T-cells are involved in the immune response against many cancers (e.g., myeloma, melanoma, breast, colon, lung, ovary, and prostate), and can be found in the tumor microenvironment (TME) [9–13]. Their anti-tumor effect relies on their direct cytolytic activity against transformed cells and their ability to stimulate and regulate the biological functions of other cell types, such as dendritic cells (DC), interferon- γ -producing CD8 $\alpha\beta$ T-cells, and natural killer (NK) cells, that are required for the initiation and the establishment of an efficient anti-tumor immune response [14–17]. Unlike conventional $\alpha\beta$ T-cells, $\gamma\delta$ T-cells display a potent MHC-independent reactivity against a broad panel of tumors. They also show limited, if any, alloreactivity, and can be massively and specifically expanded from samples (e.g., peripheral blood). For these reasons, $\gamma\delta$ T-cells are considered highly attractive therapeutic targets for anti-tumor immunotherapies. Although human V δ 1, V δ 2, and V δ 3 T-cells show a strong reactivity against tumor cells, $\gamma\delta$ T-cell-based immunotherapies primarily target the V δ 2 subset, because they can be easily expanded and specifically activated with synthetic clinical-grade phosphoantigens (e.g., BrHPP), or with pharmacological inhibitors of the mevalonate pathway (e.g., zoledronate), which produces physiologic phosphoantigens [18,19]. Although showing interesting results, 70% to 90% of patients did not respond to the treatment, even if patients exhibited a significant V δ 2 proliferation and activation. This suggested that either immunosuppressive mechanisms present in the TME inhibit V δ 2 anti-tumor functions, or that other $\gamma\delta$ subtypes are involved in the anti-tumor response, such as V δ 1 T-cells. V δ 1 T-cells are usually predominant (compared with V δ 2) in solid tumor infiltrates, and react efficiently against tumor cells by displaying potent cytotoxic activities [10,20]. Another hypothesis is that immunosuppressive $\gamma\delta$ T-cells are also expanded. In line with these hypotheses, several reports have brought evidence that $\gamma\delta$ T-cells can be associated with pro-tumor functions in some cancers, or in contrast, limit tumor progression. Regarding these “conflicting” statements, a large study of $\gamma\delta$ T-cell infiltrate in various cancers has to be done, in order to decipher their implication in cancer development and be able to declare $\gamma\delta$ T-cells as a prognosis marker.

To date, the detection of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T-cells remains a challenge. Indeed, although several studies have previously evaluated $\gamma\delta$ T-cell density analysis in cancer, the detection of tumor infiltrating $\gamma\delta$ T-cells by immunohistochemistry (IHC) has been hampered by their unreliable recognition by antibodies, or the unavailability of antibodies leading to non-reproducible intra- and inter-laboratory results.

Here, we validated an anti-TCR δ antibody that allows $\gamma\delta$ T-cell detection by IHC in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. We analyzed the frequency of $\gamma\delta$ T-cells in tissue microarrays (TMAs) of breast, colon, ovarian, and pancreatic cancers, and of representative normal tissue samples. We found that $\gamma\delta$ T-cell density varied among cancer types. Moreover, $\gamma\delta$ tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) frequency was variably associated with tumor stage (tumor, node, and metastasis; TNM), suggesting that distinct contexts underlie $\gamma\delta$ TIL recruitment, or that pro-tumor $\gamma\delta$ TIL subsets are specifically recruited or differentiate in the tumor microenvironment.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Tissue samples were selected from the Montpellier Cancer Institute (ICM) biological resources center. Clinical data (e.g., age, treatment, TNM, grade) were obtained by reviewing the medical files. Samples were collected following French laws under the supervision of an investigator, and their collection was declared to the French Ministry of Higher Education and Research (declaration number DC-2008–695). The study was approved by the Montpellier Cancer Institute Institutional Review Board

(ICM-CORT-2015-32, ICM-CORT-2019-06, and ICM 2019-12). A total of 418 samples were included in this retrospective study.

2.2. Breast Cancer Tissue Microarray

A tissue microarray (TMA) with breast tumor samples from 50 chemotherapy-naïve patients was constructed using two malignant tissue cores (1 mm diameter) per tumor. Healthy breast tissues were from another breast TMA, because no healthy tissue sample was collected for this group of patients. The main clinicopathological characteristics of this cohort are presented in Table S1.

2.3. Colorectal Cancer Tissue Microarray

Two TMAs were used for colorectal cancer investigation. The first TMA included 59 colorectal tumors (24 primary tumors and 35 metastatic tumors), and was constructed using two malignant tissue cores (1 mm diameter) per tumor. The second TMA included 53 samples from 46 patients, and was constructed using two malignant tissue cores (1 mm diameter) per tumor, and matched normal mucosa (distal or proximal) when available. The main clinicopathological characteristics of this cohort are presented in Table S2.

2.4. Pancreatic Cancer Tumor Microarray

A TMA of pancreatic cancer specimens from 50 patients was constructed using two malignant tissue cores (1 mm diameter) per tumor, and matched normal tissue and epineoplastic pancreatitis when available. The main clinicopathological characteristics of this cohort are presented in Table S3.

2.5. Ovarian Cancer Tumor Microarray

A TMA of ovarian cancer specimens from 72 patients was constructed using two malignant tissue cores (1 mm diameter) per tumor, associated with one matched normal tissue core when available. The main clinicopathological characteristics of this cohort are presented in Table S4.

2.6. Immunohistochemistry

For each TMA, 3 μm thin sections were mounted on Flex microscope slides (Agilent, Glostrup, Denmark) and dried overnight at room temperature before IHC. The PTLINK system (Agilent, Glostrup, Denmark) was used for de-paraffinization and heat-induced antigen retrieval in High pH Buffer (Agilent, Glostrup, Denmark) at 95 °C for 15 min. IHC was performed using the Dako Autostainer Link48 platform (Agilent, Glostrup, Denmark). Briefly, endogenous peroxidase was quenched by incubation with Flex Peroxidase Block (Agilent, Glostrup, Denmark) at room temperature for 5 min. Then, slides were incubated with the anti-TCR δ mouse monoclonal antibody (Clone H-41, Santa Cruz) (1/150 dilution) at room temperature for 30 min. Signal amplification was performed using a mouse linker (Agilent, Glostrup, Denmark) for 15 min, followed by two rinses in EnVision FLEX Wash buffer (Agilent, Glostrup, Denmark), and then incubation with a horseradish peroxidase-labeled polymer coupled to secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies for 20 min. During this process, 3,30-Diaminobenzidine was used as substrate. Sections were counterstained with Flex Hematoxylin (Agilent, Glostrup, Denmark), followed by rinsing in tap water for 5 min. Finally, sections were dehydrated and mounted with a coverslip.

The NanoZoomer slide scanner system (Hamamatsu Photonics) and a $\times 20$ objective were used to digitalize the TMAs after staining. Immunoreactive cells were manually identified and counted on the digitalized slides with NDP.view software. When both cores from the same tumor were assessable, the mean value was calculated and used for statistical analysis, and the data expressed as the number of TCR $\gamma\delta$ -positive cells per mm^2 . The mean and SEM were then calculated by using the mean value of the two assessable cores when possible, and the raw density (value of the single spot) for tumor samples with only one assessable core. For healthy tissue samples, only one core was available per patient.

2.7. In Situ Hybridization

RNA in situ hybridization of TMA sections was performed using specific human TCRD probes and the RNAscope 2.5 HD detection kit, according to the manufacturer's instructions (ACD, Newark, CA, USA). In brief, 5 µm thin sections were deparaffinized and placed in xylene, followed by absolute ethanol. Slides were then pretreated with a pretreatment reagent kit (ACD, Newark, CA, USA) for 15 min at 100 °C, according to the manufacturer's instructions. Following a protease step to permeabilize tissue (15 min at 40 °C), slides were then hybridized with the specific probes (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, USA) at 40 °C for 2 h in a HybEZ hybridization oven, and amplified sequentially following the 2.0 HD detection kit–brown (ACD, Newark, CA, USA) per the manufacturer's instructions. Besides the specific TCRD probe, probes that target the human housekeeping *PP1B* gene and the bacterial *DapB* gene were used as positive and negative controls, respectively.

2.8. TIL Infiltration Assessment

Hematoxylin and eosin-stained (HES) slides were scored for stromal TILs by a senior pathologist. Inflammatory infiltrate was evaluated only in TMA samples with invasive tumors. Inflammatory infiltrates in the stroma of noninvasive lesions and normal structures were excluded. For breast cancer, guidelines for TIL infiltration scoring advocated for clinical management were followed [21]. For colorectal, pancreatic, and ovarian samples, the pathologist first assessed the amount of stroma present on each sample (%S). Then, the percentage of tumor stroma area that was occupied by mononuclear inflammatory cells was evaluated (%M). The TIL infiltration score was defined as:

$$\frac{\%S \times \%M}{100} \quad (1)$$

2.9. Statistical Analysis

Data are presented as scatter plots showing the mean values with the standard error of the mean (SEM). Results were compared using either a Mann–Whitney *t*-test (when two datasets were compared) or one-way ANOVA, Kruskal–Wallis, and Dunn's multiple comparison tests (when three or more datasets were compared), depending on the experiment. Association analyses were performed using Pearson's chi-squared test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism, version 6 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. $\gamma\delta$ T-Cell Staining by Immunohistochemistry

To evaluate the ability of the anti-TCR δ monoclonal antibody H-41 to detect $\gamma\delta$ T-cell populations, we used cell suspensions composed of $\gamma\delta$ T-cell-depleted PBMCs with 0%, 50%, and 100% of purified $\gamma\delta$ T-cells. Cell pellets were embedded in an aqueous gel solution to test the H-41 antibody. The H-41 antibody detected $\gamma\delta$ T-cells, and enabled their precise quantification (0%, 50% or 100%) (Figure S1). The staining of a tertiary lymphoid structure from a patient with breast cancer confirmed that the H-41 antibody can detect $\gamma\delta$ T-cells in structures where $\gamma\delta$ T-cells are supposed to be found (Figure 1A). To confirm the antibody specificity, we compared $\gamma\delta$ T-cell detection by IHC and in situ hybridization in two adjacent colon cancer tissue sections. The pattern of $\gamma\delta$ T-cells detected by the two techniques was comparable (Figure 1B–C).

These data demonstrate that the H-41 anti-TCR δ antibody is a robust tool for the detection and quantification of $\gamma\delta$ T-cells in FFPE samples by IHC.

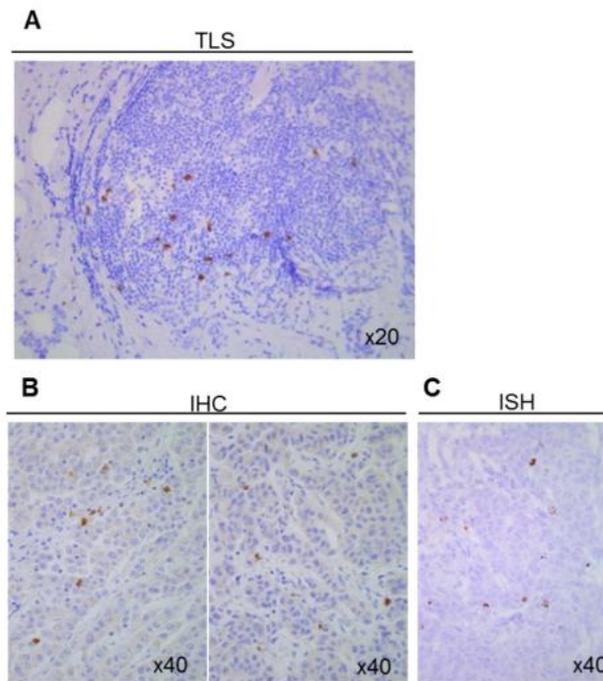


Figure 1. Detection of $\gamma\delta$ T-cells using the H-41 antibody. (A) Detection of $\gamma\delta$ T-cells by immunohistochemistry in a tertiary lymphoid structure (TLS) located close to a breast tumor. Detection of $\gamma\delta$ T-cells in colon cancer sections by (B) immunohistochemistry (IHC) and (C) in situ hybridization (ISH).

3.2. Presence of $\gamma\delta$ T Cells in Healthy Tissues

We first investigated the presence of $\gamma\delta$ T-cells in sections from healthy colon ($n = 62$), ovary ($n = 49$), breast ($n = 141$), and pancreas ($n = 31$) samples. We observed a great heterogeneity. Indeed, $\gamma\delta$ T-cells were abundant in normal colon (1 to 213 cells/mm²) and in some breast tissue samples (0 to 55 cells/mm²). Conversely, we detected only few $\gamma\delta$ T-cells in normal pancreatic (0 to 17 cells/mm²) and ovarian (0 to 29 cells/mm²) tissue samples (Figure 2). This suggests that the presence of $\gamma\delta$ T-cell infiltrates in normal tissues is variable among organs, ranging from medium to high in colon, medium to low in breast tissues, and very low or absent in ovarian and pancreatic tissue sections. We then investigated $\gamma\delta$ T-cell infiltration in the corresponding tumor tissues.

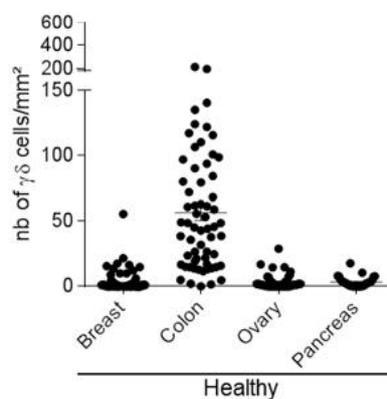


Figure 2. Heterogeneity of $\gamma\delta$ T-cell density in normal tissues. Scatter plot showing $\gamma\delta$ T-cell density assessed by IHC in tissue microarrays (TMAs) with normal breast ($n = 141$), colon ($n = 62$), ovary ($n = 49$), and pancreas ($n = 31$) samples. Data are presented as the mean \pm SEM.

3.3. $\gamma\delta$ T-Cells in Breast Cancer

We first compared $\gamma\delta$ T distribution in 50 breast cancer samples from patients who did not receive any neo-adjuvant treatment, as well as in 141 normal breast samples, and found that $\gamma\delta$ T-cell density was significantly higher in tumors than in healthy breast tissue ($p < 0.001$; Figure 3A,B). However, $\gamma\delta$ T-cell density was heterogeneous in breast cancer samples (from 1 to 500 cells/mm²) (Figure 3B). We previously showed [22] that $\gamma\delta$ T-cell density tended to increase in Scarff–Bloom–Richardson (SBR) grade II–III, compared with SBR grade I breast tumors ($p = 0.0651$, SBRI versus SBRII and III with the Mann–Whitney test). Here, we found that $\gamma\delta$ T-cell density tended to be higher in triple-negative breast cancer (TNBC) than in the other breast cancer types (Figure 3C). These observations suggest that the presence of $\gamma\delta$ T-cells might be associated with advanced tumors (higher density in SBR III samples), and might be higher in TNBC.

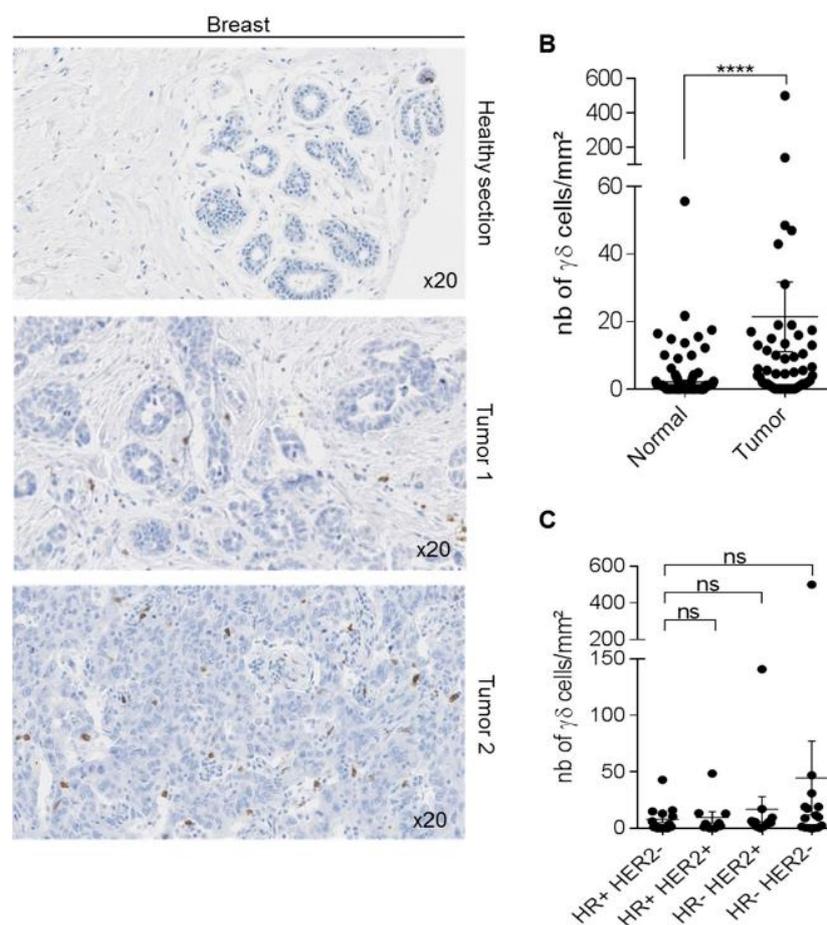


Figure 3. Detection of $\gamma\delta$ T-cells in human breast samples. Immunohistochemical detection of $\gamma\delta$ T-cells in 50 human breast cancer specimens. (A) One representative healthy breast area and two representative breast tumor sections with medium and high $\gamma\delta$ T-cell density. (B) Scatter plot comparing $\gamma\delta$ T-cell density in 141 normal breast samples and 50 breast tumors. (C) Scatter plot showing $\gamma\delta$ T-cell density in 50 breast cancer samples, according to their hormone receptor (HR) and epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status. Data are the mean \pm SEM. **** $p < 0.0001$ (Mann–Whitney test for panel B); ns: non-significant (Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test for panel C).

3.4. $\gamma\delta$ T-Cells in Colorectal Cancer

We then analyzed two TMAs that included, in total, 112 colorectal cancer samples (6 adenomas, 58 adenocarcinomas at all stages, and 48 metastatic tumors) and 62 normal mucosa samples collected near (proximal mucosa) or at a distance (distal mucosa) from the tumor site. In normal mucosa,

we detected $\gamma\delta$ T-cells in the stroma and the epithelium (Figure 4A). As observed in breast cancer, $\gamma\delta$ T-cell density was heterogeneous among tumors (from 0 to 52 cells/mm²) (Figure 4A,B). Conversely, $\gamma\delta$ T-cell density was significantly lower in primary tumors ($p < 0.0001$) and metastases ($p < 0.0001$) than in normal mucosa (proximal and distal), without any difference between primary and metastatic tumors (Figure 4B). Interestingly, the location of the tumor at the right or left colon have no impact on the $\gamma\delta$ T-cell infiltration at the tumor site (Figure S2A). Comparison of $\gamma\delta$ T-cell density according to the tumor *BRAF* and *RAS* mutational status showed a decrease, although not significant, of $\gamma\delta$ T-cell density in tumors harboring *BRAF* mutations compared with wild type (*WT*) tumors, whereas it was comparable between *WT* and *RAS* mutated samples (Figure S2B). Furthermore, no difference in $\gamma\delta$ T-cell density was observed between patients harboring microsatellite instability and patients with stable microsatellites (Figure S2C). To determine whether $\gamma\delta$ T-cell density was different among tumor stages, we excluded all samples from patients who received neo-adjuvant treatment. We did not detect any difference in $\gamma\delta$ T-cell density in the adenoma or stage I, II, and III samples. Conversely, $\gamma\delta$ T-cell density was significantly lower in the stage IV tumors ($p < 0.05$) and metastatic tumors ($p < 0.05$) compared with the adenoma samples (Figure 4C). These data suggest that $\gamma\delta$ T-cell infiltration at the tumor site is higher in early-stage colorectal cancers, and lower in late-stage and metastatic tumors.

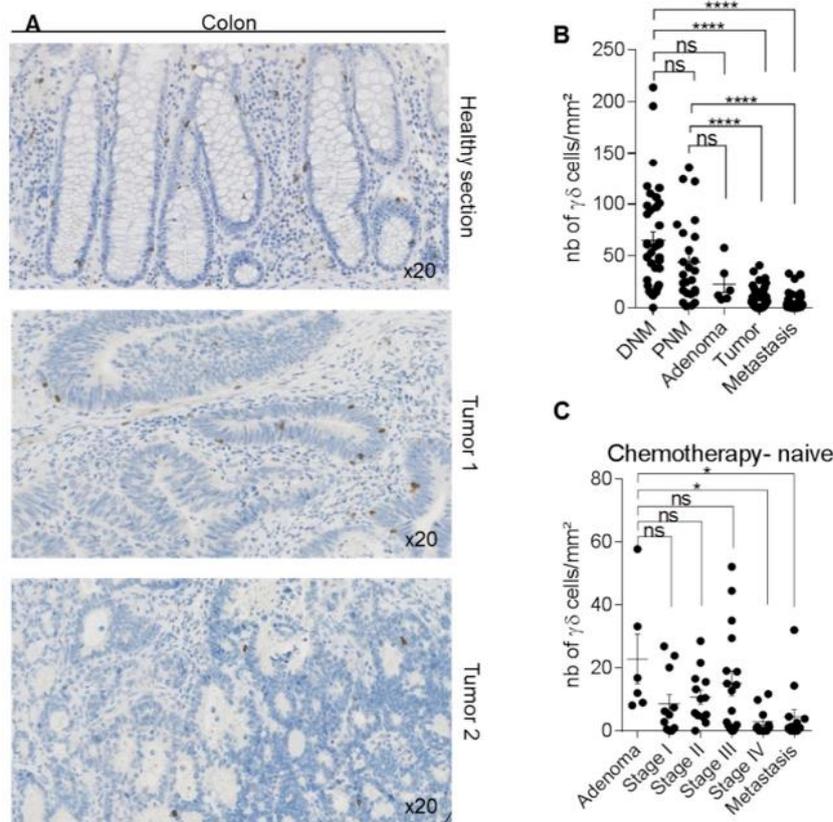


Figure 4. Detection of $\gamma\delta$ T-cells in human colon samples. Immunohistochemical detection of $\gamma\delta$ T-cells in 112 human colon cancer specimens and normal associated-mucosa ($n = 62$). (A) The figure shows one representative normal mucosa section and two representative tumors with medium and low $\gamma\delta$ T-cell density. (B) Scatter plot comparing $\gamma\delta$ T-cells density in 37 distal normal mucosa (DNM), 25 proximal normal mucosa (PNM), 6 adenoma, 58 primary tumor samples, and 48 metastasis/recurrent tumor samples from the two TMAs, described in Materials and Methods. (C) Scatter plot showing $\gamma\delta$ T-cell density according to the tumor stage in 72 colon cancer samples obtained from chemotherapy-naïve patients. Data are the mean \pm SEM. Ns: non-significant; * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ (Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test).

3.5. $\gamma\delta$ T-Cells in Pancreatic Cancer

Analysis of $\gamma\delta$ T-cell density in a TMA that included 50 pancreatic adenocarcinomas, 31 adjacent normal pancreatic tissue areas, and 10 epineoplastic pancreatitis samples (i.e., inflamed area close to the neoplastic lesion) showed that the density of $\gamma\delta$ T-cells in tumor samples remained low, and was similar to that of normal tissues (3.162 ± 0.6691 cells/mm² vs 3.313 ± 0.7116 cells/mm²) (Figure 5). Conversely, $\gamma\delta$ T-cell density was significantly increased in the inflamed tissue (10.41 ± 1.899 cells/mm² in epineoplastic pancreatitis sections).

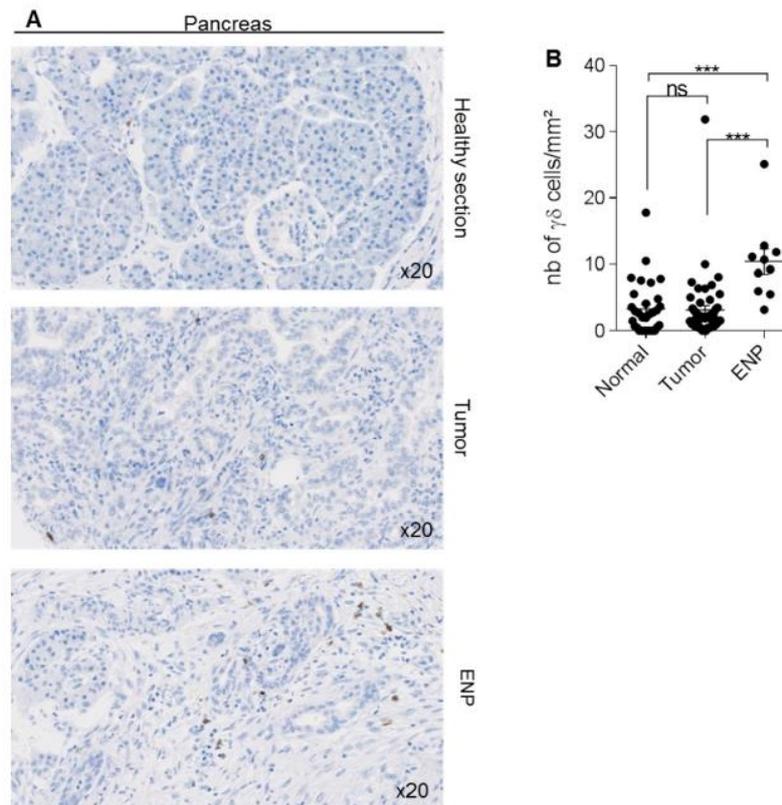


Figure 5. Detection of $\gamma\delta$ T-cells in human pancreatic tissue samples. Immunohistochemical detection of $\gamma\delta$ T-cells in 50 pancreatic adenocarcinomas, 31 adjacent normal pancreatic sections, and 10 epineoplastic pancreatitis (ENP) samples. (A) The figure shows one representative normal pancreas section, one representative tumor section, and one representative ENP section. (B) Scatter plot comparing $\gamma\delta$ T-cell density in normal, pancreatic cancer, and ENP samples. Data are the mean \pm SEM. Ns: non-significant; *** $p = 0.0001$ (Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test).

3.6. $\gamma\delta$ T-Cells in Ovarian Cancer

Finally, analysis of $\gamma\delta$ T-cell density in a TMA composed of 72 ovarian cancers with normal samples for 49 patients showed that $\gamma\delta$ T-cell density was variable among tumors (Figure 6A; from 0 to 64 cells per mm²). Nevertheless, $\gamma\delta$ T-cell density was significantly higher in tumors than paired healthy tissues (Figure 6B). As in this TMA, more than 25% of tumors were from patients who received neo-adjuvant treatment (Table S4), we wondered if the treatment influenced $\gamma\delta$ T-cell density in tumors. The exclusion of all treated patients abrogated the significant difference between normal and tumor tissues, strengthening the hypothesis of an effect of treatment on the $\gamma\delta$ T-cell density in ovarian (Figure S3A). In contrast, neo-adjuvant treatments did not influence $\gamma\delta$ T-cell infiltration in colon and pancreatic cancer samples (Figure S3B,C). We then compared $\gamma\delta$ T-cell density in ovarian tumors classified according to their FIGO stage. We did not find any difference, although $\gamma\delta$ T-cell infiltration density tended to be higher in FIGO IV tumors (i.e., advanced cancers) (Figure 6C).

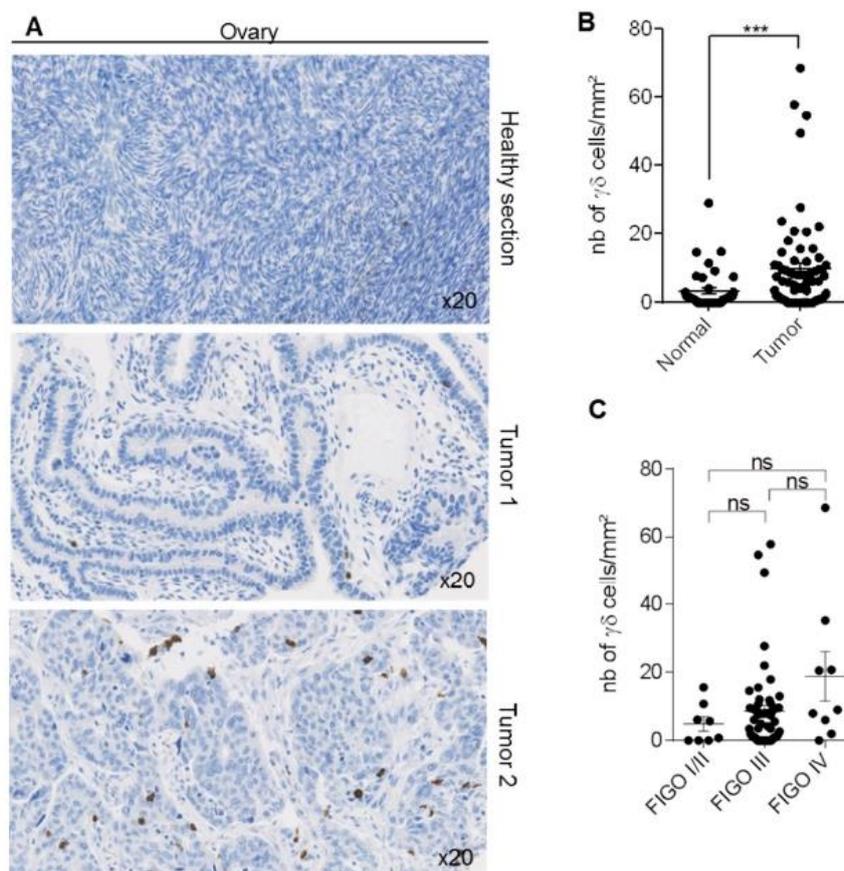


Figure 6. Detection of $\gamma\delta$ T-cells in human ovarian samples. Immunohistochemical detection of $\gamma\delta$ T-cells in 72 ovarian tumors and 49 paired normal ovarian samples. (A) The figure shows one representative normal ovarian tissue and two representative tumors with low and high $\gamma\delta$ T-cell density. (B) Scatter plot comparing $\gamma\delta$ T-cell density in normal and cancer tissue samples. (C) Scatter plot showing $\gamma\delta$ T-cell expression in the 71 ovarian cancer samples, classified according to the FIGO stage. Data are the mean \pm SEM. Ns: non-significant; *** $p < 0.001$ (Mann–Whitney test for panel B, Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test for panel C).

3.7. TNM Classification of Cancers and $\gamma\delta$ T-Cell Infiltrates

In patients with cancer, prognosis is usually determined following the histopathological analysis of tumor samples resected by surgery. Tumor staging (AJCC/UICC-TNM) is based on tumor size (T), presence of cancer cells in regional and draining lymph nodes (N), and presence or absence of metastasis (M). The TNM classification is used for many solid cancers, and has proven its utility to estimate the patient outcome [23–25]. Therefore, after excluding all samples from patients who received neo-adjuvant treatment, we analyzed $\gamma\delta$ T-cell density in breast, colorectal, ovarian, and pancreatic cancers, classified according to their TNM status, using the eighth edition of the TNM Classification of Malignant Tumors. In breast, colon, and ovarian cancers, $\gamma\delta$ T-cell density was heterogeneous at all stages, while it remained low in all pancreatic cancers (with the exception of one sample) (Figure 7). In colorectal cancer, $\gamma\delta$ T-cell density was significantly reduced in M1 tumors compared with N1 M0 tumors. Although not significant, $\gamma\delta$ T-cell density was increased in M1 ovarian tumors compared with N0 M0 tumors, and in N1 M0 breast cancers compared with N0 M0 samples. Conversely, $\gamma\delta$ T-cell density was very low in M1 breast cancer samples. Altogether, these data indicate that depending on the cancer type, $\gamma\delta$ T-cell density was positively or negatively correlated with the TNM stage.

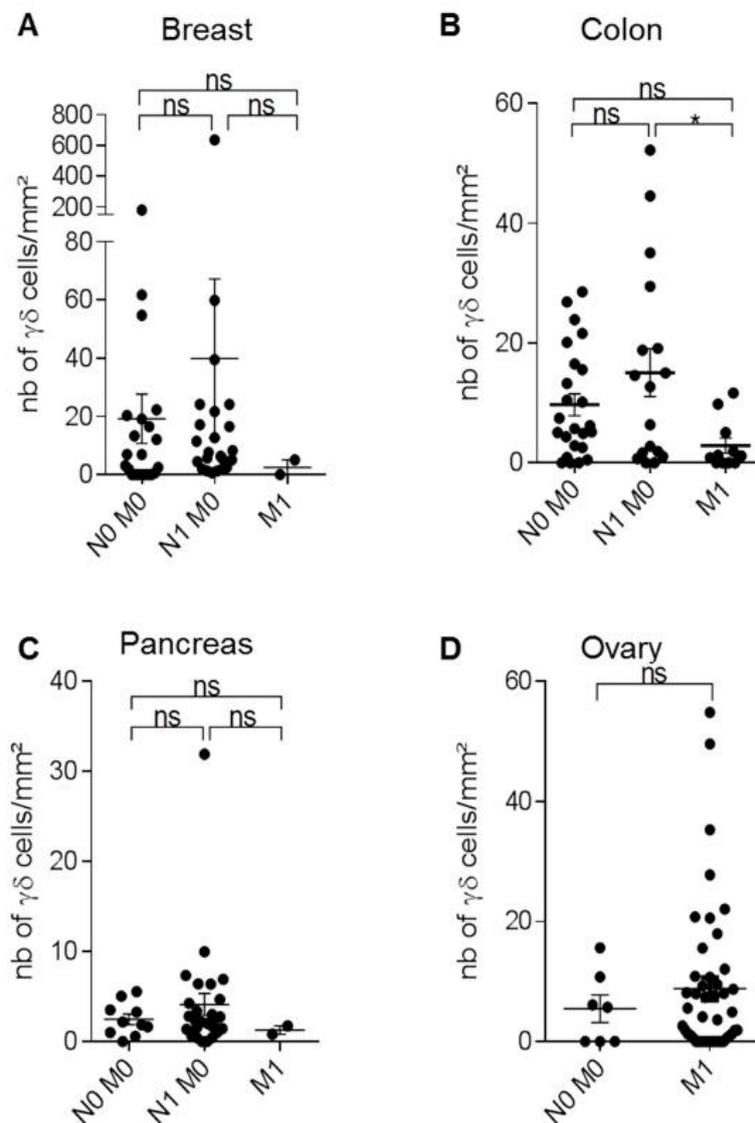


Figure 7. Analysis of $\gamma\delta$ T-cell density in function of the tumor, node, and metastasis (TNM) classification. Immunohistochemical detection of $\gamma\delta$ T-cells in breast, colon, pancreatic, and ovarian tumors in chemotherapy-naïve patients. Scatter plots comparing $\gamma\delta$ T-cell density in N0 M0, N1 M0, and M1 breast (A), colon (B), pancreatic (C), and ovarian (D) tumors. Data are the mean \pm SEM. Ns: non-significant; * $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test).

3.8. Association between $\gamma\delta$ T-Cell Infiltrates and TILs

The association between tumor-infiltrating lymphocytes and clinical outcome has been well-established in different cancers, and these findings have initiated an increasing interest for immune subpopulations as prognostic markers of tumor behavior and treatment response. In this context, we asked whether $\gamma\delta$ T-cell infiltration was correlated or associated with all lymphocyte infiltration (TILs). In the four studied cancers, we observed a significant association between $\gamma\delta$ T-cell density and TIL infiltration ($p = 0.008$ for breast cancer and $p < 0.001$ for colon, pancreatic, and ovarian cancers; Table 1A–D, respectively). However, $\gamma\delta$ T-cell infiltration was only poorly correlated with TIL infiltration in breast (Spearman’s Rho = 0.497), colon (Spearman’s Rho = 0.426), and ovarian cancer (Spearman’s Rho = 0.457), and not correlated in pancreatic cancer (Spearman’s Rho = 0.290) (Table 1E).

Table 1. Association and correlation analyses between $\gamma\delta$ T-cells and tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) densities. Association between the $\gamma\delta$ T-cell density and TIL density in (A) breast cancer ($p = 0.008$), (B) colon cancer ($p < 0.001$), (C) pancreatic cancer ($p < 0.001$) and (D) ovarian cancer ($p < 0.001$) (Pearson's chi-squared test). High and low densities were defined as values above or below the median values. (E) Correlation between the $\gamma\delta$ T-cell density and TIL density in all cancers. Spearman's Rho values are shown in the table. No correlation is observed in pancreatic cancer (Rho < 0.4), while a weak correlation is found in breast, colon and ovarian cancers (Rho < 0.6).

A				
Breast	TCR$\gamma\delta$ Low	TCR$\gamma\delta$ High		
TILs Low	28	15		
TILs High	14	25		
$p = 0.008$ (Pearson Chi2 test).				
B				
Colon	TCR$\gamma\delta$ Low	TCR$\gamma\delta$ High		
TILs Low	69	33		
TILs High	29	62		
$p < 0.001$ (Pearson Chi2 test).				
C				
Pancreas	TCR$\gamma\delta$ Low	TCR$\gamma\delta$ High		
TILs Low	35	19		
TILs High	15	33		
$p < 0.001$ (Pearson Chi2 test).				
D				
Ovary	TCR$\gamma\delta$ Low	TCR$\gamma\delta$ High		
TILs Low	44	22		
TILs High	20	42		
$p < 0.001$ (Pearson Chi2 test).				
E				
Cancer	Breast	Colon	Pancreas	Ovary
Spearman's Rho	0.497	0.426	0.29	0.452

4. Discussion

In this study, we validated the use of IHC with the H-41, anti-TCR δ monoclonal antibody to analyze $\gamma\delta$ T-cell density in normal and pathological tissues. This antibody was first tested and then recommended by Jungbluth and colleagues as a replacement of another antibody that is no longer available [26]. We first analyzed normal breast, colon, pancreatic and ovarian tissues, and observed that $\gamma\delta$ T-cell presence and density varied depending on the organ. Then, we investigated $\gamma\delta$ T-cell infiltrates in breast, colorectal, pancreatic, and ovarian tumors, and compared these findings with what was observed in the relevant normal tissues. Similarly to normal tissues, $\gamma\delta$ T-cell density was heterogeneous in the cancer types, with medium-to-high $\gamma\delta$ T-cell density in breast, colon, and ovarian tumors, and few or no $\gamma\delta$ T-cells in pancreatic tumor samples. Moreover, $\gamma\delta$ T-cell density was higher in breast and ovarian tumors compared with normal tissues. Conversely, $\gamma\delta$ T-cell density was reduced in colorectal cancer compared with healthy samples. Interestingly, in the four cancer types, $\gamma\delta$ T-cell infiltration is associated with TIL infiltration when measured as discrete value after comparison with median expression ($p = 0.008$ for breast cancer and $p < 0.001$ for colon, pancreatic, and ovarian cancers; Pearson's chi-squared test), and classically recommended neo-adjuvant treatments did not impact $\gamma\delta$ T-cell infiltration and density. Finally, $\gamma\delta$ T-cell density was low in both healthy and pancreas cancer samples, consistent with the fact that pancreatic tumors are considered "cold" tumors (i.e., poorly-infiltrated tumors) [27]. These observations suggest that $\gamma\delta$ T-cell presence or recruitment

in tissues is context- (healthy or pathological) and organ-dependent, and is associated with global TIL infiltration.

In breast cancer, $\gamma\delta$ T-lymphocyte density was highly heterogeneous between tumor samples (Figure 3A-B), but progressively increased from grade I to grade II and III tumors [22]. This suggests, as previously reported by others [28], that in breast cancer, the presence of $\gamma\delta$ T-cells is associated with late tumor grade and poor prognosis. Moreover, we found that $\gamma\delta$ T-cell density tended to be higher in TNBC than in other breast cancer types (Figure 3C). This difference was not significant, probably due to an insufficient number of samples for each type. TNBCs are very heterogeneous tumors: some are very aggressive with poor prognosis, while others display similar or better prognoses than hormone receptor-positive breast cancers [29]. This suggests that other parameters must intervene in breast cancer prognosis and progression, such as the tumor immune environment. Ye et al showed that regulatory $\gamma\delta$ T-cells are present in the breast tumor microenvironment, supporting the idea that their presence in the tumor microenvironment is associated with poor prognosis [30]. Conversely, Hidalgo et al. demonstrated the presence of $\gamma\delta$ T-cells in TNBC and suggested an anti-tumor role of this T-cell sub-population [31]. More recently, Wu et al. showed, in a small cohort of patients with TNBC, that the presence of cytotoxic $\gamma\delta$ T-cells (specifically V δ 1+ T-cells) is associated with remission and good overall survival, suggesting that in this context, the presence of $\gamma\delta$ T-cells is a good prognosis [32]. More studies are needed to determine the role of the different $\gamma\delta$ T-cell subpopulations in breast cancer progression, and to analyze their specific role in various breast cancer types.

Prognosis of patients with colon cancer depends on several factors, such as tumor molecular status (microsatellites instability, *BRAF* mutations), localization (right or left side), stage at diagnosis, and density and composition of the tumor immune infiltrate. In recent years, the distinction between right colon cancer (RCC) and left colon cancer (LCC) has been brought into focus, due to their different outcomes, prognoses, and clinical responses to chemotherapy. Notably, the outcomes were superior for patients with left-sided tumors than for those with right-sided tumors [33]. In the present study, we analyzed $\gamma\delta$ T-cell density in RCC and LCC and found no difference. Concerning the microsatellite instability status (MSI) that results from impaired DNA mismatch repair (MMR), a meta-analysis pooling 32 studies concluded that MSI was associated with better prognosis when compared to patients with intact MMR [34]. In our study, MSI/MSS status was known for 55 out of 112 patients included in the cohort, and we found that $\gamma\delta$ T-cell density was not impacted by the microsatellite status. However, the number of MSI samples were very low (nine MSI versus 46 MSS); thus, examination of a larger cohort might be required to make a definite conclusion.

The *BRAF* mutation is a novel biomarker that is gaining interest due to its association with a worse prognosis when compared to *BRAF* wild-type colon cancer [35,36]. A recent meta-analysis found that colon cancer patients with *BRAF* mutations had worse overall survival (OS) and PFS following anti-EGFR therapies compared to patients with wild-type *BRAF* tumors. Other mutations are also important, in particular for response to treatment. Patients with *Ras* mutations (especially *K-ras*) are unlikely to benefit from anti-EGFR therapy [37]. In the present study, $\gamma\delta$ T-cell density tended to be lower (although not significantly) in *BRAF*-mutated samples compared with *WT* and *RAS*-mutated samples ($n = 69$ samples (Figure S2B)). This difference was only significant when the analysis was performed in metastatic samples (data not shown). Our observations are in accordance with several studies showing that *BRAF* mutations are related to poor prognosis in metastatic colon cancer [38], and that disease-free survival is longer in patients with colon cancer harboring abundant $\gamma\delta$ T-cell infiltrates [39], suggesting a beneficial anti-tumor role of $\gamma\delta$ T-cells.

In agreement, $\gamma\delta$ T-cell density was lower in stage IV and metastatic samples compared with adenoma samples. These data correlate with the concept of the Immunoscore, a classification method based on the presence and density of effector cells, especially CD8 T-cells, in the tumor micro-environment. Many studies have shown that patients with colon cancer and low Immunoscores (i.e., low CD3 and cytotoxic CD8 cell infiltration at the tumor site) have poor prognoses, with reduced

survival chances. Conversely, patients with high immune infiltrates in the tumor (i.e., a high Immunoscore) have good prognoses [25,40].

A meta-analysis using CIBERSORT showed that an intra-tumoral $\gamma\delta$ T-cell signature emerged as one of the most significant, favorable, cancer-wide prognostic populations [41]. Moreover, $\gamma\delta$ T-cell and CD8 T-cell signatures were the most highly correlated, suggesting that intra-tumoral $\gamma\delta$ T-cell density could be a good prognostic factor. In colon cancer, surgery remains the first line of treatment, and the use of adjuvant therapies depends on the cancer stage. The current protocols recommend adjuvant therapy for stage III and IV colon cancer, while its use is still debated for patients with stage II cancer. Future studies should determine whether the analysis of $\gamma\delta$ T-cell density could improve treatment decision-making for patients with non-advanced colon cancer (particularly stage II), and whether $\gamma\delta$ T-cell density might become a predictive biomarker for adjuvant therapies.

Pancreatic cancer is a tumor with high malignancy, morbidity, and mortality for several reasons. First, its diagnosis is often very late, when tumors are already at advanced stages. Second, pancreatic cancer displays low immunogenicity, partly due to its low mutation burden, which may explain the lack of tumor-infiltrating effector T-cells [42]. Particularly, the number of CD8 T-cells, which is correlated with good clinical response to immunotherapy, is significantly lower in “non-immunogenic” cancers, such as pancreatic cancer, compared with “immunogenic” cancers, such as melanoma [43]. Also, it has often been reported that effector T-cells are excluded from the pancreatic tumor microenvironment [27,44]. In agreement, we found that $\gamma\delta$ T-cell density was low in pancreatic cancer samples, whereas it was much higher in epineoplastic pancreatitis samples, a zone rich in immune cells that can surround pancreatic tumors in certain cases. This finding is in agreement with the exclusion of effector cells from the tumor microenvironment and their re-localization in inflammatory areas [45].

Ovarian cancer is another devastating cancer, because at diagnosis, the tumor is at advanced clinical stages (III/IV) in more than 70% of patients. Moreover, more than 70% of patients will experience tumor relapse, and the five-year overall survival rate is lower than 30% [46]. In our study, $\gamma\delta$ T-cell density was higher in tumor specimens (although heterogeneous) compared with healthy tissue samples. Similarly, Chen and collaborators showed after $\gamma\delta$ TIL isolation that the V δ 1+ subset, the main population in ovarian cancer, displays reduced cytotoxic activity and inhibits the proliferation of CD4+ T-cells [47]. These authors concluded that $\gamma\delta$ T-cells might have critical roles in ovarian cancer progression.

Finally, we investigated $\gamma\delta$ T-cell density in tumors classified according to their TNM stage (Figure 7). We observed that $\gamma\delta$ T-cell density tended to be lower in advanced stages, particularly the M1 stage, in breast, pancreas, and colon cancers (statistically significant for colon cancer). This suggests that $\gamma\delta$ T-cells could be of good prognosis, notably through their anti-tumor functions in these cancers, as already reported [9,11,12,48]. However, for breast cancer, we had only two samples in the M1 stage. That is not enough to definitely determine that there was no difference, or whether the absence of significant difference was due to the low number of samples. Concerning pancreatic cancer, a very low $\gamma\delta$ T-cell density in the tumors was observed whatever the TNM stage of the patient. Conversely, $\gamma\delta$ T-cell density tended to be higher in M1-stage ovarian cancers, suggesting a pro-tumor function of $\gamma\delta$ T-cells in this tumor type (Figure 7), and reinforcing the idea that the presence of $\gamma\delta$ T-cells is correlated with poor prognosis in ovarian tumors [49,50]. Probably because of the late diagnosis and the rapid evolution of the disease in ovarian cancer, the analyzed cohort contained few N0 M0 or no N1 M0 samples, and most samples were from patients at the M1 stage. Once again, more samples are required to confirm a significant increase of $\gamma\delta$ T-cell density in the advanced stages of ovarian cancer. Overall, these results show that $\gamma\delta$ T-cell density is variably associated with the cancer stage or progression, differently that CD8+ T-cells, the presence of which is correlated with good prognosis. This is also in accordance with the conclusions of a microarray data analysis showing a discrepancy between the density of CD8 T-cells and of the V γ 9V δ 2 subset of $\gamma\delta$ T-cells in the microenvironment of various tumors [41].

Several recent studies have brought evidence that $\gamma\delta$ T-cells are not always associated with good prognosis in some solid cancers. Indeed, besides their anti-tumor functions, $\gamma\delta$ T-cells have been associated with pro-tumor functions, either directly through immunosuppression mechanisms or indirectly by favoring the establishment of an immunosuppressive environment through the recruitment of suppressive cells. Specifically, $\gamma\delta$ T-cells through interleukin (IL)-17 production display pro-tumor functions in colorectal cancer [50–53]. On the contrary, in other cancers, IL-17-producing cells can have anti-tumor functions. Ma et al. showed that IL-17-producing $\gamma\delta$ T-cells contribute to the chemotherapy-induced anticancer immune response [54]. And Lo Presti et al. demonstrated that the recruitment of $\gamma\delta$ T-cells producing either IL-17 or interferon (IFN)- γ depended on the tumor stage [14]. In breast cancer, Peng and colleagues [55] associated $\gamma\delta$ T-cell immunosuppressive functions with the induction of dendritic cell senescence and inhibition of T-cell proliferation. However, in this study, no discrimination has been done according to breast cancer subtypes. Conversely, Wu et al. demonstrated the anti-tumor functions of $\gamma\delta$ T-cell in TNBC and the good prognostic value of high $\gamma\delta$ T-cell density in this type of cancer [32]. Our data shows diversity in the $\gamma\delta$ T-cell density between the tumor localization or tissue, corroborating this discrepancy in various studies. These apparent discrepancies could actually reflect the need to better know $\gamma\delta$ T-cell density in the different cancer subtypes, and to identify $\gamma\delta$ T-cell subsets. Wu et al. showed in TNBC that the main $\gamma\delta$ T-cells were $\delta 1$ subsets [32], while we had previously reported in a study analyzing breast cancer types that the $\delta 2$ subset was also well-represented in the tumors [22]. In pancreatic ductal adenocarcinoma, $\gamma\delta$ T-cells inhibit $\alpha\beta$ T-cell activation and infiltration via PD-L1 ligation, thereby allowing tumor progression [56]. Overall, these data support the hypothesis that some $\gamma\delta$ T-cell subsets can be immunosuppressive and favor tumor progression in selected solid tumor types. Similarly, we recently identified a suppressive $\gamma\delta$ T-cell population that expresses CD73, produces IL-10 and adenosine, and is present in breast tumors [22,57]. In this context, to refine the prognostic value of $\gamma\delta$ T-cells in the tumor microenvironment, it could be interesting to analyze the ratio of anti- vs. pro-tumor $\gamma\delta$ T-cell subsets based on their CD73 expression.

A better knowledge of the immune landscape in tumors is required to identify new predictive and prognostic biomarkers. Whether $\gamma\delta$ T-cells (if the discrimination between effector and regulatory subsets is achievable) could be one of these potential new biomarkers remains to be demonstrated.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/6/1537/s1>: Figure S1: Validation of the H-41 anti-TCR δ antibody in cell suspensions by immunohistochemistry. Figure S2: Detection of $\gamma\delta$ T-cells in human colon samples. Figure S3: $\gamma\delta$ T-cell density in colon, pancreas, and ovary tumors from chemotherapy-naïve patients. Table S1: Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with breast cancer. Table S2: Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with colon cancer. Table S3: Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with pancreatic cancer. Table S4: Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with ovarian cancer.

Author Contributions: Conceptualization, G.C., V.L., and N.B.; methodology, F.B.-M., J.R., and E.L.-C.; formal analysis, G.C. and F.B.-M.; investigation, G.C. and F.B.-M.; resources, W.J., P.-E.C., and F.B.-M.; writing—original draft preparation, G.C., V.L., and N.B.; writing—review and editing, G.C., V.L., N.B., F.B.-M., C.M., E.L.-C., W.J., and P.-E.C.; funding acquisition, V.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Montpellier, the Institut Régional du Cancer de Montpellier (ICM), the SIRIC Montpellier Cancer (Grant INCa_Inserm_DGOS_12553), and the Ligue contre le Cancer. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, grant number ECO201806006863, to G.C.

Acknowledgments: The authors acknowledge the microscopy (MRI) Montpellier BioCampus shared resource facilities and the Biological Resources Center from Montpellier Cancer Institute (ICM Biobank n° BB 0033 00059). We cordially thank Dr. Jungbluth (Department of Pathology at the Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA) for his help and his advice on the use of the H-41 antibody.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Rahbar, M.; Naraghi, Z.S.; Mardanpour, M.; Mardanpour, N. Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Effect on Clinical Outcome of Muco-Cutaneous Melanoma. *Indian J. Dermatol.* **2015**, *60*, 212. [[PubMed](#)]
- Sato, E.; Olson, S.; Ahn, J.; Bundy, B.; Nishikawa, H.; Qian, F.; Jungbluth, A.A.; Frosina, D.; Gnjatic, S.; Ambrosone, C.; et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18538–18543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Galon, J.; Coleno-Costes, A.; Kirilovsky, A.; Mlecnik, B.; Lagorce-Pagès, C.; Tosolini, M.; Camus, M.; Zinzindohoué, F.; Bruneval, P.; Cugnenc, P.-H.; et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* **2006**, *313*, 1960–1964. [[CrossRef](#)]
- Sharma, P.; Shen, Y.; Wen, S.; Yamada, S.; Jungbluth, A.A.; Gnjatic, S.; Bajorin, D.F.; Reuter, V.E.; Herr, H.; Old, L.J.; et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3967–3972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mahmoud, S.M.; Paish, E.C.; Powe, D.G.; Macmillan, R.D.; Grainge, M.; Lee, A.H.S.; Ellis, I.; Green, A. Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 1949–1955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carstens, J.; De Sampaio, P.C.; Yang, D.; Barua, S.; Wang, H.; Rao, A.; Allison, J.P.; LeBleu, V.S.; Kalluri, R. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15095. [[CrossRef](#)]
- Kabelitz, D.; Marischen, L.; Oberg, H.-H.; Holtmeier, W.; Wesch, D. Epithelial Defence by $\gamma\delta$ T Cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2005**, *137*, 73–81. [[CrossRef](#)]
- Willcox, C.R.; Pitard, V.; Netzer, S.; Couzi, L.; Salim, M.; Silberzahn, T.; Moreau, J.-F.; Hayday, A.; Willcox, B.E.; Déchanet-Merville, J. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human $\gamma\delta$ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 872–879. [[CrossRef](#)]
- Bouet-Toussaint, F.; Cabillic, F.; Toutirais, O.; Le Gallo, M.; De La Pintièrre, C.T.; Daniel, P.; Genetet, N.; Meunier, B.; Dupont-Bierre, E.; Boudjema, K.; et al. V γ 9V δ 2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *57*, 531–539. [[CrossRef](#)]
- Cordova, A.; Toia, F.; La Mendola, C.; Orlando, V.; Meraviglia, S.; Rinaldi, G.; Todaro, M.; Cicero, G.; Zichichi, L.; Donni, P.L.; et al. Characterization of Human $\gamma\delta$ T Lymphocytes Infiltrating Primary Malignant Melanomas. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49878. [[CrossRef](#)]
- Corvaisier, M.; Moreau-Aubry, A.; Diez, E.; Bennouna, J.; Mosnier, J.-F.; Scotet, E.; Bonneville, M.; Jotereau, F. V γ 9V δ 2 T Cell Response to Colon Carcinoma Cells. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5481–5488. [[CrossRef](#)]
- 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 V γ 9V δ 2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin. Exp. Immunol.* **2010**, *161*, 290–297. [[CrossRef](#)]
- Raspolini, M.R.; Castiglione, F.; Degl’Innocenti, D.R.; Amunni, G.; Villanucci, A.; Garbini, F.; Baroni, G.; Taddei, G.L. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 590–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Presti, E.L.; Pizzolato, G.; Gulotta, E.; Cocorullo, G.; Dieli, F.; Meraviglia, S. Current Advances in ?? T Cell-Based Tumor Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marquez-Medina, D.; Salla-Fortuny, J.; Salud, A. Role of gamma-delta T-cells in cancer. Another opening door to immunotherapy. *Clin. Transl. Oncol.* **2012**, *14*, 891–895. [[CrossRef](#)]
- Pauza, C.D.; Liou, M.-L.; Lahusen, T.; Xiao, L.; Lapidus, R.G.; Cairo, C.; Li, H. Gamma Delta T Cell Therapy for Cancer: It Is Good to be Local. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pressey, J.G.; Adams, J.; Harkins, L.; Kelly, D.R.; You, Z.; Lamb, L.S. In vivo expansion and activation of $\gamma\delta$ T cells as immunotherapy for refractory neuroblastoma. *Medicine* **2016**, *95*, e4909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Adams, E.J.; Gu, S.; Luoma, A.M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cell. Immunol.* **2015**, *296*, 31–40. [[CrossRef](#)]
- Bonneville, M.; O’Brien, R.L.; Born, W.K. $\gamma\delta$ T cell effector functions: A blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 467–478. [[CrossRef](#)]

20. Presti, E.L.; Dieli, F.; Meraviglia, S. Tumor-Infiltrating $\text{CD}3^+$ T Lymphocytes: Pathogenic Role, Clinical Significance, and Differential Programming in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 607. [[CrossRef](#)]
21. Salgado, R.; Denkert, C.; Demaria, S.; Sirtaine, N.; Klauschen, F.; Pruneri, G.; Wienert, S.; Van den Eynden, G.; Baehner, F.L.; Penault-Llorca, F.; et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 259–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chabab, G.; Barjon, C.; Abdellaoui, N.; Salvador-Prince, L.; Dejoui, C.; Michaud, H.A.; Boissiere-Michot, F.; Lopez-Crapez, E.; Jacot, W.; Pourquier, D.; et al. Identification of a regulatory Vdelta1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *107*, 1057–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Brierley, J.; Gospodarowicz, M.; O'Sullivan, B. The principles of cancer staging. *Ecanccermedicalscience* **2016**, *10*, ed61. [[CrossRef](#)]
24. Donnem, T.; Kilvaer, T.K.; Andersen, S.; Richardsen, E.; Paulsen, E.E.; Hald, S.M.; Al-Saad, S.; Brustugun, O.T.; Helland, A.; Lund-Iversen, M.; et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 225–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Galon, J.; Pagès, F.; Marincola, F.M.; Angell, H.K.; Thurin, M.; Lugli, A.; Zlobec, I.; Berger, A.; Bifulco, C.; Botti, G.; et al. Cancer classification using the Immunoscore: A worldwide task force. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 205. [[CrossRef](#)]
26. Jungbluth, A.A.; Frosina, D.; Fayad, M.; Pulitzer, M.P.; Dogan, A.; Busam, K.J.; Imai, N.; Gnjatic, S. Immunohistochemical Detection of γ/δ T Lymphocytes in Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissues. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2019**, *27*, 581–583. [[CrossRef](#)]
27. Upadhrasta, S.; Zheng, L. Strategies in Developing Immunotherapy for Pancreatic Cancer: Recognizing and Correcting Multiple Immune "Defects" in the Tumor Microenvironment. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1472. [[CrossRef](#)]
28. Ma, C.; Zhang, Q.; Ye, J.; Wang, F.; Zhang, Y.; Wevers, E.; Schwartz, T.; Hunborg, P.; Varvares, M.A.; Hoft, D.F.; et al. Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 5029–5036. [[CrossRef](#)]
29. Yam, C.; Mani, S.A.; Moulder, S.L. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist* **2017**, *22*, 1086–1093. [[CrossRef](#)]
30. Ye, J.; Ma, C.; Hsueh, E.C.; Eickhoff, C.; Zhang, Y.; Varvares, M.A.; Hoft, D.F.; Peng, G. Tumor-derived $\gamma\delta$ regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 2403–2414. [[CrossRef](#)]
31. Hidalgo, J.V.; Bronsert, P.; Orlowska-Volk, M.; Díaz, L.B.; Stickeler, E.; Werner, M.; Schmitt-Graeff, A.; Kayser, G.; Malkovsky, M.; Fisch, P. Histological Analysis of $\gamma\delta$ T Lymphocytes Infiltrating Human Triple-Negative Breast Carcinomas. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 632. [[CrossRef](#)]
32. Wu, Y.; Kyle-Cezar, F.; Woolf, R.T.; Naceur-Lombardelli, C.; Owen, J.; Biswas, D.; Lorenc, A.; Vantourout, P.; Gazinska, P.; Grigoriadis, A.; et al. An innate-like V δ 1+ $\gamma\delta$ T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaax9364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tejpar, S.; Stintzing, S.; Ciardiello, F.; Tabernero, J.; Van Cutsem, E.; Beier, F.; Esser, R.; Lenz, H.-J.; Heinemann, V. Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 194–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gupta, R.; Sinha, S.; Paul, R.N. The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer* **2018**, *42*, 548–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yokota, T.; Ura, T.; Shibata, N.; Takahari, D.; Shitara, K.; Nomura, M.; Kondo, C.; Mizota, A.; Utsunomiya, S.; Muro, K.; et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *British J. Cancer* **2011**, *104*, 856–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yuan, Z.X.; Wang, X.Y.; Qin, Q.Y.; Chen, D.F.; Zhong, Q.H.; Wang, L.; Wang, J.P. The prognostic role of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer receiving anti-EGFR monoclonal antibodies: A meta-analysis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rowland, A.; Dias, M.M.; Wiese, M.D.; Kichenadasse, G.; McKinnon, R.A.; Karapetis, C.S.; Sorich, M.J. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *British J. Cancer* **2015**, *112*, 1888–1894. [[CrossRef](#)]

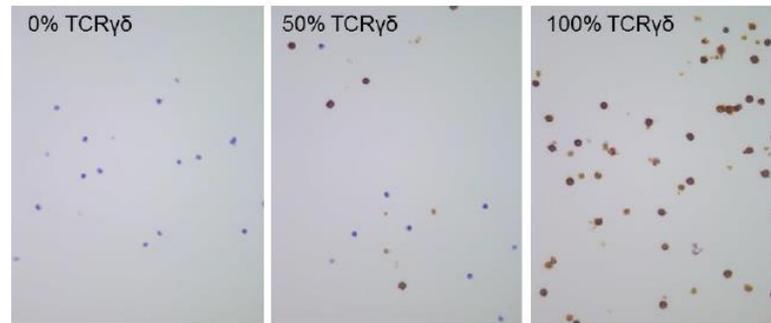
38. Kayhanian, H.; Goode, E.; Sclafani, F.; Ang, J.E.; Gerlinger, M.; Gonzalez de Castro, D.; Shepherd, S.; Peckitt, C.; Rao, S.; Watkins, D.; et al. Treatment and Survival Outcome of BRAF-Mutated Metastatic Colorectal Cancer: A Retrospective Matched Case-Control Study. *Clin. Colorectal Cancer* **2018**, *17*, e69–e76. [[CrossRef](#)]
39. Meraviglia, S.; Lo Presti, E.; Tosolini, M.; La Mendola, C.; Orlando, V.; Todaro, M.; Catalano, V.; Stassi, G.; Cicero, G.; Vieni, S.; et al. Distinctive features of tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1347742. [[CrossRef](#)]
40. Pages, F.; Galon, J.; Dieu-Nosjean, M.C.; Tartour, E.; Sautes-Fridman, C.; Fridman, W.H. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **2010**, *29*, 1093–1102. [[CrossRef](#)]
41. Tosolini, M.; Pont, F.; Poupot, M.; Vergez, F.; Nicolau-Travers, M.-L.; Vermijlen, D.; Sarry, J.-E.; Dieli, F.; Fournié, J.-J. Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 γ δ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1284723. [[CrossRef](#)]
42. Yarchoan, M.; Johnson, B.A.; Lutz, E.R.; Laheru, D.A.; Jaffee, E.M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 209–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Blando, J.; Sharma, A.; Higa, M.G.; Zhao, H.; Vence, L.; Yadav, S.S.; Kim, J.; Sepulveda, A.M.; Sharp, M.; Maitra, A.; et al. Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 1692–1697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Feig, C.; Gopinathan, A.; Neesse, A.; Chan, D.S.; Cook, N.; Tuveson, D.A. The pancreas cancer microenvironment. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4266–4276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lunardi, S.; Muschel, R.; Brunner, T.B. The stromal compartments in pancreatic cancer: Are there any therapeutic targets? *Cancer Lett.* **2014**, *343*, 147–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Timmermans, M.; Sonke, G.; Van De Vijver, K.; Van Der Aa, M.; Kruitwagen, R.F. No improvement in long-term survival for epithelial ovarian cancer patients: A population-based study between 1989 and 2014 in the Netherlands. *Eur. J. Cancer* **2018**, *88*, 31–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chen, X.; Shang, W.; Xu, R.; Wu, M.; Zhang, X.; Huang, P.; Wang, F.; Pan, S.-Y. Distribution and functions of $\gamma\delta$ T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 144. [[CrossRef](#)]
48. Kitayama, J.; Atomi, Y.; Nagawa, H.; Kuroda, A.; Mutoh, T.; Minami, M.; Juji, T. Functional analysis of TCR $\gamma\delta$ +T cells in tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) of human pancreatic cancer. *Clin. Exp. Immunol.* **1993**, *93*, 442–447. [[CrossRef](#)]
49. Lü, J.; Aggarwal, R.; Kanji, S.; Das, M.; Joseph, M.; Pompili, V.; Das, H. Human Ovarian Tumor Cells Escape $\gamma\delta$ T Cell Recognition Partly by Down Regulating Surface Expression of MICA and Limiting Cell Cycle Related Molecules. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23348. [[CrossRef](#)]
50. Rei, M.; Sousa, N.G.; Lança, T.; Thompson, R.G.; Mensurado, S.; Balkwill, F.R.; Kulbe, H.; Pennington, D.J.; Santos, B.S. Murine CD27(-) V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E3562–E3570.
51. Coffelt, S.B.; Kersten, K.; Doornebal, C.W.; Weiden, J.; Vrijland, K.; Hau, C.-S.; Versteegen, N.; Ciampricotti, M.; Hawinkels, L.J.; Jonkers, J.; et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **2015**, *522*, 345–348. [[CrossRef](#)]
52. Ma, S.; Cheng, Q.; Cai, Y.; Gong, H.; Wu, Y.; Yu, X.; Shi, L.; Wu, D.; Dong, C.; Liu, H. IL-17A Produced by T Cells Promotes Tumor Growth in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 1969–1982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wu, P.; Wu, D.; Ni, C.; Ye, J.; Chen, W.; Hu, G.; Wang, Z.; Wang, C.; Zhang, Z.; Xia, W.; et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* **2014**, *40*, 785–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ma, Y.; Aymeric, L.; Locher, C.; Mattarollo, S.; Delahaye, N.F.; Pereira, P.; Boucontet, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Casares, N.; et al. Contribution of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 491–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Peng, G.; Wang, H.Y.; Peng, W.; Kiniwa, Y.; Seo, K.H.; Wang, R.-F. Tumor-Infiltrating $\gamma\delta$ T Cells Suppress T and Dendritic Cell Function via Mechanisms Controlled by a Unique Toll-like Receptor Signaling Pathway. *Immunity* **2007**, *27*, 334–348. [[CrossRef](#)]

56. Daley, D.; Zambirinis, C.P.; Seifert, L.; Akkad, N.; Mohan, N.; Werba, G.; Barilla, R.; Torres-Hernandez, A.; Hundeyin, M.; Mani, V.R.; et al. $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation. *Cell* **2016**, *166*, 1485–1499. [[CrossRef](#)]
57. Barjon, C.; Michaud, H.-A.; Fages, A.; Dejou, C.; Zampieri, A.; They, L.; Gennetier, A.; Sanchez, F.; Gros, L.; Eliaou, J.-F.; et al. IL-21 promotes the development of a CD73-positive V γ 9V δ 2 T cell regulatory population. *OncoImmunology* **2017**, *7*, e1379642. [[CrossRef](#)]



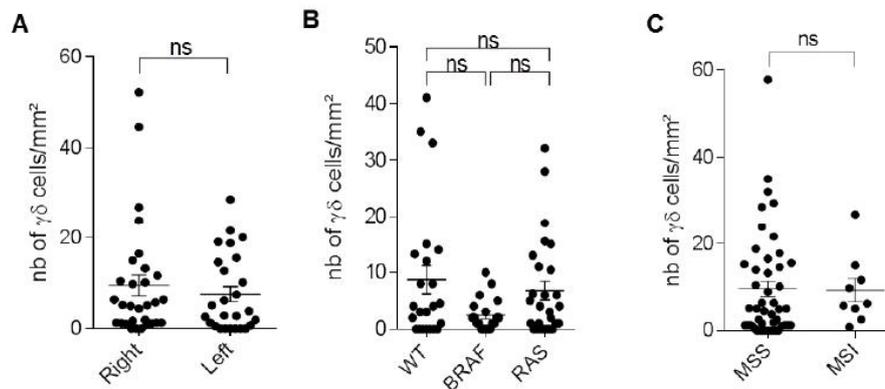
© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Appendix A



Supplemental figure 1. Validation of the H41 anti-TCR δ antibody in cell suspensions by immunohistochemistry.

$\gamma\delta$ T cells were purified from PBMCs of healthy donors by positive immunoselection using a kit from Miltenyi Biotec. PBMCs depleted of $\gamma\delta$ T cells were used to prepare cell suspensions that contained different percentages of purified $\gamma\delta$ T cells, as indicated. Cell suspensions were embedded in an aqueous gel solution for histological and immunohistochemistry analysis with the H-41 anti-TCR $\gamma\delta$ monoclonal antibody, as described in Materials and Methods.



Supplemental figure 2. Detection of $\gamma\delta$ T cells in human colon samples.

Detection by immunohistochemistry of $\gamma\delta$ T cells in human colon cancer. (A) Scatter plot showing $\gamma\delta$ T cell density in 56 colon cancer samples depending on the localization (left colon vs right colon). (B) Scatter plot showing $\gamma\delta$ T cells density in the 77 colon cancer samples with mutational status information (WT, BRAF and RAS). (C) Scatter plot showing $\gamma\delta$ T cells density in 55 colon cancer samples with microsatellite stability status information (mss : stable ; msi : instable). Data are the mean \pm SEM. ns, non-significant; * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ (Kruskal Wallis with Dunn's multiple comparison test).

Parameter	Total (n= 50)
Median age at surgery (range)	61.5 (30 - 88)
T stage	
T1	21 (42%)
T2	19 (38%)
T3	6 (12%)
T4	3 (6%)
<i>Missing</i>	1 (2%)
N stage	
N0	22 (44%)
N1	11 (22%)
N2	6 (12%)
N3	8 (16%)
<i>Missing</i>	3 (6%)
M stage	
M0	45 (90%)
M1	2 (4%)
<i>Missing</i>	3 (6%)
Grade	
I	8 (16%)
II	20 (40%)
III	22 (44%)
Breast cancer subgroup	
RH+ HER2-	14 (28%)
RH+ HER2+	9 (18%)
RH- HER2+	12 (24%)
RH- HER2-	15 (30%)
Neoadjuvant treatment	
Yes	0 (0%)
No	50 (100%)

Supplemental table 1. Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with breast cancer

Parameter	Total (103 patients/112 samples*)	
Sex	M	65
	F	38
Median age at surgery [range]	66 [25-91]	
RAS/BRAF mutations		
	RAS mutated	27
	BRAF mutated	19
	RAS/BRAF wt	23
	Undetermined	43
Microsatellite status		
	MSS	46
	MSI	9
	Undetermined	57
Adenoma	6	
Primary tumors	58	
	Right colon	30
	Left colon	26
	Missing	2
	Post-CT	6 ⁽¹⁾
	Chemo-naive	52
	Stage I	11
	Stage II	13
	Stage III	17
	Stage IV	11
Metastasis	45	
	Liver	23
	Peritoneum	17
	Lung	3
	Lymph node	2
	Post-CT	32 ⁽²⁾
	Chemo-naive	13
Local recurrence	3	
	Post-CT	2 ⁽³⁾
	Chemo-naive	1

* 5 patients displayed 2 or more lesions

⁽¹⁾ all patients received FOLFOX neo-adjuvant chemotherapy

⁽²⁾ Folfox (16); Folfirinox (4); Folfiri-bevacizumab (3); Xeloda (3); Xelox (2); Folfiri (2); Folfiri/Panitumumab (1); Xeliri-bevacizumab (1)

⁽³⁾ Folfox (1); LV5FU2 (1)

Supplemental table 2. Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with colon cancer

Parameter	Total (n= 50)
Sex	
M	22 (44%)
F	28 (56%)
Median age at surgery (range)	67 (38-89)
Neoadjuvant treatment	
Yes	11 ⁽¹⁾ (22%)
No	39 (78%)
<i>For chemo-naive samples only (n=39):</i>	
T stage	
T1	5 (13%)
T2	13 (33%)
T3	20 (51%)
T4	1 (3%)
N stage	
N0	12 (31%)
N1	23 (59%)
N2	4 (10%)
M stage	
M0	36 (92%)
M1	2 (5%)
MX	1 (3%)
R status	
R0	34 (87%)
R1	5 (13%)

⁽¹⁾ Folfirinox (6); Gemcitabine (2); Folfirinox + RT/Gemcitabine (1); Folfirinox + RT/Capecitabine (1); RT/Gemcitabine (1)

RT: radiotherapy

Supplemental table 3. Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with pancreatic cancer

Parameter	Total (n= 72)
Median age at surgery (range)	61 (34-82)
Neoadjuvant treatment	
Yes	18 ⁽¹⁾ (25%)
No	54 (75%)
FIGO stage	
I	4 (6%)
II	4 (6%)
III	54 (75%)
IV	9 (12%)
Missing	1 (1%)

For chemotherapy-naïve samples only (n=54):

T stage	
T1	4 (7%)
T2	5 (9%)
T3	41 (76%)
Missing	4 (7%)
N stage	
N0	18 (33%)
N1	33 (61%)
Missing	3 (6%)
M stage*	
M0	8 (15%)
M1	45 (83%)
Missing	2 (4%)

⁽¹⁾ Carboplatin/paclitaxel (16); carboplatin/paclitaxel/bevacizumab (2)

* Including peritoneal metastases outside the pelvis, retroperitoneal lymphadenopathy and distant metastasis

Supplemental table 4. Main clinicopathological characteristics of the cohort of patients with ovarian cancer

2.1 Conclusion

Dans cette étude, nous avons validé l'utilisation de l'anticorps monoclonal H-41 ciblant la chaîne δ du TCR $\gamma\delta$ pour l'analyse de la densité des LT $\gamma\delta$ dans des tissus normaux et pathologiques en IHC. Nous avons d'abord analysé des tissus normaux de sein, côlon, pancréas et d'ovaire, et avons observé que la présence et la densité des LT $\gamma\delta$ varient en fonction de l'organe.

Ensuite, nous avons étudié l'infiltrat LT $\gamma\delta$ dans les tumeurs mammaires, colorectales, pancréatiques et ovariennes, et comparé ces résultats à ceux obtenus dans les tissus normaux correspondants. Comme dans les tissus normaux, la densité des LT $\gamma\delta$ est hétérogène dans les échantillons tumoraux, mais globalement, on observe une infiltration modérée à forte de LT $\gamma\delta$ dans les cancers mammaires, colorectaux et ovariens, et à l'inverse, pas ou peu d'infiltration dans les cancers pancréatiques. De plus, la densité des LT $\gamma\delta$ est plus élevée dans les tumeurs du sein et des ovaires par rapport aux tissus normaux. À l'inverse, la densité des LT $\gamma\delta$ est réduite dans le cancer colorectal par rapport aux échantillons sains. De manière intéressante, dans les quatre types de cancer, l'infiltration des cellules T $\gamma\delta$ est associée à l'infiltration des TIL totaux. Enfin, la densité des LT $\gamma\delta$ est faible à la fois dans les échantillons sains et dans les échantillons de cancer du pancréas, ce qui est cohérent avec le fait que les tumeurs pancréatiques sont considérées comme des tumeurs "froides" (c'est-à-dire des tumeurs faiblement infiltrées). Ces observations suggèrent que la présence ou le recrutement des LT $\gamma\delta$ dans les tissus dépend du contexte (sain ou pathologique) et de l'organe.

Enfin, la fréquence des lymphocytes T $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs est variablement associée au stade de la tumeur en fonction des types de cancers étudiés, ce qui suggère que des contextes distincts sous-tendent le recrutement des TIL $\gamma\delta$, avec soit le recrutement de TIL $\gamma\delta$ régulateurs soit leur différenciation en LT $\gamma\delta$ régulateurs une fois dans le microenvironnement tumoral.

Chapitre 3 : Etude du rôle et de l'écosystème des LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux dans les cancers ovariens humains

Nos données précédentes montrent que l'infiltration de LT $\gamma\delta$ est augmentée dans les stades avancés de cancers ovariens. Ayant à notre disposition une cohorte de patientes avec un cancer ovarien, nous avons étudié le rôle des LT $\gamma\delta$ régulateurs CD73+ dans le TME. En combinant étude par cytométrie en flux, analyses de survie et imagerie par cytométrie de masse, nous avons pu décrire l'impact et le rôle des LT $\gamma\delta$ régulateurs CD73+ dans le TME ovarien. L'ensemble des résultats sont en cours de compilation en un manuscrit qui sera bientôt soumis pour publication. L'article en préparation est présenté dans la suite de ce manuscrit de thèse.

Deciphering CD73+ regulatory $\gamma\delta$ T cells functions and ecosystem in human ovarian cancer

Ghita Chabab¹, Henri-Alexandre Michaud^{1,2}, Cécile Dejou¹, Laure-Agnes Chépeaux^{1,2}, Yaël Glasson^{1,2}, Florence Boissière², Caroline Mollevi⁵, Michel Fabbro⁴, Nathalie Bonnefoy^{1,*} and Virginie Lafont^{1,*}

¹ IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut régional du Cancer de Montpellier, 34298 Montpellier, France

² Plateforme de Cytométrie et d'Imagerie de Masse de Montpellier, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194 - UM – ICM, Montpellier, France

³ Translational Research Department, Institut Régional du Cancer Montpellier, 34298 Montpellier, France

⁴ Medical oncology Department, Institut Régional du Cancer Montpellier, 34298 Montpellier, France

⁵ Affiliation actuelle de Caroline ?

* Co-last authors

Introduction

$\gamma\delta$ T cells are nonconventional T lymphocytes defined by the expression of a specific T cell receptor composed of the V γ and V δ chains. In humans, there are 2 main subtypes of $\gamma\delta$ T cells, according to the expressed V δ chain: (i) V δ 2 T cells, mainly represented by the innate V γ 9V δ 2 T cell subset are predominant in blood and recognize phosphorylated non-peptide Ags called phosphoantigens; and (ii) non-V δ 2 T mainly represented by the V δ 1 subset are predominant in tissues and recognize stress-induced Ags¹⁻³. Both subsets contribute to the immune response against many cancers, notably through their powerful effector functions that lead to the elimination of tumor cells and the ability to recruit other immune cells⁴⁻⁶. Besides their antitumor functions, $\gamma\delta$ T cells have been recently associated with pro-tumoral functions in certain cancers. Specifically, IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells have pro-tumoral functions in murine breast, ovarian, and hepatocellular cancer models and in human colorectal cancer⁷⁻⁹. In human breast cancer, $\gamma\delta$ T cell immunosuppressive functions have been described and

associated with DC senescence induction¹⁰. Moreover, in murine and human pancreatic ductal adenocarcinoma, $\gamma\delta$ T cells inhibit $\alpha\beta$ T cell activation and infiltration via PD-L1/PD1 pathway, thereby favoring tumor progression¹¹. Similarly, it has been reported that $\gamma\delta$ T cells present in ovarian cancer patients exert an inhibitory effect on cell proliferation of CD4+ naïve T cells¹². Overall, these data support the hypothesis that some $\gamma\delta$ T cell subsets can display immunosuppressive functions and thus favor tumor progression in certain solid tumors. In agreement, we recently identified $\gamma\delta$ T cell subsets (both V δ 2 and V δ 1) that express the ectonucleotidase CD73 and produce adenosine, an immunosuppressive molecule^{13,14}. These cell subsets also produce IL-10 and IL-8 and inhibit conventional T cell proliferation in a CD73/adenosine-dependent manner. The negative impact of CD73+ $\gamma\delta$ T cell on patient survival has been deciphered in a cohort of breast cancer patients by Hu et al¹⁵. These results prompted us into investigating the impact of these regulatory subtypes and their mechanisms in other solid cancers. We focused our study on ovarian cancer as we showed, in a previous study, that the density of $\gamma\delta$ T cells is higher in ovarian tumor tissue than in normal matched ovarian tissue and tends to be higher in FIGO III/IV tumors (i.e., advanced cancers) compared to low grade tumors¹⁶. Overall suggesting that $\gamma\delta$ T cells can have an impact on ovarian tumors progression.

Ovarian cancer is a devastating disease with a 5-year survival rate lower than 30% as it is usually diagnosed at advanced stages (FIGO stage III/IV). This delay in the diagnosis is mainly due to a lack of specific symptoms or early diagnosis methods. Moreover, relapse of the pathology is observed in 70% of the patients within 5 years, and often patients present a resistance to chemotherapy, resulting in death of the patient¹⁷⁻¹⁹. Over 90% of ovarian cancers are of epithelial origin and include high-grade serous carcinoma (HGSOC), low-grade serous carcinoma (LGSOC), endometrioid carcinoma, mucinous carcinoma, and clear cell carcinoma¹⁹. Non-epithelial ovarian cancers include malignancies of germ cell origin, sex cord-stromal cell origin, and extremely rare ovarian cancers such as sarcomas and lipoid cell tumors²⁰.

The mechanisms underlying recurrence and metastasis in ovarian cancer are not clear but are probably related to the tumor microenvironment (TME), particularly in changes in the immune compartment²¹. The tumor immune microenvironment (TIME) is the immune contexture mainly composed of infiltrated immune cells, chemokines and cytokines. TIME can affect,

positively or negatively, tumor evolution of solid cancers, including ovarian cancer²². Indeed, the infiltration of various immune cell types into the TME is associated with clinical outcomes of ovarian cancer patients. For example, infiltration of CD3 and CD8 TILs is associated with a better survival in ovarian cancer^{23,24}. On the opposite, the presence of infiltrating regulatory T cells predicts poor survival in ovarian cancer. However, little is known about the $\gamma\delta$ T cell subset in human ovarian cancer. In this study, we decipher the role, functions and ecosystem of the previously described CD73+ regulatory $\gamma\delta$ T cells in ovarian cancer.

Materials and methods

Tissue sample Collection: Tissue samples were from the biological resources center of Montpellier Cancer Institute (ICM) and collected following French laws under the supervision of an investigator, and declaration to the French Ministry of Higher Education and Research (declaration number DC-2008–695). The study was approved by the ICM Institutional Review Board. Clinical data (e.g., age, treatment, TNM, grade) were obtained by reviewing the medical files.

Ovarian Cancer Tumor Microarray: TMAs regrouping 91 ovarian cancer samples were constructed for retrospective studies allowing the comparison of long-term vs short-term ovarian cancer survivors. For each tumor sample, two cores (1 mm in diameter) were sampled from different malignant areas. The main clinicopathological characteristics of this cohort are presented in Table S1.

Immunohistochemistry: 3 μm thin sections of TMA were mounted on Flex microscope slides (Agilent, Glostrup, Denmark) and dried overnight at room temperature before IHC. The PTLINK system (Agilent, Glostrup, Denmark) was used for de-paraffinization and heat-induced antigen retrieval in High pH Buffer (Agilent, Glostrup, Denmark) at 95 °C for 15 min. IHC was performed using the Dako Autostainer Link48 platform (Agilent, Glostrup, Denmark).

Briefly, after neutralization of endogenous peroxidase, TMA sections were incubated with the mouse monoclonal anti-TCR δ Ab (Clone H-41, Santa Cruz Biotechnology) at room temperature for 30 min. This was followed by an amplification step with a mouse linker and the standard detection system (Flex, Dako). During this process, 3,30-Diaminobenzidine was used as substrate. Sections were counterstained with Flex Hematoxylin (Agilent, Glostrup,

Denmark). The NanoZoomer slide scanner system (Hamamatsu Photonics) was used to digitalize the stained TMA sections with a ×40 objective. Immunoreactive cells were manually identified and counted on the digitalized slides with the NDP.view software.

Immunofluorescence: After de-paraffinization, TMA sections of the cohort were subjected to antigen retrieval using 1X Target Retrieval Solution (Dako, S2367), then incubated in 1X Superblock Blocking Buffer (Thermofisher, 37515) for 45 min followed by 1 h incubation in a FcBlock solution (Miltenyi Biotech - 130-059-901). After washing, TMA sections were incubated with primary antibodies against TCR $\gamma\delta$ (H-41, Santa Cruz, 1/25) and CD73 (D7AF9A, CST, 1/100) overnight at 4°C and washed. Then, the sections were incubated with secondary antibodies: goat anti-Rabbit Alexa Fluor Plus 555 (Thermofisher, A32732) and goat anti-Mouse Alexa Fluor 647 (Thermofisher, A21236). Finally, the sections were counterstained with DAPI (REF) and imaged with AxioScan (Zeiss) to obtain high-power field images. TMA sections analysis have been realized by two observers blinded according to the clinicopathological characteristics and patient survival outcomes.

Survival analysis: For survival analysis, categorical variables were presented as frequency distributions and continuous variables as medians and ranges. Categorical variables were compared with the Pearson's chi-square test. OS was defined as the time between the date of surgery and the date of death (whatever the cause). Patients lost to follow-up were censored at the last documented visit. The Kaplan–Meier method was used to estimate the OS. Differences in survival rates were compared using the log–rank test. Multivariate analyses were performed using the Cox proportional hazard model. Hazard ratios (HR) are given with their 95% confidence interval (95% CI). Statistical analyses were performed with STATA 16.0 (StatCorp, College Station, TX, USA).

Tumor dissociation: Freshly resected tumors from ovarian cancer patients were cut into small pieces (around 1 mm³), and incubated in RPMI medium with a digestion solution (10 mg/ml collagenase IV from Sigma and 10 mg/ml DNase I from Roche) for 30 min at 37°C interspaced by two rounds of mechanical dissociation with gentle flushing of the mixture. The obtained single-cell suspensions was then filtered and stained for immunophenotyping as described in the next section.

Flow cytometry analysis: After dissociation, cells were washed in cold PBS and stained with a combination of Fc receptor blockade and fluorescent cell viability marker for 15 min at 4°C, to minimize nonspecific binding of Abs to Fc receptors. Then primary conjugated antibodies against surface markers were added during 25 min at 4°C in PBS-2% FCS (FACS buffer). If no intracellular staining was performed, cells were washed and fixed in 1% paraformaldehyde. If an intracellular staining was performed, cells were washed then fixed and permeabilized using FOXP3 fixation and permeabilization buffer (Thermofisher eBioscience) for 20 minutes at RT following manufacturer's protocol. Cells were then washed and incubated with an intracellular blocking solution (1X Permeabilization Buffer+20% FCS) for 10 minutes at RT. Intracellular staining was performed by incubating the cells during 1 h at 4°C diluted with primary conjugated antibodies diluted in permeabilization buffer. Cells were then washed and fixed in 1% paraformaldehyde. The antibodies used for flow cytometry experiments are listed in Table S3. Data were acquired with a Cytoflex cytometer (Beckman-Coulter) and analysed with the FlowJo software.

CAF isolation from tumor samples: After sample dissociation and filtration, the fraction left in the filters were collected and cultured in DMEM-F12 with 10% FCS until full adherence. The media was changed every 2 or 3 days and the cells were passed once they reach confluence. An IF using antibodies targeting α SMA and Vimentin were used to confirm the CAF phenotype and then the media is collected for ELISA analysis when cells are at confluence.

Imaging Mass Cytometry - tissue selection: Five tumors were selected in the short-term survivor samples depending on the levels of CD73+ $\gamma\delta$ T cell infiltration. From entire FFPE-embedded tumor blocs, three slides were cut and one labelled with hematoxylin-eosin-saffron (HES) to identify tissue structures, one for TCR $\gamma\delta$ visualisation and localization by IHC, and one for IMC labelling and analysis. Based on IHC data, 46 regions of interest were selected and analysed by IMC.

Imaging Mass Cytometry - tissue labelling: After de-paraffinization and antigen retrieval using Dako Target Retrieval Solution at pH 9 (S236784-2, Agilent technologies) in a water bath (96°C for 30min), tissue sections were encircled with a Dako Pen, incubated with Superblock™ (37515, Thermofisher Scientific) at room temperature (RT) for 45 min, and then with FcR Blocking Reagent (130-092-575, Miltenyi) at RT for 1h. After three washes (8 min/each) in PBS/0.2% Triton X-100 (PBS-T), metal-tagged antibodies (list in Table S4) were diluted in

PBS/1% BSA buffer. After incubation with the primary antibodies at 4°C overnight, sections were washed in PBS-T three times (8min/each) and nuclei were stained with iridium (1:400 in PBS; Fluidigm, Standard Biotools), a DNA Intercalator, for 30min at RT. Sections were washed in PBS for 5min, then in distilled water for 5min, and dried at RT for 30 min.

Imaging Mass Cytometry - data acquisition: Images were acquired with the Hyperion Imaging System (Fluidigm, Standard Biotools) according to the manufacturer's instructions. After choosing the region of interest (ROI), the ROI was ablated with a UV laser at 200Hz. Data were exported as MCD files and visualized using the Fluidigm MCD™ viewer 1.0.560.6. The minimum and maximum thresholds were adapted for each marker and tissue for optimal visualization. γ was set to 1.

Imaging Mass Cytometry – data processing: The data was segmented using the `ImcSegmentationPipeline`. The use of this pipeline combined with `Ilastik v1.3.3` and `CellProfiler v4.1.3` software allowed the generation of a segmentation mask and each tiff files associated with the markers and cell nuclei. From the cells identified in the segmentation mask and these .tiff files, the centroid position X and Y of each cell and the mean expression values for each marker are retrieved using the `compute Features` function in the R `EImage` package. The resulting single-cell data was saved in .fcs format using the R package `flowCore`.

Imaging Mass Cytometry – data transformation and normalization: The data were analyzed from the raw data, the data were not transformed and are based on the average intensity measurements extracted for each marker per cell.

Imaging Mass Cytometry –Generation of neighbors: To extract the neighboring cells, a homemade R function was used. Every cell for which we wanted to obtain the neighborhood were considered as the center of a circle. Then, the following formula derived from the Pythagorean Theorem was used:

$$\sqrt{|x_C - x_O|^2 + |y_C - y_O|^2} \leq R$$

With x_C and y_C the coordinates of the cell centroid of interest, x_O and y_O the coordinates of others cell centroids and R the radius defined at $12\mu\text{m}$. For each ROI, every cell for which the equation was true was considered a neighboring cell and exported in fcs format. The radius

distance of 12 μ m was chosen to obtain the cells that are most likely in contact with the cell of interest.

Ovarian cancer cell lines culture: Cells are cultured in DMEM-F12 with 10% FCS. The media is changed every 2 or 3 days and the cells are passed once they reach confluence. The supernatants of confluent cells is collected for ELISA analysis.

IL-6 ELISA: IL-6 production in the supernatants of primary cells and cell lines (primary human ovarian CAF and 4 different human ovarian cancer cell lines (SKOV3, OVCAR3, OVCAR8, Kuramochi) was tested using the Human IL-6 DuoSet ELISA (DY206-05, R&D Systems) following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis: Data are presented as scatter plots showing the mean values with the standard error of the mean (SEM). Results were compared using Mann-Whitney t test or Wilcoxon t test (specified in figures legend). A P value <0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism, version 8. * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001; ****p<0.0001

Results

CD73+ $\gamma\delta$ TILs predict worse clinical outcome in ovarian cancer

We analysed the impact of the density of $\gamma\delta$ T cells on pathological evolution with a cohort of 91 ovarian cancer patients for which all clinical data have been collected over the years. Patients were classified in two groups: long-term (LT) and short-term (ST) survivors, long-term being defined as patients still alive 5 years after the diagnosis. We quantified by immunofluorescence both total $\gamma\delta$ TILs and CD73+ $\gamma\delta$ TILs in tumor samples of the 91 ovarian cancer patients (figure 1A). We observed significantly higher densities of total $\gamma\delta$ TILs (figure 1B) and CD73+ $\gamma\delta$ TILs (figure 1C) in ST patients than in LT patients suggesting that $\gamma\delta$ and CD73+ $\gamma\delta$ T cell presence at the tumor site are associated with a poor prognosis in ovarian cancer patients.

Because tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells were predominant in ST surviving patients, we next investigated the association between these cells and clinical outcome of the patients, focusing on the overall survival (OS). The median follow-up was 13.44 years (95% CI [11.67–15.47]) and the median survival was 5.14 years (95% CI [3.75 – 6.08]). We analyzed total $\gamma\delta$ TILs, CD73+ $\gamma\delta$

TILs and clinical data from 91 patients. Patients with a low density of $\gamma\delta$ T cells at the tumor site had significantly longer OS compared with those with a high density of $\gamma\delta$ T cells ($p=0.028$; figure S1). This result is even more marked when looking at CD73+ $\gamma\delta$ TIL subset. Patients with high density of CD73+ $\gamma\delta$ T cells had significantly shorter OS compared with patients with a low density of CD73+ $\gamma\delta$ T cells ($p=0.0003$, figure 1D). Furthermore, CD73- $\gamma\delta$ TIL did not impact the OS of patients (data not shown), reinforcing the idea that the effect seen on the global $\gamma\delta$ TIL population is due to CD73+ $\gamma\delta$ TIL. Thus, the presence of CD73+ $\gamma\delta$ TILs could be a prognosis factor in ovarian cancer.

Expression of IL-10 and IL-8 in CD73+ $\gamma\delta$ TILs

We previously showed that CD73+ V δ 2 and CD73+ V δ 1 amplified *in vitro* could display immunosuppressive functions through the production of IL-8 and IL-10, among other mechanisms such as CD73-dependent adenosine production. By *ex vivo* flow cytometry analysis, we investigated the expression of IL-10 and IL-8 by $\gamma\delta$ TIL from fresh ovarian cancer samples. Although we only analysed few samples, we observed that the fraction of CD45-positive and CD3-positive cells in tumor samples is heterogenous (10% to 30% and 17 to 55% respectively), the proportion of $\gamma\delta$ T cells among CD3 positive cells is homogenous (around 7%) and 20% of $\gamma\delta$ T cells express CD73 (data not shown). We next compared the expression of IL-10 and IL-8 in CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ T cell subsets (figure 2A and 2B respectively). Around 10% of CD73- $\gamma\delta$ T cells expressed IL-8 and IL-10 while the proportions of IL-8 and IL-10 positive cells are significantly increased in the CD73+ $\gamma\delta$ T cell sub-population (55% and 40% respectively). Altogether, these results demonstrate that in ovarian tumors, CD73+ $\gamma\delta$ T cells are the main producers of IL-8 and IL-10 compared to other $\gamma\delta$ T cell subsets.

Cellular tissue composition of human ovarian tumors and phenotypic analysis of CD73+ and CD73- $\gamma\delta$ TILs

Using an innovative multiplexed imagery technology, we explored the tissue composition of 5 ovarian tumors selected among the ST patients of the cohort. We selected 41 regions of interests (ROI) among those 5 samples based on the $\gamma\delta$ T cell density identified on a serial slice by IHC. Using a 34-marker panel (table S3) developed and validated for imaging mass cytometry, we identified the cell composition of the ovarian tumor tissue (figure 3A and B; dot plots corresponding to the pie charts are presented in figure S2). We observed that 51% of

cells in the analyzed tissue samples are composed of tumor cells (identified as Ecadherin+ and PanCK+ cells), while fibroblasts and cancer-associated fibroblasts (CAF) (identified using the expression of Vimentin+ and α -SMA+) represent around 6% of the tissue cells and 19% of cells represent the immune compartment and 9% the vascular compartment (figure 3A and figure S2). The remaining cells qualified as “others” on figure 3A correspond to cells presenting a nucleus but that could not be identified using the phenotypical markers of the panel. The characterization of the immune infiltrate (figure 3B) showed that the myeloid compartment is the most represented among immune cells (62% of the total immune infiltrate), followed by the lymphoid compartment (37.8%, among which 30.3% are TIL-T and 7.5% are TIL-B).

The proportion of $\gamma\delta$ T cells is quite heterogeneous among all the ROI and represent about 5% of TIL-T (figure 3C). Furthermore, around 17% of the $\gamma\delta$ TILs are CD73+ (figure 3C). These two observations are consistent with the flow cytometry experiments realized on fresh tumor samples validating the ROI that we selected for IMC. Thus, we studied the expression of various markers on $\gamma\delta$ T cells and compared their expression in both CD73- (effector) and CD73+ (regulatory) $\gamma\delta$ T cell subsets. CD73+TILs express more immune checkpoints such as PD-1, TIM-3, LAG-3 and PD-L1 compared to their CD73- counterparts (figure 3D).

This shows the capacity of high-plex IMC to comprehensively describe the main cell compartments and their specific cell phenotypes. Importantly, IMC data files can be processed to obtain single-cell files, like classical cytometry files, allowing to the analysis of the $\gamma\delta$ TIL ecosystem.

CD73+ and CD73- $\gamma\delta$ TILs present phenotypically and functionally different ecosystems

It is now well admitted that, in addition to the immune composition of the tissues, the spatial location and interactions of immune cells within the TME is essential to their functions and the impact of the tumor development, as well as the response or resistance to treatments. Thanks to IMC technology, we can now study the ecosystem of $\gamma\delta$ TILs and compare effector vs regulatory $\gamma\delta$ TIL ecosystems. After the identification and localization of CD73+ and CD73- $\gamma\delta$ TILs in tissue slices (figure S3), we extract and analyse all the cells in direct contact with them as described in the material and method section. CD73- $\gamma\delta$ TILs are preferentially in contact with other $\gamma\delta$ T cells and with myeloid cells (figure 4A). Furthermore, looking at the myeloid compartment, only macrophages - specifically macrophages M1 (TAM-M1, figure S3)

- and dendritic cells are significantly enriched in contact of the CD73- $\gamma\delta$ TILs compared to the CD73+ $\gamma\delta$ TILs (figure 4B). CD73+ $\gamma\delta$ TIL neighbourhood shows an enrichment in CAF and CD4 T cells (figure 4A). In addition to cell type analysis, we realized a functional analysis of the various identified populations. CAF in close contact with CD73+ $\gamma\delta$ TILs express various immune checkpoint molecules, including PD-L1, and the ectonucleotidases implicated in the adenosine pathway, CD39 and CD73 (figure 5A). Although there is no difference in “proportion” of cell-to-cell contact with tumor cells and certain immune cell type such as CD8 T cells, analysis of functional marker expression shows differences between cells in contact with CD73- or CD73+ $\gamma\delta$ TILs. Indeed, tumor cells in contact with CD73+ $\gamma\delta$ TILs express immune checkpoints such as CD73, Lag-3 and PD-L1, suggesting that they are able to inhibit the functions of anti-tumor immune cells through the immune checkpoint axes. Tumor cells in contact with CD73+ $\gamma\delta$ T cells display a migration capacity through the expression of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) marker, Zeb-1 (figure 5B). Looking at the T cell compartment, we observe that CD4 and CD8 T cells display an exhausted phenotype when they are in contact with CD73+ $\gamma\delta$ TILs, with the co-expression of CD39, PD-1, Tim-3 or PD-1, Tim-3 and Lag-3; while the CD4 and CD8 T cells in contact with effector $\gamma\delta$ TILs present an activated state with the expression of PD-1 alone or no expression of any immune checkpoint (figure 6A and 6B). Interestingly, the analysis of $\gamma\delta$ T cell compartment shows that effector $\gamma\delta$ TILs are close to other CD73- $\gamma\delta$ TILs i.e effector $\gamma\delta$ T cells and close to a cluster of $\gamma\delta$ T cells expressing PD-L1, while regulatory $\gamma\delta$ TILs (CD73+) stays together, and express various combinations of immune checkpoint as PD-1, Tim-3 and CD39 (figure 6C).

Altogether, these data suggest that CD73+ $\gamma\delta$ T cells might participate to the establishment of an immunosuppressive and exhausted microenvironment within the tumors, thus favouring their development. Furthermore, CD73+ $\gamma\delta$ T cells participate to this establishment in a differently from Treg, as they display two different neighbourhoods (figure S5).

Impact of IL-6 produced by ovarian CAF and tumor cells on $\gamma\delta$ TILs

The functional phenotype of $\gamma\delta$ T cells can be modulated by the presence of soluble factors such as cytokines. We previously demonstrated that IL-21 favors the development of a pro-tumoral $\gamma\delta$ T cell subset characterized by the expression of CD73 and producing various immunosuppressive molecules such as adenosine, IL-10 and the chemokine IL-8 is. Another study showed that CAF-produced IL-6 in breast cancer environment induced CD73+ $\gamma\delta$ T cells

differentiation from paired normal breast tissues and become immunosuppressive T cells. As ovarian TME contains high levels of IL-6, we hypothesize that IL-6 could be involved in the development of CD73+ $\gamma\delta$ T cell subset within the TME. We isolated primary CAF from freshly resected ovarian tumor samples. The staining of the cells by α SMA and vimentin confirmed that the isolated cells are indeed CAF (data not shown). In parallel, we also cultured several ovarian tumor cell lines. The quantification of IL-6 in the supernatants of the cells, showed that both CAF and tumor cells produce IL-6, but CAF produce much higher amounts of IL-6 compared to tumor cells (1500 pg/mL vs ~70pg/mL) (figure 7). As it has been demonstrated by Hu et al., we confirmed that IL-6 favors the development of CD73+ $\gamma\delta$ T cells (data not shown). This suggests that an important interplay between CAF and $\gamma\delta$ T cells occurs in the TME and favors tumor growth and immune escape, probably through the mechanism described in figure 8.

Discussion

Investigating the presence and functions of suppressive TILs in the TME is essential for the development of effective immunotherapy strategies, as the intervention of immunosuppressive immune cells usually impairs or abolishes the effects of immunotherapy, leading to patient progression or relapse. We described here a new subset of regulatory $\gamma\delta$ T cell characterised by the expression of CD73, expressing various inhibitory immune checkpoints and producing immunosuppressive molecules such as IL-10 and the angiogenic and chemotactic factor IL-8. We also described their phenotype and ecosystem in solid tumors. These regulatory $\gamma\delta$ T cells are present within the TME of human ovarian cancer patients and are associated with a poor clinical outcome. Furthermore, spatial analysis of their location and environment shows that CD73+ $\gamma\delta$ T cells are in close contact with exhausted T cells as well as CAF and tumor cells expressing inhibitory immune checkpoints. Tumor cells in contact with CD73+ $\gamma\delta$ T cells also present more migrating capacities.

It is well known that cytokines can promote or inhibit tumor cell differentiation, immune cell differentiation and functions and angiogenesis, affecting *in fine* patients' response to therapy²⁵. Ovarian tumors are associated with many cytokines such as IL-6, IL8 and IL-10, and their abnormal expression affects all the component on the TME, as well as patients survival^{26,27}. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine found in various solid cancers. IL-10 inhibits

MHC and co-stimulatory molecules expression on antigen-presenting cells, thus affecting their functions. This leads to the induction of immune suppression and/or tolerance. IL-10 also downregulates Th1 cytokine expression and favors regulatory T cell functions and the polarization of macrophages to the M2 phenotype, thus increasing the immunosuppression at the tumor site²⁸. Although CD73+ $\gamma\delta$ TILs produces IL-10, we did not observe an increase of TAM-M2 population in the neighbourhood of those cells. On the opposite, we clearly observed a decrease of TAM-M1 population. Thus, by reducing pro-inflammatory and anti-tumor immune response in TME, IL-10 promotes tumor immune surveillance escape and tumor progression.

IL-8, also known as CXCL8, is a cytokine belonging to the CXC chemokine family. IL-8 was originally classified as a chemoattractant for neutrophils and MDSCs. It is now known to play other important biological activities in the various solid cancer as the induction/regulation of angiogenesis, favoring cancer cell growth and survival and promoting tumor cell migration^{29,30}. Ovarian cancer cells express at their surface the IL-8 receptor suggesting that IL-8 may display the same activities in this cancer³¹. Indeed, IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer cell³¹⁻³³. Thus, this chemokine promotes migration, invasion and metastasis formation³¹⁻³³. Also, IL-8 promotes ovarian cancer growth both in 3D spheroid models³⁴. We could not assess MDSC infiltration in our study as we did not have, in the IMC panel used, the specific markers to identify them. On the other hand, the tumor cells close to CD73+ regulatory $\gamma\delta$ T cells express high levels of Zeb-1, the transcription factors associated with EMT. Furthermore, these cells express higher levels of PD-L1, an inhibitory immune checkpoint. Studies have showed that when tumor cells enters in EMT, the expression of EMT transcription factors such as SNAIL and Zeb-1 induces the expression of other genes, including PD-L1³⁵⁻³⁷. Thus, we hypothesise that CD73+ $\gamma\delta$ T cells participate to patients' worse survival through the inhibition of anti-tumor cell functions via an IL-10 dependent mechanism; and by promoting tumor growth and migration through an IL-8 dependant mechanism.

Daley et al showed in a murine pancreatic cancer model that $\gamma\delta$ infiltrating the tumors display strong immunosuppressive functions through PD-1/PD-L1 axis¹¹. Indeed, 50% of infiltrating $\gamma\delta$ T cells express PD-L1 and induce exhaustion of $\alpha\beta$ T cells. The authors also showed that $\gamma\delta$ T cells express high levels of CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) when infiltrating these tumors. CD39 is an ectonucleotidase involved in the production of adenosine,

an immunosuppressive molecule³⁸. However, the authors did not investigate CD73 expression in their study. Adenosine derives from extracellular ATP produced by apoptotic cancer cells. Extracellular ATP is a potent immunostimulatory molecule that participates in the establishment of an anti-tumor immune response. The ectonucleotidases CD39 and CD73 catabolize ATP to AMP, and AMP to adenosine respectively. It is not mandatory that both ectonucleotidases are expressed by the same cells to generate adenosine, the close proximity of cells expressing either CD39 or CD73 is sufficient. Adenosine inhibits DC maturation, effector and helper T cell activation and functions, and enhances on the opposition the functions of MDSCs, regulatory T cells and M2 macrophages^{39–43}. In our study, regulatory $\gamma\delta$ T cell are characterized by the expression of CD73 but they can also express various immune checkpoints as PD-L1, CD39 and Lag-3. This suggest that, in addition to the effects mediated by IL-10 and IL-8, CD73+ $\gamma\delta$ T cells might mediate immunosuppression and favour cancer growth through ICI and adenosine.

Chronic inflammation is one of the hallmarks of cancer, and thus is involved in tumorigenesis as well as in tumor progression. Cytokines mediate chronic inflammation and are involved in cancer progression by regulating, for example, immune cells functions. High levels of IL-6 have been observed in ovarian cancer patient samples and both cancer cells and CAF secrete it. IL-6 inhibits the DCs maturation, induces TAMs-M2 polarisation, which in turn compromise T cell activation and functions^{39,40}. In addition, IL-6 presence in the TME of ovarian cancer patients is associated with a poor-prognosis and an increased tumor progression. Thus, clinical trials using monoclonal antibodies targeting IL-6 effect have been conducted on ovarian cancer patients. Siltuximab targets and inhibits the cytokine directly (NCT00841191)⁴¹, while Tocilizumab targets IL-6 receptor (NCT01637532)⁴². Furthermore, we and others observed that CAF are the main IL-6 producers in ovarian tumors and that IL-6 induces CD73 expression by $\gamma\delta$ T cells (data not shown and ¹⁵). Thus, the proximity observed between CD73+ $\gamma\delta$ T cells and CAF by IMC experiments allows to propose a mechanisms where CAF-produced IL-6 leads to the recruitment or the polarization of $\gamma\delta$ T cells into CD73+ suppressive $\gamma\delta$ T cells in ovarian TME. Then $\gamma\delta$ T cells display their immunosuppressive functions via the production of adenosine, IL-10 and IL-8, and *in fine* promote tumor growth. These findings are consistent with the work of Hu et al, who showed that CAF-derived IL6 induced CD73+ $\gamma\delta$ T cell differentiation in human breast cancer. CD73+ $\gamma\delta$ TILs in breast cancer produced high levels

of adenosine following the activation of the IL6/STAT3 signaling pathway. They also showed that CD73+ $\gamma\delta$ T cells could in turn promote IL6 secretion by CAFs through activating the adenosine/A2BR/p38MAPK pathway thereby forming a positive feedback loop¹⁵. This interplay between CAF and CD73+ $\gamma\delta$ T cells might thus be a general mechanism existing in all solid cancers. Our preliminary data show that CD73+ $\gamma\delta$ T cells are present in pancreatic and colorectal cancer (data not shown), but the exploration of their ecosystem remains to be analyzed.

Altogether, our study identified CD73+ $\gamma\delta$ T cells as a key mediator of immunosuppression in ovarian cancer and a new prognostic factor of human ovarian cancer. Moreover, the eradication of these cells might be a potential treatment to remove the immunosuppression and restore an effective anti-tumoral response.

Bibliography

1. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* **13**, 88–100 (2013).
2. Kabelitz, D. $\gamma\delta$ T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2331–2333 (2011).
3. Adams, E. J., Gu, S. & Luoma, A. M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cell Immunol* **296**, 31–40 (2015).
4. Cordova, A. *et al.* Characterization of human $\gamma\delta$ T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One* **7**, e49878 (2012).
5. Bouet-Toussaint, F. *et al.* Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 531–539 (2008).
6. Kabelitz, D., Serrano, R., Kouakanou, L., Peters, C. & Kalyan, S. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cell Mol Immunol* **17**, 925–939 (2020).
7. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).

8. Ma, S. *et al.* IL-17A produced by $\gamma\delta$ T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **74**, 1969–1982 (2014).
9. Wu, P. *et al.* $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* **40**, 785–800 (2014).
10. Peng, G. *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* **27**, 334–348 (2007).
11. Daley, D. *et al.* $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation. *Cell* **166**, 1485-1499.e15 (2016).
12. Chen, X. *et al.* Distribution and functions of $\gamma\delta$ T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment. *J Transl Med* **17**, 144 (2019).
13. Barjon, C. *et al.* IL-21 promotes the development of a CD73-positive V γ 9V δ 2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology* **7**, e1379642 (2017).
14. Chabab, G. *et al.* Identification of a regulatory V δ 1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J Leukoc Biol* **107**, 1057–1067 (2020).
15. Hu, G. *et al.* An IL6-Adenosine Positive Feedback Loop between CD73(+) $\gamma\delta$ Tregs and CAFs Promotes Tumor Progression in Human Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* **8**, 1273–1286 (2020).
16. Chabab, G. *et al.* Diversity of Tumor-Infiltrating, $\gamma\delta$ T-Cell Abundance in Solid Cancers. *Cells* **9**, E1537 (2020).
17. De Angelis, R. *et al.* Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* **15**, 23–34 (2014).
18. Bogani, G. *et al.* Immunotherapy for platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **158**, 484–488 (2020).

19. Colombo, P.-E. *et al.* Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **89**, 207–216 (2014).
20. Baker-Rand, H. & Edey, K. Nonepithelial ovarian cancers. *The Obstetrician & Gynaecologist* **23**, 177–186 (2021).
21. Drakes, M. L. & Stiff, P. J. Regulation of Ovarian Cancer Prognosis by Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)* **10**, E302 (2018).
22. Baci, D. *et al.* The Ovarian Cancer Tumor Immune Microenvironment (TIME) as Target for Therapy: A Focus on Innate Immunity Cells as Therapeutic Effectors. *Int J Mol Sci* **21**, E3125 (2020).
23. Ovarian Tumor Tissue Analysis (OTTA) Consortium *et al.* Dose-Response Association of CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Survival Time in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *JAMA Oncol* **3**, e173290 (2017).
24. Zhang, L. *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**, 203–213 (2003).
25. Duan, Z. & Yang, W. [Analysis of cytokines (IL-2, IL-8, IL-10) in the expressed prostatic secretions of chronic prostatitis]. *Zhonghua Nan Ke Xue* **11**, 201–203 (2005).
26. Mustea, A. *et al.* Expression of IL-10 in patients with ovarian carcinoma. *Anticancer Res* **26**, 1715–1718 (2006).
27. Zhang, L., Liu, W., Wang, X., Wang, X. & Sun, H. Prognostic value of serum IL-8 and IL-10 in patients with ovarian cancer undergoing chemotherapy. *Oncol Lett* **17**, 2365–2369 (2019).
28. Sato, T. *et al.* Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res* **51**, 170–182 (2011).

29. Yuan, A., Chen, J. J. W., Yao, P.-L. & Yang, P.-C. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci* **10**, 853–865 (2005).
30. De Larco, J. E. *et al.* A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am J Pathol* **158**, 639–646 (2001).
31. Wen, J. *et al.* IL-8 promotes cell migration through regulating EMT by activating the Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer. *J Cell Mol Med* **24**, 1588–1598 (2020).
32. Li, Y. *et al.* Effect of targeted silencing of IL-8 on in vitro migration and invasion of SKOV3 ovarian cancer cells. *Oncol Lett* **13**, 567–572 (2017).
33. Yin, J. *et al.* Interleukin-8 promotes human ovarian cancer cell migration by epithelial-mesenchymal transition induction in vitro. *Clin Transl Oncol* **17**, 365–370 (2015).
34. Uddin, M. M., Gaire, B. & Vancurova, I. Interleukin-8 Induces Proliferation of Ovarian Cancer Cells in 3D Spheroids. *Methods Mol Biol* **2108**, 117–124 (2020).
35. Lequeux, A. *et al.* Impact of hypoxic tumor microenvironment and tumor cell plasticity on the expression of immune checkpoints. *Cancer Lett* **458**, 13–20 (2019).
36. Burger, G. A., Nesenberend, D. N., Lems, C. M., Hille, S. C. & Beltman, J. B. Bidirectional crosstalk between epithelial-mesenchymal plasticity and IFN γ -induced PD-L1 expression promotes tumor progression. *bioRxiv* 2022.02.03.478950 (2022) doi:10.1101/2022.02.03.478950.
37. Evanno, E. *et al.* Tri-methylation of H3K79 is decreased in TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *Clin Epigenetics* **9**, 80 (2017).
38. Silva-Vilches, C., Ring, S. & Mahnke, K. ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity. *Front Immunol* **9**, 2581 (2018).

39. Nishio, H. *et al.* Immunosuppression through constitutively activated NF- κ B signalling in human ovarian cancer and its reversal by an NF- κ B inhibitor. *Br J Cancer* **110**, 2965–2974 (2014).
40. Browning, L., Patel, M. R., Horvath, E. B., Tawara, K. & Jorcyk, C. L. IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res* **10**, 6685–6693 (2018).
41. Angevin, E. *et al.* A phase I/II, multiple-dose, dose-escalation study of siltuximab, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **20**, 2192–2204 (2014).
42. Dijkgraaf, E. M. *et al.* A phase I trial combining carboplatin/doxorubicin with tocilizumab, an anti-IL-6R monoclonal antibody, and interferon- α 2b in patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Ann Oncol* **26**, 2141–2149 (2015).

Figures and legends

A

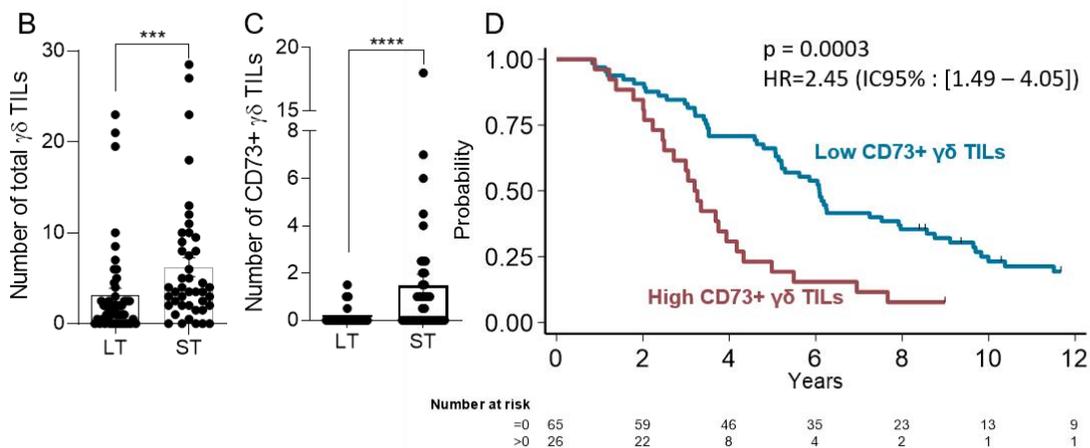
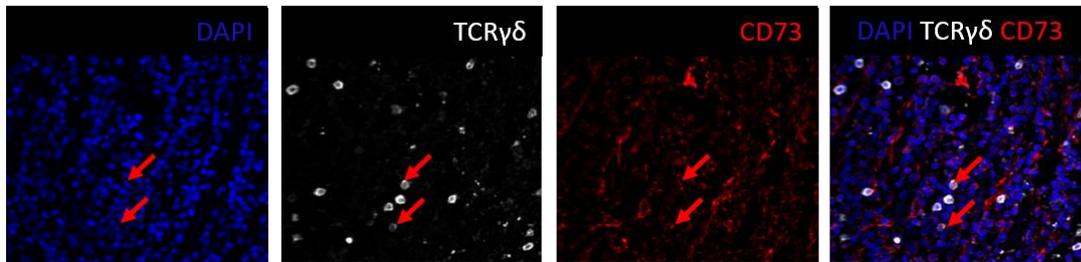


Figure 1. Impact of CD73+ $\gamma\delta$ T-cells on survival of human ovarian cancer. (A) Detection of $\gamma\delta$ T cells in 91 ovarian tumor samples by immunofluorescence. The figure shows the staining of one representative tumor. (B) Scatter plots comparing $\gamma\delta$ T-cell density in short-term surviving (ST) patients compared to long-term surviving (LT) patients (C) Scatter plots comparing CD73+ $\gamma\delta$ T-cell density in short-term surviving (ST) patients compared to long-term surviving (LT) patients. (D) Overall survival analysis depending on CD73+ $\gamma\delta$ T-cell density in patients. Data are the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (Mann–Whitney test for panels B and C ; logrank test for survival analysis)

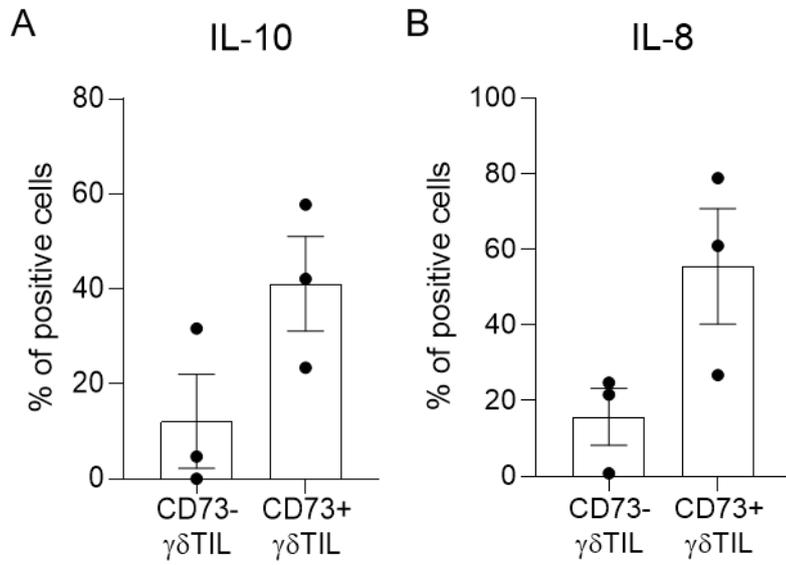


Figure 2. IL-8 and IL10 expression in ovarian CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs (A) Cumulative data presenting the percentage of immune infiltrate (CD45+ cells among the living cells); percentage T lymphocytes (CD3+ cells among CD45+); percentage of $\gamma\delta$ T cells (among the CD3+) and percentage of CD73+ cells among $\gamma\delta$ T cells (n=2 or 3). Cumulative data of 3 ovarian cancer patients showing the percentage of (B) IL-10 and (C) IL-8 positive cells in CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs.

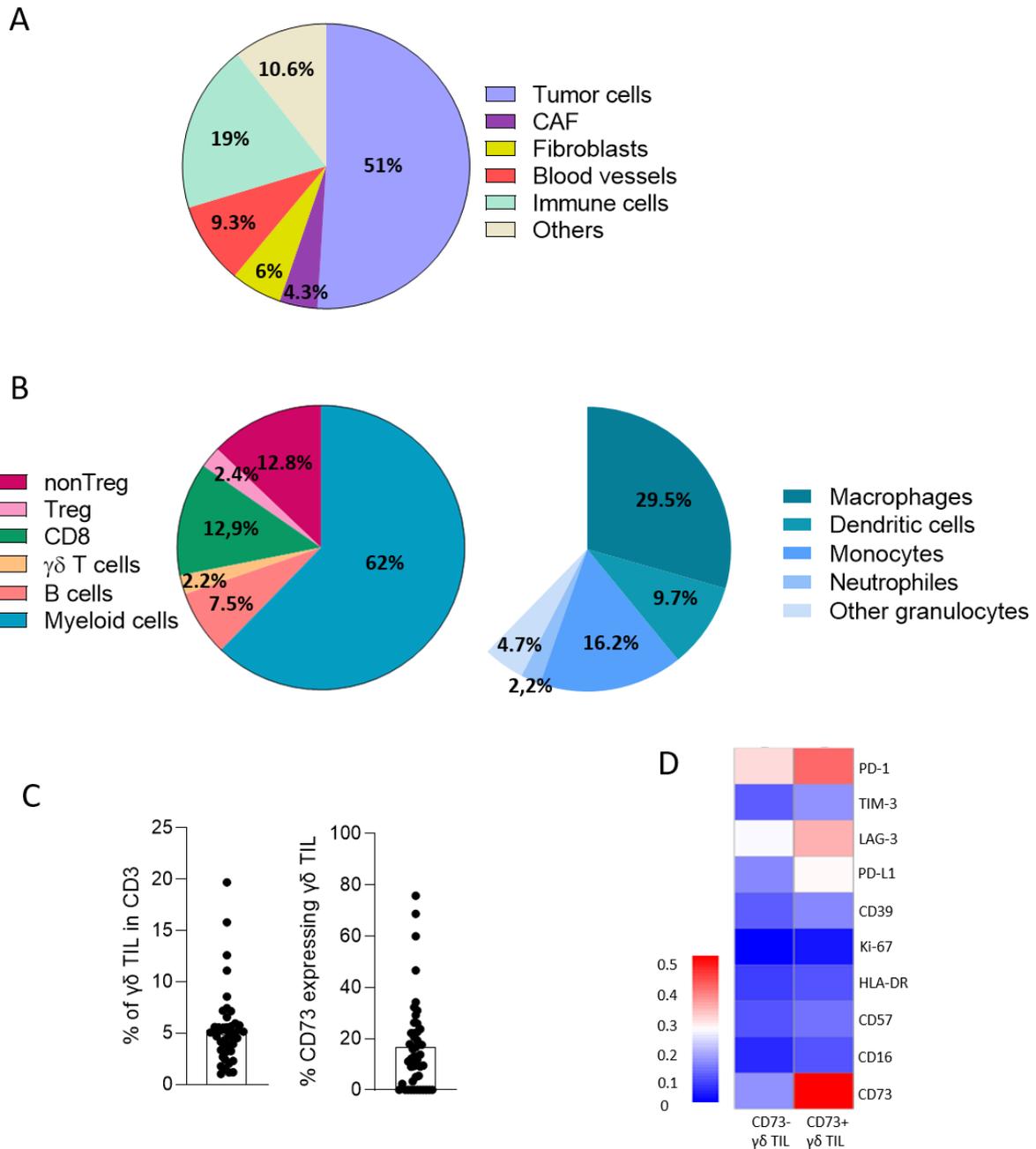


Figure 3. Ovarian tumor tissue description using imaging by mass cytometry. (A) Pie chart representing the mean value of each identified cell type in 46 selected ROI (B) Pie charts representing the mean value of each identified immune cell type in the selected 46 ROI(B) Dot plots representing $\gamma\delta$ TILs in CD3 positive cells and CD73 positive $\gamma\delta$ cells in $\gamma\delta$ TILs (D) Heat map representing the expression of various markers by CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs.

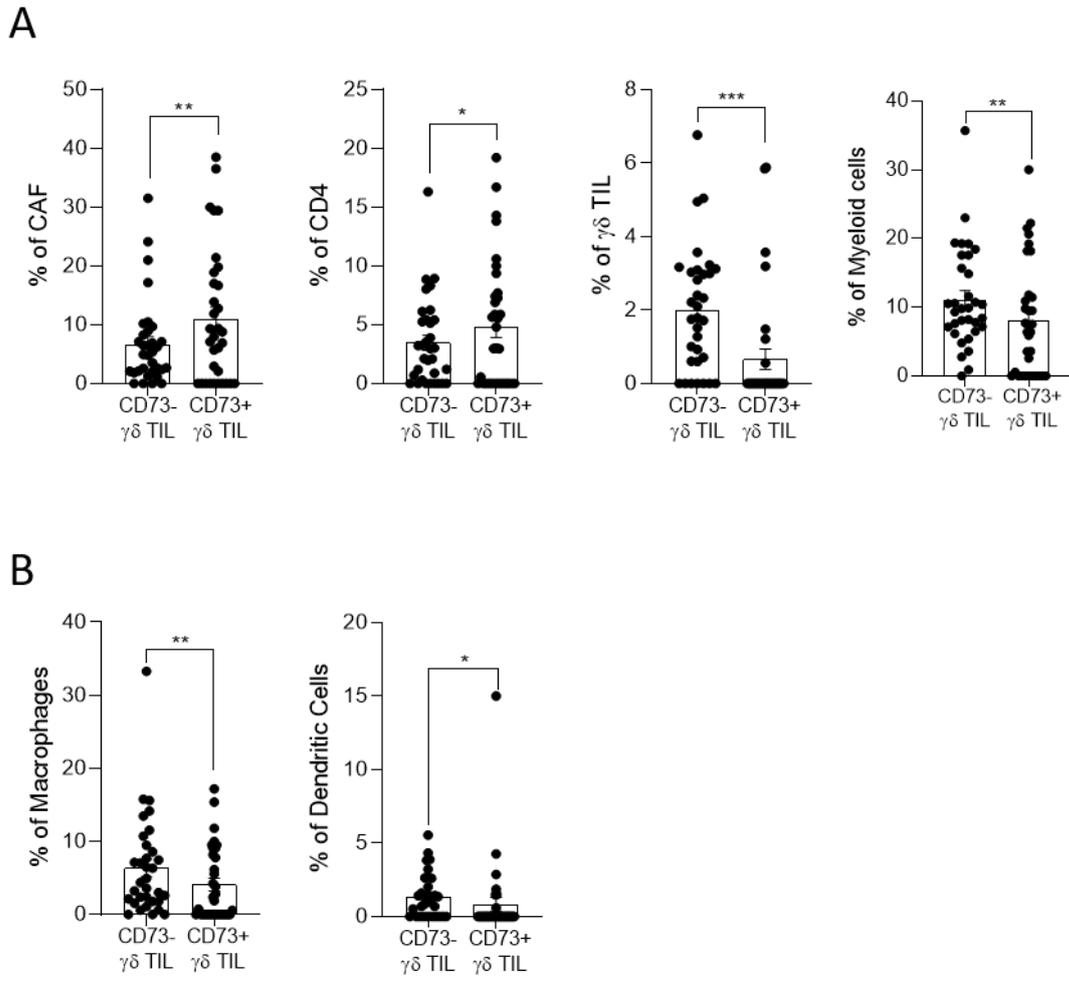
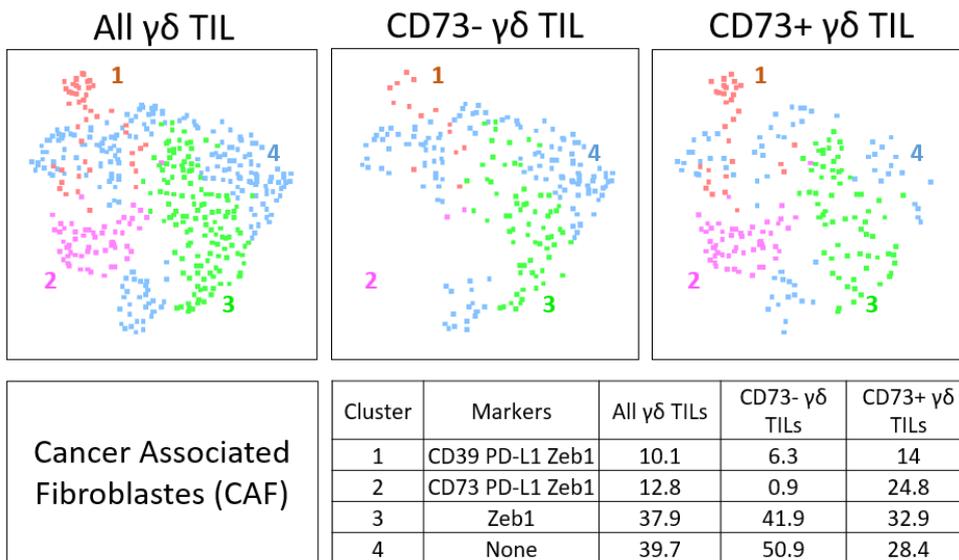


Figure 4. Comparison of CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs neighbourhood (frequency). (A) Dot plots representing significantly different cell population frequencies in contact with CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs. (B) Dot plots representing macrophage and DC population frequencies in contact with CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.001$ (Wilcoxon paired t test).

A



B

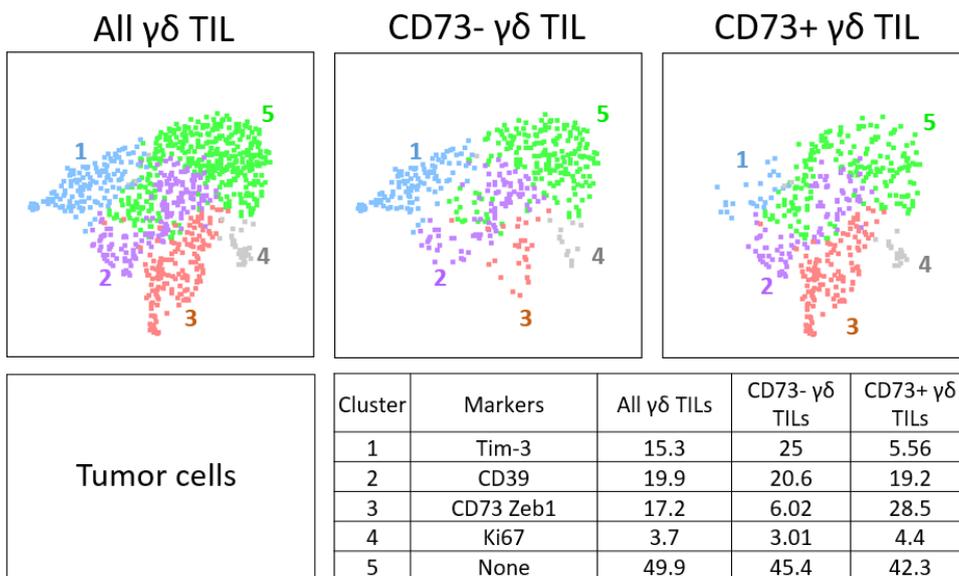


Figure 5. UMAP representing stromal compartment in the neighbourhood of CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs. Clustering of CAF (A) and Tumor cells (B) according to functional marker expression in the neighbourhood of whole (left panels), CD73- (medium panels) and CD73+ (right panels) $\gamma\delta$ TILs.

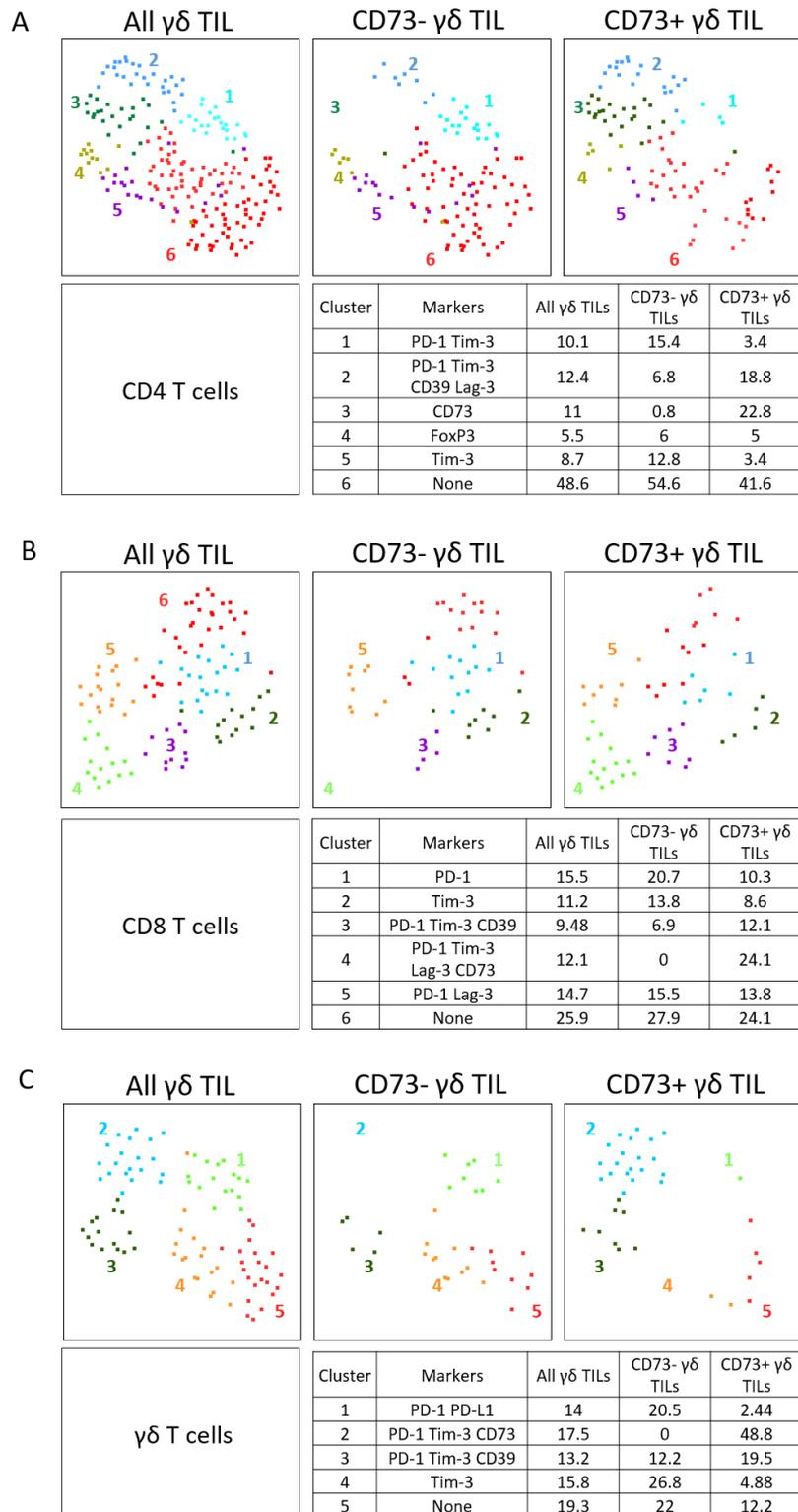


Figure 6. Comparison of markers expression by immune compartment in the neighbourhood of CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs. Clustering of (A) CD4 TILs (B) CD8 TILs and (C) $\gamma\delta$ TILs according to of functional marker expression in the neighbourhood of whole (left panels), CD73- (medium panels) and CD73+ (right panels) $\gamma\delta$ TILs.

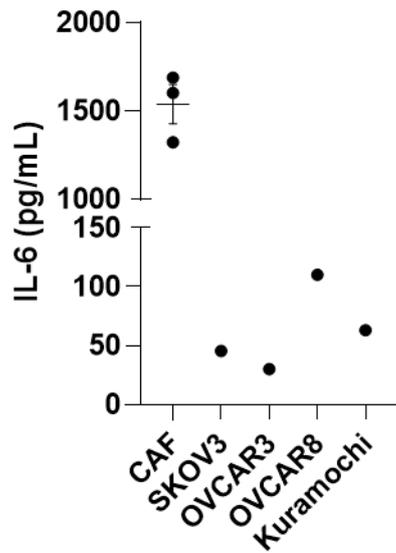


Figure 7. IL-6 production by CAF and ovarian cancer cell lines Dot plot representing the quantity of IL-6 produced by primary CAF and 4 different ovarian cancer cell lines

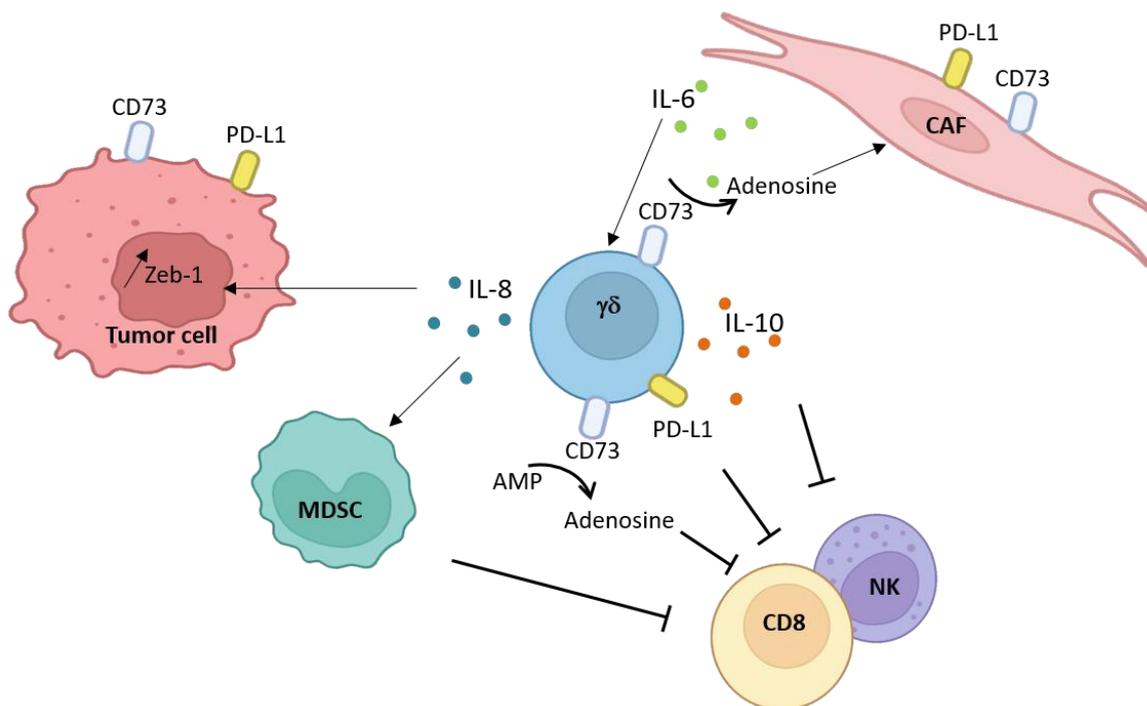


Figure 8. Involved mechanisms in the implementation of an immunosuppressive TME in ovarian tumor. Interplay between $\gamma\delta$ TILs, CAF, Tumor cells and immune cells.

Supplemental materials

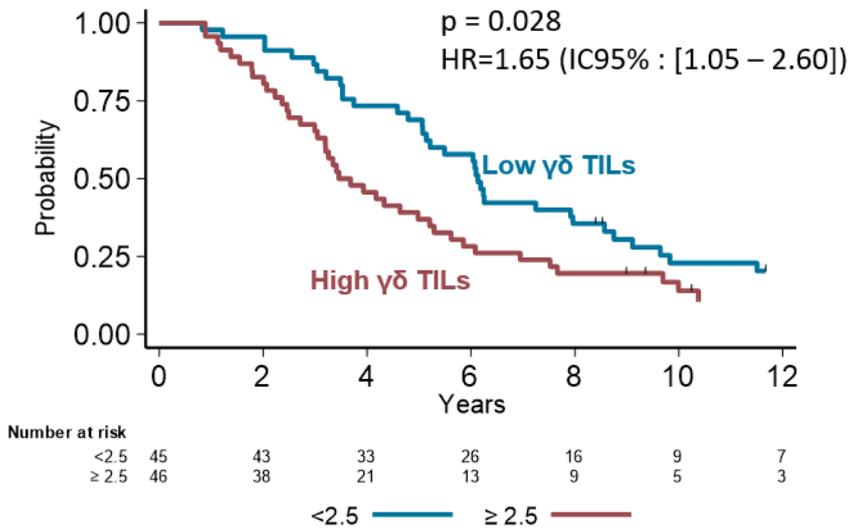


Figure S1. Impact of $\gamma\delta$ T-cells on survival of human ovarian cancer. Overall survival analysis depending on $\gamma\delta$ T-cell density in patients. Data are the mean \pm SEM. Logrank test was performed for survival analysis.

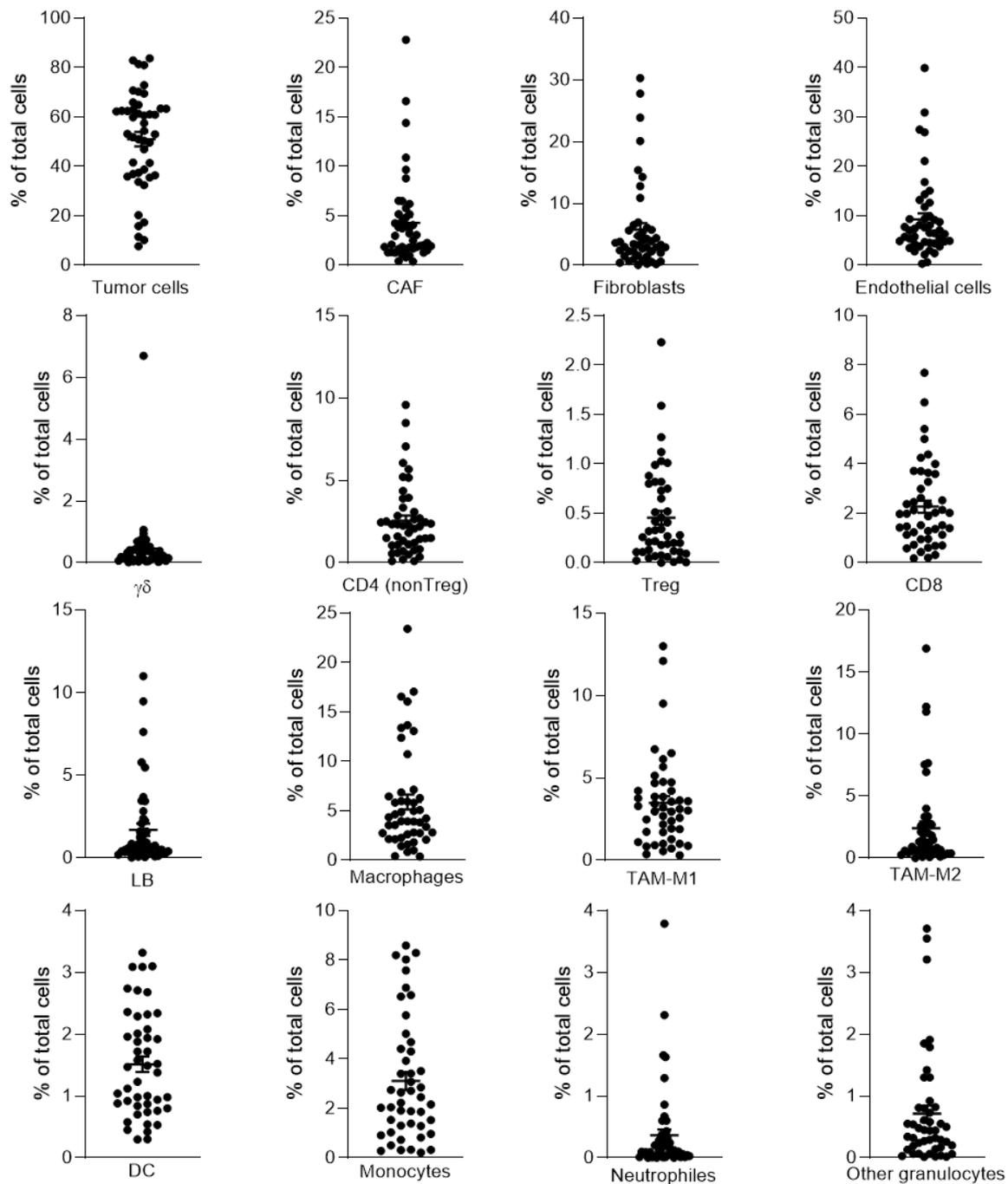


Figure S2. Ovarian tumor tissue description using imaging by mass cytometry. Cumulative data of 46 ROI from 5 ovarian cancer patients showing the frequency of each identified cell populations

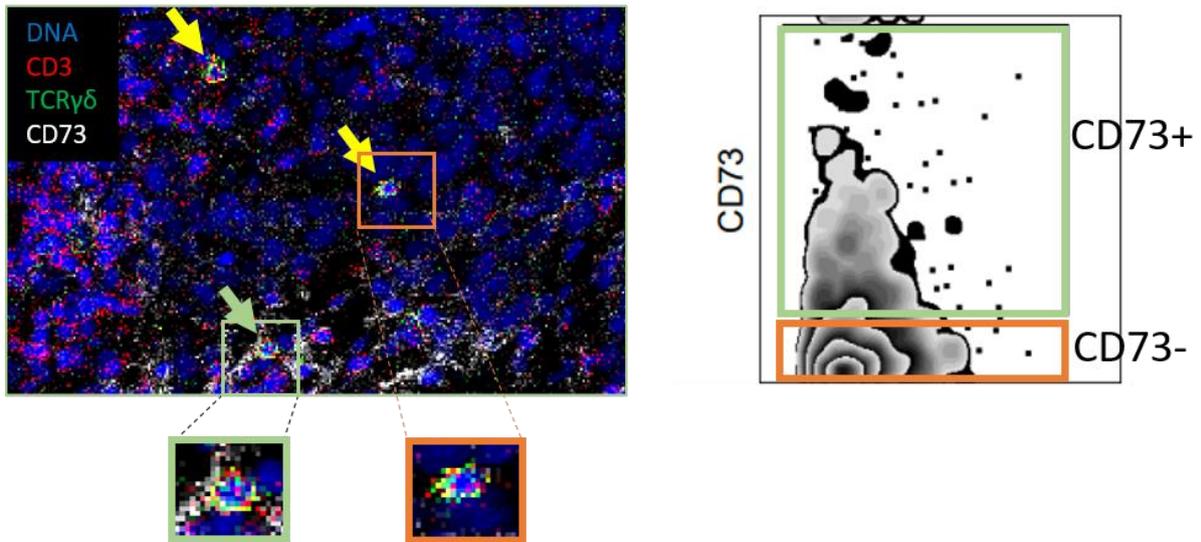


Figure S3. Imaging by mass cytometry example of selection and identification of CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs.

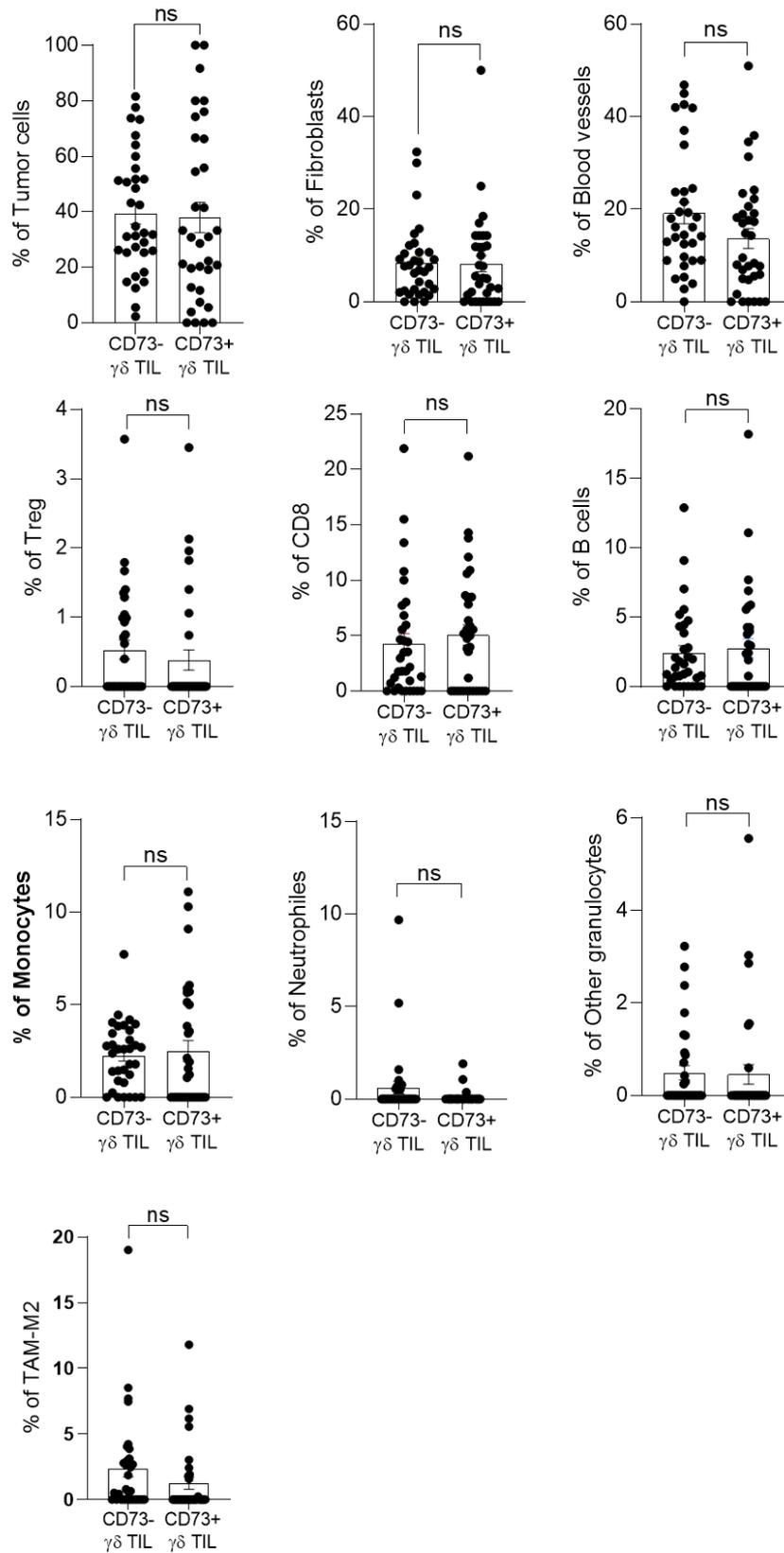


Figure S4. Comparison of CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs neighbourhood. Dot plots representing cell populations in contact of CD73- and CD73+ $\gamma\delta$ TILs. ns: non-significant (Wilcoxon paired t test).

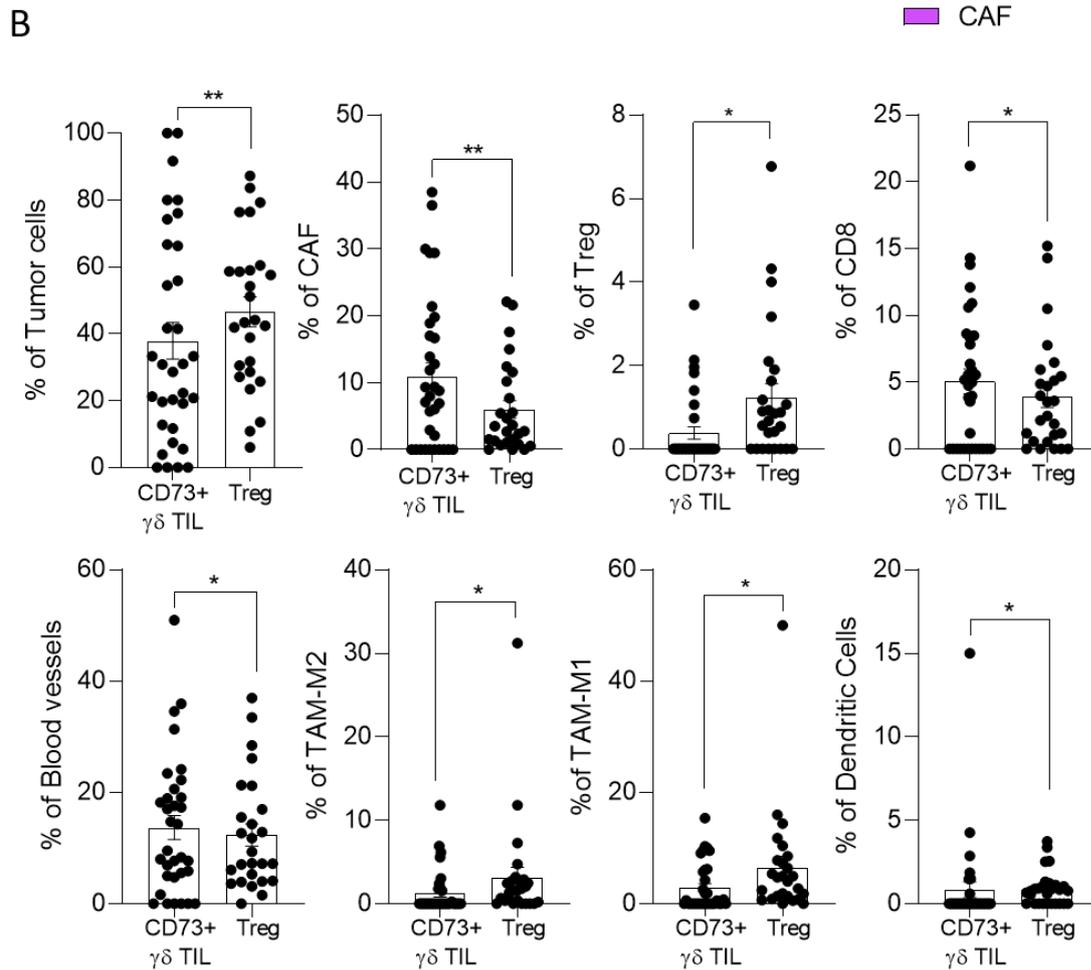
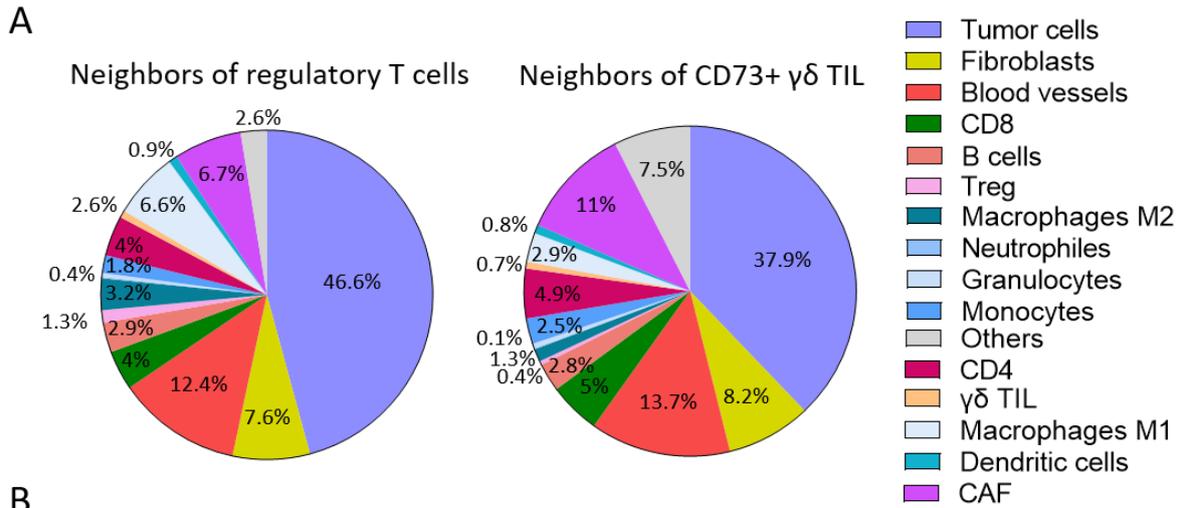


Figure S5. Comparison of CD73+ $\gamma\delta$ TILs and Treg neighbourhood. (A) Pie chart representing the mean value of each identified cell type from the 46 ROI studied (B) Dot plots representing cell population frequencies in contact of CD73+ $\gamma\delta$ TILs and Treg * p < 0.05 ** p < 0.005 (Wilcoxon paired t test).

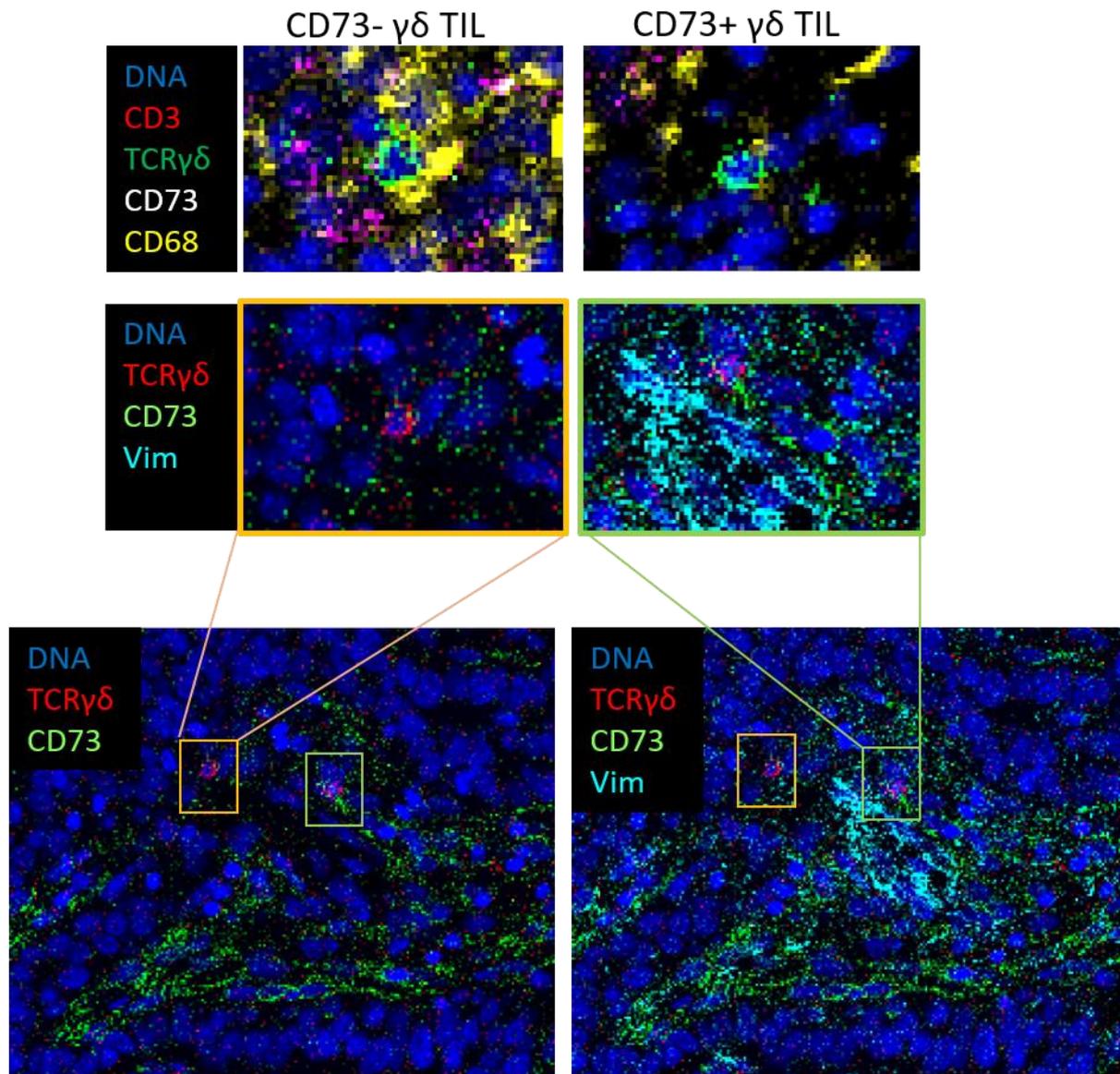
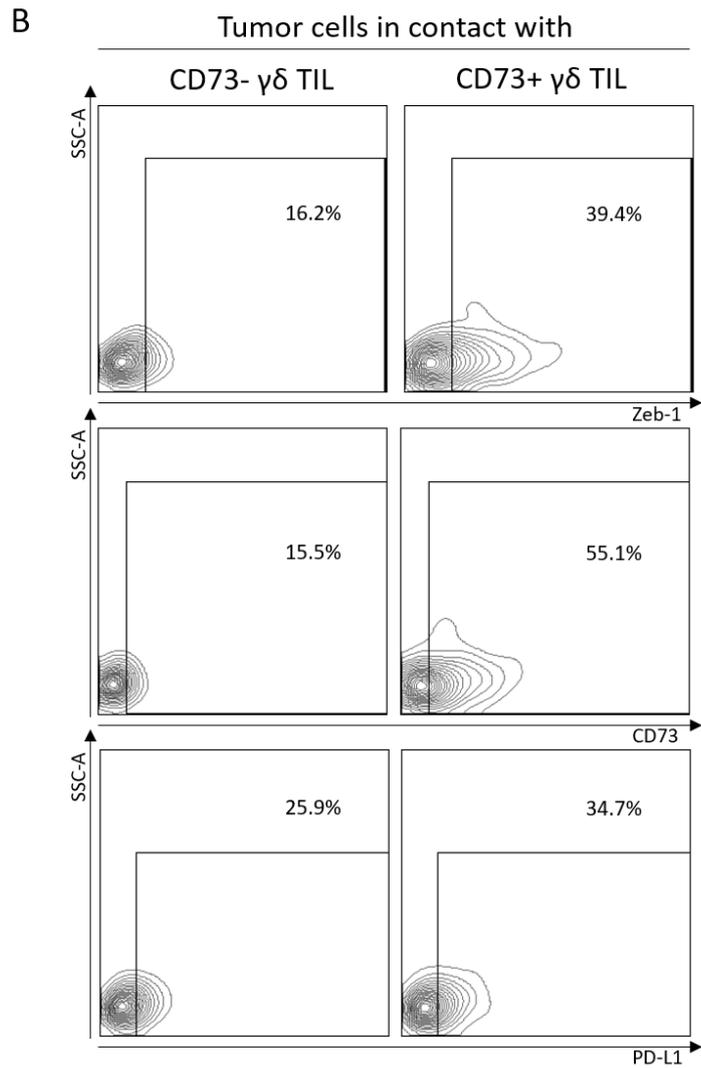
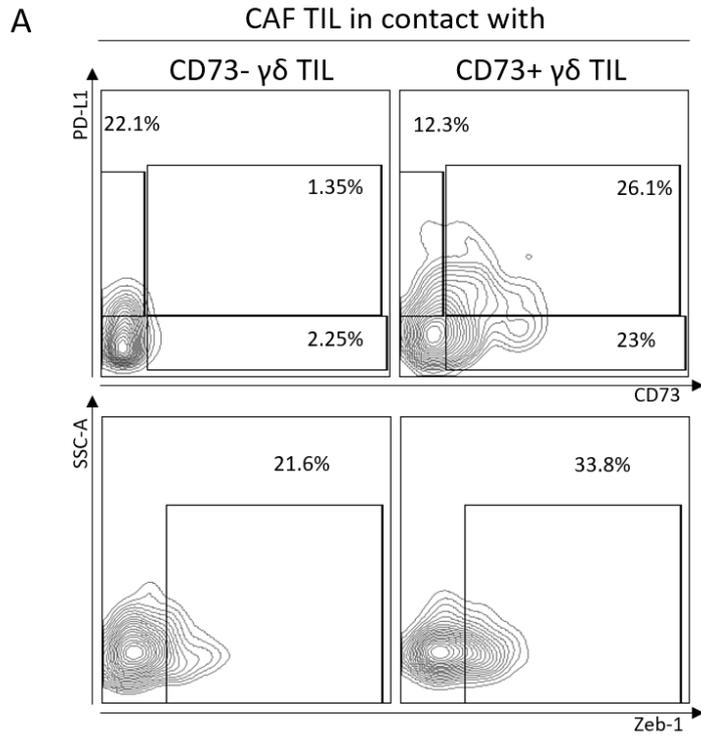


Figure S6. Visual validation of the neighbors. Visualisation according to phenotypic marker expression in the neighbourhood of CD73- (right panels) and CD73+ (left panels) $\gamma\delta$ TILs. Example of macrophages (CD68) and CAF (Vimentine). The orange square is the zoom of a CD73- $\gamma\delta$ TIL and its neighbors. The green square is the zoom of a CD73+ $\gamma\delta$ TIL and its neighbors.



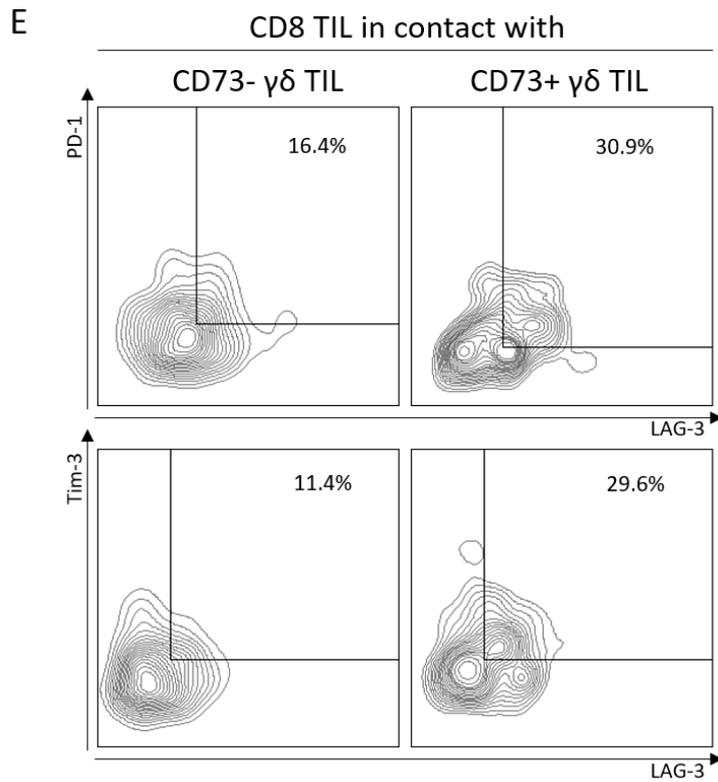
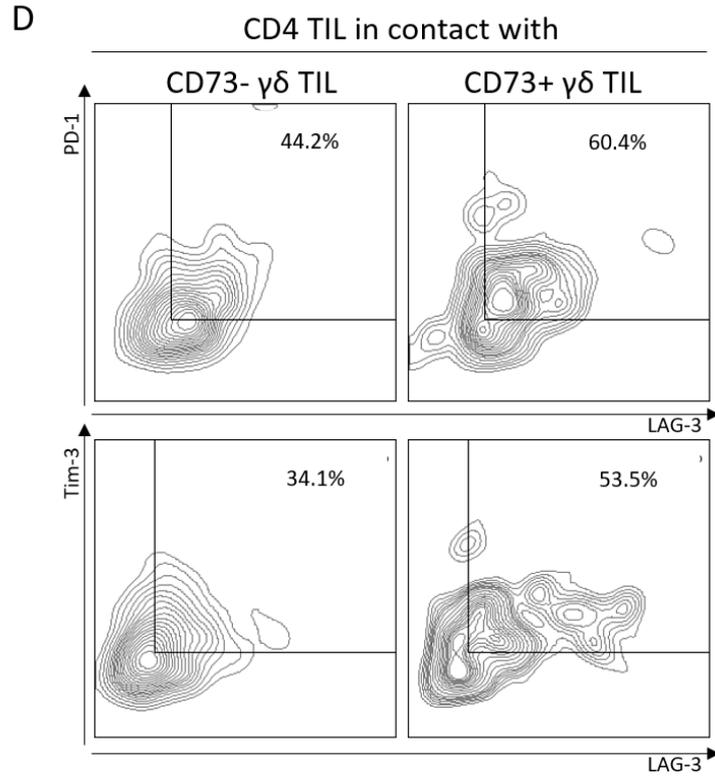


Figure S7. Validation of the phenotype of neighbors of CD73+ and CD73- $\gamma\delta$ TILs using supervised analysis. (A) CAF, (B) Tumor cells, (C) CD4 TILs and (D) CD8 TILs

Parameter	Long-term survivors (n=49)	Short-term survivors (n=49)	Total (n=98)
Median age at surgery (range)	61 (21-77)	62 (32-78)	61 (21-78)
Neoadjuvant treatment			
Yes	8 (16.3%)	8 (16.3%)	16 (16.3%)
No	41 (83.7%)	41 (83.7%)	82 (83.7%)
FIGO stage			
III	43 (87.8%)	41 (83.7%)	84 (85.7%)
IV	6 (12.2%)	8 (16.3%)	14 (14.3%)

Table S1. Main clinicopathological characteristics of ovarian cancer patient

Target	Fluoro	Clone	Supplier
CD3	BV786	SK7	BD
CD45	APC Cy7	2D1	BD
CD73	PE	AD2	BD
D1	PC7	REA173	Miltenyi
D2	BV605	B6	BD
GD	PC5.5	IMMU510	Beckman Coulter
IFN- γ	APC	B27	BD
IL10	BV421	JES3-9D7	BD
IL8	BV510	G265-8	BD
Viability dye	IR885	-	Beckman Coulter

Table S2. List of antibodies used for flow cytometry experiments

Target	Clone	Supplier	Tag
Alpha-SMA	1A4	Fluidigm	141 Pr
anti-Mouse	Polyclonal	Fluidigm	172 Yb
anti-Rabbit	Polyclonal	Fluidigm	175 Lu
CD11b	EPR1344	Fluidigm	149 Sm
CD11c	EP1347Y	Abcam	154 Sm
CD14	EPR3653	Fluidigm	144 Nd
CD15	MMA	Abcam	163 Dy
CD16	EPR16784	Fluidigm	146 Nd
CD163	EDHu-1	Fluidigm	147 Sm
CD20	EP459Y	Abcam	142 Nd
CD208	REA	Miltenyi	160 Gd
CD3	D7A6E	CellSignalling	152Sm
CD31	EPR3094	Fluidigm	151 Eu
CD366/TIM-3	D5D5R	CellSignalling	171 Er
CD39	EPR20627	Abcam	176 Yb
CD4	EPR6855	Fluidigm	156 Gd
CD45	D9M8I	CellSignalling	89Y
CD57	NK1	Abcam	145 Nd
CD66b	REA306	Miltenyi	153 Eu
CD68	KP1	Fluidigm	159 Tb
CD73	D7F9A	CellSignalling	166 Er
CD8a	C8/144B	Fluidigm	162 Dy
Ecadherin	2,40E+11	Fluidigm	158 Gd
FoxP3	263A/E7	Fluidigm	155 Gd
$\gamma\delta$ T cells	H-41	CellSignalling	161 Dy
Granzyme-B	EPR20129-217	Fluidigm	167 Er
HK-TM	HA-137	-	169 Tm
HLA-DR	TAL-1B5	Abcam	174 Yb
Ki-67	B56	Fluidigm	168 Er
Lag3	D2G4O	CellSignalling	164 Dy
Nkp46	195314	R&D	Uncoupled - use of a secondary antibody
Pan CK	AE1/AE3	SantaCruz	148 Nd
PD-1	EH33	CellSignalling	165 Ho
PD-L1	SP142	Abcam	Uncoupled - use of a secondary antibody
Vimentin	D21H3	Fluidigm	143 Nd
Zeb1/2	2A8A6	Novus	170 Er

Table S3. List of antibodies used for imaging by mass cytometry experiment

Discussion

Bien que les LT $\gamma\delta$ offrent des perspectives intéressantes pour des applications cliniques en immunothérapie cellulaire, il est clair que leurs fonctions pro-tumorales doivent être prises en compte. En effet, divers facteurs environnementaux peuvent polariser ou différencier les LT $\gamma\delta$, entraînant une perte de leurs fonctions anti-tumorales. De plus, d'importantes avancées permettant la compréhension de la biologie des LT $\gamma\delta$ ont révélé une grande diversité dans la fonctionnalité et les modes d'activation de ces cellules, donnant un nouveau défi à la communauté scientifique : mieux caractériser et comprendre le rôle des différents sous-types de LT $\gamma\delta$ en fonction du contexte biologique/pathologique dans lequel ces cellules interviennent.

C'est autour de cette question que s'est articulée mon travail de thèse : à savoir la caractérisation du phénotype, des fonctions et de l'écosystème de LT $\gamma\delta$ suppresseurs, population précédemment identifiée par mon équipe.

Dans une étude publiée en 2017, mon équipe a décrit pour la première fois une sous-population de LT V γ 9V δ 2 présentant des fonctions immunosuppressives et caractérisée par l'expression de l'ectonucléotidase CD73¹⁶². En première partie de mon travail de thèse, j'ai identifié une sous-population de LT V δ 1 exprimant CD73 et présentant des fonctions immunosuppressives. Combinés à l'étude précédente de l'équipe, ces résultats montrent que l'IL-21 favorise l'émergence de populations de LT régulatrices $\gamma\delta$ (V γ 9V δ 2 ou V δ 1) caractérisées par l'expression de CD73 et ayant des fonctions régulatrices par la production de molécules immunosuppressives, telles que l'adénosine, l'IL-10 et l'IL-8.

L'ATP et l'adénosine extracellulaires sont parmi les modulateurs les plus puissants des cellules tumorales et des réponses immunitaires dans les tumeurs. Les cellules apoptotiques libèrent de l'ATP qui agit comme un signal majeur pour le recrutement des phagocytes²²⁰, et qui est essentiel pour l'immunogénicité des cellules cancéreuses apoptotiques²²¹. L'ATP extracellulaire favorise le recrutement et la maturation des DC, deux étapes essentielles pour l'amorçage de la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique²²². L'ATP inhibe également la prolifération des cellules tumorales, mais pas des cellules saines, et favorise la mort des cellules cancéreuses²²³. À l'inverse, l'adénosine atténue la réponse immunitaire en bloquant les fonctions des cellules effectrices et en stabilisant les cellules T régulatrices immunosuppressives. Elle inhibe l'activation des DC²²⁴, la production de cytokines Th1/Th2, la prolifération et l'activation des LT¹⁰⁹, l'activation et la cytotoxicité des cellules NK¹¹⁰, et

renforce les fonctions suppressives des Treg²²⁵ et des TAM-M2²²⁶. Ainsi, via leur capacité à produire de l'adénosine, les LT $\gamma\delta$ CD73+ participent à l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur. Ces données apportent une justification moléculaire aux travaux de Hu et al²⁰⁸ qui ont rapporté une importante infiltration de LT $\gamma\delta$ CD39+ dans les tissus tumoraux de CCR et ont mis en évidence leur activité régulatrice via la production d'adénosine sans pour autant avoir analysé l'expression de CD73 par les LT $\gamma\delta$ CD39+. Le niveau élevé d'IL-21 dans le microenvironnement des cancers (en particulier CCR), pourrait favoriser le recrutement et/ou l'amplification des LT $\gamma\delta$ CD73-positifs dans le TME comme nous l'avons montré *in vitro*.

Les LT $\gamma\delta$ CD73+, via leur capacité à produire de l'IL-10, participent aussi à inhiber la réponse anti-tumorale. En effet, IL-10 est fréquemment régulée à la hausse dans le TME de divers types de cancer²²⁷ et affecte de nombreux mécanismes ou acteurs de la réponse anti-tumorale. Elle affecte directement les fonctions des CPA en inhibant l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation, ce qui induit une diminution des fonctions des LT ou une tolérance de ces cellules vis-à-vis des cellules cibles. L'IL-10 inhibe également la production des cytokines Th1 et favorise les fonctions des Treg. En outre, une corrélation directe entre la présence de l'IL-10 dans le cancer du sein et l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales a été démontrée, ce qui suggère qu'en plus de ses fonctions immunosuppressives, l'IL-10 peut favoriser directement la croissance tumorale. Bien que le rôle pro-tumoral de l'IL-10 en tant que facteur immunosuppresseur soit bien documenté, il pourrait également avoir une fonction anti-tumorale dans des contextes spécifiques. Par exemple, dans des modèles murins de tumeurs, l'IL-10 agit comme une cytokine immunostimulante, entraînant la régression de la tumeur et l'inhibition des métastases^{228,229}. Néanmoins, les mécanismes moléculaires de cet effet n'ont pas encore été entièrement caractérisés.

Dans le contexte de mes travaux de recherches, j'ai montré que l'IL-8 fait également partie de l'arsenal immunosuppresseur des LT $\gamma\delta$ CD73+. Elle favorise le développement tumoral en soutenant l'immunosuppression locale via le recrutement des MDSC et des neutrophiles et en favorisant l'angiogenèse, ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales²⁰⁵.

L'un des principaux défis associés à la caractérisation des sous-populations de LT $\gamma\delta$ CD73+ réside dans l'évaluation de leur présence *in vivo* ainsi que de leur pertinence dans les

pathologies humaines, telles que le cancer. Nous avons démontré qu'une forte infiltration de LT $\gamma\delta$ est présente principalement dans les échantillons de cancer du sein de haut grade (chapitre 1 et chapitre 2 des résultats). Ceci est en accord avec de précédentes études montrant que la présence de LT $\gamma\delta$ est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein²⁰⁴. De plus, nous avons constaté que 20% des LT $\gamma\delta$ infiltrant la tumeur expriment CD73, ce qui soutient l'hypothèse de la présence de LT $\gamma\delta$ régulateurs/immunosuppresseurs dans les tumeurs du sein. Nous avons également montré que les LT $\gamma\delta$ CD73+ infiltrant les tumeurs expriment plus d'IL-10 et d'IL8 et de points de contrôles immunitaires (tels que PD-L1, TIGIT et PD-L2) que leurs homologues CD73-. Cela suggère que ces cellules pourraient favoriser le développement tumoral via les mécanismes identifiés *in vitro* et décrits précédemment avec en plus une autre corde à leur arc : les points de contrôles immunitaires. A l'inverse, Wu et ses collègues ont constaté que dans les échantillons de TNBC (non inclus dans la cohorte de tissus frais que nous avons analysée), la présence de LT $\gamma\delta$ est associée à un bon pronostic chez les patientes²³⁰. Ceci suggère qu'en fonction du sous-type de cancer (classification moléculaire différente, présence de diverses mutations, localisation...), la présence de LT $\gamma\delta$ peut être bénéfique ou délétère. De ce fait, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les sous-populations de LT $\gamma\delta$ infiltrants les tissus diffèrent selon les sous-types de cancer du sein et autres types de cancers ; et pour comprendre le rôle de chaque sous-population dans l'évolution des pathologies.

La suite de ma de ma thèse a été focalisé sur l'étude de l'infiltrat T $\gamma\delta$ dans les cancers. Nous avons d'abord étudié l'infiltrat LT $\gamma\delta$ dans 4 cohortes de patients atteints de cancer du sein, colorectal, pancréatique et ovarien. Pour cela, nous avons d'abord validé un nouvel outil pour étudier les LT $\gamma\delta$ sur des coupes de tissus humaines : l'utilisation de l'anticorps H-41 en IHC, un anticorps monoclonal anti-TCR δ . Les résultats obtenus suggèrent que la présence ou le recrutement des LT $\gamma\delta$ dans les tissus dépend du contexte (sain ou pathologique) et de l'organe, et est associée à l'infiltration globale des TIL (Résultats, chapitre 2).

Dans le cancer du sein, la densité des LT $\gamma\delta$ est très hétérogène entre les échantillons de tumeurs, mais est supérieur dans les tumeurs de haut grades suggérant comme d'autres l'ont déjà montré, que la présence de lymphocytes T $\gamma\delta$ est associée à un stade tumoral tardif et à un mauvais pronostic dans le cancer du sein²⁰⁴. De plus, nous avons constaté que la densité des LT $\gamma\delta$ a tendance à être plus élevée dans le TNBC que dans les autres types de cancer du

sein. Les TNBC sont des tumeurs très hétérogènes²³¹⁻²³⁴: certaines sont très agressives et de mauvais pronostic, tandis que d'autres affichent des pronostics similaires ou meilleurs que les cancers du sein à récepteurs hormonaux positifs. Cela suggère que d'autres paramètres doivent intervenir dans le pronostic et la progression du cancer du sein, comme l'environnement immunitaire de la tumeur. Ye et al ont montré que des LT $\gamma\delta$ régulateurs sont présents dans le MET des tumeurs du sein, soutenant l'idée que leur présence dans le microenvironnement tumoral est associée à un mauvais pronostic²³⁵. A l'inverse, Hidalgo et al²³⁶ ont montré la présence de LT $\gamma\delta$ dans le TNBC et suggèrent plutôt un rôle anti-tumoral de cette sous-population de LT, allant dans le sens des observations de Wu et al. Ces études ont été réalisées sur un petit nombre de cas et nous avons donc décidé d'étudier l'impact de l'infiltrat $\gamma\delta$ dans une cohorte plus importante de patientes atteintes de cancer du sein triple négatif. Nous avons étudié les corrélations entre les données clinicopathologiques et l'impact pronostique des TIL, en particulier des $\gamma\delta$ TIL, chez 162 patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (TNBC). Cette étude, dans laquelle je suis second auteure (annexe 3), révèle qu'une densité plus élevée de LT $\gamma\delta$ est significativement associée à un âge plus jeune, à un grade histologique tumoral plus élevé, à une meilleure réponse aux chimiothérapie adjuvante, à la méthylation du promoteur BRCA1, à la densité des TIL et à l'expression de PD-L1 et PD-1. Dans les analyses multivariées, l'infiltration des LT $\gamma\delta$ est un facteur pronostique indépendant de la survie des patientes. Cependant, cet impact pronostique varie en fonction du statut mutationnel tumoral PIK3CA. Une forte infiltration de LT $\gamma\delta$ est associée à une meilleure survie chez les patients présentant des tumeurs non-mutées pour la PIK3CA, et n'impacte pas la survie dans le sous-groupe des tumeurs mutées PIK3CA. Dans l'ensemble, ces données suggèrent qu'un infiltrat élevé de LT $\gamma\delta$ est corrélé à l'infiltration immunitaire et à une meilleure survie des patientes atteintes de TNBC, ce qui est en accord avec les observations d'Hidalgo et al et Wu et al. Mais cela conforte également l'idée selon laquelle l'infiltration de LT $\gamma\delta$ au site tumoral peut être bénéfique ou délétère en fonction des caractéristiques moléculaires et des sous-types de cancers.

La suite des résultats obtenus semble confirmer cette hypothèse puisqu'en fonction du cancer étudié, la densité des LT $\gamma\delta$ varie et leur présence associée ou non à des stades avancés. L'impact des LT $\gamma\delta$ dans le développement du cancer colorectal a montré des effets pro- ou anti-tumoraux en fonction des études et des auteurs. Wu et al ont montré que les LT $\gamma\delta$

participent au maintien de l'inflammation dans le CRC via la production d'IL-17, ce qui favorise le développement tumoral²⁰⁵. A l'inverse, Mikulak et al ont montré que les LT V δ 1 présents dans les tissus de CRC ont de fortes activités cytotoxiques, et que des fréquences plus élevées en LT V δ 1 dans les tissus sains adjacents des tumeurs chez les patients atteints de CRC sont corrélées à un risque plus faible de développer des stades de maladie métastatique III/IV²³⁷. Nos données vont dans le même sens et montrent que la densité des LT $\gamma\delta$ est plus faible dans les échantillons tumoraux comparé à du tissu sain adjacent, et que la densité de LT $\gamma\delta$ est la plus faible dans les échantillons de stade IV et métastatiques par rapport aux échantillons d'adénomes suggérant un rôle bénéfique des LT $\gamma\delta$. Ces données sont en corrélation avec le concept d'Immunoscore, une méthode de classification basée sur la présence et la densité des cellules effectrices, notamment des LT CD8, dans le microenvironnement tumoral. De nombreuses études ont montré que les patients atteints de cancer du côlon et présentant un faible Immunoscore (c'est-à-dire une faible infiltration de LT et de LT CD8 CTL au site tumoral) ont un mauvais pronostic, avec des chances de survie réduites. À l'inverse, les patients présentant des infiltrats immunitaires élevés dans la tumeur (c'est-à-dire un Immunoscore élevé) ont un bon pronostic^{238,239}. L'étude plus poussée des sous-populations de LT $\gamma\delta$ (anti-versus pro-tumorales) et de leurs fonctions dans le cancer colorectal permettrait d'en faire un marqueur renforçant ou complétant l'Immunoscore.

Le cancer du pancréas est une tumeur dont la malignité, la morbidité et la mortalité sont élevées pour plusieurs raisons. Premièrement, son diagnostic est souvent très tardif, les tumeurs sont donc déjà à un stade avancé. Ensuite, le cancer du pancréas présente une faible immunogénicité, en partie due à son faible taux de mutation, ce qui peut expliquer le manque de LT effecteurs infiltrant la tumeur²⁴⁰. En particulier, le nombre de LT CD8, qui est corrélé à une bonne réponse clinique à l'immunothérapie, est significativement plus faible dans les cancers "non immunogènes", comme le cancer du pancréas, par rapport aux cancers "immunogènes", comme le mélanome²⁴¹. De plus, il a souvent été rapporté que les LT effecteurs sont exclus du microenvironnement des tumeurs pancréatiques, notamment grâce au stroma du MET (plus particulièrement les CAF) qui viennent entourer les cellules tumorales et créent une barrière physique empêchant l'infiltration des cellules de l'immunité²⁴²⁻²⁴⁴. En accord avec ces connaissances, nous avons constaté que la densité des LT $\gamma\delta$ est faible dans les échantillons tumoraux, alors qu'elle est beaucoup plus élevée dans les échantillons de

pancréatite épinoïdique, une zone hautement enflammée riche en cellules immunitaires qui peut entourer les tumeurs pancréatiques dans certains cas. Il y a exclusion des cellules immunitaires du MET et elles sont relocalisées dans les zones inflammatoires²⁴⁵. De ce fait, trouver le moyen d'améliorer l'infiltration des cellules immunitaires en intra-tumoral pourrait permettre d'améliorer le pronostic des patients. Cependant, en améliorant l'infiltration des LT $\gamma\delta$, on favorise également l'infiltration de cellules à fonctions pro-tumorales. En effet, dans un modèle de PDAC, Daley et al ont montré que 40% des LT infiltrant les tumeurs sont des LT $\gamma\delta$ et que ceux-ci inhibent la prolifération et les fonctions des LT $\alpha\beta$ par un mécanisme PD-1/PD-L1 dépendant. Il faudrait donc améliorer l'infiltration des cellules immunitaires, tout en excluant ou inhibant les cellules à fonctions immunosuppressives.

Le cancer de l'ovaire est un autre cancer dévastateur pour lequel le diagnostic se fait malheureusement tardivement. La tumeur est en générale à un stade clinique avancé (III/IV) chez plus de 70 % des patientes au diagnostic et plus de 70% des patientes présenteront une rechute, et le taux de survie globale à cinq ans est inférieur à 30%²⁴⁶. Dans notre étude, la densité des LT $\gamma\delta$ est plus élevée dans les échantillons tumoraux (bien qu'hétérogène) par rapport aux échantillons de tissus sains. On observe, bien que cela ne soit qu'une tendance, que la densité de LT $\gamma\delta$ est plus élevée dans les stades avancés du cancer, suggérant que leur présence est plutôt délétère pour les patients. Chen et al ont montré que les LT $\gamma\delta$ infiltrants les tumeurs d'ovaires humaines sont principalement des LT V δ 1 qui présentent une activité cytotoxique réduite et inhibent la prolifération des LT CD4, suggérant que les LT $\gamma\delta$ pourraient avoir des rôles critiques dans la progression du cancer de l'ovaire²⁰⁹. Une critique est quand même à faire sur ce papier, notamment concernant les résultats d'IHC. En effet, les images présentées dans ce papier nous amènent à douter de la qualité du marquage. Les LT $\gamma\delta$ étant des lymphocytes T, ceux-ci doivent normalement avoir une petite taille, ainsi qu'un cytoplasme réduit. Or, sur les images du papier, les cellules présentent un cytoplasme très large et une taille cellulaire supérieure à celle d'un LT classique. En se basant sur ces résultats, nous avons voulu tester l'anticorps utilisé dans cette étude et valider sa spécificité sur des LT V δ 1 purifiés. Les résultats montrent que cet anticorps ne reconnaît pas les LT V δ 1, et nous amène à douter des résultats et conclusions de cette étude.

Ayant à notre disposition une cohorte de patientes atteintes de cancer de l'ovaire ainsi que leurs données cliniques, nous avons évalué l'impact de la densité de LT $\gamma\delta$ CD73+ sur la survie

des patientes. Les résultats obtenus montrent que les patientes présentant une densité intra-tumorale élevée de LT $\gamma\delta$ CD73+ ont une survie globale significativement plus courte que les patientes avec une faible densité de LT $\gamma\delta$ CD73+ suggérant que la fréquence intra-tumorale des LT $\gamma\delta$ CD73+ pourrait être un facteur de mauvais pronostic des cancers de l'ovaire. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (EP20305290 - PCT/EP2021/057050: Method for predicting the survival time of patient suffering from a cancer). En accord avec nos résultats, Hu et al ont montré que la survie globale des patientes atteintes d'un cancer du sein avec une faible densité de LT $\gamma\delta$ CD73+ intra-tumoraux était significativement meilleure que celles qui avaient une densité élevée LT $\gamma\delta$ CD73+. De plus, chez les patientes avec une densité intra-tumorale élevée de LT $\gamma\delta$ CD73+, la présence de LT CD8+ n'est plus associée à un pronostic favorable, alors que chez les patients avec une faible densité de LT $\gamma\delta$ CD73+, la présence de LT CD8+ améliore significativement la survie²⁴⁷. Ces données indiquent que la présence des LT $\gamma\delta$ CD73+ dans le MET impacte l'activité des LT CD8+ et donc leur facteur pronostique renforçant ainsi l'hypothèse principale de ma thèse selon laquelle la présence de LT $\gamma\delta$ CD73+ pourrait être un marqueur très robuste de pronostic défavorable dans les tumeurs solides. Des investigations complémentaires dans divers cancers solides pour valider le caractère pronostique des LT $\gamma\delta$ CD73+ sont nécessaires afin de pouvoir généraliser ces observations à d'autres cancers solides, et peut être proposé un nouvel outil pronostique ou prédictif aux cliniciens pour l'évaluation des patients et leur prise en charge.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à la caractérisation approfondie de ces populations régulatrices (LT $\gamma\delta$ CD73+). Pour cela, nous avons choisi d'analyser leur localisation, distribution et interactions cellulaires (écosystème) au sein du MET en les comparant aux populations LT $\gamma\delta$ effectrices (LT $\gamma\delta$ CD73-). Pour étudier la distribution spatiale et l'écosystème des LT $\gamma\delta$ effecteurs (CD73-) et régulateurs (CD73+), nous avons travaillé en collaboration avec la plateforme d'imagerie par cytométrie de masse (IMC) de notre institut. Cette technique innovante permet d'analyser sur des coupes fixées de tissus 35 marqueurs phénotypiques et fonctionnels en une étape unique grâce à un marquage multiplexé. J'ai concentré mes travaux sur le cancer de l'ovaire pour lequel nous avons démontré la présence de LT $\gamma\delta$ CD73+ fonctionnels dans le MET, ainsi que leur rôle pronostique. Les premières observations m'ont permis de voir que les LT $\gamma\delta$ suppresseurs (CD73+) et les LT $\gamma\delta$ effecteurs (CD73-) ont une répartition spatiale et un écosystème différent. En effet, ces deux populations

ont des partenaires cellulaires différents, avec, par exemple, plus de CAF à proximité des LT $\gamma\delta$ suppresseurs, et plus de cellules immunitaires activées à proximité des LT $\gamma\delta$ effecteurs. La présence des CAF à proximité des LT $\gamma\delta$ CD73+ a particulièrement attiré notre attention du fait que dans leur étude, Hu et al ont montré que, dans le cancer du sein, l'IL-6 produite par les CAF induit l'expression de CD73 par les LT $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs. De plus, ils montrent que ces LT $\gamma\delta$ régulateurs se retrouvent à proximité des CAF et induisent par un mécanisme adénosine dépendant la sécrétion d'IL-6, créant ainsi une boucle de rétroaction positive entre ces deux partenaires. Ceci est d'autant plus intéressant, que les LT $\gamma\delta$ seuls semblent de bon pronostic dans ce type de cancer, mais l'étude de l'impact des LT $\gamma\delta$ CD73+ sur la survie des patients montre que ceux-ci sont de mauvais pronostic. Nos résultats montrent eux aussi une proximité, ou plutôt un contact, entre les LT $\gamma\delta$ CD73+ et les CAF, et un impact de la présence des LT $\gamma\delta$ CD73+ sur la survie des patientes. L'analyse du surnageant de CAF primaires dérivés de tumeurs ovariennes de patientes montre qu'ils produisent de fortes quantités d'IL-6. Ceci suggère que cette boucle de rétroaction décrite dans le cancer du sein est probablement retrouvée dans les cancers ovariens. Cependant, savoir si ce sont les CAF ou les LT $\gamma\delta$ CD73+ qui initient ce processus reste à déterminer. Récemment, Seifert et al ont montré dans le cancer du pancréas que les LT $\gamma\delta$ se positionnent principalement à proximité des cellules pancréatiques étoilées (PSC, *Pancreatic stellate cells*) qui sont des cellules fibroblastes-like²⁴⁸. Ils montrent également par des expériences de co-culture entre des LT $\gamma\delta$ de donneurs sains et des PSC dérivés de patients que les LT $\gamma\delta$ stimulent la production d'IL-6 par les PSC. Ceci nous amène à penser que l'induction de cette boucle de communication entre les LT $\gamma\delta$ CD73+ et les CAFs se fait à l'initiative des LT $\gamma\delta$, mais cela reste à prouver, d'autant plus que dans le microenvironnement tumoral de nombreux autres types cellulaires sont présents, et qu'un potentiel troisième partenaire pourrait également intervenir. L'ensemble de ces résultats laissent penser que ce mécanisme, présenté en figure 26, peut être généralisé à tous les cancers solides, mais des études complémentaires sont nécessaires pour le prouver.

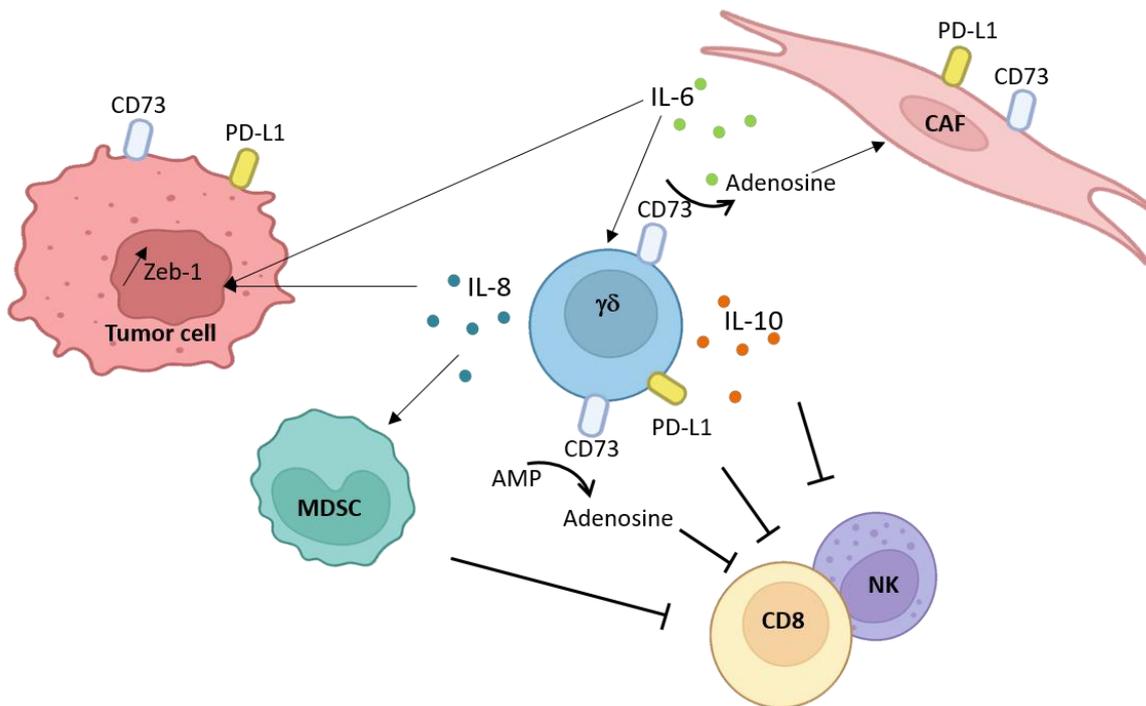


Figure 26 : Mécanismes d'immunosuppression proposé. Via l'expression de PD-L1 et la production de molécules immunosuppressives telles que l'IL-10 et l'adénosine, les LT $\gamma\delta$ CD73+ vont inhiber les fonctions anti-tumorales de diverses cellules effectrices. L'IL-10 peut également impacter et favoriser les fonctions des Treg et autres cellules immunosuppressives. L'IL-8 produite par les LT $\gamma\delta$ CD73+ agit en tant de chimioattractant pour les MDSCs, favorise l'angiogenèse (*non présenté sur ce schéma*), et induit la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales, traduite par l'expression de Zeb1 ici. Enfin, l'adénosine produite par les LT $\gamma\delta$ CD73+ induit la production d'IL-6 par les CAF. L'IL-6 produite agit d'une part sur les LT $\gamma\delta$ en augmentant l'expression de CD73 par ces derniers, et, d'autre part, sur les cellules tumorales en augmentant l'expression de Zeb1 par celles-ci.

L'ensemble de mes travaux de thèse ont permis 1- de mettre en évidence le rôle néfaste que peuvent avoir les LT $\gamma\delta$ dans les cancers solides et 2- d'identifier les mécanismes impliqués dans cette fonction pro-tumorale. L'ensemble de mes travaux auront un impact aussi bien du point de la recherche fondamentale que translationnelle et clinique. En effet, ces résultats apportent une meilleure compréhension de la biologie et du rôle des LT $\gamma\delta$ humains au cours du développement du cancer, avec notamment la caractérisation approfondie d'une nouvelle sous-population LT $\gamma\delta$ régulatrice, sa localisation et ses fonctions au sein du MET. Ils apportent également un potentiel nouvel outil pour les cliniciens avec l'utilisation des LT $\gamma\delta$ régulateurs

comme marqueur pronostique des cancers solides permettant une meilleure prise en charge des patients.

Compléter la caractérisation de ces populations par l'étude des voies métaboliques utilisées par les LT $\gamma\delta$ est particulièrement pertinente puisqu'il est maintenant établi que le métabolisme des cellules cancéreuses est modifié conduisant à un MET appauvri en métabolites énergétiques (appauvrissement en glucose), hypoxie (peu d'oxygène) et acide (présence de lactate), impactant ainsi leur environnement. En effet, une compétition pour le glucose entre les cellules tumorales et les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) se met en place et influence la progression du cancer en impactant les fonctions des TILs effecteurs²⁴⁹. Alors que les lymphocytes T effecteurs anti-tumoraux utilisent la glycolyse aérobie avec une consommation massive de glucose pour générer leurs fonctions effectrices telles que la production de cytokines, les lymphocytes T régulateurs se servent de la phosphorylation oxydative mitochondriale, voie métabolique consommant moins de molécules de glucose, pour soutenir leur survie, leur différenciation et leurs fonctions²⁵⁰. Ces données suggèrent que le programme métabolique des LT $\gamma\delta$ pourrait dépendre de leur différenciation en lymphocytes effecteurs (CD73-) ou régulateurs (CD73+). Au vu de la difficulté à isoler les LT $\gamma\delta$ intra-tumoraux et leur faible nombre, l'utilisation de techniques classiques d'analyses du métabolisme tel que le Seahorse ne sont pas envisageables. Cependant, de nouvelles techniques ont été développées ces dernières années afin d'étudier le programme métabolique au niveau de la cellule unique par des analyses en cytométrie en flux (méthode SCENITH développée par le Dr Rafael Arguello, CIML)²⁵¹, ce qui nous permettrait d'étudier les voies métaboliques utilisées par les LT $\gamma\delta$ CD73- et CD73+ présents dans le TME. Continuer le projet dans cette direction pourrait apporter de précieuses et nouvelles informations.

Pour aller plus loin dans l'étude des lymphocytes T $\gamma\delta$ effecteurs et régulateurs et de leurs écosystèmes, nous pourrions également réaliser une analyse transcriptomique spatiale, à savoir étudier les ARN exprimés par des régions tumorales sélectionnées pour la présence de lymphocytes T $\gamma\delta$ CD73- ou CD73+ par l'une des nouvelles technologies permettant de faire du *single-cell spatial transcriptomics*. Ceci permettrait de mieux définir les caractéristiques moléculaires des cellules tumorales (et autres cellules du MET) au contact des LT $\gamma\delta$ cytotoxiques ou régulateurs et d'identifier des molécules ou des marqueurs spécifiques exprimés par les cellules tumorales qui pourraient être impliqués dans l'évasion immunitaire

et/ou la résistance aux thérapies anticancéreuses. De plus, l'analyse des profils transcriptomiques des populations de LT $\gamma\delta$ pro-tumoraux pourrait permettre l'identification de signatures spécifiques utilisables comme marqueurs pronostiques dans l'évolution de la maladie ou prédictifs de la réponse au traitement.

Une meilleure connaissance des caractéristiques et propriétés des LT $\gamma\delta$ régulateurs pourrait également être très intéressante dans d'autres contextes pathologiques et apporter potentiellement de nouvelles pistes de traitements, notamment dans le cas des maladies auto-immunes. En effet, le potentiel immunosuppresseur des LT $\gamma\delta$ CD73+ pourrait être extrêmement bénéfique, de la même manière que les LT $\gamma\delta$ 17 sont délétères dans le cancer et les maladies auto-immunes, mais bénéfiques dans la lutte anti-infectieuse^{214,252-254}. La prévalence des maladies auto-immunes dans la population générale est estimée entre 3 et 5 %²⁵⁵. Parmi celles-ci, près de la moitié sont des maladies rhumatismales auto-immunes. Ce groupe d'affections inflammatoires chroniques entraîne souvent une morbidité à vie et une mortalité précoce. Les thérapies actuellement disponibles sont loin d'être satisfaisantes, car elles ne sont que partiellement efficaces et ne guérissent aucune de ces maladies bien qu'atténuant certains de leurs symptômes. De plus, les nouvelles approches thérapeutiques biologiques, y compris l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour le traitement des maladies auto-immunes, sont largement basées sur une immunosuppression non spécifique entraînant des effets secondaires importants qui ne peuvent susciter un environnement suppressif durable. De ce fait, l'utilisation d'une thérapie cellulaire basée sur le transfert adoptif de LT $\gamma\delta$ CD73+ serait bénéfique, d'autant plus que la non-toxicité de ces transferts a déjà été prouvée dans le cadre d'études sur le cancer.

Bibliographie

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
2. World Health Organization. GLOBOCAN. (2020).
3. Dinmohamed, A. G. *et al.* Fewer cancer diagnoses during the COVID-19 epidemic in the Netherlands. *Lancet Oncol* **21**, 750–751 (2020).
4. Kutikov, A. *et al.* A War on Two Fronts: Cancer Care in the Time of COVID-19. *Ann Intern Med* **172**, 756–758 (2020).
5. National Cancer Institute's PROSPR Consortium *et al.* Cancer Screening During the Coronavirus Disease-2019 Pandemic: A Perspective From the National Cancer Institute's PROSPR Consortium. *Gastroenterology* **160**, 999–1002 (2021).
6. Maringe, C. *et al.* The impact of the COVID-19 pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: a national, population-based, modelling study. *Lancet Oncol* **21**, 1023–1034 (2020).
7. Cussenot, O. & Cancel-Tassin, G. Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate. *Med Sci (Paris)* **20**, 562–568 (2004).
8. Bray, F. & Soerjomataram, I. The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control. in *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)* (eds. Gelband, H., Jha, P., Sankaranarayanan, R. & Horton, S.) (The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, 2015).
9. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
10. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
11. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).

12. Frankel, A. E. *et al.* Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia* **19**, 848–855 (2017).
13. Davar, D. *et al.* Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science* **371**, 595–602 (2021).
14. Kaur, A. *et al.* Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discov* **9**, 64–81 (2019).
15. Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J. & Werb, Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun* **11**, 5120 (2020).
16. Sahai, E. *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* **20**, 174–186 (2020).
17. Arina, A. *et al.* Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 7551–7556 (2016).
18. Peng, D., Fu, M., Wang, M., Wei, Y. & Wei, X. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer* **21**, 104 (2022).
19. Yoon, H. *et al.* TGF- β 1-mediated transition of resident fibroblasts to cancer-associated fibroblasts promotes cancer metastasis in gastrointestinal stromal tumor. *Oncogenesis* **10**, 13 (2021).
20. Niu, N., Yao, J., Bast, R. C., Sood, A. K. & Liu, J. IL-6 promotes drug resistance through formation of polyploid giant cancer cells and stromal fibroblast reprogramming. *Oncogenesis* **10**, 65 (2021).
21. Astin, J. W. *et al.* Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat Cell Biol* **12**, 1194–1204 (2010).

22. De Francesco, E. M. *et al.* HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Res* **15**, R64 (2013).
23. Costa, A. *et al.* Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **33**, 463-479.e10 (2018).
24. St Croix, B. *et al.* Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* **289**, 1197–1202 (2000).
25. Goveia, J. *et al.* An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates. *Cancer Cell* **37**, 421 (2020).
26. Hida, K., Ohga, N., Akiyama, K., Maishi, N. & Hida, Y. Heterogeneity of tumor endothelial cells. *Cancer Sci* **104**, 1391–1395 (2013).
27. Ohga, N. *et al.* Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol* **180**, 1294–1307 (2012).
28. Georganaki, M., van Hooren, L. & Dimberg, A. Vascular Targeting to Increase the Efficiency of Immune Checkpoint Blockade in Cancer. *Front Immunol* **9**, 3081 (2018).
29. Shih, T. & Lindley, C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* **28**, 1779–1802 (2006).
30. Fallah, A. *et al.* Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **110**, 775–785 (2019).
31. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 11–22 (2004).

32. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
33. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**, 329–360 (2004).
34. Burnet, M. *Cancer—A Biological Approach*. (1957).
35. Thomas L. In *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. 529–532 (1959).
36. Hernandez, C., Huebener, P. & Schwabe, R. F. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* **35**, 5931–5941 (2016).
37. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* **6**, 715–727 (2006).
38. Bhatia, A. & Kumar, Y. Cancer Immunoediting: Immunosurveillance, Immune Equilibrium, and Immune Escape. in *Cancer Immunology* (ed. Rezaei, N.) 195–208 (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-662-44006-3_12.
39. O’Donnell, J. S., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 151–167 (2019).
40. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway’s immunobiology*. (Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, 2016).
41. Zilionis, R. *et al.* Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* **50**, 1317-1334.e10 (2019).
42. Barry, K. C. *et al.* A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat Med* **24**, 1178–1191 (2018).

43. Böttcher, J. P. *et al.* NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* **172**, 1022-1037.e14 (2018).
44. Binnewies, M. *et al.* Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4(+) T Cell Immunity. *Cell* **177**, 556-571.e16 (2019).
45. Human dendritic cells in cancer. *SCIENCE IMMUNOLOGY* **13** (2022).
46. Bourdely, P. *et al.* Transcriptional and Functional Analysis of CD1c(+) Human Dendritic Cells Identifies a CD163(+) Subset Priming CD8(+)CD103(+) T Cells. *Immunity* **53**, 335-352.e8 (2020).
47. Poli, A. *et al.* CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* **126**, 458–465 (2009).
48. Dalle, J.-H. *et al.* Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res* **57**, 649–655 (2005).
49. Liu, S. *et al.* NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol* **14**, 7 (2021).
50. Molgora, M., Cortez, V. S. & Colonna, M. Killing the Invaders: NK Cell Impact in Tumors and Anti-Tumor Therapy. *Cancers* **13**, 595 (2021).
51. Karmakar, S., Pal, P. & Lal, G. Key Activating and Inhibitory Ligands Involved in the Mobilization of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapies. *ITT Volume* **10**, 387–407 (2021).
52. Prager, I. & Watzl, C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol* **105**, 1319–1329 (2019).
53. Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S. & Sondel, P. M. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **6**, 368 (2015).

54. Zhang, J., Zheng, H. & Diao, Y. Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **20**, 317 (2019).
55. Wang, F., Lau, J. K. C. & Yu, J. The role of natural killer cell in gastrointestinal cancer: killer or helper. *Oncogene* **40**, 717–730 (2021).
56. ChÃ¡vez-GalÃ¡n, L., Olleros, M. L., Vesin, D. & Garcia, I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
57. Liu, J., Geng, X., Hou, J. & Wu, G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int* **21**, 389 (2021).
58. Giese, M. A., Hind, L. E. & Huttenlocher, A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood* **133**, 2159–2167 (2019).
59. Sun, B. *et al.* Neutrophil Suppresses Tumor Cell Proliferation via Fas /Fas Ligand Pathway Mediated Cell Cycle Arrested. *Int J Biol Sci* **14**, 2103–2113 (2018).
60. Syed Mortadza, S. A., Wang, L., Li, D. & Jiang, L.-H. TRPM2 Channel-Mediated ROS-Sensitive Ca²⁺ Signaling Mechanisms in Immune Cells. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
61. Laumont, C. M., Banville, A. C., Gilardi, M., Hollern, D. P. & Nelson, B. H. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **22**, 414–430 (2022).
62. Tang, J. *et al.* B Cells and Tertiary Lymphoid Structures Influence Survival in Lung Cancer Patients with Resectable Tumors. *Cancers (Basel)* **12**, E2644 (2020).
63. Garaud, S. *et al.* Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI Insight* **5**, 129641 (2019).
64. VÃ¤yrynen, J. P. *et al.* Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer* **134**, 2126–2135 (2014).

65. Petitprez, F. *et al.* B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* **577**, 556–560 (2020).
66. Cabrita, R. *et al.* Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* **577**, 561–565 (2020).
67. Kinker, G. S. *et al.* B Cell Orchestration of Anti-tumor Immune Responses: A Matter of Cell Localization and Communication. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 678127 (2021).
68. Boyerinas, B. *et al.* Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. *Cancer Immunol Res* **3**, 1148–1157 (2015).
69. Gilbert, A. E. *et al.* Monitoring the systemic human memory B cell compartment of melanoma patients for anti-tumor IgG antibodies. *PLoS One* **6**, e19330 (2011).
70. Basu, A. *et al.* Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **12**, 669474 (2021).
71. Richardson, J. R., Schöllhorn, A., Gouttefangeas, C. & Schuhmacher, J. CD4+ T Cells: Multitasking Cells in the Duty of Cancer Immunotherapy. *Cancers* **13**, 596 (2021).
72. Geginat, J. *et al.* Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol* **5**, 630 (2014).
73. Chabab, G., Bonnefoy, N. & Lafont, V. IL-21 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1240**, 73–82 (2020).
74. Cachot, A. *et al.* Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Sci. Adv.* **7**, eabe3348 (2021).
75. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P. & Gögenur, I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* **124**, 359–367 (2021).
76. van der Leun, A. M., Thommen, D. S. & Schumacher, T. N. CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer* **20**, 218–232 (2020).

77. Mishalian, I., Granot, Z. & Fridlender, Z. G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology* **222**, 82–88 (2017).
78. Veglia, F., Sanseviero, E. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol* **21**, 485–498 (2021).
79. Hao, Z. *et al.* Landscape of Myeloid-derived Suppressor Cell in Tumor Immunotherapy. *Biomark Res* **9**, 77 (2021).
80. Elliott, L. A., Doherty, G. A., Sheahan, K. & Ryan, E. J. Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
81. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* **21**, 938–945 (2015).
82. Gimeno, R. & Barquintero, J. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Inmunología* **30**, 45–53 (2011).
83. Grzywa, T. M. *et al.* Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. *Front. Immunol.* **11**, 938 (2020).
84. Masucci, M. T., Minopoli, M. & Carriero, M. V. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front. Oncol.* **9**, 1146 (2019).
85. Togashi, Y., Shitara, K. & Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 356–371 (2019).
86. Li, Z. *et al.* Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Res* **68**, 8687–8694 (2008).
87. Jiang, R. *et al.* IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer* **13**, 59 (2013).

88. Kobold, S. *et al.* Interleukin-22 is frequently expressed in small- and large-cell lung cancer and promotes growth in chemotherapy-resistant cancer cells. *J Thorac Oncol* **8**, 1032–1042 (2013).
89. Wang, T. *et al.* Elevated Th22 cells and related cytokines in patients with epithelial ovarian cancer. *Medicine (Baltimore)* **96**, e8359 (2017).
90. Yao, Y. *et al.* Th22 Cells/IL-22 Serves as a Protumor Regulator to Drive Poor Prognosis through the JAK-STAT3/MAPK/AKT Signaling Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Immunol Res* **2022**, 8071234 (2022).
91. Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* **3**, 944–950 (2002).
92. Yoshizaki, A. *et al.* Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* **491**, 264–268 (2012).
93. Rosser, E. C. *et al.* Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat Med* **20**, 1334–1339 (2014).
94. Menon, M., Blair, P. A., Isenberg, D. A. & Mauri, C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* **44**, 683–697 (2016).
95. Dambuza, I. M. *et al.* IL-12p35 induces expansion of IL-10 and IL-35-expressing regulatory B cells and ameliorates autoimmune disease. *Nat Commun* **8**, 719 (2017).
96. Iwata, Y. *et al.* Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* **117**, 530–541 (2011).
97. Matsumoto, M. *et al.* Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* **41**, 1040–1051 (2014).

98. Zhou, X., Su, Y.-X., Lao, X.-M., Liang, Y.-J. & Liao, G.-Q. CD19(+)IL-10(+) regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4(+) T cells to CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Oral Oncol* **53**, 27–35 (2016).
99. Spary, L. K. *et al.* Tumor stroma-derived factors skew monocyte to dendritic cell differentiation toward a suppressive CD14+ PD-L1+ phenotype in prostate cancer. *Oncoimmunology* **3**, e955331 (2014).
100. Aspod, C., Leccia, M.-T., Charles, J. & Plumas, J. Plasmacytoid Dendritic Cells Support Melanoma Progression by Promoting Th2 and Regulatory Immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer Immunology Research* **1**, 402–415 (2013).
101. Zhou, B., Lawrence, T. & Liang, Y. The Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Cancers. *Front. Immunol.* **12**, 749190 (2021).
102. Lapeyre-Prost, A. *et al.* Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 330 295–342 (Elsevier, 2017).
103. Tamura, R. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in the hypoxic and immunosuppressive tumor microenvironment: perspectives for therapeutic implications. *Med Oncol* **37**, 2 (2020).
104. Yang, L., Pang, Y. & Moses, H. L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* **31**, 220–227 (2010).
105. Niu, F. *et al.* Arginase: An emerging and promising therapeutic target for cancer treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **149**, 112840 (2022).
106. Meireson, A., Devos, M. & Brochez, L. IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? *Front. Immunol.* **11**, 531491 (2020).
107. Allard, B., Allard, D., Buisseret, L. & Stagg, J. The adenosine pathway in immunology. *Nat Rev Clin Oncol* **17**, 611–629 (2020).

108. Gros, L. *et al.* Une nouvelle génération d'immunothérapies ciblant la voie CD39/CD73/adénosine pour favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale. *Med Sci (Paris)* **36**, 112–115 (2020).
109. Zarek, P. E. *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **111**, 251–259 (2008).
110. Cekic, C., Day, Y.-J., Sag, D. & Linden, J. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res* **74**, 7250–7259 (2014).
111. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252–264 (2012).
112. Nirschl, C. J. & Drake, C. G. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **19**, 4917–4924 (2013).
113. Han, Y., Liu, D. & Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* **10**, 727–742 (2020).
114. Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* **20**, 651–668 (2020).
115. Manieri, N. A., Chiang, E. Y. & Grogan, J. L. TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends Immunol* **38**, 20–28 (2017).
116. Acharya, N., Sabatos-Peyton, C. & Anderson, A. C. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape. *J Immunother Cancer* **8**, e000911 (2020).
117. Chocarro, L. *et al.* Understanding LAG-3 Signaling. *IJMS* **22**, 5282 (2021).
118. Grosso, J. F. *et al.* LAG-3 regulates CD8⁺ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest* **117**, 3383–3392 (2007).

119. Qin, S. *et al.* Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer* **18**, 155 (2019).
120. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* **13**, 88–100 (2013).
121. Kabelitz, D. $\gamma\delta$ T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2331–2333 (2011).
122. Qi, C., Wang, Y., Li, P. & Zhao, J. Gamma Delta T Cells and Their Pathogenic Role in Psoriasis. *Front. Immunol.* **12**, 627139 (2021).
123. Kalyan, S. & Kabelitz, D. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol* **10**, 21–29 (2013).
124. Pellicci, D. G., Koay, H.-F. & Berzins, S. P. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge. *Nat Rev Immunol* **20**, 756–770 (2020).
125. Legut, M., Cole, D. K. & Sewell, A. K. The promise of $\gamma\delta$ T cells and the $\gamma\delta$ T cell receptor for cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* **12**, 656–668 (2015).
126. Adams, E. J., Gu, S. & Luoma, A. M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cell Immunol* **296**, 31–40 (2015).
127. Willcox, B. E. & Willcox, C. R. $\gamma\delta$ TCR ligands: the quest to solve a 500-million-year-old mystery. *Nat Immunol* **20**, 121–128 (2019).
128. Jomaa, H. *et al.* Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**, 1573–1576 (1999).
129. Gober, H.-J. *et al.* Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* **197**, 163–168 (2003).
130. Kunzmann, V., Bauer, E. & Wilhelm, M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* **340**, 737–738 (1999).

131. Kondo, M. *et al.* Expansion of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells using zoledronate. *J Vis Exp* 3182 (2011) doi:10.3791/3182.
132. Coppens, I. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat Rev Microbiol* **11**, 823–835 (2013).
133. Redwan, E. M., Al-Hejin, A. M., Almehdar, H. A., Elsaway, A. M. & Uversky, V. N. Prediction of Disordered Regions and Their Roles in the Anti-Pathogenic and Immunomodulatory Functions of Butyrophilins. *Molecules* **23**, E328 (2018).
134. Sandstrom, A. *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* **40**, 490–500 (2014).
135. Rigau, M. *et al.* Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells. *Science* **367**, eaay5516 (2020).
136. Karunakaran, M. M. *et al.* Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity* **52**, 487-498.e6 (2020).
137. Cano, C. E. *et al.* BTN2A1, an immune checkpoint targeting V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity against malignant cells. *Cell Rep* **36**, 109359 (2021).
138. Vyborova, A. *et al.* $\gamma\delta$ 2T cell diversity and the receptor interface with tumor cells. *J Clin Invest* **130**, 4637–4651 (2020).
139. Scotet, E. *et al.* Tumor recognition following V γ 9V δ 2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* **22**, 71–80 (2005).
140. Zeng, X. *et al.* $\gamma\delta$ T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity* **37**, 524–534 (2012).

141. Kabelitz, D., Serrano, R., Kouakanou, L., Peters, C. & Kalyan, S. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cell Mol Immunol* **17**, 925–939 (2020).
142. Déchanet, J. *et al.* Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* **103**, 1437–1449 (1999).
143. Kaminski, H. *et al.* Characterization of a Unique $\gamma\delta$ T-Cell Subset as a Specific Marker of Cytomegalovirus Infection Severity. *J Infect Dis* **223**, 655–666 (2021).
144. Kierkels, G. J. J. *et al.* Identification of a tumor-specific allo-HLA-restricted $\gamma\delta$ TCR. *Blood Adv* **3**, 2870–2882 (2019).
145. Benveniste, P. M. *et al.* Generation and molecular recognition of melanoma-associated antigen-specific human $\gamma\delta$ T cells. *Sci Immunol* **3**, eaav4036 (2018).
146. Russano, A. M. *et al.* CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta+ T lymphocytes. *J Immunol* **178**, 3620–3626 (2007).
147. Bai, L. *et al.* The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant V δ 1 TCR. *Eur J Immunol* **42**, 2505–2510 (2012).
148. Mangan, B. A. *et al.* Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human V δ 3 T cells. *J Immunol* **191**, 30–34 (2013).
149. Marlin, R. *et al.* Sensing of cell stress by human $\gamma\delta$ TCR-dependent recognition of annexin A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3163–3168 (2017).
150. Harly, C. *et al.* Human $\gamma\delta$ T cell sensing of AMPK-dependent metabolic tumor reprogramming through TCR recognition of EphA2. *Sci Immunol* **6**, eaba9010 (2021).
151. Bessoles, S., Ni, M., Garcia-Jimenez, S., Sanchez, F. & Lafont, V. Role of NKG2D and its ligands in the anti-infectious activity of V γ 9V δ 2 T cells against intracellular bacteria. *Eur J Immunol* **41**, 1619–1628 (2011).

152. Lafont, V. *et al.* Specific Signaling Pathways Triggered by IL-2 in Human V γ 9V δ 2 T Cells: An Amalgamation of NK and $\alpha\beta$ T Cell Signaling. *J Immunol* **171**, 5225–5232 (2003).
153. Wrobel, P. *et al.* Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol* **66**, 320–328 (2007).
154. Poccia, F. *et al.* CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. *J Immunol* **159**, 6009–6017 (1997).
155. Correia, D. V. *et al.* Differentiation of human peripheral blood V δ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood* **118**, 992–1001 (2011).
156. von Lilienfeld-Toal, M. *et al.* Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. *Clin Exp Immunol* **144**, 528–533 (2006).
157. Wesch, D., Peters, C., Oberg, H.-H., Pietschmann, K. & Kabelitz, D. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2357–2370 (2011).
158. Lafont, V. *et al.* Plasticity of $\gamma\delta$ T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Front Immunol* **5**, 622 (2014).
159. Dunne, M. R., Mangan, B. A., Madrigal-Estebas, L. & Doherty, D. G. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human V γ 9V δ 2 T cells. *Mediators Inflamm* **2010**, 704941 (2010).
160. Wesch, D., Glatzel, A. & Kabelitz, D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol* **212**, 110–117 (2001).

161. Joalland, N. *et al.* IL-21 Increases the Reactivity of Allogeneic Human V γ 9V δ 2 T Cells Against Primary Glioblastoma Tumors. *J Immunother* **41**, 224–231 (2018).
162. Barjon, C. *et al.* IL-21 promotes the development of a CD73-positive V γ 9V δ 2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology* **7**, e1379642 (2017).
163. Chabab, G. *et al.* Identification of a regulatory V δ 1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J Leukoc Biol* **107**, 1057–1067 (2020).
164. Tosolini, M. *et al.* Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology* **6**, e1284723 (2017).
165. Dudal, S. *et al.* Release of LL-37 by Activated Human V γ 9V δ 2 T Cells: A Microbicidal Weapon against *Brucella suis*. *J Immunol* **177**, 5533–5539 (2006).
166. Liautard, J. *et al.* Identification and Isolation of *Brucella suis* Virulence Genes Involved in Resistance to the Human Innate Immune System. *Infect Immun* **75**, 5167–5174 (2007).
167. Hiromatsu, K. *et al.* A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *J Exp Med* **175**, 49–56 (1992).
168. Dhar, S. & Chiplunkar, S. V. Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells by V γ 9V δ 2 T cells. *Cancer Immun* **10**, 10 (2010).
169. Viey, E. *et al.* Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* **174**, 1338–1347 (2005).
170. Todaro, M. *et al.* Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J Immunol* **182**, 7287–7296 (2009).
171. Knight, A., Mackinnon, S. & Lowdell, M. W. Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells. *Cytotherapy* **14**, 1110–1118 (2012).

172. Siegers, G. M. *et al.* Human V δ 1 $\gamma\delta$ T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. *Cytotherapy* **13**, 753–764 (2011).
173. Tokuyama, H. *et al.* V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. *Int J Cancer* **122**, 2526–2534 (2008).
174. Brandes, M., Willimann, K. & Moser, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* **309**, 264–268 (2005).
175. Moser, B. & Brandes, M. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol* **27**, 112–118 (2006).
176. Brandes, M. *et al.* Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2307–2312 (2009).
177. Himoudi, N. *et al.* Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol* **188**, 1708–1716 (2012).
178. Ismaili, J., Orlslagers, V., Poupot, R., Fournié, J.-J. & Goldman, M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol* **103**, 296–302 (2002).
179. Petrasca, A. & Doherty, D. G. Human V δ 2(+) $\gamma\delta$ T Cells Differentially Induce Maturation, Cytokine Production, and Alloreactive T Cell Stimulation by Dendritic Cells and B Cells. *Front Immunol* **5**, 650 (2014).
180. Münz, C., Steinman, R. M. & Fujii, S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* **202**, 203–207 (2005).
181. Leslie, D. S. *et al.* CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* **196**, 1575–1584 (2002).

182. Maniar, A. *et al.* Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood* **116**, 1726–1733 (2010).
183. Born, W. K. *et al.* $\gamma\delta$ T Cells and B Cells. *Adv Immunol* **134**, 1–45 (2017).
184. Park, J. H. & Lee, H. K. Function of $\gamma\delta$ T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. *Exp Mol Med* **53**, 318–327 (2021).
185. Wilhelm, M. *et al.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* **102**, 200–206 (2003).
186. Dieli, F. *et al.* Targeting human $\{\gamma\delta\}$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* **67**, 7450–7457 (2007).
187. Kobayashi, H. *et al.* Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 469–476 (2007).
188. Kobayashi, H., Tanaka, Y., Yagi, J., Minato, N. & Tanabe, K. Phase I/II study of adoptive transfer of $\gamma\delta$ T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **60**, 1075–1084 (2011).
189. Wilhelm, M. *et al.* Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical $\gamma\delta$ T cells. *J Transl Med* **12**, 45 (2014).
190. Alnaggar, M. *et al.* Allogenic V γ 9V δ 2 T cell as new potential immunotherapy drug for solid tumor: a case study for cholangiocarcinoma. *J Immunother Cancer* **7**, 36 (2019).
191. Lin, M. *et al.* Irreversible electroporation plus allogenic V γ 9V δ 2 T cells enhances antitumor effect for locally advanced pancreatic cancer patients. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 215 (2020).

192. Almeida, A. R. *et al.* Delta One T Cells for Immunotherapy of Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical-Grade Expansion/Differentiation and Preclinical Proof of Concept. *Clinical Cancer Research* **22**, 5795–5804 (2016).
193. Catros, V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux. *Med Sci (Paris)* **35**, 316–326 (2019).
194. Rozenbaum, M. *et al.* Gamma-Delta CAR-T Cells Show CAR-Directed and Independent Activity Against Leukemia. *Front Immunol* **11**, 1347 (2020).
195. Saura-Esteller, J. *et al.* Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future. *Front. Immunol.* **13**, 915837 (2022).
196. Makkouk, A. *et al.* Off-the-shelf V δ 1 gamma delta T cells engineered with glypican-3 (GPC-3)-specific chimeric antigen receptor (CAR) and soluble IL-15 display robust antitumor efficacy against hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer* **9**, e003441 (2021).
197. Neelapu, S. S. *et al.* A phase 1 study of ADI-001: Anti-CD20 CAR-engineered allogeneic gamma delta ($\gamma\delta$) T cells in adults with B-cell malignancies. *JCO* **40**, 7509–7509 (2022).
198. De Gassart, A. *et al.* Development of ICT01, a first-in-class, anti-BTN3A antibody for activating V γ 9V δ 2 T cell-mediated antitumor immune response. *Sci Transl Med* **13**, eabj0835 (2021).
199. Oberg, H.-H. *et al.* Novel bispecific antibodies increase $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **74**, 1349–1360 (2014).
200. Oberg, H.-H. *et al.* Bispecific antibodies enhance tumor-infiltrating T cell cytotoxicity against autologous HER-2-expressing high-grade ovarian tumors. *J Leukoc Biol* **107**, 1081–1095 (2020).

201. Johanna, I. *et al.* Evaluating in vivo efficacy - toxicity profile of TEG001 in humanized mice xenografts against primary human AML disease and healthy hematopoietic cells. *J Immunother Cancer* **7**, 69 (2019).
202. Watanabe, D. *et al.* The Generation of Human $\gamma\delta$ T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells from Whole Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture. *Stem Cells Translational Medicine* **7**, 34–44 (2018).
203. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
204. Ma, C. *et al.* Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol* **189**, 5029–5036 (2012).
205. Wu, P. *et al.* $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* **40**, 785–800 (2014).
206. Daley, D. *et al.* $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation. *Cell* **166**, 1485-1499.e15 (2016).
207. Peng, G. *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* **27**, 334–348 (2007).
208. Hu, G. *et al.* Tumor-infiltrating CD39+ $\gamma\delta$ Tregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1277305 (2017).
209. Chen, X. *et al.* Distribution and functions of $\gamma\delta$ T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment. *J Transl Med* **17**, 144 (2019).
210. Patil, R. S. *et al.* IL17 producing $\gamma\delta$ T cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients. *Int J Cancer* **139**, 869–881 (2016).

211. Kang, N. *et al.* Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunol Lett* **125**, 105–113 (2009).
212. Casetti, R. *et al.* Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol* **183**, 3574–3577 (2009).
213. Li, X. *et al.* Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGF-beta and their involvement in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **186**, 6693–6700 (2011).
214. Sutton, C. E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* **31**, 331–341 (2009).
215. Michel, M.-L. *et al.* Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing $\gamma\delta$ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17549–17554 (2012).
216. Colak, S. & Ten Dijke, P. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. *Trends Cancer* **3**, 56–71 (2017).
217. Hua, F. *et al.* Potential regulatory role of in vitro-expanded V δ 1 T cells from human peripheral blood. *Immunol Res* **56**, 172–180 (2013).
218. Peters, C., Oberg, H.-H., Kabelitz, D. & Wesch, D. Phenotype and regulation of immunosuppressive V δ 2-expressing $\gamma\delta$ T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 1943–1960 (2014).
219. Chabab, G., Barjon, C., Bonnefoy, N. & Lafont, V. Pro-tumor $\gamma\delta$ T Cells in Human Cancer: Polarization, Mechanisms of Action, and Implications for Therapy. *Front. Immunol.* **11**, 2186 (2020).
220. Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282–286 (2009).

221. Aymeric, L. *et al.* Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* **70**, 855–858 (2010).
222. Silva-Vilches, C., Ring, S. & Mahnke, K. ATP and Its Metabolite Adenosine as Regulators of Dendritic Cell Activity. *Front Immunol* **9**, 2581 (2018).
223. White, N. & Burnstock, G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 211–217 (2006).
224. Novitskiy, S. V. *et al.* Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* **112**, 1822–1831 (2008).
225. Ohta, A. *et al.* The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol* **3**, 190 (2012).
226. de Andrade Mello, P., Coutinho-Silva, R. & Savio, L. E. B. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol* **8**, 1526 (2017).
227. Mannino, M. H. *et al.* The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett* **367**, 103–107 (2015).
228. Emmerich, J. *et al.* IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res* **72**, 3570–3581 (2012).
229. Oft, M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol Res* **2**, 194–199 (2014).
230. Wu, Y. *et al.* An innate-like V δ 1(+) $\gamma\delta$ T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Sci Transl Med* **11**, (2019).

231. Prat, A. *et al.* Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* **18**, 123–133 (2013).
232. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **121**, 2750–2767 (2011).
233. Masuda, H. *et al.* Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* **19**, 5533–5540 (2013).
234. Lehmann, B. D. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* **11**, e0157368 (2016).
235. Ye, J. *et al.* Tumor-derived $\gamma\delta$ regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. *J Immunol* **190**, 2403–2414 (2013).
236. Hidalgo, J. V. *et al.* Histological Analysis of $\gamma\delta$ T Lymphocytes Infiltrating Human Triple-Negative Breast Carcinomas. *Front Immunol* **5**, 632 (2014).
237. Mikulak, J. *et al.* NKp46-expressing human gut-resident intraepithelial V δ 1 T cell subpopulation exhibits high antitumor activity against colorectal cancer. *JCI Insight* **4**, 125884 (2019).
238. Galon, J. *et al.* Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* **10**, 205 (2012).
239. Pagès, F. *et al.* Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**, 1093–1102 (2010).
240. Yarchoan, M., Johnson, B. A. 3rd, Lutz, E. R., Laheru, D. A. & Jaffee, E. M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* **17**, 209–222 (2017).

241. Blando, J. *et al.* Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 1692–1697 (2019).
242. Upadhrasta, S. & Zheng, L. Strategies in Developing Immunotherapy for Pancreatic Cancer: Recognizing and Correcting Multiple Immune ‘Defects’ in the Tumor Microenvironment. *J Clin Med* **8**, (2019).
243. Feig, C. *et al.* The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* **18**, 4266–4276 (2012).
244. Geng, X. *et al.* Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* **9**, 655152 (2021).
245. Lunardi, S., Muschel, R. J. & Brunner, T. B. The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer Lett* **343**, 147–155 (2014).
246. Timmermans, M., Sonke, G. S., Van de Vijver, K. K., van der Aa, M. A. & Kruitwagen, R. F. P. M. No improvement in long-term survival for epithelial ovarian cancer patients: A population-based study between 1989 and 2014 in the Netherlands. *Eur J Cancer* **88**, 31–37 (2018).
247. Hu, G. *et al.* An IL6-Adenosine Positive Feedback Loop between CD73(+) $\gamma\delta$ Tregs and CAFs Promotes Tumor Progression in Human Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* **8**, 1273–1286 (2020).
248. Seifert, A. M. *et al.* Gamma-delta T cells stimulate IL-6 production by pancreatic stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **146**, 3233–3240 (2020).
249. Chang, C.-H. *et al.* Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **162**, 1229–1241 (2015).

250. Almeida, L. *et al.* Ribosome-Targeting Antibiotics Impair T Cell Effector Function and Ameliorate Autoimmunity by Blocking Mitochondrial Protein Synthesis. *Immunity* **54**, 68–83.e6 (2021).
251. Argüello, R. J. *et al.* SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metab* **32**, 1063–1075.e7 (2020).
252. Silva-Santos, B., Serre, K. & Norell, H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **15**, 683–691 (2015).
253. Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K. & Yoshikai, Y. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. *J Immunol* **178**, 4466–4472 (2007).
254. Papotto, P. H., Reinhardt, A., Prinz, I. & Silva-Santos, B. Innately versatile: $\gamma\delta$ 17 T cells in inflammatory and autoimmune diseases. *J Autoimmun* **87**, 26–37 (2018).
255. Lerner, A., Patricia, W. & Matthias, T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease* **3**, 151–155 (2015).

Annexes

IL-21 Signaling in the Tumor Microenvironment

6

Ghita Chabab, Nathalie Bonnefoy,
and Virginie Lafont

Abstract

IL-21 is an immunomodulatory cytokine produced by natural killer (NK) cells and T cells that has pleiotropic roles in immune and non-immune cells. IL-21 can modulate innate and specific immunity activities. It is a potent stimulator of T and natural killer cell-mediated antitumor immunity but also has pro-inflammatory functions in many tissues and is involved in oncogenesis. It is important to understand IL-21 biology in these different situations to ensure the maximal benefit of therapeutic strategies targeting this cytokine. This chapter summarizes IL-21 characteristics and signaling, its role in immune system components, and its use in cancer immunotherapies.

Keywords

Cytokine · Immune cells · Lymphocytes · Myeloid cells · Tumor microenvironment · Antitumor activity · Pro-tumoral activity · Signaling pathways · γ c Cytokine family · JAK-STAT pathways · PI3-kinase pathway ·

ERK pathway · Transcription factors · Regulation

6.1 Introduction

For a long time, cancer was thought to originate from a single cell that started to proliferate in an uncontrolled manner due to chronic stress or a gene mutation. Later, thanks to the progress in sequencing methodologies, the notion of tumor heteroclonality emerged and could be demonstrated. Genetic heterogeneity during tumor development/progression challenges cancer therapies because it increases the likelihood of drug resistance, treatment failure, and relapse. Therefore, new therapeutic strategies have been investigated in parallel with the unraveling of cancer complexity. A tumor is now considered as a heterogeneous ecosystem composed of cancer cells and other cell types (i.e., cancer-associated fibroblasts, endothelial cells, and immune cells). These cells are referred to as tumor-infiltrating cells and constitute the tumor microenvironment (TME). It has been demonstrated that TME cell composition directly influences tumor development. Among these cells, immune cells infiltrate the tumor and establish a permanent cross talk with cancer cells. Analysis of the tumor immune microenvironment (TIME) revealed that interactions between immune and cancer cells can be

G. Chabab · N. Bonnefoy · V. Lafont (✉)
IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de
Montpellier, INSERM U1194, Université de
Montpellier, Institut régional du Cancer de
Montpellier, Montpellier, France
e-mail: virginie.lafont@inserm.fr

resumed in three phases, called the three E's. In the first phase (elimination phase), immune cells detect and eliminate tumor cells. In the second phase (equilibrium phase), tumor cell lysis and death and tumor cell proliferation are equivalent. In the third and final phase (escape phase), tumor cells escape the immune surveillance, thus leading to tumor growth and progression. During the escape phase, the immune system is no longer able to eliminate tumor cells due to the appearance of resistance mechanisms that cooperate to thwart the antitumor immunity. It has been shown that the escape phase relies on the ability of cancer cells to shape and control the immune system. For instance, cancer cells express the immune checkpoint programmed cell death ligand-1 (PDL-1), whereas effector T lymphocytes, especially cytotoxic T lymphocytes (CTL), express its receptor programmed cell death protein 1 (PD1). Upon binding to its receptor, PDL-1 inhibits CTL activity, thus impairing tumor cell lysis. As TME's, particularly TIME, importance became clear, new therapeutic concepts were developed, tested, and adopted in the clinic for the treatments of some cancer types. For instance, tumor-infiltrating immune cells can be targeted to promote, stimulate, or restore an effective antitumor immune response. The development of antibodies against immune checkpoints, such as PDL-1, PD1, and cytotoxic T lymphocyte protein 4 (CTLA4), brought huge advances in cancer therapies with fantastic results in some cancers (melanoma, lung, kidney, and bladder), when used alone or in combination with conventional therapies (chemotherapy, radiotherapy). Besides immune checkpoint inhibitors, there are other approaches to potentiate the immune system, such as using vaccines and cytokines to boost the immune antitumor response. For example, interleukin-2 (IL-2) is a key cytokine with pleiotropic roles in the immune system, such as supporting T cell survival and inducing the proliferation of CTL and natural killer (NK) cells. IL-2-based therapy has been approved for metastatic renal cancer and melanoma [1]. However, IL-2 therapeutic potential in cancer therapies has been limited by its severe side effects (hypotension, heart toxicity, vascular leak syndrome, etc.). Another

limitation is IL-2 ability to amplify and activate regulatory T (Treg) cells that promote tumor growth through the impairment of CTL functions. The ability of other cytokines to control, directly or not, the antitumor immune responses is still not well known and remains a major research axis. Recent studies highlighted an interesting role of IL-21. IL-21 is a member of the common gamma chain cytokine family (γ_c) and displays a dual role in tumor development that needs to be clarified [2]. Indeed, IL-21 overexpression in the gut mucosa of patients with ulcerative colitis (UC) exacerbates inflammation that has a pro-tumoral effect and favors colon cancer development. However, IL-21 also has an antitumor effect in skin and kidney cancer [3]. Many studies have been performed to understand IL-21 role and signaling in the microenvironment of various tumors. In this chapter, we first summarize IL-21 signaling and roles in the immune system, and then we discuss its contribution to cancer therapies.

6.2 IL-21 Signaling (Fig. 6.1)

IL-21 is an immunomodulatory cytokine with pleiotropic actions in many immune and nonimmune cell types. In its mature form, IL-21 is a protein of 162 amino acids (aa) that form a four-helix bundle of 14 kDa. Human IL-21 shares 63% sequence identity with mouse IL-21. IL-21 binds to the IL-21 receptor (IL-21R), a heterodimeric complex composed of the common gamma chain (CD132 or γ_c) and the specific IL-21 receptor chain (IL-21R α or CD360). IL-21R α is a transmembrane glycoprotein of 75 kDa with six tyrosine residues on the intracytoplasmic domain that are essential for IL-21 signaling. CD132 is a 347-aa-long protein, with a molecular weight of 40 kDa. This receptor is used also by other cytokines: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, and IL-15 [4]. Together, they form the common gamma chain family of cytokines [5]. IL-21 is produced mainly by CD4+ T cells and NK T cells (NKT). IL-21 signals via three different pathways: the Janus kinase-signal transducers and activator of transcription (JAK-STAT)

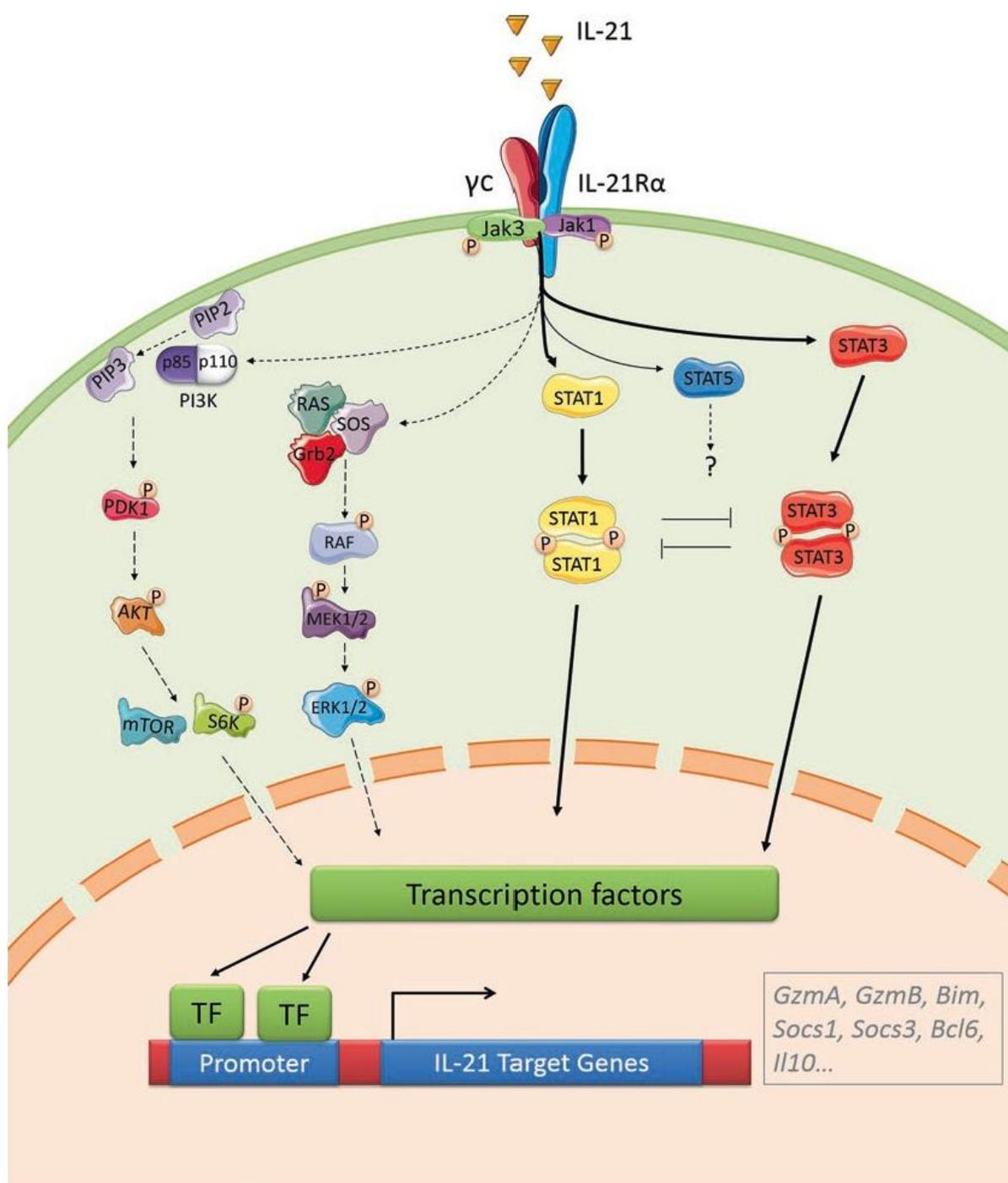


Fig. 6.1 IL-21 signaling pathways. IL-21 activates the JAK-STAT, PI3K-AKT, and MAPK pathways. STAT3 is the main contributor to IL-21 biological effects. STAT1 also participates in IL-21 signaling and co-regulates with STAT3 IL-21 target gene expression. STAT5 role is

not well understood yet. The PI3K and MAPK pathways contribute to the activation of transcription factors and cofactors, such as cJun and cFos. The PI3K and MAPK pathways contribute to IL-21 proliferative effects

pathway, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-serine/threonine kinase (AKT) pathway, and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. The PI3K-AKT and MAPK signaling path-

ways are implicated in IL-21-dependent effects on cell survival and proliferation [6]. Upon IL-21 binding, the receptor complex (IL-21R α and CD132) dimerizes allowing the transphos-

phorylation and activation of JAK1 and JAK3, two kinases that are associated with IL-21R α and CD132 intracytoplasmic parts, respectively. Then, activated JAKs phosphorylate STAT1, STAT3, and, to a lesser extent, STAT5. Phosphorylated STAT3 proteins form homodimers that translocate to the nucleus and bind to interferon (IFN) γ -activated sequences (GAS) and modulate the expression of IL-21-responsive genes, such as *BCL2* and *BAD* (two antiapoptotic genes), activation-induced cytidine deaminase (*AICDA* or *AID*; a gene encoding the AID protein involved in isotypic class switching in B cells), *IFNG*, suppressor of cytokine signaling 3 and 1 (*SOCS3* and *SOCS1*, two negative regulators of the JAK-STAT pathway via the inhibition of JAK kinase activity), and also *IL21* [6, 7]. IL-21 can also signal through STAT1 and STAT5. Although little is known about STAT5's role in IL-21 signaling, it has been shown that STAT1 and STAT3 work together to potentiate the expression of IL-21 target genes. They also have partially opposite roles in signaling pathway activation and cross-inhibition [7]. Specifically, Wan et al. observed in murine models that IL-21-mediated STAT1 phosphorylation is increased in STAT3-deficient (*Stat3*^{-/-})/CD4⁺ T cells, suggesting that STAT3 downregulates STAT1 phosphorylation. They also showed that *Stat3*^{-/-}/CD4⁺ T cells express lower levels of SOCS1 and SOCS3, leading to an increase of STAT1 phosphorylation. Specifically, 10% of IL-21 target genes are STAT1-dependent, but 50% of these genes are also co-regulated by STAT3. For example, Th1 signature genes (i.e., *Tbx21* and *Ifng*) are not induced by IL-21 in *Stat1*^{-/-}/CD4⁺ T cells but are increased in *Stat3*^{-/-}/CD4⁺ T cells, suggesting that STAT1 induces while STAT3 represses their expression. Moreover, STAT1 and STAT3 homodimers have different binding sites (ChIP-seq analysis): STAT1, but not STAT3, binds to the *Il21* promoter site, while both STAT1 and STAT3 bind to the *Tbx21* and *Ifng* promoters. This explains the differential gene regulation observed by the authors. IL-21R is expressed by various immune cell types, such as T cells, B cells, NK cells, NKT cells, dendritic cells, and also nonimmune

cells (gut epithelial cells). Consequently, IL-21 may impact their activity and phenotype in the TME.

6.3 IL-21 in Immunity (Fig. 6.2)

In this part, we discuss IL-21 roles in different immune cell types that express IL-21R.

Natural killer cells Several studies showed that IL-21 enhances NK cell effector activities, in different species, through the JAK/STAT and PI3K/MAPK pathways [8]. In murine models, IL-21 inhibits NK cell proliferation but also induces their activation and maturation as well as the production of cytolytic molecules (perforin and granzyme), thus strengthening their cytotoxic functions [9]. In humans, IL-21 also potentiates the cytotoxic activity of NK cells. In vitro experiments showed that culture in the presence of IL-21 promotes survival and activation of NK cells [10]. Interestingly, like in murine models, IL-21 can act in synergy with other cytokines, such as IL-15, to potentiate NK cell cytotoxic activity, leading to increased expression of perforin and granzyme and production of IFN γ [10, 11]. NK cells constitutively express the low-affinity Fc γ receptor (Fc γ RIIIa or CD16) that is essential for antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), an important mechanism exploited in cancer therapy with antitumor antibodies [12–14]. Roda et al. showed that the ADCC-dependent antitumor effect of NK cells is enhanced in the presence of IL-21. Specifically, when HER2⁺ human breast cancer cell lines coated with trastuzumab (an anti-HER2/Neu monoclonal antibody) are cocultured with human NK cells in the presence of IL-21, NK cell production of IFN γ , TNF α , and chemokines, such as IL-8 and MIP-1 α , is increased as well as their cytolytic activity. Experiments using *Stat1*-deficient mouse NK cells and antibody-coated murine tumor cells demonstrated that IFN γ production is STAT1-dependent [14]. Other studies in human and murine models showed that IL-21 also modifies the expression of proteins involved in NK cell activation or the modulation of their

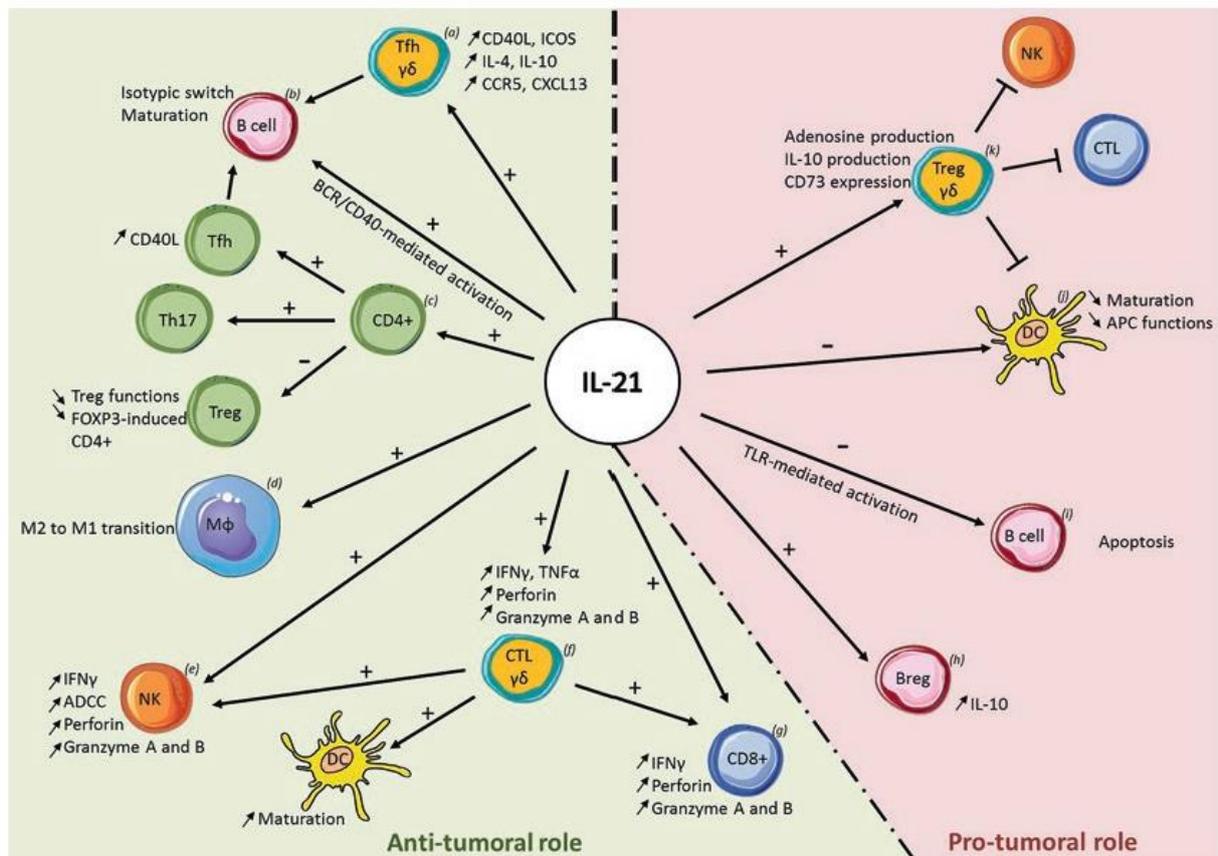


Fig. 6.2 IL-21 impact on immune cells. IL-21 has a broad range of effects on immune cells, leading to antitumor or pro-tumoral effects. IL-21 induces the differentiation of $\gamma\delta$ T cells into follicular helper T cells (a) that can activate B cells (b) and induce their maturation. IL-21 can also act directly on B cells and induces their maturation and differentiation into Ig-producing cells when activated by B cell receptor (BCR) and/or CD40 stimulation (b) or triggers their apoptosis when activated by Toll-like receptor (TLR) recruitment (i). IL-21 induces CD4⁺ T cell activation and proliferation (c) and their differentiation into follicular helper T cells (Tfh) or Th17 cells. Conversely, IL-21 inhibits T regulatory (Treg) cell differentiation and functions, thus increasing the antitumor functions of the other cells (e.g., cytotoxic T lymphocytes, CTL). IL-21 also induces M2 to M1 transition in macrophages (d), restoring their antitumor functions. IL-21 can enhance

cytotoxic effects of natural killer (NK) cells (e), CTL $\gamma\delta$ T cells (f), and CD8⁺ T cells (g) by increasing perforin and granzyme production and cytokine production and promoting antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanisms (for NK cells). IL-21 indirectly induces CD8⁺ T cell and NK cell activation through its effect on CTL $\gamma\delta$ T cells (f). CTL $\gamma\delta$ T cell activation promotes dendritic cell (DC) maturation, improving the presentation of tumor antigens to T cells and the activation of the immune response. Conversely, IL-21 also favors the differentiation or activity of various regulatory cell types, such as regulatory B cells (h) and regulatory $\gamma\delta$ T cells (k). Regulatory $\gamma\delta$ T cells inhibit NK cell and CTL functions and also DC maturation and functions. Both regulatory B cells and $\gamma\delta$ T cells produce IL-10, an immunosuppressive cytokine. IL-21 also directly inhibits DC (j) maturation and APC functions, thus limiting the immune system activation

activity. For instance, NKG2A and CD25 are increased [9, 10], while NKG2D is decreased [10, 15]. These and many other studies demonstrated the stimulating effect of IL-21 on NK cell cytotoxic activity and cytokine production.

B cells IL-21 has various effects on B cells depending on the type of activation (CD40-, B cell receptor- or Toll-like receptor-mediated) and

the cell maturation state. Indeed, IL-21R expression is different in naive, memory, and plasma cells [16, 17]. Diehl et al. showed that in the presence of IL-21, B cell activation through B cell receptor and/or CD40 recruitment enhances their proliferation and differentiation into immunoglobulin (Ig)-producing plasma cells [18, 19]. This mechanism is STAT3-dependent [18, 20]. Conversely, when activated through the Toll-like

receptor pathway, IL-21 triggers B cell apoptosis [19]. Another study demonstrated that IL-21 affects Ig isotypic class-switch. Indeed, when cultured in the presence of both IL-21 and an anti-CD40 antibody, naive B cells are activated and differentiate into IgG1- and IgG3-producing cells through STAT3-dependent induction of AID expression [21]. Moreover, on regulatory B cells also called B10 cells due to their ability to produce the immunosuppressive IL-10 cytokine, IL-21 increases proliferation and IL-10 production [22, 23]. All these studies showed that IL-21 has pleiotropic effects in B cells, depending on the recruited signaling pathway(s) and the B cell subset. This must be taken into account when developing IL-21-based therapeutics for B cell malignancies, as discussed below.

Helper and cytotoxic T cells IL-21 modulates T cell responses in different manners. First, IL-21 induces survival and proliferation of CD4⁺ T cell by rendering them resistant to Treg-mediated suppression. In vitro experiments on CD4⁺ T cell proliferation showed that when cocultured with Treg cells, CD3-stimulated CD4⁺ T cells do not proliferate. However, addition of IL-21 restores their proliferation [24]. Second, IL-21 produced by Th17 cells favors their differentiation through an autocrine mechanism [25]. Third, IL-21 in synergy with IL-15 induces survival and expansion of naive and memory CD8⁺ T cells [26]. It also enhances the cytotoxic activities of effector and memory CD8⁺ T cells through increased production of perforin and IFN γ [27–29]. Finally, IL-21 induces T follicular helper cell proliferation and maturation (i.e., expression of CD40L), allowing the maturation of B cells present in germinal centers through CD40 activation.

Regulatory T cells IL-21 inhibits Treg cell activation, differentiation, and survival and thus limits their immunoregulatory effects toward effector cells [24]. Interestingly, using IL-21R-deficient conventional and/or regulatory T cells, Attridge et al. showed that functional IL-21R signaling in conventional T cells is required to block Treg-mediated immunosuppression through reduction

of IL-2 production by T cells. IL-2 is a key activation and survival factor for Treg cells. By decreasing IL-2 secretion by conventional T cells, IL-21 indirectly inhibits Treg cell immunosuppressive activity [24, 30, 31]. IL-21 also inhibits cancer-mediated FOXP3 induction in naive human CD4 T cells, thus directly blocking their differentiation into regulatory cells [32, 33].

$\gamma\delta$ T cells V γ 9V δ 2 T cells are the main subpopulation of peripheral $\gamma\delta$ T cells in human blood. They are involved in antitumor responses through their capacity to recognize and react against a broad range of tumors [34]. Like in B cells, IL-21 has pleiotropic effects in V γ 9V δ 2 T cells. Several studies showed that IL-21, in combination with IL-2, induces V γ 9V δ 2 T cell differentiation into Tfh-type $\gamma\delta$ T cells [35, 36]. Upon TCR-mediated activation, a subset of V γ 9V δ 2 T cells cultured in the presence of IL-21 expresses CXCR5, the receptor of the chemokine CXCL13 that is involved in the migration of Tfh and B cells to lymph node follicles. They also express ICOS and CD40L, and consequently they can activate B cells through CD40/CD40L interactions. They also produce IL-10 and IL-4, two cytokines involved in antibody production by B cells, thus enhancing the humoral antitumor response [35, 36]. IL-21 also directly modulates antitumor responses mediated by $\gamma\delta$ T cells. Ex vivo TCR-stimulated V γ 9V δ 2 T cells show Th1-like differentiation with higher expression of lytic granules (perforin, granzymes A and B) and increased production of IFN γ in the presence of IL-2 and IL-21 compared with IL-2 alone, suggesting that these cells have a more potent antitumor activity [34]. Conversely, more recent studies showed that IL-21 promotes the development of a regulatory subtype of V γ 9V δ 2 T cells that produces inhibitory molecules, such as adenosine and IL-10 [37]. These regulatory cells express the ectonucleotidase CD73 that is involved in adenosine production. The authors also observed that the degranulation capacity of CD73⁺ V γ 9V δ 2 T cells was reduced compared with CD73⁻ V γ 9V δ 2 T cells, suggesting a reduced cytotoxic activity of these cells against tumor cells [37]. Once again,

IL-21 signaling in antitumor activities varies depending on the activation conditions and the considered cell subset.

Dendritic cells Dendritic Cells (DC) are professional antigen-presenting cells (APC) involved in the initiation of T cell-mediated immune responses. As DCs express IL-21R at their surface, they are regulated by IL-21 signaling. When cultured *in vitro* with IL-21, DC maturation is impaired as indicated by the decreased expression of CCR7, a marker of mature DCs, and of MHCII, leading to reduced antigen presentation [38]. Furthermore, DCs cultured in the presence of IL-21 cannot stimulate CD8⁺ T cell proliferation. Thus, IL-21 has a negative role on DC maturation and APC functions.

Altogether, the different IL-21 effects in immune cells confirm the pleiotropic role of this cytokine and emphasize the difficulty of considering IL-21 for cancer therapies. Therefore, many groups tried to determine in which cancer types IL-21-based therapies would be beneficial. These studies will be discussed in the next part of this chapter.

6.4 IL-21 in Cancer and IL-21-Based Therapies

As discussed before, IL-21 effects in immune cells depend on many parameters (e.g., cell type, maturation status, activation stimuli). Similarly, IL-21 can promote or inhibit tumor development in function of the tumor type and stage.

Colorectal cancer (CRC) was one the first cancers where IL-21 was shown to be involved in cancer initiation. IL-21 is a key player in CRC tumorigenesis, by establishing a pro-inflammatory environment and thus contributing to the installation of chronic inflammation, a driving force in CRC initiation and progression [39]. Indeed, CRC risk is higher in patients with chronic inflammatory diseases, such as UC and Crohn's disease, due to the maintenance of a more or less severe inflammation in the intestine

[39, 40]. Stolfi et al. showed by immunostaining that IL-21 is overexpressed in intestinal tissue sections from patients with UC and with UC-associated CRC compared with healthy controls and that IL-21 overexpression is correlated with increased CD3⁺ cell infiltration. Similarly, IL-21 expression is increased in murine models of colitis (wild-type mice treated with azoxymethane) and colitis-associated colon cancer (CAC; wild-type mice treated with azoxymethane and dextran sulfate sodium) compared with control non-treated mice. Furthermore, comparison of colon tumors and paired healthy tissues from CAC mice indicated that IL-21 expression is significantly increased in tumors, suggesting an important role of IL-21 in tumor formation and progression. Experiments in *IL21*^{-/-} mice confirmed this hypothesis. Indeed, tumor size and number following azoxymethane and dextran sulfate sodium treatment were reduced in *IL21*^{-/-} mice compared with wild-type mice. Additional experiments suggested that tumor promotion by IL-21 is mainly due to its effect on immune cells, because IL-21R is not expressed by tumor epithelial cells but by cells in the TME. Moreover, IL-21 inhibits the development of Treg cells (fewer FOXP3⁺ CD4⁺ T cells). This leads to an increase of effector T cell activity and of inflammatory signals through production of IFN γ and IL-17A in the TME, thus sustaining an inflammatory TME and promoting tumor initiation and progression [39, 40].

On the other hand, murine melanoma, fibrosarcoma, and murine mammary adenocarcinoma that secrete functional IL-21 are rejected by 90% of mice compared with control tumor cells that do not produce IL-21 [41]. Tumor rejection is associated with a higher production of IFN γ by CD8⁺ T cells and enhanced cytotoxic activity of NK and CD8⁺ T cells (perforin and granzyme expression) [41, 42]. Expression of IL-21R by B cells is interesting in the context of B cell malignancy therapies. Malignant cells isolated from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) express IL-21R, and *in vitro* experiments showed IL-21R upregulation after CD40 stimula-

tion. IL-21 inhibits CLL B cell proliferation and induces their apoptosis through caspase activation and BID cleavage [43]. Gelebart et al. also showed IL-21-induced cancer cell apoptosis in mantle cell lymphoma, a B cell lymphoma that is resistant to chemotherapies, which gives more relevance to IL-21 use in antitumor therapies [44]. IL-21 pro-apoptotic activity in B cell malignancies supports its development as a potential therapeutic molecule. A clinical trial using recombinant IL-21 in combination with rituximab was performed in patients with CLL, small lymphocytic lymphoma, follicular lymphoma, and marginal zone lymphoma. IL-21 improved rituximab efficacy because tumor burden was decreased in 84% of patients, and complete and/or partial response was observed in 42% of patients. IL-21 potentiated rituximab effects through its positive effect on NK cell activity [45].

IL-21 efficacy as an immunotherapeutic cytokine in non-hematologic cancers has been assessed in phase I and II clinical trials [46, 47]. In metastatic melanoma, 62.5% of patients displayed a partial response or stable disease upon treatment with IL-21. Response to treatment was independent of the tumor mutational status⁴⁷. In metastatic renal cell carcinoma, IL-21 combined with sorafenib, a tyrosine kinase inhibitor, showed poor response rate (21%) but good disease control rate (82%) [46]. In this clinical trial, the response to IL-21 treatment was dose-dependent. Nevertheless, therapies based on IL-21 need to be improved, particularly concerning the adverse events observed in some patients.

6.5 Future Directions

In this chapter, we presented an overview of IL-21 role, its signaling, and its effects on tumor development and in TME cells. The potential use of IL-21 as a therapeutic target in many cancers is currently investigated, with variable results depending on the tumor type, the used dose, and the TME immune contexture. Specifically, in CRC, IL-21 promotes the early phase of tumor development through its inflammatory proper-

ties. On the other hand, in various solid and hematological tumors, IL-21 improves effector T cell and NK cell cytotoxic activity.

It is clear now that the choice of the best cancer treatment for a patient cannot be based on one single indication, for instance, the tumor mutational status, but requires many different analyses to capture the tumor complexity, interactivity, and dynamics. This might allow predicting which therapy could be more effective for a patient and could limit the adverse effects. This is called personalized medicine, a method that uses different prediction, prevention, and diagnosis approaches to find the best way to treat patients, depending on the information given by a combination of analyses.

References

1. Rosenberg SA (2014) IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol* 192:5451. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490019>
2. Spolski R, Leonard WJ (2014) Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 13:379. <https://doi.org/10.1038/nrd4296>
3. Søndergaard H, Skak K (2009) IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy. *Tissue Antigens* 74:467–479
4. Habib T, Senadheera S, Weinberg K, Kaushansky K (2002) The common γ chain (γ c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* 41:8725. <https://doi.org/10.1021/bi0202023>
5. Parrish-Novak J et al (2000) Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408:57. <https://doi.org/10.1038/35040504>
6. Zeng R et al (2007) The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood* 109:4135. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-054973>
7. Wan C-K et al (2015) Opposing roles of STAT1 and STAT3 in IL-21 function in CD4 + T cells. *Proc Natl Acad Sci* 112:9394–9399
8. Konjević GM, Vuletić AM, Mirjačić Martinović KM, Larsen AK, Jurišić VB (2019) The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine* 117:30–40
9. Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL (2014) IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 172:2048–2058
10. Skak K, Frederiksen KS, Lundsgaard D (2008) Interleukin-21 activates human natural killer cells

- and modulates their surface receptor expression. *Immunology* 123:575–583
11. Strengell M et al (2003) IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- γ production in human NK and T cells. *J Immunol* 170:5464–5469
 12. Park YK et al (2012) Interleukin-21 increases direct cytotoxicity and IFN- γ production of ex vivo expanded nk cells towards breast cancer cells. *Anticancer Res* 32:839–846
 13. McMichael EL et al (2017) Activation of the Fc γ ReceptorIIIa on human natural killer cells leads to increased expression of functional interleukin-21 receptor. *Oncoimmunology* 6:1–10
 14. Roda JM et al (2014) Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. *J Immunol* 177:120–129
 15. Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F, Coligan JE (2014) IL-21 Down-regulates NKG2D/DAPI0 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol* 176:1490–1497
 16. Good KL, Bryant VL, Tangye SG (2014) Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol* 177:5236–5247
 17. Wang SP et al (2015) Amplification of IL-21 signalling pathway through bruton's tyrosine kinase in human B cell activation. *Rheumatology (Oxford)* 54:1488. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu532>
 18. Diehl SA et al (2008) STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol* 180:4805–4815
 19. Jin H, Carrio R, Yu A, Malek TR (2014) Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol* 173:657–665
 20. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH (2013) IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol* 190:1827. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201678>
 21. Pene J et al (2014) Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol* 172:5154–5157
 22. Iwata Y et al (2011) Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117:530. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249>
 23. Yoshizaki A et al (2012) Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491:264. <https://doi.org/10.1038/nature11501>
 24. Peluso I et al (2014) IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 178:732–739
 25. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ (2007) IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282:34605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705100200>
 26. Zeng R et al (2005) Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8 + T cell expansion and function. *J Exp Med* 201:139. <https://doi.org/10.1084/jem.20041057>
 27. Sutherland APR et al (2013) IL-21 promotes CD8+ CTL activity via the transcription factor T-bet. *J Immunol* 190:3977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201730>
 28. Alves NL, Arosa FA, van Lier RAW (2014) IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8+ T cells. *J Immunol* 175:755–762
 29. Casey KA, Mescher MF (2007) IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J Immunol* 178:7640–7648
 30. Attridge K et al (2012) IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *Blood* 119:4656. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-388546>
 31. Gowda A et al (2010) Differential effects of IL-2 and IL-21 on expansion of the CD4 +CD25+Foxp3+ T regulatory cells with redundant roles in natural killer cell mediated antibody dependent cellular cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia. *MAbs* 2:35–41
 32. Kim-Schulze S, Kim HS, Fan Q, Kim DW, Kaufman HL (2009) Local IL-21 promotes the therapeutic activity of effector T cells by decreasing regulatory T cells within the tumor microenvironment. *Mol Ther* 17:380–388
 33. Kannappan V et al (2017) Interleukin 21 inhibits cancer-mediated FOXP3 induction in naive human CD4 T cells. *Cancer Immunol Immunother* 66:637. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1970-6>
 34. Thedrez A et al (2009) IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V γ 9V δ 2 T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 182:3423–3431
 35. Bansal RR, Mackay CR, Moser B, Eberl M (2012) IL-21 enhances the potential of human $\gamma\delta$ T cells to provide B-cell help. *Eur J Immunol* 42:110. <https://doi.org/10.1002/eji.201142017>
 36. Caccamo N et al (2012) IL-21 regulates the differentiation of a human $\gamma\delta$ T cell subset equipped with B cell helper activity. *PLoS One* 7:e41940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041940>
 37. Barjon C et al (2017) IL-21 promotes the development of a CD73-positive V γ 9V δ 2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology* 7:1–11
 38. Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC, Rückert R (2003) Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102:4090. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0669>
 39. Stolfi C et al (2011) Involvement of interleukin-21 in the regulation of colitis-associated colon cancer. *J Exp Med* 208:2279–2290
 40. De Simone V et al (2015) Interleukin-21 sustains inflammatory signals that contribute to sporadic colon tumorigenesis. *Oncotarget* 6:9908
 41. Ma H-L et al (2003) IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor

- responses that require Perforin but are independent of IFN-gamma. *J Immunol* 171:608–615
42. Di Carlo E et al (2014) IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN- γ -dependent CXC chemokines in syngeneic mice. *J Immunol* 172:1540–1547
 43. De Toter D et al (2006) Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 107:3708–3715
 44. Gelebart P et al (2009) Interleukin-21 effectively induces apoptosis in mantle cell lymphoma through a STAT1-dependent mechanism. *Leukemia* 23:1836–1846
 45. Timmerman JM et al (2012) A phase I dose-finding trial of recombinant interleukin-21 and rituximab in relapsed and refractory low grade B-cell lymphoproliferative disorders. *Clin Cancer Res* 18:5752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0456>
 46. Bhatia S et al (2014) Recombinant interleukin-21 plus sorafenib for metastatic renal cell carcinoma: a phase 1/2 study. *J Immunother Cancer* 2:1–11
 47. Petrella TM et al (2012) Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 30:3396. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.0655>



Pro-tumor $\gamma\delta$ T Cells in Human Cancer: Polarization, Mechanisms of Action, and Implications for Therapy

Ghita Chabab[†], Clément Barjon^{†‡}, Nathalie Bonnefoy[§] and Virginie Lafont^{*§}

IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Khashayarsha Khazaie,
Mayo Clinic College of Medicine &
Science, United States

Reviewed by:

Serena Meraviglia,
University of Palermo, Italy
Xinhui Wang,
Massachusetts General Hospital and
Harvard Medical School,
United States

*Correspondence:

Virginie Lafont
virginie.lafont@inserm.fr

[†]These authors share first authorship

‡Present address:

Clément Barjon,
Duve Institute, UCLouvain,
Brussels, Belgium

[§]These authors share last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 22 June 2020

Accepted: 11 August 2020

Published: 16 September 2020

Citation:

Chabab G, Barjon C, Bonnefoy N and
Lafont V (2020) Pro-tumor $\gamma\delta$ T Cells
in Human Cancer: Polarization,
Mechanisms of Action, and
Implications for Therapy.
Front. Immunol. 11:2186.
doi: 10.3389/fimmu.2020.02186

The tumor immune microenvironment contributes to tumor initiation, progression and response to therapy. Among the immune cell subsets that play a role in the tumor microenvironment, innate-like T cells that express T cell receptors composed of γ and δ chains ($\gamma\delta$ T cells) are of particular interest. Indeed, $\gamma\delta$ T cells contribute to the immune response against many cancers, notably through their powerful effector functions that lead to the elimination of tumor cells and the recruitment of other immune cells. However, their presence in the tumor microenvironment has been associated with poor prognosis in various solid cancers (breast, colon and pancreatic cancer), suggesting that $\gamma\delta$ T cells also display pro-tumor activities. In this review, we outline the current evidences of $\gamma\delta$ T cell pro-tumor functions in human cancer. We also discuss the factors that favor $\gamma\delta$ T cell polarization toward a pro-tumoral phenotype, the characteristics and functions of such cells, and the impact of pro-tumor subsets on $\gamma\delta$ T cell-based therapies.

Keywords: $\gamma\delta$ T cells, cancer, pro-tumor functions, immunosuppression, therapy

INTRODUCTION

Within a tumor, the malignant features of cancer cells are tightly regulated by their local environment and the reciprocal network they form with host cells (e.g., immune cells, angiogenic vascular cells, endothelial cells, and cancer-associated fibroblasts) and that define the cancer ecosystem. The tumor immune microenvironment is a critical determinant of cancer evolution and outcome. In this context, the nature and frequency of tumor-infiltrating immune cells are considered to be prognostic factors in many cancers. A better knowledge of this dynamic immune environment is required to improve prognosis, choose therapies, and evaluate the response to treatments.

Among the tumor-infiltrating immune cells, T cell sub-populations, especially CD8⁺ T lymphocytes, are a key anti-tumor immune component. $\gamma\delta$ T cells, a subgroup of T cells that belong to the non-conventional or innate lymphocyte family, also are found in the tumor microenvironment and are involved in tumor surveillance. Although they share many properties with $\alpha\beta$ T cells, such as cytotoxic activity and pro-inflammatory cytokine production, the structure of their T cell receptor (TCR; composed of γ and δ chains) is different as well as their activation mechanisms that are independent of major histocompatibility complex (MHC) molecules. Human

$\gamma\delta$ T cells can be divided in three main populations, based on their TCR δ chain ($\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$) (1, 2). V $\delta 2$ T cells, also known as V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cells, are the main $\gamma\delta$ T subtype (90%) in peripheral blood. The V $\delta 1$ and V $\delta 3$ subsets are mostly found in tissues and mucosa, respectively.

V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cells display specific properties, such as the TCR-dependent recognition of non-peptidic phosphorylated antigens, called phosphoantigens. Phosphoantigens are molecules produced by the isoprenoid synthesis pathways of prokaryotic pathogens and by infected or transformed eukaryotic cells. Although phosphoantigen recognition does not require MHC molecule presentation, several studies brought evidences of the involvement of the cell surface butyrophilin 3A (BTN3A) (3) and the requirement of butyrophilin 2A1 (BTN2A1) (4). Phosphoantigen-induced TCR activation of V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cells triggers their proliferation, cytokine production, and cytotoxic activity (5). V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cells also express natural killer (NK) receptors, such as NKG2A and NKG2D, and their activation is modulated by the presence of their ligands in the environment (6, 7).

V $\delta 1$ T cells recognize the stress-inducible MHC class I-related chain A and B (MICA and MICB) proteins that are expressed by some tumor and virus-infected cells (8), as well as glycolipid antigens presented by the CD1c (9) and CD1d proteins (10, 11), and the algal protein phycoerythrin (12). Additionally, V $\delta 1$ T cells can be activated independently of their TCR, via ligation of stimulatory receptors, including NKG2C, NKG2D, NKp30, toll-like receptors, and the β -glucan receptor dectin 1 (13–17). To date, little is known on the activation mechanisms of the V $\delta 3$ T cell subset.

Although the human V $\delta 1$, V $\delta 2$ and V $\delta 3$ T cell subsets display a strong reactivity against tumor cells, $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapies primarily target the V $\delta 2$ subset because they are easily expanded and activated by synthetic clinical-grade phosphoantigens (e.g., bromohydrin pyrophosphate) or by pharmacological inhibitors (e.g., zoledronate) of the isoprenoid synthesis pathway that produces these metabolites (18, 19).

Many clinical trials using V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cells have been carried out. Although their safety have been proven, response rate was moderate and only in 10–33% of patients with hematologic and solid malignancies benefit from V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cell-based immunotherapies (20–25). This suggests the presence in the tumor microenvironment (TME) of suppressive mechanisms that inhibit/divert V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cell functions and/or their ability to infiltrate tumors. New tools to target and boost V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cell anti-tumor functions are currently under study (26), while other $\gamma\delta$ T cell subtypes (e.g., V $\delta 1$ T cells) are now tested as new therapeutic candidates (27). Although therapies using $\gamma\delta$ T cells received a new burst of interest due to these new research axes, the existence of $\gamma\delta$ T cell subsets with pro-tumor functions has also been suggested.

In this review, we will discuss the evidences concerning $\gamma\delta$ T cell pro-tumor functions in human cancer, and the factors that could favor $\gamma\delta$ T cell polarization toward a pro-tumoral phenotype, the characteristics and functions of these cells, and also the possible consequences for $\gamma\delta$ T cell-based therapies.

EVIDENCE OF PRO-TUMORAL $\gamma\delta$ T CELLS IN HUMAN CANCER (TABLE 1)

In line with the potent anti-tumor properties of $\gamma\delta$ T cells, a large study of publicly available gene expression data from bulk tumors showed that the $\gamma\delta$ T cell signature is associated with the most significant favorable prognosis in 25 malignancies (37). However, it was later demonstrated that the sorting algorithm used in this study could not accurately differentiate $\gamma\delta$ T cells from CD8+ and NK cells due to the transcriptome overlaps in these three cell types (38). Using a refined signature for the V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cells subset based on sorted cells, the authors found that a high-level infiltration of $\gamma\delta$ T cells in tumors was not always associated with a positive outcome (38). In line with these results, recent studies suggested that these cells may also have a pro-tumor role in some cancers.

In breast cancer, high V $\delta 1$ T cell prevalence has been associated with immunosuppressive functions, such as inhibition of naive T cell proliferation and the impairment of dendritic cell (DC) maturation and function (28). Moreover, $\gamma\delta$ T cell infiltration level in breast cancer was the most significant independent prognostic factor of disease severity, in terms of survival and relapse (29).

In colorectal cancer, CD39+ V $\delta 1$ T cell infiltration establishes an immunosuppressive microenvironment through the adenosine pathway and the recruitment of myeloid-derived suppressive cells (MDSCs). The presence of these cells has been associated with the disease severity (31). Another study demonstrated the pro-tumor functions of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in colon cancer through their capacity to recruit MDSCs (33). Moreover, pro-inflammatory V $\delta 2$ T cells might participate in colorectal cancer pathogenesis by supporting chronic inflammation (39). Besides breast and colon cancer, several studies have shown a potentially deleterious role of $\gamma\delta$ T cell subsets in pancreatic, ovarian, gallbladder and renal cancer (32, 34–36).

POLARIZATION OF $\gamma\delta$ T CELLS TOWARD A PRO-TUMOR FUNCTIONAL PHENOTYPE (FIGURE 1)

Although $\gamma\delta$ T cells have been originally described as pro-inflammatory cells with a Th1-like phenotype, they display high plasticity and can be polarized toward different functional phenotypes, depending on their environment (40). Understanding precisely the influence of different environmental factors, such as cytokines, on $\gamma\delta$ T cells and the limits of their plasticity is crucial to determine how the TME can skew $\gamma\delta$ T cells toward a pro-tumor function that will directly or indirectly impair the anti-tumor immune response and support tumor growth. Although studying T cell functional plasticity within tumors is a complex endeavor, several *ex vivo* studies involving the activation of naive $\gamma\delta$ T cells in the presence of various cytokines have brought some insights into how $\gamma\delta$ T cells can be skewed toward a pro-tumoral activity. Specifically, it has been shown that TGF- β , IL-4 and more recently IL-21 favor the

TABLE 1 | Pro-tumoral characteristics of infiltrating $\gamma\delta$ T cells in human cancer.

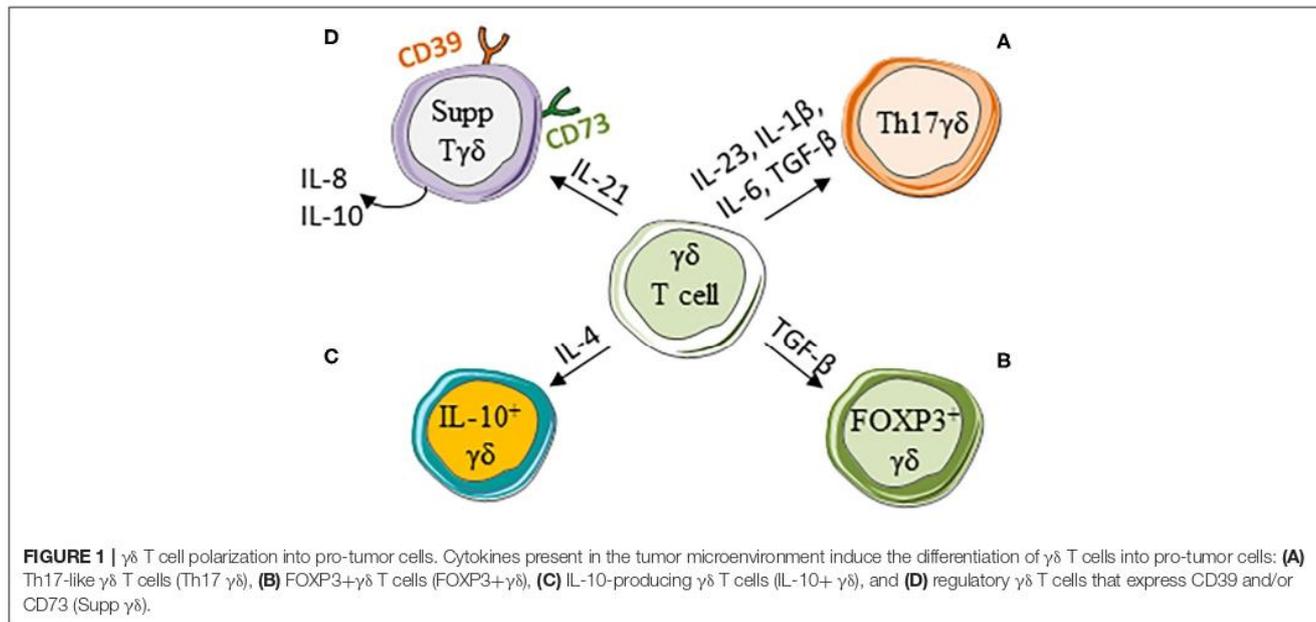
Type of cancer	$\gamma\delta$ sub-populations	Phenotype (surface markers)	Mode of action	Pro-tumoral/suppression factors	Prognosis value	References
Breast cancer	V δ 1 (predominantly)	CD8 $\alpha\alpha$ +, CD25-, FoxP3- (TILs clones)	Suppression of T cells and DC	Undefined soluble factor (not TGF- β or IL-10)	Correlation with advanced tumor stages, inverse correlation with OS and RFS	(28, 29)
	V δ 1 and V δ 2	CD39+, CD73+	n/a	n/a	Associated with late stage disease	(30)
Colorectal cancer	V δ 1 (predominantly)	CD39+, CD25+, FoxP3+	Suppression of T cells	Adenosine	Correlation with malignant clinicopathological features	(31)
	V δ 1 (V δ 2 defined as anti-tumoral)	n/a	Suppression of T cells	n/a	Correlation of V δ 1 with disease T stage (negative correlation with V δ 2)	(32)
	V δ 1 (predominantly)	CD45RO+, CD161+, CCR6+, CD69+ TEM phenotype CD45RA-, CD27-	Attraction of PMN-MDSCs	IL-17A, IL-8, GM-CSF	Correlation with advanced clinicopathological features	(33)
Gallbladder cancer	$\gamma\delta$	n/a (CXCR3)	Angiogenesis, suspected attraction of MDSCs	IL-17A	Associated with poor survival	(34)
Ovarian cancer	V δ 1 (predominantly)	n/a	Suppression of T cells, suspected promotion of pro-tumoral myeloid cells	Suppressive factor not determined, production of IL-17A	Correlation with advanced clinicopathological features	(35)
Pancreatic ductal adeno carcinoma	Non V γ 9	TEM phenotype CD45RA-, CD27-, CD62L-	Suppression of T cells (mouse model)	PD-L1, Galectin-9	n/a	(36)

acquisition of pro-tumoral properties by human and mouse $\gamma\delta$ T cells. Moreover, various cytokine combinations can polarize $\gamma\delta$ T cells into Th17-like cells with pro-tumor effects.

TGF- β

TGF- β is a pleiotropic cytokine that is produced by most cells in a latent form. TGF- β 1 (subsequently referred to as TGF- β), the most studied isoform, is a potent suppressor of the immune system. It can be secreted in a complex with latent TGF-beta binding proteins (LTBP) and deposited in the extracellular matrix, or tethered to the surface of cells when bound in a covalent manner to glycoprotein A repetitions predominant (GARP) or leucine-rich-repeat-containing protein 33 (LRRC33). Active TGF- β needs to be released from the latent complex through the interaction with other partners, such as integrins, to act on its target cells through binding to TGF- β receptors (41, 42). TGF- β can induce the differentiation of naive CD4+ T cells into regulatory T cells (Tregs) or Th17 cells, depending on the context, and is often enriched in tumors. Therefore, TGF- β could play a crucial role in $\gamma\delta$ T cell polarization toward pro-tumoral cells in the TME (43, 44). *In vitro*, human peripheral blood mononuclear

cells (PBMCs) can be stimulated with phosphoantigens and cultured with IL-2 to selectively expand V γ 9V δ 2 T cells. Addition of TGF- β to the culture increases FOXP3 expression in these cells. FOXP3 expression remains stable for at least 10 days. Sorted FOXP3+ V γ 9V δ 2 T cells inhibit the proliferation of TCR-stimulated PBMCs (45). Another study confirmed TGF- β role in the development of FOXP3+ V γ 9V δ 2 T cells and demonstrated that decitabin, a DNA hypomethylating agent, promotes the generation and the immunosuppressive activity of FOXP3+ V γ 9V δ 2 T cells induced by TGF- β (46). Importantly, the relevance of FOXP3 as a regulatory marker depends on the type of stimulation. Indeed, V δ 2 cell activation using anti-CD3 and anti-CD28 antibodies instead of phosphoantigens leads to transient FOXP3 expression that does not correlate with the regulatory phenotype (47, 48). Interestingly, vitamin C increases the stability of TGF- β -induced FOXP3 expression in V δ 2 cells through an epigenetic modification of the FOXP3 gene, and enhances their suppressive capacities (49). Li et al. demonstrated that upon TCR stimulation V δ 1 T cells can be polarized toward a suppressive phenotype in the presence of IL-2 and TGF- β . These V δ 1 cells express FOXP3 and suppress the proliferation



of activated CD4+ T cells (50). In human colorectal cancer, tumor-infiltrating CD39+ $\gamma\delta$ T cells were described as regulatory $\gamma\delta$ T cells that express FOXP3 and act mainly through the adenosine pathway (31). The authors found that TGF- β 1 mRNA level is higher in the tumor than in the associated normal tissue. Moreover, CD39+ $\gamma\delta$ T cells from normal tissue incubated with tumor supernatant acquire a potent suppressive capacity through increased adenosine production. This effect can be abrogated by incubation with an anti-TGF- β antibody, and can be reproduced by stimulating cells with recombinant TGF- β . TGF- β -induced polarization of $\gamma\delta$ T cells toward FOXP3+ suppressive cells was also demonstrated in the mouse (51). Additionally, TGF- β is required for the polarization of V γ 9V δ 2 into IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells, together with IL-1 β , IL-6 and IL-23, as described below (52). Overall, these results suggest that TGF- β could be one of the key factors responsible for conversion of $\gamma\delta$ T cells into suppressive and/or IL-17-producing cells.

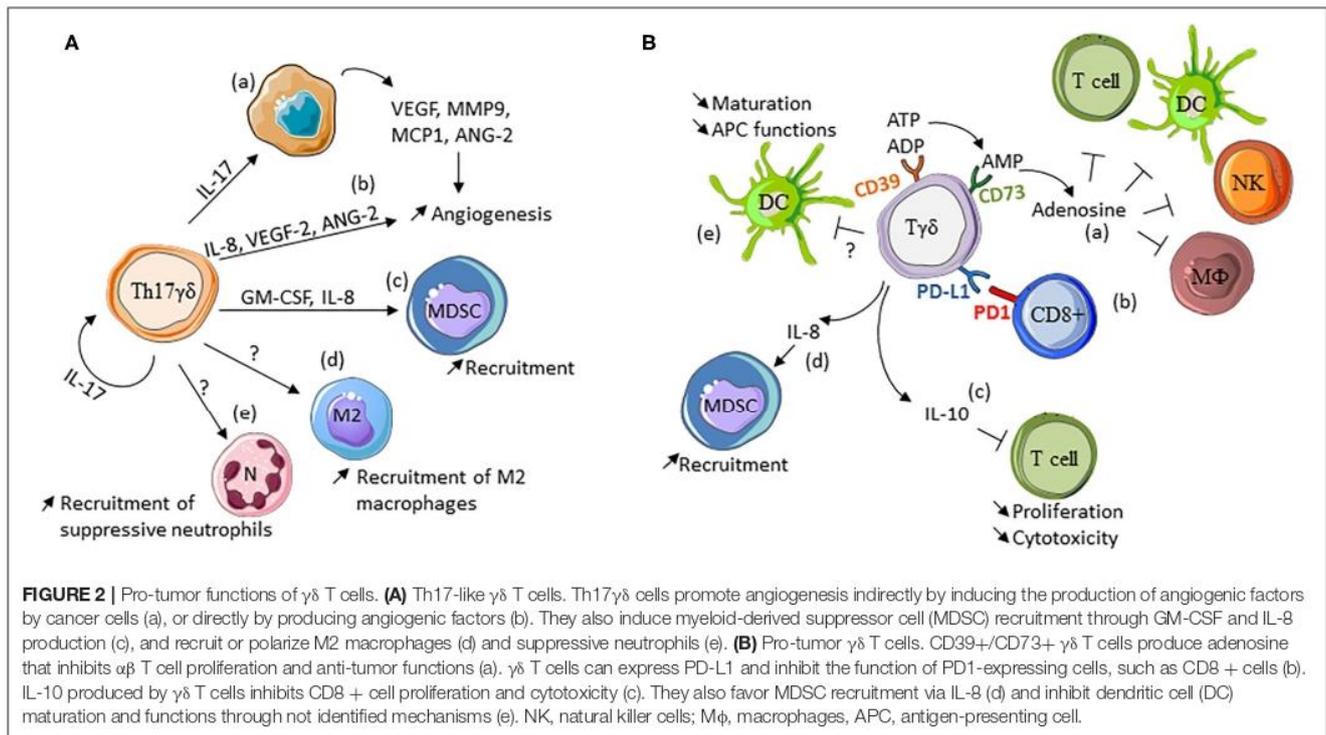
IL-4

IL-4 is a potent regulator of the humoral response and more generally of the adaptive immunity, particularly through the differentiation of naive T cells into Th2 cells. In cancer, IL-4 has been associated with tumor aggressiveness, and IL-4 pathway blockade is currently investigated as anti-cancer strategy (53). IL-4 is often enriched in the microenvironment of human solid tumors, notably in cancers with high $\gamma\delta$ T cell infiltration, such as breast cancer (54). *In vitro*, human V δ 2 cells isolated from peripheral blood and activated by phosphoantigens in the presence of IL-4 produce low levels of interferon γ (IFN- γ) and high levels of IL-4, although this production is not stable over time (55). In a more recent study, Mao et al. showed that IL-4 inhibits *in vitro* the activation of blood $\gamma\delta$ T cells induced by TCR stimulation (54). Nevertheless, IL-4 promotes the growth

of activated $\gamma\delta$ T cells and increases the levels of V δ 1 T cells, which in turn inhibit V δ 2 T-cell growth via significant IL-10 secretion (54). IL-4 inhibits $\gamma\delta$ T cell activation when present at the moment of the stimulation, but enhances their proliferation when added later. Moreover, concanavalin A-stimulated V δ 1 T cells cultured with IL-4 retain their cytotoxic properties against tumor cells. This suggests a complex and context-dependent role of IL-4 in $\gamma\delta$ T cell polarization (56).

IL-21

IL-21 is a potent immunomodulatory cytokine, mainly produced by activated CD4+ T cells and NKT cells. IL-21 enhances the effector functions of NK cells, helper CD4+ T cells and cytotoxic T cells (CTL), but also inhibits Tregs (57). Therefore, it is often defined as a pro-inflammatory cytokine. In colorectal cancer, IL-21 is strongly associated with chronic inflammatory colitis that precedes the malignant disease (57–59). A similar pro-inflammatory effect of IL-21 on $\gamma\delta$ T cells was initially described. Upon *in vitro* expansion with IL-21, human V γ 9V δ 2 cells display increased levels of granzyme B and increased production of IFN- γ after activation, resulting in enhanced cytotoxic activity toward tumor cells (60). However, IL-21 modulatory role may depend on the cell type and the duration of the exposure. For example, IL-21 enhances IL-10 production by regulatory B cells and their proliferation. Similarly, our group recently found that IL-21 is implicated in the polarization of human V γ 9V δ 2 T cells and V δ 1 T cells toward a regulatory phenotype (30, 61). We isolated a subpopulation of CD73+ regulatory V γ 9V δ 2 T cells following their expansion in the presence of IL-21. We demonstrated that this subset can synthesize adenosine through CD73 enzymatic activity, and produces the suppressive cytokine IL-10 and the chemokine IL-8 (also known as CXCL8) that is involved in the recruitment of polymorphonuclear leukocytes



(PMN)-MDSCs. This CD73⁺ cell subpopulation can suppress the T cell immune response directly in an adenosine- and IL-10-dependent manner, and indirectly by impairing DC antigen presentation (61). We then extended these observations to V δ 1 T cells. We identified in the blood of healthy donors a V δ 1 T cell subpopulation that expresses CD73 and displays immunosuppressive phenotype and functions (i.e., production of immunosuppressive molecules, such as IL-10, adenosine and IL-8). As shown for V γ 9V δ 2 T cells, incubation with IL-21 favors the development and amplification of this V δ 1 subset. Importantly, we detected CD73⁺ $\gamma\delta$ T cells in breast cancer biopsies, suggesting that they could interfere with the anti-tumor response (30). Moreover, in mouse $\gamma\delta$ T cells, CD73 expression is increased after exposure to IL-21, suggesting that this polarization could be a common mechanism among different species (61). Interestingly, after infection with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG), the number of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells was higher in IL-21 receptor knockout mice than wild type animals. IL-21 induces the apoptosis of these cells, suggesting the existence of a balance between IL-21-induced regulatory $\gamma\delta$ T cells and IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells, at least in some contexts (62).

Polarization Into Th17-Like Cells

IL-17 production was first described in helper CD4⁺ cells, called Th17 cells. Th17 cell cytokine secretion, transcription regulation and effects on the immune system are now well-characterized. Their development is controlled by the transcription factors ROR γ t (63) and STAT3, and also by IRF4 in some cases when

the differentiation is induced by cytokines (64). In mice, TGF- β , IL-6, IL-21 and IL-23 play a critical role in the differentiation or polarization of CD4⁺ cells into Th17 cells. In humans, IL-1 and IL-23 seem to have the most important role in Th17 cell differentiation, followed by TGF- β and IL-6 (65–67). IL-17 is produced by murine $\gamma\delta$ T cells (68) and also by human $\gamma\delta$ T cells (69). In both species, IL-7 strongly promotes the expansion of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells (Th17 $\gamma\delta$ T cells) (70). Moreover, several studies have shown that when cultured in the presence of various cytokine combinations, naive V γ 9V δ 2 T cells acquire an IL-17-secreting Th17-like phenotype or a mixed Th1/Th17 phenotype, and produce both IFN- γ and IL-17 (52, 71, 72). Human cord blood-derived V γ 9V δ 2 T cells stimulated with the phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP) require IL-6, IL-1 β and TGF- β to differentiate into Th17 $\gamma\delta$ cells, and also IL-23 for differentiation into $\gamma\delta$ Th1/Th17 cells (71, 72). In adults, differentiation of naive $\gamma\delta$ T cells into memory $\gamma\delta$ Th1/Th17 T cells and Th17 $\gamma\delta$ T cells requires IL-23, IL-1 β and TGF- β , but not IL-6. $\gamma\delta$ Th17 cells can also produce IL-22 (especially cells in the cord blood) (71, 72). The pro-tumor role of IL-17 has been well established in some contexts, and the pro-tumor role of Th17 $\gamma\delta$ T cells will be developed in the next part.

PRO-TUMORAL FUNCTIONS OF $\gamma\delta$ T CELLS (FIGURE 2)

Th17 $\gamma\delta$ T Cells

IL-17 is detected in mice and human tumor (73–75), and $\alpha\beta$ Th17 cells are not the only source of IL-17. Indeed, NK cells,

neutrophils and $\gamma\delta$ T cells also produce IL-17. Notably, Th17 $\gamma\delta$ T cells are the first and major source of IL-17 at sites of inflammation or infection, and also in tumors.

Although Ma et al. showed that IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells (V γ 4 and V γ 6) contribute to the chemotherapy-induced anti-cancer immune response (76), many studies found that Th17 $\gamma\delta$ cells display pro-tumor functions in mouse models and human solid cancers.

In mouse models of fibrosarcoma (77), ovarian (78) and breast cancers (79), $\gamma\delta$ T cells are the main IL-17 producers at the tumor site, and promote tumor growth. Th17 $\gamma\delta$ T cells increase the expression of the angiogenic factors VEGF-2 and ANG-2 at the tumor sites, suggesting that tumor-infiltrating IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells promote tumor development by enhancing angiogenesis (77). They also participate in the establishment of an immunosuppressive TME through the recruitment, expansion and polarization of neutrophils that can suppress cytotoxic T lymphocyte (CTL) activities (79), and the recruitment of MDSCs or small peritoneal macrophages in ovarian cancer. All these cells also induce the expression of pro-tumor and pro-angiogenic factors that promote tumor growth.

In human solid cancers, Wu et al. were the first to demonstrate the pro-tumor role of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in human colorectal cancer (33). They showed that the main IL-17 producers in colon cancer are $\gamma\delta$ T cells (up to 83% of V δ 1 T cells). In this cancer, Th17 $\gamma\delta$ T cell differentiation and activation are triggered by IL-23 produced by activated DCs present at the tumor site. Colon cancer-infiltrating Th17 $\gamma\delta$ T cells produce also IL-8 that participates in tumor progression through its role in angiogenesis and in MDSC recruitment. These MDSCs contribute to establishing an immunosuppressive microenvironment that favors tumor development. Interestingly, the strong and positive correlation between tumor-infiltrating Th17 $\gamma\delta$ T cells and TNM stage (tumor size, lymphatic invasion, and metastases) strengthens the pro-tumor activities of Th17 $\gamma\delta$ T cells in human colorectal cancer (33). Studies in patients with gallbladder cancer showed an increase of Th17 $\gamma\delta$ T cells in the blood (compared with healthy individuals), and also of tumor-infiltrating lymphocytes in patients who did not receive any treatment. They confirmed the implication of Th17 $\gamma\delta$ T cells in angiogenesis promotion (induction of VEGF production by gallbladder cancer cells) and tumor progression. Moreover, the presence of Th17 $\gamma\delta$ T cells in the blood of patients is associated with poor survival compared with patients with few or without Th17 $\gamma\delta$ T cells (34). Lo Presti et al. showed that $\gamma\delta$ T cells are increased in the blood and at the tumor site in patients with squamous cell carcinoma. Interestingly, tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells are functionally different depending on the tumor stage (80). At early stages, $\gamma\delta$ T cells produce mainly IFN- γ , while at late stages, they produce IL-17. Indeed, higher numbers of IL-17-producing cells (both V δ 1 and V δ 2 $\gamma\delta$ T cell subsets) are found in advanced-stage squamous cell carcinoma compared with early stage tumors. They also showed that both V δ 1 and V δ 2 cell subsets produce high levels of IL-17 at the tumor site. Moreover, V δ 2 T cells produce IFN- γ in the blood, suggesting that Th17 $\gamma\delta$ T polarizing factors are present in the TME (80).

Overall, many reports demonstrated the pro-tumor functions of $\gamma\delta$ T cells with a Th17 $\gamma\delta$ T phenotype. To date, it is not possible to say whether this Th17 $\gamma\delta$ T cell sub-population is recruited at the tumor site or is polarized *in situ* toward IL-17-producing cells due to the presence of Th17-polarizing cytokines in the TME (e.g., IL-1 β , IL-23, TGF- β , IL-6). Nevertheless, it is now well-established that Th17 $\gamma\delta$ T cells favor tumor growth by promoting angiogenesis, metastasis development, and the recruitment of other immunosuppressive cells, such as suppressive neutrophils and MDSCs.

Production of Suppressive Cytokines

As discussed in the polarization section, upon exposure to specific stimuli $\gamma\delta$ T cells can acquire potent regulatory functions, particularly through the production of IL-10 and TGF- β , two strongly suppressive cytokines.

IL-10 is a key anti-inflammatory cytokine that inhibits the production of pro-inflammatory cytokines and the expression of co-stimulatory molecules by Th1 and antigen-presenting cells (81). *In vitro*, IL-4-polarized V δ 1 T cells produce IL-10 and inhibit the growth of V δ 2 T cells in an IL-10-dependent manner. Similarly, V δ 1 T cells activated with anti-TCR antibodies strongly secrete IL-10 (54, 82). In the presence of IL-21, the CD73+ V δ 2 and V δ 1 T cell subsets secrete high levels of IL-10 upon activation (30, 61). In human colorectal cancer, infiltrating CD39+ $\gamma\delta$ T cells, which are mainly V δ 1+ cells, produce more IL-10 than CD39- $\gamma\delta$ T cells and CD39+ $\gamma\delta$ T cells from the tumor-adjacent normal tissue. However, after several days of culture *ex vivo*, these cells do not maintain IL-10 production and lose their ability to suppress the proliferation of activated T cells (31). In mice, IL-10-producing $\gamma\delta$ T cells have been identified in tumors. In a breast cancer model, supernatant from infiltrating $\gamma\delta$ T cells suppresses the proliferation of anti-tumor CTLs in an IL-10-dependent manner (83). In a syngeneic model of OVA-expressing EL4 tumors (lymphoma), IL-10-producing $\gamma\delta$ T cells suppress the CD8-dependent anti-tumor response, and their depletion significantly reduces tumor growth (84). Similarly, IL-10+ $\gamma\delta$ T cells are observed in the spleen and tumors of mice grafted with TC1 cells (transformed lung epithelial cells) (61). IL-10-producing $\gamma\delta$ T cells are also observed in other conditions, for instance during pregnancy (both human and mouse), and in oral tolerance and infection in the mouse (85–87). Collectively, these results suggest that V δ 1 and V δ 2 T cells can produce IL-10; however, the amount and the impact of this production in human tumors has not been clearly established yet.

TGF- β is a potent immunosuppressive factor that is tightly regulated, particularly at the post-translational level. To be active, the mature part of the protein needs to be released from the latent peptide (LAP) through interaction with the integrin α v β 6 or α v β 8, the main activating partners of TGF- β . *In vitro*, TGF β mRNA level and LAP surface expression are increased in V δ 1 T cells sorted from PBMCs and activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (88). High TGF- β level has also been detected in the supernatant of PBMCs stimulated with an anti-TCR V δ 1 antibody (82), and in the supernatant of V δ 2 T cells stimulated with the ligand isopentenyl pyrophosphate and expanded with TGF- β and IL-15 (45). In colorectal cancer, TGF- β surface

expression is higher in $\gamma\delta$ T cells isolated from tumors than from normal tissue (31). Interestingly, in the mouse tumor model MM2, infiltrating $\gamma\delta$ T cells suppress the anti-MM2 CTLs through TGF- β in addition to IL-10 (83). However, it is unclear whether total or active TGF- β was measured in these studies. While total TGF- β is a measure of the whole TGF- β production by the cells, only active TGF- β quantification indicates the actual suppressive potential of such cells through TGF- β . Indeed, in these studies, $\gamma\delta$ T cell suppressive properties were not affected by a neutralizing anti-TGF- β antibody, despite their supposed high level of TGF- β production, or the impact of TGF- β neutralization was not explored. A possible explanation for this discrepancy is that only total TGF- β was measured and not active TGF- β . This argument is supported by the reported high concentration that is more consistent with the measurement of total TGF- β . These results suggest that human $\gamma\delta$ T cells, particularly V δ 1 T cells, can produce and present latent TGF- β at their surface in some contexts. However, because of the lack of $\alpha\text{V}\beta$ 6 or $\alpha\text{V}\beta$ 8 integrin expression, $\gamma\delta$ T cells might not be able to produce active TGF- β on their own, unlike conventional Tregs (89, 90). Nonetheless, the presence of latent TGF- β at the $\gamma\delta$ T cell surface is highly relevant because they represent a new source of latent TGF- β that may be activated by integrin-expressing partners within the tumor.

Besides the production of directly suppressive cytokines, $\gamma\delta$ T cells also support the establishment of a suppressive TME through the production of other cytokines, such as IL-8 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) that favor PMN-MDSC accumulation and expansion in colorectal cancer (33). Interestingly, IL-21, which is highly expressed in this cancer type, increases the production of IL-8 by CD73+ V δ 2 T cells and V δ 1 T cells *in vitro* (30, 61).

Involvement of the Adenosine Pathway

Extracellular ATP and adenosine are considered potent modulators of the anti-tumor immune response. Extracellular ATP, released by apoptotic cells for example, induces inflammation and promotes strong anti-tumor responses because it increases the immunogenicity of dying cancer cells (91, 92). It favors the recruitment of phagocytes, the recruitment and maturation of DC, inhibits the proliferation of tumor cells but not of healthy cells, and promotes cancer cell death (91, 93, 94). Conversely, extracellular adenosine inhibits the anti-tumor immune response and induces the establishment of an immunosuppressive microenvironment (95). The adenosine pathway involves the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ENTPD1 or CD39) that catalyzes the phosphohydrolysis of extracellular ATP into ADP and of ADP into AMP, and the ecto-5'-nucleotidase CD73 that completes AMP conversion into adenosine (92, 96, 97). It has been shown that $\gamma\delta$ T cells express CD39 and/or CD73 during inflammation and in the TME. Their expression is associated with suppression or inhibition of the immune response (98–100). In murine pancreatic cancer, Daley et al. found that tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells upregulate CD39 expression (among other immunosuppressive molecules) and promote tumor progression by restricting $\alpha\beta$ T cell activation (36). Hu and

colleagues described in human colorectal cancer a subpopulation of regulatory $\gamma\delta$ T cells that express CD39 (31). CD39+ $\gamma\delta$ T cells are enriched at the tumor site and produce high levels of adenosine in the TME, compared with other regulatory cells such as conventional Tregs. Furthermore, they showed that infiltration of CD39+ $\gamma\delta$ T cells is positively correlated with the TNM stage, suggesting that these cells participate in the establishment of an immunosuppressive TME, thus promoting tumor growth (31). *In vitro*, our group identified subpopulations of regulatory $\gamma\delta$ T cells isolated from peripheral blood that express CD73 and can produce adenosine. These CD73+ populations (V γ 9V δ 2 or V δ 1) also express CD39 and catalyze the transformation of ATP into adenosine, thus displaying immunosuppressive functions, as revealed by their capacity to inhibit $\alpha\beta$ T cell proliferation (30, 61). These regulatory CD73+ $\gamma\delta$ T cells are found in human breast cancer samples, suggesting that they could interfere with the anti-tumor immune response and favor tumor progression (30). Altogether, these studies indicate that the CD39/CD73/adenosine pathway is a major component of $\gamma\delta$ T cell regulatory/immunosuppressive functions in the TME.

Other Suppressive Mechanisms of $\gamma\delta$ T Cells

The previously described regulatory $\gamma\delta$ T cells can contribute to the establishment of an immunosuppressive microenvironment and to the inhibition of the anti-tumor response in different manners, for instance by producing inhibitory factors (e.g., IL-10, IL-8, TGF- β and adenosine) or by recruiting immunosuppressive cells (e.g., MDSCs and neutrophils). $\gamma\delta$ T cells can also exert their regulatory functions by providing negative co-stimulatory signals to T cells in the TME through expression of immune checkpoint proteins. Programmed cell death 1 (PD1) and its ligand programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) play a major role in the negative regulation of cell-mediated immune responses. Indeed, PD1 is expressed by T cells, and upon binding to its ligand (expressed by B cells, macrophages and cancer cells), it inhibits T cell activation, thus impairing the anti-tumor T cell response. Peters et al. showed that V δ 2 T cells obtained from the blood of healthy donors can express PD-L1 following activation (47). These cells inhibit $\alpha\beta$ T cell proliferation in co-culture experiments, and this effect can be abrogated by PD-L1 blockade (47). This could be another mechanism by which regulatory $\gamma\delta$ T cells exert their immunosuppressive activities and promote tumor growth. In agreement, Daley et al. showed in a pancreatic cancer mouse model that PD-L1 expression is higher in tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells than in splenic $\gamma\delta$ T cells (36). In co-culture experiments, they found that tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells prevent $\alpha\beta$ T cell activation and that this inhibition is reversed by an anti-PD-L1 antibody (36). Interestingly, the same regulatory phenotype is observed in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Indeed, PD-L1 is strongly expressed in $\gamma\delta$ T cells from the blood of patients with pancreatic cancer compared with healthy donors. Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells also express PD-L1 in human PDAC (50% of infiltrating $\gamma\delta$ T cells), suggesting that $\gamma\delta$ T cells can promote tumor progression through the PD1/PD-L1 axis (36).

T-cell immunoglobulin mucin receptor 3 (TIM-3) and its ligand galectin-9 (GAL-9) are other immune checkpoint molecules that participate in T cell response inhibition. TIM-3 interaction with GAL-9 limits T cell expansion and effector function in the TME (101, 102). GAL-9 expression is upregulated on tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in human and mouse PDAC, and $\gamma\delta$ T cell-mediated suppression is dependent on GAL-9 (36).

Little is known about the expression of other immune checkpoint molecules, such as PD-L2, CD80/86 and CTLA-4, by $\gamma\delta$ T cells in cancer. More studies are needed to investigate the expression of these and other suppressive molecules to fully understand the mechanisms of action of regulatory $\gamma\delta$ T cells.

IMPLICATIONS FOR $\gamma\delta$ T CELL-BASED TUMOR IMMUNOTHERAPY

The discovery of $\gamma\delta$ T cell-mediated tumor immune surveillance has led to much research to understand the underlying mechanisms and to harness their potent anti-tumor properties. It is now firmly established that $\gamma\delta$ T cells are well-equipped to recognize and eliminate malignant cells (20, 103). Thus, much effort has focused on the development of therapeutics using $\gamma\delta$ T cells, especially the V γ 9V δ 2 subset because they can be easily obtained and expanded from the blood (104, 105). Two main strategies were first investigated: (i) *in vivo* expansion of V γ 9V δ 2 T cells by injection of phosphoantigens and low-dose IL-2 in the patient, and (ii) adoptive transfer of *ex vivo* expanded V γ 9V δ 2 T cells. Clinical trials using both strategies in patients with hematological or solid cancers confirmed the safety of this immunotherapy (well-tolerated and no toxicity), but showed moderate clinical success (106–109). Indeed, the results were not as good as expected because only few patients showed complete response to the therapy. Among the reasons of these relatively modest clinical results were the skewing of $\gamma\delta$ T cells toward a non-reactive or even a pro-tumor phenotype. For example, Hoeres et al. showed that incubation of PBMCs from patients with leukemia with IL-2 and/or zoledronic acid, which are used to activate $\gamma\delta$ T cells, induces PD-1 expression by $\gamma\delta$ T cells and impairs their anti-tumor functions (110). Similarly, Castella et al. reported PD-1 expression by $\gamma\delta$ T cells in patients with myeloma after phosphoantigen activation (111). Several *in vitro* and *in vivo* studies, summarized here, have demonstrated that $\gamma\delta$ T cell polarization toward suppressive and/or IL-17-producing cells is a real possibility and that anti- and pro-tumor $\gamma\delta$ T cells might co-exist in the tumor.

After these first clinical trials, new refined approaches based on recent discoveries are currently being developed. Aminobisphosphonate activation of $\gamma\delta$ T cells in combination with chemotherapy or with FDA-approved antibodies is one of these axes. Hoeres et al. and Castella et al. showed that incubation with an anti-PD-1 antibody restores the proliferative and anti-tumor properties of V γ 9V δ 2 T cells from patients with leukemia or lymphoma (110, 111). However, Castella et al. then found that phosphoantigen stimulation of anergic PD-1+ V γ 9V δ 2 combined with PD-1 blockade increases the expression of PD-1 and of two other immune checkpoint

molecules (TIM-3 and LAG-3), leading to a “super-nergic” state (112). Thus, although the combination of $\gamma\delta$ T cell stimulation and immune checkpoint blockade is an interesting and easily feasible therapeutic alternative, it still needs to be improved, by combining for example two or more antibodies against immune checkpoint molecules. The use of bi-specific T-cell engagers (BITEs), tribodies, and engineered T cells harboring a chimeric antigen receptor (CAR) are other interesting options. For instance, the redirection of V γ 9V δ 2 T cells against tumor cells using bispecific antibodies or tribodies is efficient in HER-2-positive PDAC and ovarian cancer (113). TEGs are $\alpha\beta$ T cells engineered to express tumor-specific V γ 9V δ 2 TCRs. In *in vitro* models and in humanized mouse cancer models, TEGs reduce colony formation of progenitor cells of primary acute myeloid leukemia blasts and inhibit leukemia growth (114). TEGs engineered from patients with myeloma can recognize and efficiently kill myeloma cells in a 3D bone marrow niche model. Phase 1 clinical trials are currently in development to test TEGs, CAR $\gamma\delta$ T cells, and antibodies (bispecific antibodies or anti-BTN3A antibodies) to specifically “engage” $\gamma\delta$ T cells in the anti-tumor immune response (26).

Another strategy would be to focus on V δ 1 T cells, the main subpopulation that infiltrates the TME of solid tumors. Despite their potent anti-tumor properties, V δ 1 T cells had never been tested in the clinic due to lack of suitable expansion/differentiation protocols. Recently, Silva-Santos’ team developed a new and robust clinical-grade method for selective and large-scale expansion and differentiation of cytotoxic V δ 1 T cells, and showed that these cells can inhibit tumor growth and dissemination in preclinical models of chronic lymphocytic leukemia (27).

On the basis of reports demonstrating $\gamma\delta$ T cell pro-tumor functions, regulatory $\gamma\delta$ T cell subsets could be a thorn in the side of these newly developed therapies and need to be taken into account. Unfortunately, no clear phenotypic marker of such cells has emerged yet. V δ 1 cells have been associated with pro-tumor T cells, but when cultured in proper conditions they show very high potential for anti-tumor therapies due to their strong reactivity and cytotoxicity toward tumor cells. Adenosine pathway markers (e.g., CD39 and CD73) are interesting, but do not characterize pro-tumor $\gamma\delta$ T cells on their own. Indeed, CD39 can be considered as an activation marker for T cells (115, 116), and CD73 is also expressed by naive $\gamma\delta$ T cells (117, 118). More studies are needed to better characterize $\gamma\delta$ T cell pro-tumor phenotypes and to identify markers or marker combinations that will allow the depletion of pro-tumor subsets in the whole $\gamma\delta$ T cell population.

In the absence of such specific phenotypic markers to deplete or sort out the pro-tumor $\gamma\delta$ T cells before cell therapy, targeting polarizing cytokines or pro-tumor cytokines produced by pro-tumor $\gamma\delta$ T cells could be of interest. While IL-21 expression might favor the emergence of a regulatory $\gamma\delta$ T cell population, its positive role on the cytotoxicity of other cell types, such as CTL and NK cells, might be important for the anti-tumor response. Alternatively, targeting TGF- β as a pro-tumor cytokine and a polarizing factor for $\gamma\delta$ T cells toward both suppressive and IL-17-producing cells might be of interest. Newly developed highly

selective approaches targeting the TGF- β -anchoring protein GARP or the latent TGF- β peptide LAP could be employed in pro-tumor $\gamma\delta$ T cell-rich tumors, such as colorectal cancer, or with $\gamma\delta$ T cell-based therapies to avoid their polarization (119, 120). While no anti-human IL-10 antibody has been approved for cancer treatment, the production of IL-17A and adenosine could be targeted in tumors that are highly infiltrated by pro-tumor $\gamma\delta$ T cells, such as breast and colorectal cancer.

CONCLUDING REMARKS

Although $\gamma\delta$ T cells offer interesting perspectives for clinical applications in cell-based immunotherapy, their pro-tumor functions have to be taken into account. Indeed, environmental factors can polarize or repolarize $\gamma\delta$ T cells, leading to loss of the anti-tumor function. Moreover, important advances in $\gamma\delta$ T cell immunobiology have revealed a large diversity in functionality and activation modes of these cells. The new challenge is to better characterize and understand the role of the various $\gamma\delta$ T cell subsets in function of the specific context.

REFERENCES

- Kabelitz D, Marischen L, Oberg HH, Holtmeier W, Wesch D. Epithelial defence by gamma delta T cells. *Int Arch Allergy Immunol.* (2005) 137:73–81. doi: 10.1159/000085107
- Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, Silberzahn T, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol.* (2012) 13:872–9. doi: 10.1038/ni.2394
- 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 Vgamma9Vdelta2 T cell activation. *Immunity.* (2019) 50:1043–53 e1045. doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.016
- Rigau M, Ostrowska 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:eaay5516. doi: 10.1126/science.aay5516
- Fournie JJ, Bonneville M. Stimulation of gamma delta T cells by phosphoantigens. *Res Immunol.* (1996) 147:338–47. doi: 10.1016/0923-2494(96)89648-9
- Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, Poccia F, Salvetti M, Ristori G, et al. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J Immunol.* (1997) 159:3723–30.
- De Libero G. Control of gammadelta T cells by NK receptors. *Microbes Infect.* (1999) 1:263–7. doi: 10.1016/S1286-4579(99)80043-4
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science.* (1998) 279:1737–40. doi: 10.1126/science.279.5357.1737
- Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med.* (2000) 191:937–48. doi: 10.1084/jem.191.6.937
- Bai L, Picard D, Anderson B, Chaudhary V, Luoma A, Jabri B, et al. The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR. *Eur J Immunol.* (2012) 42:2505–10. doi: 10.1002/eji.201242531
- Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, Mcpherson KG, Lim RT, et al. CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol.* (2013) 14:1137–45. doi: 10.1038/ni.2713
- Zeng X, Wei YL, Huang J, Newell EW, Yu H, Kidd BA, et al. Gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity.* (2012) 37:524–34. doi: 10.1016/j.immuni.2012.06.011
- Fausther-Bovendo H, Wauquier N, Cherfils-Vicini J, Cremer I, Debre P, Vieillard V. NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *AIDS.* (2008) 22:217–26. doi: 10.1097/QAD.0b013e3282f46e7c
- Wesch D, Peters C, Oberg HH, Pietschmann K, Kabelitz D. Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci.* (2011) 68:2357–70. doi: 10.1007/s00018-011-0699-1
- Hudspeth K, Fogli M, Correia DV, Mikulak J, Roberto A, Della Bella S, et al. Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood.* (2012) 119:4013–6. doi: 10.1182/blood-2011-11-390153
- Kuroda H, Saito H, Ikeguchi M. Decreased number and reduced NKG2D expression of Vdelta1 gammadelta T cells are involved in the impaired function of Vdelta1 gammadelta T cells in the tissue of gastric cancer. *Gastric Cancer.* (2012) 15:433–9. doi: 10.1007/s10120-011-0138-x
- Maher CO, Dunne K, Comerford R, O’dea S, Loy A, Woo J, et al. *Candida albicans* stimulates IL-23 release by human dendritic cells and downstream IL-17 secretion by Vdelta1 T cells. *J Immunol.* (2015) 194:5953–60. doi: 10.4049/jimmunol.1403066
- 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
- Adams EJ, Gu S, Luoma AM. Human gamma delta T cells: evolution and ligand recognition. *Cell Immunol.* (2015) 296:31–40. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.04.008
- Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B. Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res.* (2010) 70:10024–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3236
- Marquez-Medina D, Salla-Fortuny J, Salud-Salvia A. Role of gamma-delta T-cells in cancer: another opening door to immunotherapy. *Clin Transl Oncol.* (2012) 14:891–5. doi: 10.1007/s12094-012-0935-7
- Buccheri S, Guggino G, Caccamo N, Li Donni P, Dieli F. Efficacy and safety of gammadelta T cell-based tumor immunotherapy: a meta-analysis. *J Biol Regul Homeost Agents.* (2014) 28:81–90.
- Pressey JG, Adams J, Harkins L, Kelly D, You Z, Lamb LS Jr. *In vivo* expansion and activation of gammadelta T cells as immunotherapy for

- refractory neuroblastoma: a phase I study. *Medicine*. (2016) 95:e4909. doi: 10.1097/MD.0000000000004909
24. Lo Presti E, Pizzolato G, Gulotta E, Cocorullo G, Gulotta G, Dieli F, et al. Current advances in gammadelta T cell-based tumor immunotherapy. *Front Immunol*. (2017) 8:1401. doi: 10.3389/fimmu.2017.01401
 25. Pauza CD, Liou ML, Lahusen T, Xiao L, Lapidus RG, Cairo C, et al. Gamma delta T cell therapy for cancer: it is good to be local. *Front Immunol*. (2018) 9:1305. doi: 10.3389/fimmu.2018.01305
 26. Garber K. gammadelta T cells bring unconventional cancer-targeting to the clinic - again. *Nat Biotechnol*. (2020) 38:389–91. doi: 10.1038/s41587-020-0487-2
 27. 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. *Clin Cancer Res*. (2016) 22:5795–804. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0597
 28. 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) 27:334–48. doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.020
 29. Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Wevers E, et al. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol*. (2012) 189:5029–36. doi: 10.4049/jimmunol.1201892
 30. Chabab G, Barjon C, Abdellaoui N, Salvador-Prince L, Dejous C, Michaud HA, et al. Identification of a regulatory Vdelta1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J Leukoc Biol*. (2020) 107:1057–67. doi: 10.1002/JLB.3MA0420-278RR
 31. Hu G, Wu P, Cheng P, Zhang Z, Wang Z, Yu X, et al. Tumor-infiltrating CD39(+)gammadeltaTregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*. (2017) 6:e1277305. doi: 10.1080/2162402X.2016.1277305
 32. Rong L, Li K, Li R, Liu HM, Sun R, Liu XY. Analysis of tumor-infiltrating gamma delta T cells in rectal cancer. *World J Gastroenterol*. (2016) 22:3573–80. doi: 10.3748/wjg.v22.i13.3573
 33. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, 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
 34. Patil RS, Shah SU, Shrikhande SV, Goel M, Dikshit RP, Chiplunkar SV. IL17 producing gammadelta T cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients. *Int J Cancer*. (2016) 139:869–81. doi: 10.1002/ijc.30134
 35. Chen X, Shang W, Xu R, Wu M, Zhang X, Huang P, et al. Distribution and functions of gammadelta T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment. *J Transl Med*. (2019) 17:144. doi: 10.1186/s12967-019-1897-0
 36. 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) 166:1485–99 e1415. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.046
 37. 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. *Nat Med*. (2015) 21:938–45. doi: 10.1038/nm.3909
 38. Tosolini M, Pont F, Poupot M, Vergez F, Nicolau-Travers ML, Vermijlen D, et al. Assessment of tumor-infiltrating TCRVgamma9Vdelta2 gammadelta lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology*. (2017) 6:e1284723. doi: 10.1080/2162402X.2017.1284723
 39. Lo Presti E, Moccio F, Mitri RD, Corsale AM, Di Simone M, Vieni S, et al. Analysis of colon-infiltrating gammadelta T cells in chronic inflammatory bowel disease and in colitis-associated cancer. *J Leukoc Biol*. (2020) 108:749–60. doi: 10.1002/JLB.5MA0320-201RR
 40. Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, Michaud HA, Gros L, Eliaou JF, et al. Plasticity of gammadelta T cells: impact on the anti-tumor response. *Front Immunol*. (2014) 5:622. doi: 10.3389/fimmu.2014.00622
 41. Travis MA, Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*. (2014) 32:51–82. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120257
 42. Qin Y, Garrison BS, Ma W, Wang R, Jiang A, Li J, et al. A milieu molecule for TGF-beta required for microglia function in the nervous system. *Cell*. (2018) 174:156–71. e116. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.027
 43. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. (2003) 198:1875–86. doi: 10.1084/jem.20030152
 44. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. (2008) 9:641–9. doi: 10.1038/ni.1610
 45. Casetti R, Agrati C, Wallace M, Sacchi A, Martini F, Martino A, et al. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J Immunol*. (2009) 183:3574–7. doi: 10.4049/jimmunol.0901334
 46. Hu Y, Cui Q, Gu Y, Sheng L, Wu K, Shi J, et al. Decitabine facilitates the generation and immunosuppressive function of regulatory gammadelta T cells derived from human peripheral blood mononuclear cells. *Leukemia*. (2013) 27:1580–5. doi: 10.1038/leu.2012.345
 47. Peters C, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Phenotype and regulation of immunosuppressive Vdelta2-expressing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci*. (2014) 71:1943–60. doi: 10.1007/s00018-013-1467-1
 48. Peters C, Hasler R, Wesch D, Kabelitz D. Human Vdelta2 T cells are a major source of interleukin-9. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2016) 113:12520–5. doi: 10.1073/pnas.1607136113
 49. Kouakanou L, Peters C, Sun Q, Floess S, Bhat J, Huehn J, et al. Vitamin C supports conversion of human gammadelta T cells into FOXP3-expressing regulatory cells by epigenetic regulation. *Sci Rep*. (2020) 10:6550. doi: 10.1038/s41598-020-63572-w
 50. Li X, Kang N, Zhang X, Dong X, Wei W, Cui L, et al. Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGF-beta and their involvement in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. (2011) 186:6693–700. doi: 10.4049/jimmunol.1002776
 51. Kang N, Tang L, Li X, Wu D, Li W, Chen X, et al. Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunol Lett*. (2009) 125:105–13. doi: 10.1016/j.imlet.2009.06.005
 52. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Blood*. (2011) 118:129–38. doi: 10.1182/blood-2011-01-331298
 53. Setrerrahmane S, Xu H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. *Mol Cancer*. (2017) 16:153. doi: 10.1186/s12943-017-0721-9
 54. Mao Y, Yin S, Zhang J, Hu Y, Huang B, Cui L, et al. A new effect of IL-4 on human gammadelta T cells: promoting regulatory Vdelta1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of Vdelta2 T cells. *Cell Mol Immunol*. (2016) 13:217–28. doi: 10.1038/cmi.2015.07
 55. Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol*. (2001) 212:110–7. doi: 10.1006/cimm.2001.1850
 56. Siegers GM, Ribot EJ, Keating A, Foster PJ. Extensive expansion of primary human gamma delta T cells generates cytotoxic effector memory cells that can be labeled with FeraHeme for cellular MRI. *Cancer Immunol Immunother*. (2013) 62:571–83. doi: 10.1007/s00262-012-1353-y
 57. Chabab G, Bonnefoy N, Lafont V. IL-21 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. (2020) 1240:73–82. doi: 10.1007/978-3-030-38315-2_6
 58. Stolfi C, Rizzo A, Franze E, Rotondi A, Fantini MC, Sarra M, et al. Involvement of interleukin-21 in the regulation of colitis-associated colon cancer. *J Exp Med*. (2011) 208:2279–90. doi: 10.1084/jem.20111106
 59. De Simone V, Ronchetti G, Franze E, Colantoni A, Ortenzi A, Fantini MC, et al. Interleukin-21 sustains inflammatory signals that contribute to sporadic colon tumorigenesis. *Oncotarget*. (2015) 6:9908–23. doi: 10.18632/oncotarget.3532
 60. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournie JJ, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev*. (2007) 215:123–35. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00468.x

61. Barjon C, Michaud HA, Fages A, Dejoux C, Zampieri A, They L, et al. IL-21 promotes the development of a CD73-positive Vgamma9Vdelta2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology*. (2017) 7:e1379642. doi: 10.1080/2162402X.2017.1379642
62. Huang Y, Matsumura Y, Hatano S, Noguchi N, Murakami T, Iwakura Y, et al. IL-21 inhibits IL-17A-producing gammadelta T-cell response after infection with Bacillus Calmette-Guerin via induction of apoptosis. *Innate Immun*. (2016) 22:588–97. doi: 10.1177/1753425916664125
63. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*. (2008) 28:29–39. doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.016
64. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*. (2007) 19:281–6. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.005
65. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. (2003) 421:744–8. doi: 10.1038/nature01355
66. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. (2007) 8:950–7. doi: 10.1038/ni1497
67. Zhou L, Ivanov I, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. (2007) 8:967–74. doi: 10.1038/ni1488
68. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. (2009) 31:331–41. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.001
69. Deknuydt F, Scotet E, Bonneville M. Modulation of inflammation through IL-17 production by gammadelta T cells: mandatory in the mouse, dispensable in humans? *Immunol Lett*. (2009) 127:8–12. doi: 10.1016/j.imlet.2009.08.003
70. Michel ML, Pang DJ, Haque SF, Potocnik AJ, Pennington DJ, Hayday AC. Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:17549–54. doi: 10.1073/pnas.1204327109
71. Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol*. (2010) 184:7268–80. doi: 10.4049/jimmunol.1000600
72. Ness-Schwickerath KJ, Morita CT. Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing gammadelta T cells. *Cell Mol Life Sci*. (2011) 68:2371–90. doi: 10.1007/s00018-011-0700-z
73. Kato Y, Tanaka Y, Miyagawa F, Yamashita S, Minato N. Targeting of tumor cells for human gammadelta T cells by nonpeptide antigens. *J Immunol*. (2001) 167:5092–8. doi: 10.4049/jimmunol.167.9.5092
74. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, Mcallister F, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and *in vivo* growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol*. (2005) 175:6177–89. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.6177
75. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwajiri S, Szeliga W, Kolls J, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*. (2007) 178:6730–3. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.6730
76. Ma Y, Aymeric L, Locher C, Mattarollo SR, Delahaye NF, Pereira P, et al. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med*. (2011) 208:491–503. doi: 10.1084/jem.20100269
77. 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. *Eur J Immunol*. (2010) 40:1927–37. doi: 10.1002/eji.200940157
78. Rei M, Goncalves-Sousa N, Lanca T, Thompson RG, Mensurado S, Balkwill FR, et al. Murine CD27(–) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2014) 111:E3562–70. doi: 10.1073/pnas.1403424111
79. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. (2015) 522:345–8. doi: 10.1038/nature14282
80. Lo Presti E, Toia F, Oieni S, Buccheri S, Turdo A, Mangiapane LR, et al. Squamous cell tumors recruit gammadelta T cells producing either IL17 or IFNgamma depending on the tumor stage. *Cancer Immunol Res*. (2017) 5:397–407. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0348
81. Wei H, Li B, Sun A, Guo F. Interleukin-10 family cytokines immunobiology and structure. *Adv Exp Med Biol*. (2019) 1172:79–96. doi: 10.1007/978-981-13-9367-9_4
82. Hua F, Kang N, Gao YA, Cui LX, Ba DN, He W. Potential regulatory role of *in vitro*-expanded Vdelta1 T cells from human peripheral blood. *Immunol Res*. (2013) 56:172–80. doi: 10.1007/s12026-013-8390-2
83. Seo N, Tokura Y, Takigawa M, Egawa K. Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. *J Immunol*. (1999) 163:242–9.
84. Ke Y, Kapp LM, Kapp JA. Inhibition of tumor rejection by gammadelta T cells and IL-10. *Cell Immunol*. (2003) 221:107–14. doi: 10.1016/S0008-8749(03)00066-2
85. Arck PC, Ferrick DA, Steele-Norwood D, Croitoru K, Clark DA. Murine T cell determination of pregnancy outcome: I. Effects of strain, alpha beta T cell receptor, gammadelta T cell receptor, and gammadelta T cell subsets. *Am J Reprod Immunol*. (1997) 37:492–502. doi: 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00265.x
86. Rhodes KA, Andrew EM, Newton DJ, Tramonti D, Carding SR. A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. *Eur J Immunol*. (2008) 38:2274–83. doi: 10.1002/eji.200838354
87. Fan DX, Duan J, Li MQ, Xu B, Li DJ, Jin LP. The decidual gammadelta T cells up-regulate the biological functions of trophoblasts via IL-10 secretion in early human pregnancy. *Clin Immunol*. (2011) 141:284–92. doi: 10.1016/j.clim.2011.07.008
88. Kuhl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Bleszenohl M, Westermann J, Zeitz M, et al. Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology*. (2009) 128:580–8. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03162.x
89. Stockis J, Lienart S, Colau D, Collignon A, Nishimura SL, Sheppard D, et al. Blocking immunosuppression by human Tregs *in vivo* with antibodies targeting integrin alphaVbeta8. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2017) 114:E10161–8. doi: 10.1073/pnas.1710680114
90. Siegers GM. Integral Roles for Integrins in gammadelta T Cell Function. *Front Immunol*. (2018) 9:521. doi: 10.3389/fimmu.2018.00521
91. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Martins I, Kroemer G, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res*. (2010) 70:855–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3566
92. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev*. (2017) 276:121–44. doi: 10.1111/imr.12528
93. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. (2009) 461:282–6. doi: 10.1038/nature08296
94. Silva-Vilches C, Ring S, Mahnke K. ATP and its metabolite adenosine as regulators of dendritic cell activity. *Front Immunol*. (2018) 9:2581. doi: 10.3389/fimmu.2018.02581
95. La Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol*. (2001) 166:1611–7. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.1611
96. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. (2013) 19:355–67. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005
97. Bastid J, Cortalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. (2013) 32:1743–51. doi: 10.1038/onc.2012.269

98. Otsuka A, Hanakawa S, Miyachi Y, Kabashima K. CD39: a new surface marker of mouse regulatory gammadelta T cells. *J Allergy Clin Immunol.* (2013) 132:1448–51. doi: 10.1016/j.jaci.2013.05.037
99. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Dejoux C, Giustiniani J, Laheurte C, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res.* (2015) 3:254–65. doi: 10.1158/2326-6066.CCR-14-0018
100. Liang D, Zuo A, Zhao R, Shao H, Born WK, O'Brien RL, et al. CD73 Expressed on gammadelta T cells shapes their regulatory effect in experimental autoimmune uveitis. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0150078. doi: 10.1371/journal.pone.0164502
101. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med.* (2010) 207:2187–94. doi: 10.1084/jem.20100643
102. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* (2011) 12:492–9. doi: 10.1038/ni.2035
103. 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
104. Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol.* (2006) 18:539–46. doi: 10.1016/j.coi.2006.07.002
105. Sugie T, Murata-Hirai K, Iwasaki M, Morita CT, Li W, Okamura H, et al. Zoledronic acid-induced expansion of gammadelta T cells from early-stage breast cancer patients: effect of IL-18 on helper NK cells. *Cancer Immunol Immunother.* (2013) 62:677–87. doi: 10.1007/s00262-012-1368-4
106. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, Rolland F, Philip I, Galea C, 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) 57:1599–609. doi: 10.1007/s00262-008-0491-8
107. Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, Goto S, Kaneko T, Yoshida Y, et al. A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells. *Eur J Cardiothorac Surg.* (2010) 37:1191–7. doi: 10.1016/j.ejcts.2009.11.051
108. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Minato N, Tanabe K. Phase I/II study of adoptive transfer of gammadelta T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* (2011) 60:1075–84. doi: 10.1007/s00262-011-1021-7
109. Sakamoto M, Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, Yoshida Y, Murayama T, et al. Adoptive immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using zoledronate-expanded gammadelta T cells: a phase I clinical study. *J Immunother.* (2011) 34:202–11. doi: 10.1097/CJI.0b013e318207ecfb
110. Hoeres T, Holzmann E, Smetak M, Birkmann J, Wilhelm M. PD-1 signaling modulates interferon-gamma production by Gamma Delta (gammadelta) T-Cells in response to leukemia. *Oncoimmunology.* (2019) 8:1550618. doi: 10.1080/2162402X.2018.1550618
111. Castella B, Foglietta M, Sciancalepore P, Rigoni M, Coscia M, Griggio V, et al. Anergic bone marrow Vgamma9Vdelta2 T cells as early and long-lasting markers of PD-1-targetable microenvironment-induced immune suppression in human myeloma. *Oncoimmunology.* (2015) 4:e1047580. doi: 10.1080/2162402X.2015.1047580
112. Castella B, Melaccio A, Foglietta M, Riganti C, Massaia M. Vgamma9Vdelta2 T cells as strategic weapons to improve the potency of immune checkpoint blockade and immune interventions in human myeloma. *Front Oncol.* (2018) 8:508. doi: 10.3389/fonc.2018.00508
113. Oberg HH, Kellner C, Gonnermann D, Sebens S, Bauerschlag D, Gramatzki M, et al. Tribody [(HER2)2xCD16] is more effective than trastuzumab in enhancing gammadelta T cell and natural killer cell cytotoxicity against HER2-expressing cancer cells. *Front Immunol.* (2018) 9:814. doi: 10.3389/fimmu.2018.00814
114. Marcu-Malina V, Heijhuus S, Van Buuren M, Hartkamp I, Strand S, Sebestyen Z, et al. Redirecting alphabeta T cells against cancer cells by transfer of a broadly tumor-reactive gammadelta T-cell receptor. *Blood.* (2011) 118:50–9. doi: 10.1182/blood-2010-12-325993
115. Dombrowski KE, Ke Y, Brewer KA, Kapp JA. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev.* (1998) 161:111–8. doi: 10.1111/j.1600-065X.1998.tb01575.x
116. Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal.* (2007) 3:171–80. doi: 10.1007/s11302-006-9050-y
117. Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol.* (2013) 171:1–7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04623.x
118. Bono MR, Fernandez D, Flores-Santibanez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* (2015) 589:3454–60. doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.027
119. Cuende J, Lienart S, Dedobbeleer O, Van Der Woning B, De Boeck G, Stockis J, et al. Monoclonal antibodies against GARP/TGF-beta1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells *in vivo*. *Sci Transl Med.* (2015) 7:284ra256. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1983
120. Martin CJ, Datta A, Littlefield C, Kalra A, Chapron C, Wawersik S, et al. Selective inhibition of TGFbeta1 activation overcomes primary resistance to checkpoint blockade therapy by altering tumor immune landscape. *Sci Transl Med.* (2020) 12:aay8456. doi: 10.1126/scitranslmed.aay8456

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 Chabab, Barjon, Bonnefoy and Lafont. 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.

Article

Clinicopathological Correlates of $\gamma\delta$ T Cell Infiltration in Triple-Negative Breast Cancer

Florence Boissière-Michot^{1,*}, Ghita Chabab^{1,2,3}, Caroline Mollevi^{1,2,3}, Séverine Guiu^{1,2,3}, Evelyne Lopez-Crapez^{1,2,3}, Jeanne Ramos¹, Nathalie Bonnefoy^{1,2,3}, Virginie Lafont^{1,2,3,†} and William Jacot^{1,2,3,†}

- ¹ Institut Régional du Cancer de Montpellier (ICM), Val d'Aurelle, 34298 Montpellier, France; ghita.chabab@inserm.fr (G.C.); Caroline.Mollevi@icm.unicancer.fr (C.M.); Severine.Guiu@icm.unicancer.fr (S.G.); Evelyne.Crapez@icm.unicancer.fr (E.L.-C.); Jeanne.Ramos@icm.unicancer.fr (J.R.); nathalie.bonnefoy@inserm.fr (N.B.); virginie.lafont@inserm.fr (V.L.); William.Jacot@icm.unicancer.fr (W.J.)
- ² Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), Inserm U1194, 34298 Montpellier, France
- ³ Montpellier University, 34090 Montpellier, France
- * Correspondence: Florence.Boissiere@icm.unicancer.fr; Tel: +33-467-61-85-66; Fax: +33-467-61-31-92
- † These authors contributed equally to this paper.



Citation: Boissière-Michot, F.; Chabab, G.; Mollevi, C.; Guiu, S.; Lopez-Crapez, E.; Ramos, J.; Bonnefoy, N.; Lafont, V.; Jacot, W. Clinicopathological Correlates of $\gamma\delta$ T Cell Infiltration in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers* 2021, 13, 765. <https://doi.org/10.3390/cancers13040765>

Academic Editor: Rudolf Oehler

Received: 20 January 2021

Accepted: 8 February 2021

Published: 12 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The prognostic impact of the different tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) subpopulations remains debated in solid cancers. We investigated the clinicopathological correlates and prognostic impact of TILs, particularly of $\gamma\delta$ T cells, in 162 triple-negative breast cancer (TNBC) patients. A high $\gamma\delta$ T cell density was significantly associated with younger age, higher tumor histological grade, adjuvant chemotherapy, *BRCA1* promoter methylation, TIL density, and PD-L1 and PD-1 expression. In multivariate analyses, $\gamma\delta$ T cell infiltration was an independent prognostic factor. However, this prognostic impact varied according to the tumor *PIK3CA* mutational status. High $\gamma\delta$ T cell infiltration was associated with better survival in patients with *PIK3CA* wild-type tumors, without significant difference in the *PIK3CA*-mutated tumor subgroup. Altogether, these data suggest that high $\gamma\delta$ T cell infiltrate is correlated with immune infiltration and might represent a prognostic tool in TNBC patients.

Abstract: The prognostic impact of the different tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) subpopulations in solid cancers is still debated. Here, we investigated the clinicopathological correlates and prognostic impact of TILs, particularly of $\gamma\delta$ T cells, in 162 patients with triple-negative breast cancer (TNBC). A high $\gamma\delta$ T cell density (>6.625 $\gamma\delta$ T cells/mm²) was associated with younger age ($p = 0.008$), higher tumor histological grade ($p = 0.002$), adjuvant chemotherapy ($p = 0.010$), *BRCA1* promoter methylation ($p = 0.010$), TIL density ($p < 0.001$), and PD-L1 ($p < 0.001$) and PD-1 expression ($p = 0.040$). In multivariate analyses, $\gamma\delta$ T cell infiltration (cutoff = 6.625 $\gamma\delta$ T cells/mm²) was an independent prognostic factor (5-year relapse-free survival: 63.3% vs. 89.8%, $p = 0.027$; 5-year overall survival: 73.8% vs. 89.9%, $p = 0.031$, for low vs. high infiltration). This prognostic impact varied according to the tumor *PIK3CA* mutational status. High $\gamma\delta$ T cell infiltration was associated with better survival in patients with *PIK3CA* wild-type tumors, but the difference was not significant in the subgroup with *PIK3CA*-mutated tumors. Altogether, these data suggest that high $\gamma\delta$ T cell infiltrate is correlated with immune infiltration and might represent a candidate prognostic tool in patients with TNBC.

Keywords: triple-negative breast cancer; $\gamma\delta$ T cells; prognosis; basal-like; *BRCA1*; *PIK3CA*

1. Introduction

Triple-negative breast cancers (TNBCs) represent 15% of all breast cancers (BCs) and are defined by the absence of estrogen receptors (ERs), progesterone receptors (PRs), and HER2 overexpression/amplification [1,2]. Despite good chemosensitivity of TNBC, its

prognosis is poor [1–3]. Tremendous efforts have been made in the last decades to better characterize TNBC subtypes. Based on hierarchical clustering, Perou et al. initially described five intrinsic molecular BC subtypes, including a basal-like subtype [4,5]. TNBCs represent approximately 70% of all basal-like BCs, and 80% of the TNBCs can be classified as basal-like tumors using the PAM50 classifier [6]. Immunohistochemistry (IHC) with an expanded surrogate panel of markers (ER, PR, HER2, EGFR, and cytokeratin (CK) 5/6) has provided a more specific definition of basal-like BC [7]. Finally, Lehmann et al. classified a set of 587 TNBC into six subtypes with unique gene expression profiles and ontologies: luminal androgen receptor (AR), basal-like 1 and 2, immunomodulatory, mesenchymal, and mesenchymal stem-like [8]. These subtypes have different therapeutic targets, chemosensitivity levels, and stromal characteristics [9,10].

It is also described that genetic alterations in tumor cells influence the tumor microenvironment. The PIK3CA pathway is the most common activated pathway in breast cancer (for a review, see [11]). In ER+ breast cancers, Sobral-Leite et al. have shown that PIK3CA pathway alteration was associated with CD8 infiltration [12]. In a mouse model of invasive lobular carcinoma of the breast, activation of the PIK3CA pathway led to immune suppression and exhaustion [13]. In TNBC, we previously showed that exon 9 PIK3CA mutation was an independent poor prognostic factor [14].

Besides the molecular features, the immune infiltrate also varies in the different BC subtypes. TNBCs show higher density of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) than other BC subtypes, probably because of their higher number of antigenic tumor variants, neoepitope load, and tumor mutational burden [15]. In TNBC, stromal TILs are considered a strong prognostic factor and patients with a high TIL density show better survival [16–19]. Guidelines for the reliable and reproducible scoring of TIL density have been issued [20] for the routine management of primary BC, in addition to other prognostic markers.

The tumor immune microenvironment comprises heterogeneous populations of different lymphocyte subtypes, predominantly T cells and then B cells, natural killer (NK) cells, macrophages, and dendritic cells (DCs) [21]. The tumor immune cell infiltration differs among TNBC subtypes. This suggests that the immune response can be modulated by the cancer subtype. It also underlies the complex cross-talk between cancer cells and the immune microenvironment [10,22] and its critical role in the cancer outcome. However, in breast cancer, besides the global evaluation of stromal TIL density, there is no consensus to date on the clinical relevance of analyzing the extent of tumor infiltration by specific immune populations [20,23,24]. Particularly, the prognostic value of tumor infiltration by lymphocyte subpopulations, such as different T helper CD4⁺ cell subsets (Th1, Th2, Th17, and FOXP3⁺ regulatory T cells), B cells, cytotoxic NK cells, $\gamma\delta$ T cells, and myeloid cells, is poorly documented. Although IHC-based subtyping could improve accuracy, it does not seem to add any new information for outcome prediction compared with their morphology [20]. Therefore, it is important to better describe the TNBC immune microenvironment to precisely understand the mechanisms driving the immune-regulatory processes. This might allow improving TNBC clinical management and developing new therapeutic strategies.

In this context, a recent study emphasized the importance of investigating the role of $\gamma\delta$ T cell populations in TNBC outcome [25]. Indeed, Wu et al. demonstrated that progression-free survival and overall survival (OS) correlate with the density of V δ 1⁺ T cells, a subset of $\gamma\delta$ T cells. $\gamma\delta$ T cells belong to the family of non-conventional or innate lymphocytes that display both T cell and NK cell characteristics (T cell receptor (TCR), NK receptor, Fc receptor expression, etc.). Two main $\gamma\delta$ T cell subtypes are present in humans: V δ 1 T cells, mainly found in tissues, and V γ 9V δ 2 T cells, mainly found in peripheral blood. Both subsets have been detected in the microenvironment of solid tumors (e.g., melanoma, breast, colon, lung, ovary, and prostate), and several studies have shown that they participate in the immune response against many solid and hematological malignancies [26–30]. $\gamma\delta$ T cells unveil their anti-tumor activities by displaying direct cytolytic activities against transformed cells or/and by stimulating or regulating the biological functions of other

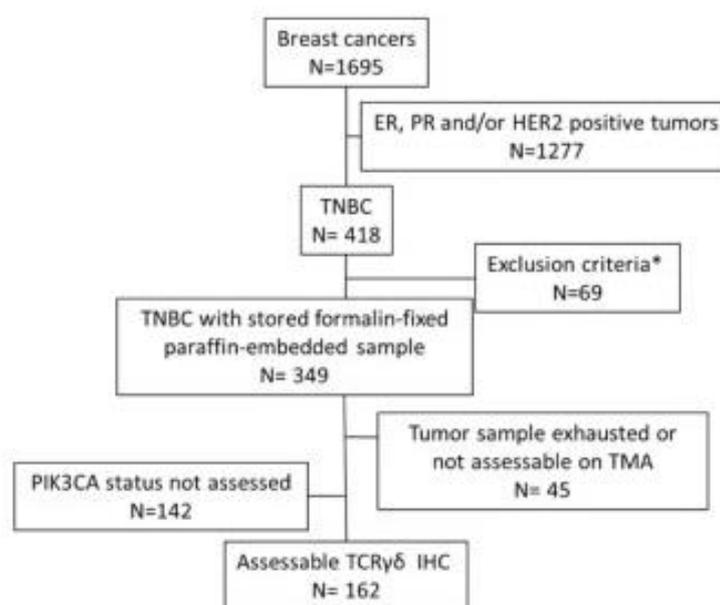
immune cells, such as DCs, interferon- γ -producing CD8 $\alpha\beta$ T cells, and NK cells [27–29]. $\gamma\delta$ T cells are considered as attractive therapeutic targets for anti-tumor immunotherapies because of their unique properties. Indeed, they display a strong major histocompatibility complex-independent reactivity against many tumor cell types; they also have no alloreactivity and can be massively expanded from human samples [31]. Although evidence indicates that $\gamma\delta$ T cells have a role in cancer, data on their frequency in cancer tissues and clinicopathological correlates remain scarce, particularly in TNBC, for which only a small number of samples have been analyzed [25,32–34]. Yet, the precise characterization of TNBC stromal components could allow refining the prognostic evaluation and identifying additional targets for immune modulation in this cancer subtype, for which treatments were lacking.

Here, we investigated the clinicopathological correlates and prognostic impact of TILs, and particularly $\gamma\delta$ T cell infiltration, in 162 patients with TNBC. The clinicopathological variables of this cohort, including *PIK3CA* mutation status, were previously described [14,35,36].

2. Results

2.1. Patient and Tumor Characteristics

In this study, we evaluated $\gamma\delta$ T cell infiltration in 162 TNBC samples from chemotherapy-naïve patients that were previously analyzed in tissue microarrays (TMAs) (Figure 1) [35,36].



* Metastatic disease at time of tumor sampling, neoadjuvant treatment before tumor sampling, history of another invasive cancer in the previous 5 years, multifocal tumors, BRCA germline mutation.

Figure 1. Consort diagram.

The main clinicopathological characteristics of this cohort of patients with TNBC (Table 1) were consistent with the classical TNBC features. The patients' median age was 55.4 years (range: 28.7–86.3 years). The most common histological type was ductal carcinoma (82.7%), and 72.0% of the patients received adjuvant chemotherapy. IHC data indicated that 60.6% of the tumors had a basal-like phenotype (i.e., a TNBC tumor that expresses at least one of the two basal markers, EGFR and CK5/6) and 36.5% of the tumors had a molecular apocrine phenotype (i.e., a TNBC tumor that expresses both AR and FOXA1). Moreover, 22.5% of the tumors exhibited *BRCA1* promoter hypermethylation and 13.6% carried a *PIK3CA* mutation (exon 9 or 20).

Table 1. Patient and tumor characteristics.

Variables	N = 162	%
Age (years), median [min–max]	55.4	[28.7–86.3]
<55	79	48.8
≥55	83	51.2
Tumor size (pT)		
T1	70	43.2
T2	79	48.8
T3/T4	13	8.0
Nodal status (pN)		
N–	108	66.7
N+	54	33.3
Histological grade (SBR; 3 missing values)		
1–2	50	31.4
3	109	68.6
Histology		
Ductal	134	82.7
Lobular	6	3.7
Other	22	13.6
Adjuvant chemotherapy (1 missing value)		
No	45	28.0
Yes	116	72.0
Basal-like phenotype (2 missing values)		
No	63	39.4
Yes	97	60.6
AR/FOXA1 expression (1% cutoff; 6 missing values)		
AR ⁺ /FOXA1 [–]	11	7.1
AR ⁺ /FOXA1 ⁺	57	36.5
AR [–]	88	56.4
BRCA1 promoter methylation (2 missing values)		
No	124	77.5
Yes	36	22.5
PIK3CA mutations		
None	140	86.4
Exon 9	10	6.2
Exon 20	12	7.4
TILs (%; 4 missing values)		
≤10	124	78.5
>10	34	21.5
CD3 ⁺ cell density (cells/mm ²), median [min–max] (6 missing values)	658.41	[0.33–6821]
≤658.41	78	50.0
>658.41	78	50.0
CD8 ⁺ cell density (cells/mm ²), median [min–max] (5 missing values)	73.81	[0–1870]
≤73.81	79	50.3
>73.81	78	49.7
PD-L1 _{TC} (8 missing values)		
<1%	84	54.6
≥1%	70	45.4
PD-L1 _{SC} (%; 8 missing values)		
0	29	18.8
]0–10]	68	44.1
]10–50]	34	22.1
>50	23	15.0

Table 1. Cont.

Variables	N = 162	%
PD-1 _{SC} (%; 10 missing values)		
0	45	29.6
]0–10]	50	32.9
]10–50]	46	30.3
>50	11	7.2
$\gamma\delta$ T cells density (cells/mm ²), median [min–max]	6.625	[0–193.8]
≤6.625	81	50.0
>6.625	81	50.0

Basal-like phenotype was considered in the case of positive staining for cytokeratin 5/6 and/or EGFR (>10% of tumor cells stained in IHC). SBR: Scarff–Bloom–Richardson grade; AR: androgen receptor; FOXA1: Forkhead box protein A1; TILs: tumor-infiltrating lymphocytes; PD-L1_{TC}: programmed cell death ligand 1; PD-1: programmed cell death 1; TC: tumor cells; SC: stromal cells.

2.2. Association of Tumor-Infiltrating Lymphocytes with TNBC Biological Features

First, we evaluated the association between the immune microenvironment and biological variables in our TNBC cohort (Table S1). The molecular apocrine phenotype was associated with low TIL infiltration ($p = 0.01$), confirmed by the lower CD3⁺ cell density in this TNBC subtype ($p = 0.024$) and with negative PD-L1_{TC} (tumor cells) status ($p = 0.001$). The immune infiltrate, based on TIL, CD3⁺, and CD8⁺ cell quantification, was similar in basal-like and non-basal-like tumors ($p = 0.353$, 0.509 , and 0.668 , respectively). However, positive PD-L1_{TC} status was associated with the basal-like phenotype ($p = 0.013$) and with *BRCA1* promoter methylation ($p = 0.030$). In TNBC samples with *BRCA1* promoter methylation, the fraction of PD-1-positive cells was higher ($p = 0.041$) and a trend was observed with higher CD3⁺ cell density ($p = 0.07$). *PIK3CA*-mutated tumors were characterized by lower CD8⁺ cell infiltration ($p = 0.038$) and negative PD-L1_{SC} (stromal cells) status ($p = 0.048$). Conversely, tumors with wild-type *PIK3CA* tended to have positive PD-L1_{TC} status ($p = 0.064$).

Altogether, these results suggest an association between the immune network and the TNBC molecular subtype. Overall, basal-like tumors, which frequently harbor *BRCA1* promoter hypermethylation (in our sample, 80.6% of TNBCs with *BRCA1* promoter hypermethylation were basal-like tumors; $p = 0.004$), were more often associated with positive PD-L1_{TC} and/or PD-1_{SC} status. Conversely, molecular apocrine tumors, which frequently harbor *PIK3CA* mutations (77.3% of *PIK3CA*-mutated tumors had this phenotype in our study; $p < 0.001$), were more often associated with a low TIL density and the absence of PD-L1 and PD-1 expression.

2.3. In Situ $\gamma\delta$ T Cell Infiltration Analysis

We used the recently validated monoclonal antibody H-41 [37] to detect the TCR δ -chain by IHC in the 162 TNBCs arrayed on TMAs. In TNBC samples, $\gamma\delta$ T cell infiltration was very variable (from 0 to 193.8 $\gamma\delta$ T cells/mm²; median: 6.625). Overall, we observed $\gamma\delta$ T cell infiltration in 84.6% of the samples (137/162 TNBC samples had at least one $\gamma\delta$ T cell). When present, $\gamma\delta$ T cells were mostly located in the stroma and, to a lower extent, inside tumor nests (Figure 2).

2.4. Association of In Situ $\gamma\delta$ T Cell Infiltration with Clinicopathological Features

To determine the clinical significance of $\gamma\delta$ T cells in TNBC, we analyzed the main clinicopathological features relative to the $\gamma\delta$ T cell infiltration level (Table 2). A high $\gamma\delta$ T cell density (above the median value of 6.625 cells/mm²) was associated with younger age (<55 years; $p = 0.008$); higher histological grade ($p = 0.002$); adjuvant chemotherapy ($p = 0.010$); *BRCA1* promoter methylation ($p = 0.010$); TIL, CD3⁺, and CD8⁺ cell infiltration ($p < 0.001$ for all three parameters); PD-L1 expression by tumor cells ($p < 0.001$) and stromal cells ($p < 0.001$); and PD-1 expression ($p = 0.040$). Conversely, $\gamma\delta$ T cell infiltration was not correlated with tumor size, nodal status, histological type, basal-like phenotype, *PIK3CA1*

mutations, and AR or FOXA1 expression. Nevertheless, we observed a trend between low $\gamma\delta$ T cell density and molecular apocrine phenotype (AR and FOXA1 expression; $p = 0.072$).

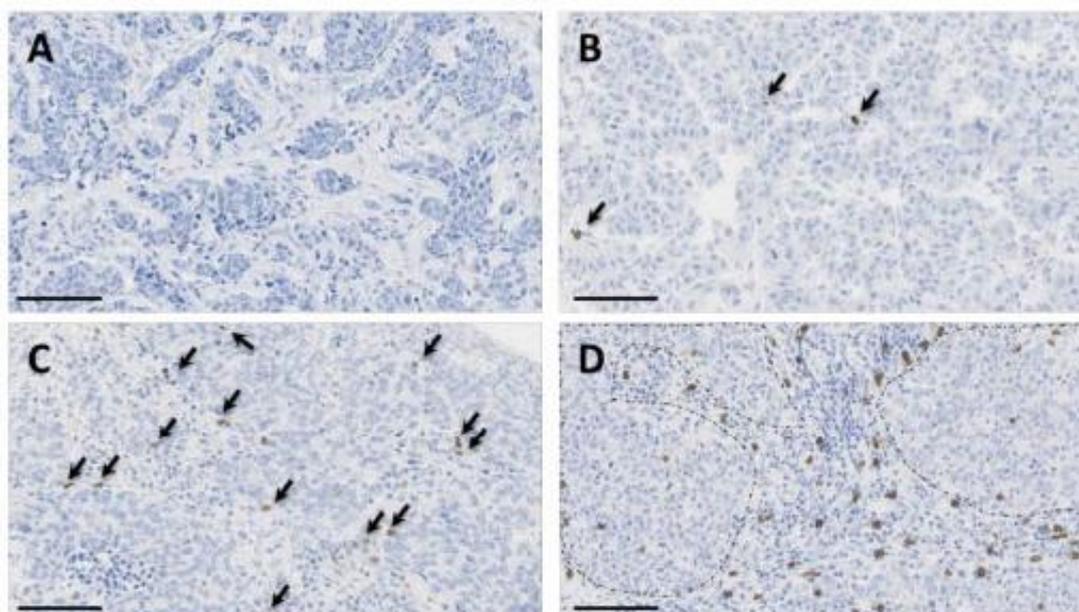


Figure 2. Immunohistochemical staining of $\gamma\delta$ T cells in four triple-negative breast cancer (TNBC) samples showing variable $\gamma\delta$ T cell infiltration, from absent (panel (A)) to high (panel (D)) infiltration. $\gamma\delta$ T cells are highlighted by arrows in panels (B,C). In panel (D), note the presence of $\gamma\delta$ T cells in the inflammatory stroma and inside tumor nests (surrounded by dotted lines). Tissue sections were analyzed by immunohistochemistry (IHC) with an anti-T cell receptor (TCR) δ -chain antibody to detect $\gamma\delta$ T cells (brown) and counterstained with hematoxylin. Scale bar: 100 μm .

Table 2. Correlations between clinicopathological features and $\gamma\delta$ T cell infiltration.

Variables	$\gamma\delta$ T Cell Infiltration (/mm ²)				p-Value
	≤ 6.625		> 6.625		
	n = 81	%	n = 81	%	
Age (years)					0.008
<55	31	38.3	48	59.3	
≥ 55	50	61.7	33	40.7	
Tumor size (pT)					0.341
T1	32	39.5	38	46.9	
T2/T3/T4	49	60.5	43	53.1	
Nodal status (pN)					0.096
N-	49	60.5	59	72.8	
N+	32	39.5	22	27.2	
Histological grade (SBR)					0.002
1-2	34	43.0	16	20.0	
3	45	57.0	64	80.0	
Histology					0.325
Ductal	65	80.2	69	85.2	
Lobular	5	6.2	1	1.2	
Other	11	13.6	11	13.6	
Adjuvant chemotherapy					0.010
No	30	37.0	15	18.7	
Yes	51	63.0	65	81.3	

Table 2. Cont.

Variables	$\gamma\delta$ T Cell Infiltration (/mm ²)				p-Value
	≤ 6.625		> 6.625		
	n = 81	%	n = 81	%	
Basal-like phenotype					0.184
No	36	44.4	27	34.2	
Yes	45	55.6	52	65.8	
AR/FOXA1 (1% cutoff)					0.072
AR ⁺ /FOXA1 ⁺	35	43.2	22	29.3	
Other	46	56.8	53	70.7	
BRCA1 promoter methylation					0.010
No	68	86.1	56	69.1	
Yes	11	13.9	25	30.9	
PIK3CA mutations					0.107
None	66	81.5	74	91.4	
Exon 9/Exon 20	15	18.5	7	8.6	
TILs					<0.001
$\leq 10\%$	74	92.5	50	64.1	
$> 10\%$	6	7.5	28	35.9	
CD3 ⁺ cell density (cells/mm ²)					<0.001
≤ 658.41	65	84.4	13	16.5	
> 658.41	12	15.6	66	83.5	
CD8 ⁺ cell density (cells/mm ²)					<0.001
≤ 73.81	54	70.1	25	31.2	
> 73.81	23	29.9	55	68.8	
PD-L1 _{TC}					<0.001
$< 1\%$	58	74.4	26	34.2	
$\geq 1\%$	20	25.6	50	65.8	
PD-L1 _{SC}					<0.001
$\leq 10\%$	63	80.8	34	44.7	
$> 10\%$	15	19.2	42	55.3	
PD-1 _{SC}					0.040
$\leq 10\%$	53	70.7	42	54.5	
$> 10\%$	22	29.3	35	45.5	

Basal-like phenotype was considered in the case of positive staining for cytokeratin 5/6 and/or EGFR ($> 10\%$ of tumor cells stained in IHC). SBR: Scarff–Bloom–Richardson grade; AR: androgen receptor; FOXA1: Forkhead box protein A1; TILs: tumor-infiltrating lymphocytes; PD-L1: programmed cell death ligand 1; PD-1: programmed cell death 1; TC: tumor cells; SC: stromal cells.

As we observed a significant association between $\gamma\delta$ T cell density and TIL infiltration, assessed according to the published guidelines [20] or by CD3⁺ and CD8⁺ cell immunostaining and quantification, we asked whether $\gamma\delta$ T cell density was positively correlated with TILs. We observed a strong correlation of $\gamma\delta$ T cell density with CD3⁺ cell and TIL density (Spearman's rho = 0.74 and 0.63, respectively; Figure 3A,B) and a moderate correlation with CD8⁺ cell density (Spearman's rho = 0.51; Figure 3C).

2.5. Survival Analyses

Using 24 October 2016 as the cutoff date, the median follow-up was 10.4 years (95% CI (9.1–11.5)). During this period, 51 patients died (5-year OS: 81.8%; 95% CI (74.9–87.0)) and 39 had a tumor relapse (5-year relapse-free survival (RFS): 77.1%; 95% CI (69.4–83.1)). The relapse pattern was consistent with the previously reported temporal distribution of relapse risk in patients with TNBC [2,38].

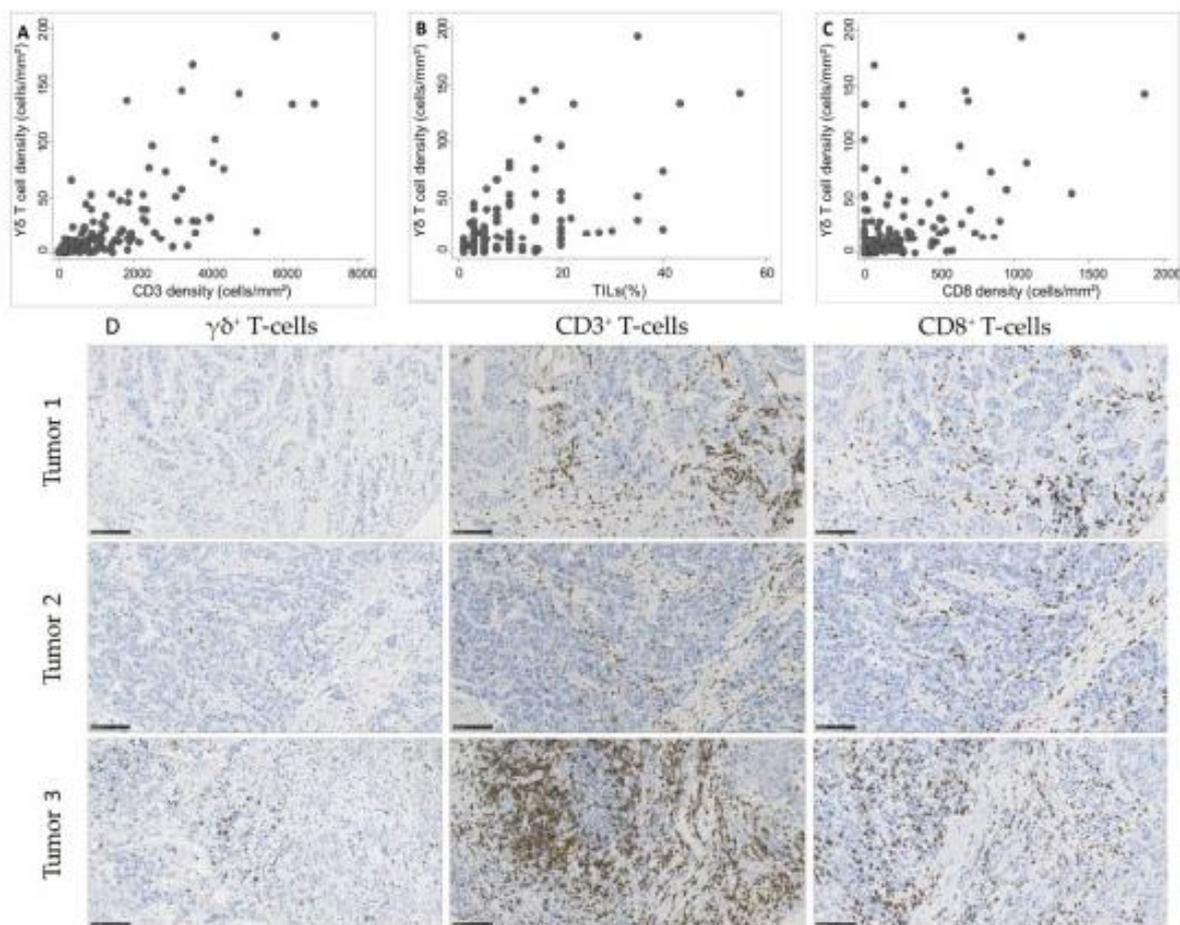


Figure 3. Correlation between $\gamma\delta$ T cell density and (A) CD3⁺ cell density (Spearman's rho = 0.74), (B) tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) infiltration (Spearman's rho = 0.63), and (C) CD8⁺ cell density (Spearman's rho = 0.51) in 162 TNBC samples. (D) Representative images of TNBC with variable $\gamma\delta$ T cell densities and corresponding CD3 and CD8 infiltration. Scale bar: 100 μ m.

Univariate analysis (Table 3) showed that high pT and pN stages, absence of adjuvant chemotherapy, low TIL and CD3⁺ cell densities, low PD-L1 expression by stromal cells, and low $\gamma\delta$ T cell density were significantly associated with shorter OS and RFS. The 5-year OS rates were 73.8% (95% CI (62.6–82.0)) and 89.9% (95% CI (80.9–94.8)) ($p = 0.001$) (Figure 4A) and the 5-year RFS rates were 63.3% (95% CI (50.8–73.5)) and 89.8% (95% CI (80.6–94.8)) ($p < 0.001$) in the subgroups with low $\gamma\delta$ T cell density and high $\gamma\delta$ T cell density, respectively (Figure 4B). OS was significantly associated with younger age ($p = 0.030$) and showed a trend for *PIK3CA* mutations ($p = 0.061$). High tumor infiltration by CD8⁺ cells was associated with longer RFS ($p = 0.045$).

We also analyzed the $\gamma\delta$ T/CD3⁺ and $\gamma\delta$ T/CD8⁺ cell ratios because the quantitative balance between these TIL subsets might give insights into $\gamma\delta$ T cell functional impact. However, these ratios were not associated with OS and RFS, suggesting that the absolute density of each subpopulation is more important than its relative proportion.

In multivariate analysis (Table 4), high pT and pN stages and low $\gamma\delta$ T cell infiltration were associated with shorter OS and RFS. Conversely, adjuvant chemotherapy and lack of *PIK3CA* mutations were associated with better OS and high tumor infiltration by CD8⁺ cells with longer RFS. t

In an exploratory analysis, we evaluated the impact of $\gamma\delta$ T cell infiltration on specific TNBC subgroups based on the tumor biological profile.

Table 3. Univariate analysis.

Variables	OS		RFS	
	HR	95% CI	HR	95% CI
Age (years)		<i>p</i> = 0.030		<i>p</i> = 0.177
<55	1		1	
≥55	1.86	1.05–3.31	1.55	0.81–2.96
Tumor size (pT)		<i>p</i> < 0.001		<i>p</i> < 0.001
T1	1		1	
T2/T3/T4	3.44	1.76–6.70	4.07	1.80–9.24
Nodal status (pN)		<i>p</i> < 0.001		<i>p</i> < 0.001
N–	1		1	
N+	2.66	1.54–4.60	5.10	2.62–9.93
Histological grade (SBR)		<i>p</i> = 0.966		<i>p</i> = 0.526
1–2	1		1	
3	0.99	0.55–1.77	1.25	0.62–2.51
Histology		<i>p</i> = 0.448		<i>p</i> = 0.442
Ductal	1		1	
Other	0.74	0.33–1.65	0.70	0.27–1.80
Adjuvant chemotherapy		<i>p</i> < 0.001		<i>p</i> = 0.036
No	1		1	
Yes	0.32	0.19–0.56	0.49	0.26–0.94
Basal-like phenotype		<i>p</i> = 0.329		<i>p</i> = 0.964
No (<10%)	1		1	
Yes (Basal)	1.33	0.74–2.37	1.02	0.53–1.94
AR/FOXA1		<i>p</i> = 0.501		<i>p</i> = 0.272
AR+/FOXA1+	1		1	
Other	0.83	0.47–1.44	0.70	0.37–1.32
BRCA1 promoter methylation		<i>p</i> = 0.701		<i>p</i> = 0.208
No	1		1	
Yes	0.87	0.44–1.75	0.59	0.25–1.41
PIK3CA mutations		<i>p</i> = 0.061		<i>p</i> = 0.202
None	1		1	
Exon 9/Exon 20	1.98	1.01–3.86	1.71	0.78–3.71
TILs		<i>p</i> = 0.005		<i>p</i> = 0.001
≤10%	1		1	
>10%	0.29	0.10–0.80	0.17	0.04–0.69
CD3 ⁺ cell density (cells/mm ²)		<i>p</i> = 0.010		<i>p</i> < 0.001
≤658.41	1		1	
>658.41	0.48	0.27–0.85	0.26	0.12–0.55
CD8 ⁺ cell density (cells/mm ²)		<i>p</i> = 0.312		<i>p</i> = 0.045
≤73.81	1		1	
>73.81	0.75	0.42–1.32	0.51	0.27–0.99
PD-L1 _{TC}		<i>p</i> = 0.125		<i>p</i> = 0.150
<1%	1		1	
≥1%	0.65	0.37–1.14	0.62	0.32–1.20
PD-L1 _{SC}		<i>p</i> = 0.004		<i>p</i> = 0.002
≤10%	1		1	
>10%	0.41	0.21–0.78	0.30	0.14–0.69
PD-1 _{SC}		<i>p</i> = 0.403		<i>p</i> = 0.808
≤10%	1		1	
>10%	1.27	0.72–2.22	1.08	0.57–2.07
γδ T cell density (cells/mm ²)		<i>p</i> = 0.001		<i>p</i> < 0.001
≤6.625	1		1	
>6.625	0.39	0.22–0.70	0.28	0.14–0.58

OS: overall survival; RFS: relapse-free survival; HR: hazard ratio; CI: confidence interval; basal-like phenotype was considered in the case of positive staining for cytokeratin 5/6 and/or EGFR (>10% of tumor cells stained in IHC); SBR: Scarff–Bloom–Richardson grade; AR: androgen receptor; FOXA1: Forkhead box protein A1; TILs: tumor-infiltrating lymphocytes; PD-L1: programmed cell death ligand 1; PD-1: programmed cell death 1; TC: tumor cells; SC: stromal cells.

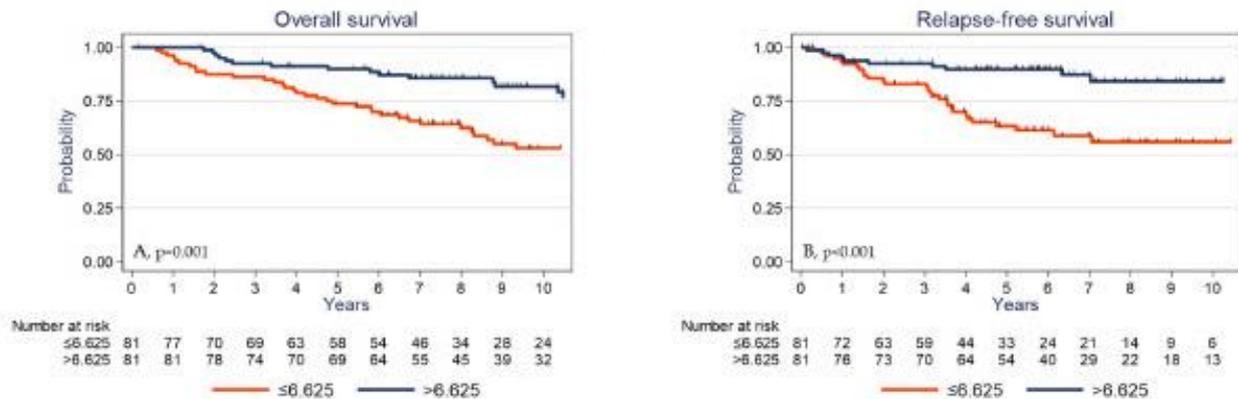


Figure 4. Overall survival (A) and relapse-free survival (B) as a function of the tumor $\gamma\delta$ T cell density (median value used as the cutoff) in the whole cohort of patients with TNBC.

Table 4. Multivariate analysis.

Variables	OS N = 161		RFS N = 157	
	HR	95% CI	HR	95% CI
Tumor size		$p = 0.003$		$p = 0.002$
T1	1		1	
T2/T3/T4	2.73	1.34–5.56	3.37	1.45–7.83
Nodal status		$p = 0.002$		$p < 0.001$
N–	1		1	
N+	2.64	1.42–4.92	4.39	2.16–8.91
Adjuvant chemotherapy		$p < 0.001$		
No	1			
Yes	0.27	0.14–0.49		
PIK3CA mutations		$p = 0.032$		
None	1			
Exon 9/Exon 20	2.25	1.12–4.49		
CD8 ⁺ cell density (cells/mm ²)				$p = 0.017$
≤73.81			1	
>73.81			0.43	0.21–0.87
$\gamma\delta$ T cell density (cells/mm ²)		$p = 0.031$		$p = 0.011$
≤6.625	1		1	
>6.625	0.51	0.28–0.96	0.39	0.18–0.84

OS: overall survival; RFS: relapse-free survival; HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

The prognostic impact of $\gamma\delta$ T cell infiltration varied according to the *PIK3CA* mutational status. High $\gamma\delta$ T cell infiltration was associated with better survival in *PIK3CA* wild-type tumors (Figure 5A,B) but not in the subgroup of tumors with mutated *PIK3CA* (Figure 5C,D).

To further address the question of the impact of the methylation status of $\gamma\delta$ T cells prognosis value, we analyzed OS and RFS in patients with TNBC harboring methylated or unmethylated *BRCA1* promoter. Survival analyses showed a significant prognosis value of $\gamma\delta$ T cells regardless of the methylation status of the *BRCA1* promoter.

Finally, to evaluate the predictive value of $\gamma\delta$ T cells on clinical outcome under adjuvant treatment, we analyzed the subgroup of patients who received adjuvant chemotherapy. In this subpopulation ($n = 116$), a high $\gamma\delta$ T cell density was significantly associated with better OS and RFS ($p = 0.007$ and $p = 0.002$, respectively; Figure 6A,B). Conversely, the $\gamma\delta$ T cell density assessed in the untreated TNBC cohort was not significantly associated with OS and RFS ($p = 0.462$ and $p = 0.122$, respectively; Figure 6C,D). Altogether, these data

suggest that the prognostic impact of the $\gamma\delta$ T cell infiltrate is restricted to the population of patients exposed to adjuvant chemotherapy, possibly due to the immunological effects described with this treatment. However, these latter analyses were carried out on a small number of samples ($n = 45$) and would need to be validated using independent cohorts with larger numbers of samples.

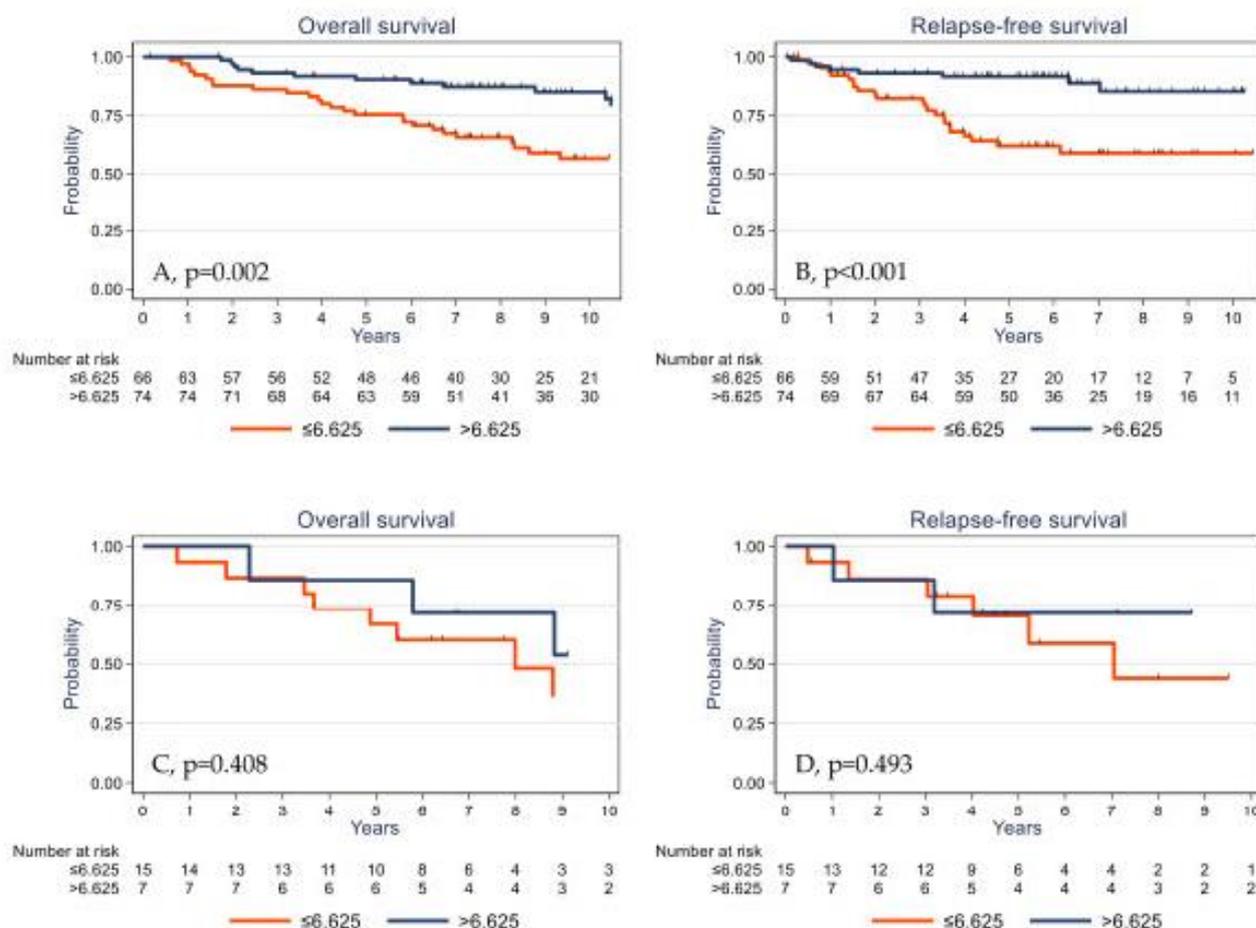


Figure 5. Overall survival (A,C) and relapse-free survival (B,D) as a function of the tumor $\gamma\delta$ T cell density (median value used as the cutoff) in patients with TNBC harboring wild-type (A,B) and mutated *PIK3CA* (C,D).

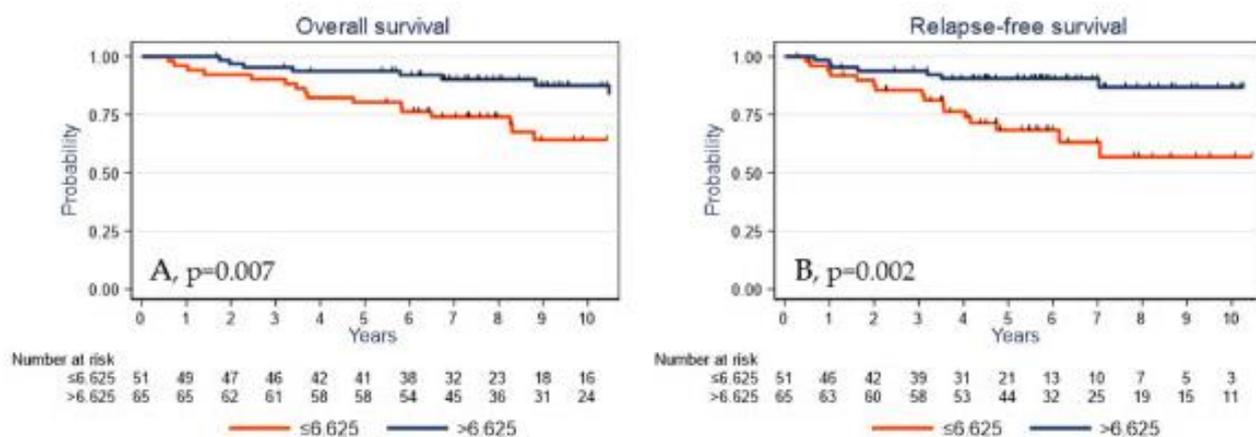


Figure 6. Cont.

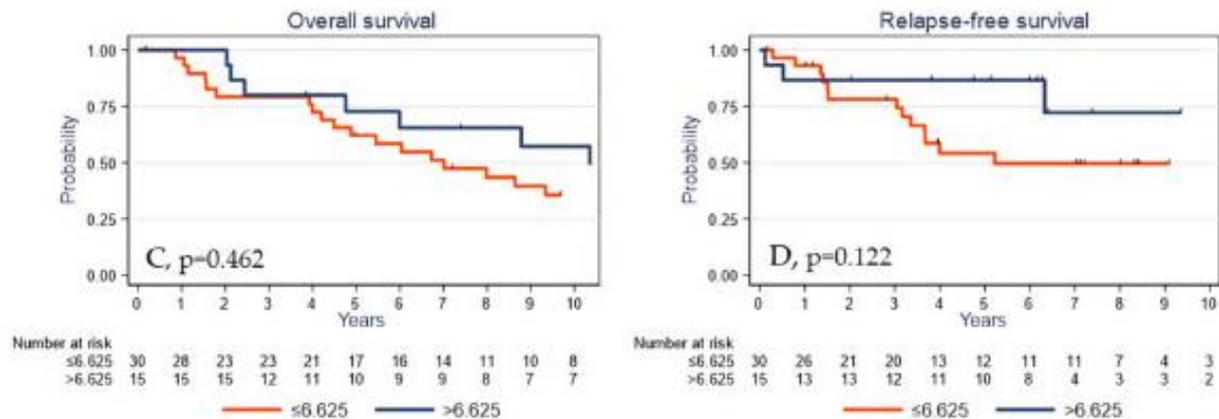


Figure 6. Overall survival (A,C) and relapse-free survival (B,D) as a function of the tumor $\gamma\delta$ T cell density (median value used as the cutoff) in patients with TNBC treated (A,B) or untreated (C,D) with adjuvant chemotherapy.

3. Discussion

Recently, considerable effort has been focused on targeting immune checkpoints in combination with chemotherapy for TNBC treatment, but with controversial results [39–41]. The effect of immunotherapy appears to be linked to tumor mutational burden and genome instability [42] and the functional aspects of immune cell infiltration [43]. As in TNBC, immune cell infiltration differs as a function of their molecular subtypes [21,22], a better description of the immune microenvironment could allow one to precisely determine their prognostic impact and therapeutic opportunities.

Several studies based on the CIBERSORT analysis have reported that intra-tumoral $\gamma\delta$ T cell signatures emerged as the most significant favorable cancer-wide prognostic population [44], particularly in all BC types [45]. However, Tosolini et al. [46] demonstrated that the CIBERSORT analysis of pure $\gamma\delta$ T cell transcriptome data fails to correctly differentiate these cells from $\alpha\beta$ T and NK cells. As we previously validated a $\gamma\delta$ T cell detection method by IHC in various human tumors, we used this approach to investigate $\gamma\delta$ T cell infiltrate in TNBC [47]. We report here a comprehensive evaluation of the association of immune cell infiltration, particularly $\gamma\delta$ T cells, with clinicopathological characteristics and its prognostic impact on 162 patients with TNBC and long-term follow-up.

First, we found, consistently with previous publications [22], that the basal-like phenotype, which is characterized by EGFR and/or CK5/6 expression, frequently related to genomic instability (highlighted in our series by the frequent hypermethylation of the *BRCA1* promoter), was associated with positive PD-L1_{TC} and/or PD-1_{SC} status. Conversely, molecular apocrine tumors, defined as AR- and FOXA1-expressing tumors that frequently harbor *PIK3CA* mutations [48,49], were more frequently associated with a “cold tumor” phenotype (i.e., low TIL density and absence of PD-L1 expression). Altogether, these data reveal important differences between TNBC subtypes and their immune microenvironments.

TILs include different cell populations, but mostly T cells. We previously showed that $\gamma\delta$ T cell infiltration tends to be higher in TNBC than in other BC types [47]. Here, we found that in TNBC, a high $\gamma\delta$ T cell density was associated with aggressive clinicopathological variables, such as younger age, high histological grade, *BRCA1* promoter hypermethylation, and adjuvant chemotherapy. A high $\gamma\delta$ T cell density was also correlated with higher TIL, CD3⁺, and CD8⁺ cell densities and with expression of the PD-1 and PD-L1 immune checkpoint proteins. Overall, these results delineate, to our knowledge for the first time in a large TNBC population, the correlation between $\gamma\delta$ T cell density, immune infiltrate extent, and immune exhaustion.

Interestingly, despite its association with pejorative clinicopathological factors, high $\gamma\delta$ T cell infiltration was an independent determinant of longer survival (RFS and OS), together with classical clinicopathological prognostic factors, in this population. Moreover,

the $\gamma\delta$ T cell prognostic value was independent of, or stronger than, the TIL prognostic impact because TILs were not retained in the final multivariate model, highlighting, for the first time, the specific prognostic impact of $\gamma\delta$ T cells.

Several studies have brought evidence of the presence of $\gamma\delta$ T cells in the tumor microenvironment of TNBC [25,32–34]. Ma et al. previously evaluated the correlations between $\gamma\delta$ T cell infiltration and BC characteristics and prognosis in 46 patients [50]. They found a correlation between $\gamma\delta$ T cell infiltration, T and N stage, HER2 expression, and worse RFS and OS. In multivariate analysis, $\gamma\delta$ T cell infiltration was the most significant independent prognostic factor. However, these 46 patients represented all BC complexity (biology, prognosis, and treatment) and no information was available on TNBC. On the other side, one study by Hidalgo et al. [32] described the localization of $\gamma\delta$ T cells in a small cohort of 26 TNBC but did not analyze their correlation with clinical outcome. More recently, Wu et al. [25] and Janssen et al. [34] investigated the role of $\gamma\delta$ T cells in TNBC by analyzing their biological functions. Wu et al. showed that $\gamma\delta$ TILs from TNBC display a Th1 profile with cytolytic functions and IFN- γ production and their density positively correlates with progression-free and overall survival. Janssen et al. also demonstrated that $\gamma\delta$ TILs produce IFN- γ and TNF- α but are not the source of IL-17 in TNBC, contrarily to $\gamma\delta$ TILs from colorectal cancer.

The role of the various $\gamma\delta$ T cell subsets (V δ 1 and V γ 9V δ 2 T cells) in the tumor microenvironment remains to be clarified. Conversely to Wu et al. [25], who identified V δ 1 T cells as the major human-breast-resident $\gamma\delta$ subset, Janssen et al. [34] described V δ 2 T cells as the main subpopulation of the $\gamma\delta$ T cells present in TNBC. The small number of patient samples in these two studies ($n = 11$ for each studies) might explain these contradictory results. Moreover, the function of V δ 1 cells in BC is still a matter of debate. We and others [51,52] described potent immunosuppressive functions. Our large population of 162 well-characterized TNBCs allowed us to refine these clinicopathological correlates by validating the results with patient survival, in particular in the patients treated with adjuvant chemotherapy. Together with the biological functions described by Wu et al. and Janssen et al., our data suggest that, in TNBC, $\gamma\delta$ T cells display anti-tumor functions through a Th1 profile. Thus, $\gamma\delta$ T cell density could be a prognostic and predictive marker in TNBC. One limitation of our study is that we assessed the total $\gamma\delta$ T cell population, without identifying the specific V δ 1 or V δ 2 subsets. However, to the best of our knowledge, there is currently no validated antibody to differentiate V δ 1 and V γ 9V δ 2 T cells in formalin-fixed paraffin-embedded samples for the analysis of large BC cohorts.

Beside the phenotypic dichotomy between V δ 1 and V γ 9V δ 2 T cells, their functional properties can also allow the identification of specific $\gamma\delta$ T subpopulations. For instance, a population of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells with pro-tumor effects has been described in murine breast, ovarian, and hepatocellular cancer models [53–56], as well as in human colorectal cancer [53]. In human BC, $\gamma\delta$ T cell pro-tumor functions have been associated with the induction of DC senescence [52], while in murine and human pancreatic ductal adenocarcinoma, $\gamma\delta$ T cells allow tumor progression by inhibiting $\alpha\beta$ T cell activation and infiltration via PD-L1 ligation. Overall, these data support the idea that some $\gamma\delta$ T cell subsets can be immunosuppressive and favor tumor progression in selected solid tumor types. We recently reported the presence of $\gamma\delta$ T cells in BC, particularly in high-grade tumors, and showed that ~20% of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells express CD73, an enzyme involved in the production of the immunosuppressive molecule adenosine [51]. These cells also produce IL-10, an immunosuppressive cytokine, and IL-8, a chemokine involved in the recruitment of myeloid-derived suppressor cells. Therefore, some $\gamma\delta$ T cells localized in the BC microenvironment might display pro-tumor functions that could favor an immunosuppressive microenvironment and ultimately promote tumor growth [51]. Thus, it would be interesting to combine CD73 and $\gamma\delta$ TCR analyses to determine the ratio of CD73⁻ (cytotoxic cells) vs. CD73⁺ (immunosuppressive cells) $\gamma\delta$ T cells. To use a $\gamma\delta$ T cell as a prognostic marker, it is necessary to analyze CD73⁻ $\gamma\delta$ T cell density vs. CD73⁺ $\gamma\delta$ T cell density according to patient survival. Nevertheless, on the basis of our

results on the prognostic value of $\gamma\delta$ T cells in TNBC, we can hypothesize that if they exist, immunosuppressive CD73⁺ $\gamma\delta$ T cells should be a minority.

The identification, in our cohort, of a possible association between the prognostic impact of $\gamma\delta$ T cell infiltration and *PIK3CA* mutational status highlights the complex cross-talk between oncogenic signaling pathways and anti-tumor immunity [57]. This correlation between PI3K/AKT pathway activation and immune modulation has been previously described. Crane et al. reported that the expression of B7-H1, a negative regulator of T cell function, correlates with PI3K activation in breast and prostate cancers [58]. Recently, Borcoman et al. found a correlation between *PIK3CA* mutations and reduced immune infiltration of the tumor stroma in bladder cancer [59]. Moreover, PI3K inhibition has been associated with higher immune cell infiltration. In our series, the presence of *PIK3CA* mutations was not associated with TIL density ($p = 0.681$; Table S1) and with $\gamma\delta$ T cell infiltration ($p = 0.107$). Although this last finding was not significant and the group of *PIK3CA*-mutated tumors was quite small ($n = 22$), it suggests possible differences in $\gamma\delta$ T cell functions according to *PIK3CA* status. This hypothesis is strengthened by the observation that the prognostic value of $\gamma\delta$ T cell infiltration was restricted, in our series, to the tumors without *PIK3CA* mutations.

Lastly, we identified a relation between the use of adjuvant chemotherapy and the prognostic impact of the $\gamma\delta$ T cell infiltrate. While needing validation in an independent data set, considering the number of patients and the subgroup nature of the analysis, our results could emphasize the immunological effects reported with chemotherapy, such as cyclophosphamide, used in breast adjuvant chemotherapies [60,61].

Our findings, if validated in an independent series, could allow the development of strategies based on the characterization of the immune infiltrate and TNBC subtype. They might also help to develop immune intervention strategies for basal-like, immune-infiltrated tumors and anti-PI3K agents, possibly associated with immune modulators, to target the cold tumor phenotype of molecular apocrine tumors.

4. Materials and Methods

4.1. Objectives

The primary objective was the evaluation of the impact of $\gamma\delta$ T cell infiltration, assessed by IHC, on OS and RFS in patients with TNBC. Secondary objectives were the evaluation of the association between $\gamma\delta$ T cell infiltration and clinicopathological variables and the multivariate evaluation of the impact of these variables on prognosis (RFS and OS).

4.2. Patients and Tumor Samples

We used samples collected between 2002 and 2010 in a dedicated breast cancer prospective database (tumor biobank number BB-0033-00059). We selected only samples with less than 10% of RE- and RP-immunoreactive tumor cells and with HER2 0/1+ by immunohistochemistry and/or not amplified by in situ hybridization. Patients who received neoadjuvant treatment, who had metastatic disease at the time of surgery or multifocal tumors, who had a history of another invasive cancer in the previous 5 years, and those with known germline BRCA mutation were excluded from the study. Overall, 162 patients with available/sufficient tumor tissue and with described CK5/6, EGFR, PD-L1, PD-1, AR, and FOXA1 status (by IHC), as well as *BRCA1* promoter methylation and *PIK3CA* status [35,36,62], were available for the study. None of the patients received targeted therapy or any investigational product, and each patient was treated according to our institution guidelines [63]. The clinicopathological characteristics and treatment of the study cohort are summarized in Table 1. The study was reviewed and approved by the Montpellier Cancer Institute Institutional Review Board (ID number ICM-CORT-2018-34). All patients gave their written, informed consent. As part of the study evaluated the prognostic impact of biological markers, this manuscript adheres to the REMARK guidelines.

4.3. Tissue Microarray

TCR δ expression was analyzed in the same TMA blocks that were used in our previous studies [35,36]. Briefly, for each tumor sample, two cores (1 mm in diameter) were sampled from different malignant areas and arrayed in six TMA blocks. Then, 3 or 4 μ m thick sections were cut from the TMA blocks. The 4 μ m sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES).

4.4. Immunohistochemistry

The 3 μ m TMA sections were placed on microscope slides (Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA) and dried at room temperature overnight before IHC procedure using the Dako Autostainer Link48 platform and the Flex+ visualization system (Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA). Sections were incubated with the recently validated anti-TCR δ mouse monoclonal antibody (clone H-41, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) at 1:150 dilution at room temperature for 30 min [37] or with anti-CD3 (rabbit polyclonal, Ref A0452, 1:200, 20 min, Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA), anti-CD8 (mouse monoclonal, clone 8/144B, ready to use, 20 min, Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA), anti-CK 5/6 (mouse monoclonal, clone 6D5/16 B4, 1:100, 20 min, Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA), anti-EGFR (mouse monoclonal, clone 31G7, 1:50, 20 min, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-PD-L1 (rabbit monoclonal, clone SP142, 1:200, 30 min, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), anti-PD1 (mouse monoclonal, clone MRQ-22, BioSB, Santa Barbara, CA, USA), anti-RA (mouse monoclonal, clone AR441, 1:150, 30 min, Dako/Agilent, Santa Clara, CA, USA), and anti-FOXA1 (goat polyclonal, Ref HNF-3 α / β (C-20), 1:200, 20 min, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) antibodies, as previously described [35,36].

The NanoZoomer slide scanner system (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan) was used to digitalize the stained TMA sections with a \times 20 objective. TCR δ -positive cells were manually identified and counted within the malignant areas on the digitalized slides with the NDP.view 2.7.39 software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan). Data were expressed as the number of TCR $\gamma\delta$ -positive cells per mm². CD3⁺ and CD8⁺ cell densities were assessed using the Histolab[®] Image Analysis software (Microvision, Evry, France), as previously described [64]. TMA sections stained with other antibodies were analyzed independently by two trained observers, both blinded to the clinicopathological characteristics and patient outcomes at the time of scoring, as previously reported [35,36]. Missing TMA cores, those containing fewer than 10 cancer cells, or those demonstrating significant artefacts were not scored. Discordant cases were reviewed and scored by consensus.

4.5. TIL Assessment

A trained pathologist assessed TILs on HES-stained digitalized TMA sections, following the guidelines issued by the International TIL Working Group [20]. As recommended, only stromal TILs were quantified. Intratumor TILs, defined as intraepithelial mononuclear cells within tumor cell nests, were excluded from the TIL assessment. Stromal TILs are reported as the percentage of area occupied by TILs relative to the whole stroma area.

4.6. Tissue Processing and DNA Extraction

Frozen tumor samples were used for DNA extraction with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions, as previously described [65,66].

4.7. Molecular Analysis

BRCA1 promoter methylation status was analyzed as previously reported [36]. Briefly, DNA methylation patterns at the CpG islands of the BRCA1 promoter were assessed using the methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) assay [35,66,67], which analyzes seven CpG sites located at -37, -29, -21, -19, +16, +19, and +27 relative to the BRCA1 exon 1A transcription start site.

PIK3CA mutation status was analyzed by the PCR amplification and high-resolution melting method, followed by sequencing of the purified PCR products [14]. Primers were designed to amplify *PIK3CA* fragments that span the two mutation hotspots in exon 9, including the p.E542X and p.E545X mutations, and exon 20, including the hotspot mutations p.H1047X, p.H1048X, and p.G1049X.

4.8. Statistical Analysis

Categorical variables were described by the number of observations and the frequency of each modality and compared with Pearson's chi-square or Fisher's exact test. Continuous variables were described by the number of observations, the median, the minimum, and the maximum. OS was defined as the time from surgery to death (whatever the cause). Patients alive or lost to follow-up were censored at the date of last news. RFS was defined as the time from surgery to recurrence. Patients alive without recurrence and patients lost to follow-up were censored at the date of documented visit. Patients who died without recurrence were censored at the date of death. The Kaplan–Meier method was used to estimate the survival rates. The comparison of survival distributions was performed using the log-rank test. Hazard ratios (HRs) with a 95% confidence interval (95% CI) were estimated using a Cox proportional hazard model. Statistical analyses were performed with STATA 16.0 (StatCorp, College Station, TX, USA).

5. Conclusions

In TNBC, $\gamma\delta$ T cell infiltration is correlated with immune infiltration and with a higher level of T-cell exhaustion, as indicated by its association with the expression of the immune checkpoints PD-L1 and PD-1. After adjusting for common clinicopathological factors in TNBC, $\gamma\delta$ T cell infiltration remained a significant favorable prognostic factor for OS and RFS, especially in the *PIK3CA* wild-type subgroup of tumors, and thus represents a candidate prognostic tool. Nevertheless, before its broad application, it must be validated in studies that will also characterize the different $\gamma\delta$ T cell populations.

Supplementary Materials: The following is available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/4/765/s1>: Table S1: Associations between immune microenvironment and TNBC biological variables.

Author Contributions: F.B.-M. provided the study patients and material, collected and assembled the data, carried out the assays, and drafted the manuscript. G.C. carried out the assays and helped to draft the manuscript. C.M. participated in the study conception and design and performed the statistical analysis. S.G. participated in the study conception and design, provided study patients and material, and helped to draft the manuscript. E.L.-C. collected and assembled the data and helped to draft the manuscript. J.R. performed the pathological evaluation and helped to draft the manuscript. N.B. participated in the study conception and design and helped to draft the manuscript. V.L. participated in the study conception and design, interpreted the data, and drafted the manuscript. W.J. participated in the study conception and design; provided study patients and material; collected, assembled, and interpreted the data; and drafted the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale, France (grant number ECO201806006863 to GC).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Institut Régional du Cancer de Montpellier (study number ICM-CORT-2018-34; 12 November 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: The authors acknowledge the microscopy (MRI) Montpellier BioCampus shared resource facilities and the Biological Resources Center from Montpellier Cancer Institute (ICM Biobank n° BB-0033-00059).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

Abbreviations

AR	Androgen receptor
BC	Breast cancer
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility gene
CK 5/6	Cytokeratin 5/6
DC	Dendritic cells
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen receptor
FOXA1	Forkhead box protein A1
HES	Hematoxylin-Eosin-Saffron
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hazard ratio
IHC	Immunohistochemistry
NK	Natural killer
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PR	Progesterone receptor
REMARK	Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies
RFS	Relapse-free survival
SC	Stromal cells
TC	Tumor cells
TCR	T cell receptor
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte
TMA	Tissue microarray
TNBC	Triple-negative breast cancer

References

- Dent, R.; Hanna, W.M.; Trudeau, M.; Rawlinson, E.; Sun, P.; Narod, S.A. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *115*, 423–428. [[CrossRef](#)]
- Dent, R.; Trudeau, M.; Pritchard, K.I.; Hanna, W.M.; Kahn, H.K.; Sawka, C.A.; Lickley, L.A.; Rawlinson, E.; Sun, P.; Narod, S.A. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4429–4434. [[CrossRef](#)]
- Carey, L.A.; Dees, E.C.; Sawyer, L.; Gatti, L.; Moore, D.T.; Collichio, F.; Ollila, D.W.; Sartor, C.I.; Graham, M.L.; Perou, C.M. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2329–2334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Perou, C.M.; Sorlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**, *406*, 747–752. [[CrossRef](#)]
- Sorlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10869–10874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Prat, A.; Adamo, B.; Cheang, M.C.; Anders, C.K.; Carey, L.A.; Perou, C.M. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* **2013**, *18*, 123–133. [[CrossRef](#)]
- Cheang, M.C.; Voduc, D.; Bajdik, C.; Leung, S.; McKinney, S.; Chia, S.K.; Perou, C.M.; Nielsen, T.O. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1368–1376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lehmann, B.D.; Bauer, J.A.; Chen, X.; Sanders, M.E.; Chakravarthy, A.B.; Shtyr, Y.; Pieterpol, J.A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 2750–2767. [[CrossRef](#)]

9. Masuda, H.; Baggerly, K.A.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Meric-Bernstam, F.; Valero, V.; Lehmann, B.D.; Pietersen, J.A.; Hortobagyi, G.N.; et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5533–5540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Lehmann, B.D.; Jovanovic, B.; Chen, X.; Estrada, M.V.; Johnson, K.N.; Shyr, Y.; Moses, H.L.; Sanders, M.E.; Pietersen, J.A. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157368. [[CrossRef](#)]
11. Ellis, H.; Ma, C.X. PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 110. [[CrossRef](#)]
12. Sobral-Leite, M.; Salomon, I.; Opdam, M.; Kruger, D.T.; Beelen, K.J.; van der Noort, V.; van Vlierberghe, R.L.P.; Blok, E.J.; Giardiello, D.; Sanders, J.; et al. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res.* **2019**, *21*, 90. [[CrossRef](#)]
13. An, Y.; Adams, J.R.; Hollern, D.P.; Zhao, A.; Chang, S.G.; Gams, M.S.; Chung, P.E.D.; He, X.; Jangra, R.; Shah, J.S.; et al. Cdh1 and Pik3ca Mutations Cooperate to Induce Immune-Related Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 702–714.e706. [[CrossRef](#)]
14. Jacot, W.; Mollevi, C.; Fina, F.; Lopez-Crapez, E.; Martin, P.M.; Colombo, P.E.; Bibeau, F.; Romieu, G.; Lamy, P.J. High EGFR protein expression and exon 9 PIK3CA mutations are independent prognostic factors in triple negative breast cancers. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Narang, P.; Chen, M.; Sharma, A.A.; Anderson, K.S.; Wilson, M.A. The neoepitope landscape of breast cancer: Implications for immunotherapy. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ibrahim, E.M.; Al-Foheidi, M.E.; Al-Mansour, M.M.; Kazkaz, G.A. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *148*, 467–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Adams, S.; Gray, R.J.; Demaria, S.; Goldstein, L.; Perez, E.A.; Shulman, L.N.; Martino, S.; Wang, M.; Jones, V.E.; Saphner, T.J.; et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 2959–2966. [[CrossRef](#)]
18. Gao, G.; Wang, Z.; Qu, X.; Zhang, Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 179. [[CrossRef](#)]
19. Pruneri, G.; Vingiani, A.; Bagnardi, V.; Rotmensz, N.; De Rose, A.; Palazzo, A.; Colleoni, A.M.; Goldhirsch, A.; Viale, G. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 249–256. [[CrossRef](#)]
20. Salgado, R.; Denkert, C.; Demaria, S.; Sirtaine, N.; Klauschen, F.; Pruneri, G.; Wienert, S.; Van den Eynden, G.; Baehner, F.L.; Penault-Llorca, F.; et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 259–271. [[CrossRef](#)]
21. Stovgaard, E.S.; Nielsen, D.; Hogdall, E.; Balslev, E. Triple negative breast cancer-prognostic role of immune-related factors: A systematic review. *Acta Oncol.* **2018**, *57*, 74–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Harano, K.; Wang, Y.; Lim, B.; Seitz, R.S.; Morris, S.W.; Bailey, D.B.; Hout, D.R.; Skelton, R.L.; Ring, B.Z.; Masuda, H.; et al. Rates of immune cell infiltration in patients with triple-negative breast cancer by molecular subtype. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204513. [[CrossRef](#)]
23. Bottai, G.; Raschioni, C.; Losurdo, A.; Di Tommaso, L.; Tinterri, C.; Torrì, R.; Reis-Filho, J.S.; Roncalli, M.; Sotiropoulos, C.; Santoro, A.; et al. An immune stratification reveals a subset of PD-1/LAG-3 double-positive triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res.* **2016**, *18*, 121. [[CrossRef](#)]
24. Dieci, M.V.; Tsvetkova, V.; Griguolo, G.; Miglietta, F.; Tasca, G.; Giorgi, C.A.; Cumerlato, E.; Massa, D.; Lo Mele, M.; Orvieto, E.; et al. Integration of tumour infiltrating lymphocytes, programmed cell-death ligand-1, CD8 and FOXP3 in prognostic models for triple-negative breast cancer: Analysis of 244 stage I-III patients treated with standard therapy. *Eur. J. Cancer* **2020**, *136*, 7–15. [[CrossRef](#)]
25. Wu, Y.; Kyle-Cezar, F.; Woolf, R.T.; Naceur-Lombardelli, C.; Owen, J.; Biswas, D.; Lorenc, A.; Vantourout, P.; Gazinska, P.; Grigoriadis, A.; et al. An innate-like Vdelta1(+) gammadelta T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaax9364. [[CrossRef](#)]
26. Bouët-Toussaint, F.; Cabillic, F.; Toutirais, O.; Le Gallo, M.; de la Pintière, C.T.; Daniel, P.; Genetet, N.; Meunier, B.; Dupont-Bierre, E.; Boudjema, K.; et al. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 531–539. [[CrossRef](#)]
27. Cordova, A.; Toia, F.; La Mendola, C.; Orlando, V.; Meraviglia, S.; Rinaldi, G.; Todaro, M.; Cicero, G.; Zichichi, L.; Donni, P.L.; et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49878. [[CrossRef](#)]
28. Corvaisier, M.; Moreau-Aubry, A.; Diez, E.; Bennouna, J.; Mosnier, J.F.; Scotet, E.; Bonneville, M.; Jotereau, F. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5481–5488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. 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.

30. Raspollini, M.R.; Castiglione, F.; Degl'innocenti, D.R.; Amunni, G.; Villanucci, A.; Garbini, F.; Baroni, G.; Taddei, G.L. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 590–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Bonneville, M.; O'Brien, R.L.; Born, W.K. Gammadelta T cell effector functions: A blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 467–478. [[CrossRef](#)]
32. Hidalgo, J.V.; Bronsert, P.; Orłowska-Volk, M.; Diaz, L.B.; Stickeler, E.; Werner, M.; Schmitt-Graeff, A.; Kayser, G.; Malkovsky, M.; Fisch, P. Histological Analysis of gammadelta T Lymphocytes Infiltrating Human Triple-Negative Breast Carcinomas. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 632. [[CrossRef](#)]
33. Siegers, G.M.; Dutta, L.; Kang, E.Y.; Huang, J.; Kobel, M.; Postwit, L.M. Aberrantly Expressed Embryonic Protein NODAL Alters Breast Cancer Cell Susceptibility to gammadelta T Cell Cytotoxicity. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Janssen, A.; Hidalgo, J.V.; Beringer, D.X.; van Dooremalen, S.; Fernando, E.; van Diest, E.; Terrizi, A.R.; Bronsert, P.; Kock, S.; Schmitt-Graeff, A.; et al. gammadelta T-cell Receptors Derived from Breast Cancer-Infiltrating T Lymphocytes Mediate Antitumor Reactivity. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 530–543. [[CrossRef](#)]
35. Guiu, S.; Mollevi, C.; Charon-Barra, C.; Boissiere, F.; Crapez, E.; Chartron, E.; Lamy, P.J.; Gutowski, M.; Bourgier, C.; Romieu, G.; et al. Prognostic value of androgen receptor and FOXA1 co-expression in non-metastatic triple negative breast cancer and correlation with other biomarkers. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 76–79. [[CrossRef](#)]
36. Jacot, W.; Lopez-Crapez, E.; Mollevi, C.; Boissiere-Michot, F.; Simony-Lafontaine, J.; Ho-Pun-Cheung, A.; Chartron, E.; Theillet, C.; Lemoine, A.; Saffroy, R.; et al. BRCA1 Promoter Hypermethylation is Associated with Good Prognosis and Chemosensitivity in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Jungbluth, A.A.; Frosina, D.; Fayad, M.; Pulitzer, M.P.; Dogan, A.; Busam, K.J.; Imai, N.; Grjatic, S. Immunohistochemical Detection of gamma/delta T Lymphocytes in Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissues. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2019**, *27*, 581–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Cho, E.Y.; Chang, M.H.; Choi, Y.L.; Lee, J.E.; Nam, S.J.; Yang, J.H.; Park, Y.H.; Ahn, J.S.; Im, Y.H. Potential candidate biomarkers for heterogeneity in triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *68*, 753–761. [[CrossRef](#)]
39. Schmid, P.; Adams, S.; Rugo, H.S.; Schneeweiss, A.; Barrios, C.H.; Iwata, H.; Dieras, V.; Hegg, R.; Im, S.A.; Shaw Wright, G.; et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2108–2121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Schmid, P.; Cortes, J.; Pusztai, L.; McArthur, H.; Kummel, S.; Bergh, J.; Denkert, C.; Park, Y.H.; Hui, R.; Harbeck, N.; et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 810–821. [[CrossRef](#)]
41. Schmid, P.; Rugo, H.S.; Adams, S.; Schneeweiss, A.; Barrios, C.H.; Iwata, H.; Dieras, V.; Henschel, V.; Molinero, L.; Chui, S.Y.; et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): Updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 44–59. [[CrossRef](#)]
42. Yarchoan, M.; Hopkins, A.; Jaffee, E.M. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2500–2501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Filipovic, A.; Miller, G.; Bolen, J. Progress Toward Identifying Exact Proxies for Predicting Response to Immunotherapies. *Front. Cell. Dev. Biol.* **2020**, *8*, 155. [[CrossRef](#)]
44. Gentles, A.J.; Newman, A.M.; Liu, C.L.; Bratman, S.V.; Feng, W.; Kim, D.; Nair, V.S.; Xu, Y.; Khuong, A.; Hoang, C.D.; et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 938–945. [[CrossRef](#)]
45. Bense, R.D.; Sotiriou, C.; Piccart-Gebhart, M.J.; Haanen, J.; van Vugt, M.; de Vries, E.G.E.; Schroder, C.P.; Fehrmann, R.S.N. Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, djw192. [[CrossRef](#)]
46. Tosolini, M.; Pont, F.; Poupot, M.; Vergez, F.; Nicolau-Travers, M.L.; Vermijlen, D.; Sarry, J.E.; Dieli, F.; Fournie, J.J. Assessment of tumor-infiltrating TCRV gamma9Vdelta2 gammadelta lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1284723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chabab, G.; Boissiere-Michot, F.; Mollevi, C.; Ramos, J.; Lopez-Crapez, E.; Colombo, P.E.; Jacot, W.; Bonnefoy, N.; Lafont, V. Diversity of Tumor-Infiltrating, gammadelta T-Cell Abundance in Solid Cancers. *Cells* **2020**, *9*, 1537. [[CrossRef](#)]
48. Lehmann-Che, J.; Hamy, A.S.; Porcher, R.; Barritault, M.; Bouhidel, F.; Habuelallah, H.; Leman-Detours, S.; de Roquancourt, A.; Cahen-Doidy, L.; Boursstyn, E.; et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFF15. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R37. [[CrossRef](#)]
49. Weisman, P.S.; Ng, C.K.; Brogi, E.; Eisenberg, R.E.; Won, H.H.; Piscuoglio, S.; De Filippo, M.R.; Ioris, R.; Akram, M.; Norton, L.; et al. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Mod. Pathol.* **2016**, *29*, 476–488. [[CrossRef](#)]
50. Ma, C.; Zhang, Q.; Ye, J.; Wang, F.; Zhang, Y.; Wevers, E.; Schwartz, T.; Hunborg, P.; Varvares, M.A.; Hofst, D.F.; et al. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 5029–5036. [[CrossRef](#)]
51. Chabab, G.; Barjon, C.; Abdellaoui, N.; Salvador-Prince, L.; Dejoui, C.; Michaud, H.A.; Boissiere-Michot, F.; Lopez-Crapez, E.; Jacot, W.; Pourquier, D.; et al. Identification of a regulatory Vdelta1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J. Leukoc. Biol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Peng, G.; Wang, H.Y.; Peng, W.; Kiniwa, Y.; Seo, K.H.; Wang, R.F. 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. [[CrossRef](#)]
53. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Coffelt, S.B.; Kersten, K.; Doornebal, C.W.; Weiden, J.; Vrijland, K.; Hau, C.S.; Versteegen, N.J.M.; Ciampicotti, M.; Hawinkels, L.; Jonkers, J.; et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **2015**, *522*, 345–348. [[CrossRef](#)]
56. Rei, M.; Goncalves-Sousa, N.; Lanca, T.; Thompson, R.G.; Mensurado, S.; Balkwill, F.R.; Kulbe, H.; Pennington, D.J.; Silva-Santos, B. Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E3562–E3570. [[CrossRef](#)]
57. Kobayashi, Y.; Lim, S.O.; Yamaguchi, H. Oncogenic signaling pathways associated with immune evasion and resistance to immune checkpoint inhibitors in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *65*, 51–64. [[CrossRef](#)]
58. Crane, C.A.; Panner, A.; Murray, J.C.; Wilson, S.P.; Xu, H.; Chen, L.; Simko, J.P.; Waldman, F.M.; Pieper, R.O.; Parsa, A.T. PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene* **2009**, *28*, 306–312. [[CrossRef](#)]
59. Borcoman, E.; De La Rochere, P.; Richer, W.; Vacher, S.; Chemlali, W.; Krucker, C.; Sirab, N.; Radvanyi, E.; Allory, Y.; Pignot, G.; et al. Inhibition of PI3K pathway increases immune infiltrate in muscle-invasive bladder cancer. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1581556. [[CrossRef](#)]
60. Bao, L.; Hao, C.; Wang, J.; Wang, D.; Zhao, Y.; Li, Y.; Yao, W. High-Dose Cyclophosphamide Administration Orchestrates Phenotypic and Functional Alterations of Immature Dendritic Cells and Regulates Th Cell Polarization. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Madondo, M.T.; Quinn, M.; Plebanski, M. Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *42*, 3–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Jacot, W.; Lopez-Crapez, E.; Thezenas, S.; Senal, R.; Fina, F.; Bibeau, F.; Romieu, G.; Lamy, P.J. Lack of EGFR-activating mutations in European patients with triple-negative breast cancer could emphasise geographic and ethnic variations in breast cancer mutation profiles. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R133. [[CrossRef](#)]
63. Jacot, W.; Gutowski, M.; Azria, D.; Romieu, G. Adjuvant early breast cancer systemic therapies according to daily used technologies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2012**, *2*, 361–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Boissiere-Michot, F.; Jacot, W.; Fraisse, J.; Gourgou, S.; Timaxian, C.; Lazenec, G. Prognostic Value of CXCR2 in Breast Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 2076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lamy, P.J.; Fina, F.; Bascoul-Mollevi, C.; Labeienne, A.C.; Martin, P.M.; Ouafik, L.; Jacot, W. Quantification and clinical relevance of gene amplification at chromosome 17q12-q21 in human epidermal growth factor receptor 2-amplified breast cancers. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Jacot, W.; Thezenas, S.; Senal, R.; Viglianti, C.; Labeienne, A.C.; Lopez-Crapez, E.; Bibeau, F.; Bleuse, J.P.; Romieu, G.; Lamy, P.J. BRCA1 promoter hypermethylation, 53BP1 protein expression and PARP-1 activity as biomarkers of DNA repair deficit in breast cancer. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 523. [[CrossRef](#)]
67. Esteller, M.; Silva, J.M.; Dominguez, G.; Bonilla, F.; Matias-Guiu, X.; Lerma, E.; Bussaglia, E.; Prat, J.; Harkes, I.C.; Repasky, E.A.; et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 564–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]