



HAL
open science

Rôle de TLR7 dans la progression tumorale dans le cancer du poumon

Marion Dajon

► **To cite this version:**

Marion Dajon. Rôle de TLR7 dans la progression tumorale dans le cancer du poumon. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066272 . tel-02305243

HAL Id: tel-02305243

<https://theses.hal.science/tel-02305243>

Submitted on 4 Oct 2019

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED 394)

UMRS1138 – Equipe Cancer et Immunité anti-tumorale

Rôle de TLR7 dans la progression tumorale dans le cancer du poumon

Présentée par :

Marion Dajon

Thèse de doctorat

Spécialité Immunologie

Soutenue publiquement le lundi 02 octobre 2017

Devant un jury composé de :

Carole Elbim	PU UPMC	Présidente du Jury
Nathalie Bendriss-Vermare	CR1 INSERM	Rapporteur
Pedro Romero	Professeur Ordinaire	Rapporteur
Marie Wislez	PU PH UPMC	Examineur
Julien Cherfils-Vicini	CR2 CNRS	Examineur
Isabelle Cremer	PU UPMC	Directrice de Thèse

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche des Cordeliers
Equipe 13 : Cancer et immunité anti-tumorale
15 rue de l'Ecole de médecine
75006 PARIS

Sous la direction de :
Pr Isabelle Cremer

REMERCIEMENTS

Je voulais tout d'abord remercier les Professeurs **Hervé FRIDMAN** et **Catherine FRIDMAN** de m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche des Cordeliers, et permis d'effectuer mon Master 2 ainsi que ma thèse au sein de leur unité dans des conditions idéales.

Je remercie le Dr **Jean-Luc TEILLAUD** et le Pr **Isabelle CREMER** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 13. Isa, merci de m'avoir proposé un sujet aussi passionnant et intéressant que celui-là. Malheureusement, je n'aurai pas eu le temps de tout finir, il reste encore tant de choses à faire avec les virus !!! Je te remercie également pour la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées, dans mon organisation, dans les manip et dans les collaborations. Merci pour ta compréhension lors de mes crises de folie lorsqu'il y avait de la significativité ou quand on obtenait des résultats supers (attendus ou inattendus). Tu m'as de nombreuses fois poussée pour faire des communications orales (chose que j'ai longtemps détestée), et finalement, maintenant, je n'y vais plus à reculons et je crois même que j'aime ça !! Alors merci !! Cela m'a permis de grandir, de savoir structurer mon travail, d'être autonome et à la fois, de travailler en équipe. Merci chef !

Mehdi et **Esther**, je vous remercie pour toute l'aide que vous m'avez apportée lors de mes nombreuses questions administratives (surtout à propos du Canada) !!! Merci également pour toutes les commandes passées !!

Merci à **Laëtitia** pour son aide en IHC et pour ce super livre sur l'écologie que j'essaye de suivre au maximum ! Je te souhaite une bonne continuation !

Nathalie, notre maman du labo !!! Merci pour ta patience, toutes les cafetières qui nous ont fait survivre au cours de ces trois années !!! Tu es là tous les jours pour nous, un peu moins depuis que tu es à Cochin et tu nous manques beaucoup !!! Je te remercie pour tout ce que tu fais pour nous, tu es notre maman du labo, tu vas vraiment beaucoup me manquer !!! Qui va donc me traiter de « Folle de Shangai » !!! N'oublie pas de penser un peu à toi et de faire un peu plus ce que tu nous dis de faire !!! ☺ Prends soin de toi !!!

Eliane, je suis tellement heureuse d'être arrivée avant que tu ne partes et d'avoir fait ta connaissance !!! Merci pour toutes les discussions, les petits plats et les fous-rires !!! Je te souhaite plein de bonheur et de bien profiter de ta retraite, mais je ne me fais aucun doute la dessus te connaissant !!!!! ^^

Je ne sais pas s'ils auront accès à ces remerciements, mais je remercie du fond du cœur tous les **animaliers** ! Vous faites un travail difficile et pas tous les jours sympathique ! Alors merci !!!! Je souhaite remercier tout particulièrement **Carole** (qui est un super responsable de la zone Viro, toujours très gentille et très bienveillante), **Georges** (pour tous ses conseils et le temps qu'il passe à tout nous montrer!!), **Ariel** et **Aurélié** (qui se sont occupés avec gentillesse et douceur de mes animaux en zone Viro ! C'était toujours un plaisir de vous croiser !!!), **Valérie** (à qui j'ai envoyé beaucoup de mails pleins de questions!!!), **Cédric** et **Sonia** (pour l'élevage des animaux) ! Encore une fois merci beaucoup à vous tous!!! J'ai passé beaucoup de temps en animalerie et vous faites de cet endroit un super environnement de travail !!!

Je remercie **Estelle** et **Hélène** du CICC (maintenant appelé CHIC ! Attention!!!), pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée lors de mes tris interminables ! En parlant de la plateforme, je voulais aussi remercier **Christophe** pour ses conseils et sa patience en microscopie à fluorescence !!!

Tessa, merci pour tes caprices qui m'ont souvent beaucoup fait rire !!! Merci pour les discussions voyage, bronzage et tennis !!! Je te souhaite beaucoup de chocolat noir pour la suite !!!

Pierre-Emmanuel, merci pour tes conseils scientifiques et ton soutien à des moments qui ont été assez compliqués pendant ma thèse.

Le bureau des filles ! **Sam**, merci d'être aussi pétillante et drôle tous les jours !!! Tu es une très belle personne et je t'admire énormément !! J'espère qu'on sera amenées à se revoir par la suite ! Et maintenant, avec qui vais-je faire le débrif de Grey's Anatomy ?? **Hanane**, on ne sait pas bien entendu tous les jours (surtout au début), mais avec le temps ça s'est amélioré !!! Merci pour toute ton aide et tes conseils !!! Je me rappellerai toujours de quand notre flopée de masters est arrivée, tu nous as dit : "Ne pensez pas que labo va rester comme ça, dans 6 mois la moitié des gens vont surement devoir partir!!". Finalement après plus de trois ans, la majorité est toujours là et je vais même partir avant certains !!! ☺ Bonne chance pour la suite ! **Mélanie**, merci pour toute ton aide ! Surtout en biomol car je n'y connais vraiment quasiment rien ! Il fallait me supporter avec mes millions de questions pendant les formations !! Je suis contente que tu aies trouvé ce que tu souhaitais à Bordeaux et je ne te souhaite que de la réussite pour la suite !!

Allez !! **Erwan**, je vais te faire plaisir et te dire que tu es le meilleur stagiaire !!! Normal tu es l'élite de la nation !!! En vrai c'était cool !! Merci de nous avoir beaucoup fait rire en soirée TicTic et moi (attention à ton téléphone☺) !!!! A charge de revanche pour de nouvelles blessures !!!! Bon courage pour la suite, tu vas en avoir besoin !!!!

Florent !! Tu es le mec avec les Tee-shirts les plus cools de la Terre !! Ca va beaucoup me manquer !! Mais aussi les nombreuses bières le soir et les croissants le mercredi matin (TicTic et Erwan aussi☺) !!!! Merci pour toutes ces folles soirées !!!! Un merci infini pour ton aide pour mon CV et ma lettre de motivation, je crois que sans toi et TicTic, je n'aurais jamais trouvé un travail !! Ils se seraient rendu compte trop vite de ma folie et des nombreuses personnes dans ma tête !!! Merci également pour ton aide pour ce manuscrit !! Je te souhaite bon courage pour la suite car j'avoue on t'abandonne un peu avant la fin, mais je suis sûre qu'on arrivera à se revoir (cf. Afterwork, Congrès ou Bar Paris/Lyon).

Nico et **Benoit**, mes deux compagnons de galères !!! Je vous lâche un peu plus tôt, mais je sais que vous suivrez dans pas longtemps, même si Nico tu y restes encore après !!!! Je m'excuse d'avance car il y a de grandes chances que je ne puisse pas venir à vos soutenances, ce que j'avoue m'enquiquine fortement (pour le pot soyons bien d'accord !!! :P) !!! Non, plus sérieusement j'ai beaucoup aimé partager ce bureau avec vous !! Merci pour toutes ces discussions scientifiques et non scientifiques, pour les fous-rires, les lancers de boulettes en papier (hihihi Benoit j'ai quasiment réussi à te pousser à bout !!!), les ChiChis (oui oui Benoit, je te remercie pour tes ChiChis !!! Profite je ne le ferai qu'une fois et je nierai tout et ne parlerai qu'en présence de mon avocat !!), les C1q (ne signifiant pas la même chose pour l'un et pour l'autre)!! Merci également pour tous les moments en dehors du labo !! Merci Benoit pour les longues conversations scientifiques et les tournées de shots où tu es toujours partant !!! Merci Nico pour ton écoute et ton soutien quand ça allait mais également quand ça n'allait pas du tout !!! Tu as su être là quand j'en avais besoin et je t'en remercie énormément, j'espère un jour pouvoir de te rendre la pareille !! (Au fait, Nico, je parie toujours que tu seras chef d'une super équipe quand tu seras grand !!! On verra si j'ai raison, mais je sais que oui car tu es une des personnes les plus brillantes que je connaisse !! ☺).

Hélène, merci pour toutes nos discussions et bon courage pour la suite !!! Je suis sûre que tu vas faire de magnifiques papiers et que tu n'auras pas passé toutes ces heures dans le grand L2 en vain !!!

Rémi, je suis contente d'avoir fait ta connaissance !! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite !! Tu le mérites et je suis sûre que tout va hyper bien se passer et que tu vas déchirer !!! Et si tu as un coup de déprim', descends d'un étage pour voir ton chaton, ou viens dans les Alpes pour un week-end ski, moi je suis hyper partante (et peut-être que d'ici là, je serai moins mauvaise !!!). Sinon prends un café bien bien serré au petit-déj, ça fait toujours du bien !!!! ^^

Les post doc !!!! Alalalala vous étiez là avant mon arrivée et vous serez encore là après mon départ !!!! Merci pour tout !!! Je vous ai sûrement souvent dérangé, mais j'aimais beaucoup venir vous embêter dans votre bureau !!!! Merci pour votre aide lors de la rédaction de mon M2 ! Pour les conseils avisés pendant la thèse ! Pour les phrases "chocs" et les « Eh Dajon ! » de **Biton** et les remarques sur mes tenues ou autres de **Claire** qui m'ont toujours donné le sourire !!!!! Merciii

Nathalie Josseume, merci pour ton accent chantant et ta bonne humeur tous les jours !!! Pour tes bons petits plats et ta patience avec la gestion des L2. Merci pour tes conseils lors de mon voyage à Toulouse, j'ai vraiment beaucoup aimé cette ville !!! Les gens y sont aussi gentils que toi !!!! Merci !!

Un petit tour au club des sales meufs !!!! A toutes les trois, merci pour votre folie, votre bonne humeur, votre joie, vos sourires !!!!! Merci pour tout !! C'est compliqué de vous dire merci car ça veut dire que je m'en vais ! Vous êtes les bienvenues quand vous voulez à Lyon !!!! Et ce n'est pas une invitation, c'est une obligation !!!! ^^

Pauline, toi et ton SAS spécial vous allez beaucoup me manquer !!! Binôme de congrès et de copinage avec les gens en congrès !! Merci beaucoup pour tout, pour les fous rires à cause de ta tête en l'air (elle est où ma pince à cheveux), de ton incapacité à reconnaître un speaker (juste en l'écrivant je rigole encore), de tes blagues que je trouve souvent très drôles, pour tes goûts musicaux (NEKEFEU représente !!), ta discrétion, ta capacité à garder un secret !! Merci aussi pour tous tes conseils, que ce soit au travail, pour le futur, pour les moments pas cools (« Soit un pigeon, laisse couler les mauvaises choses sur tes plumes

hydrophobes et ne prends que le bon »), pour l'écologie, pour la liberté du corps (et de l'esprit) !!! Merci pour les soirées de danse endiablée ! Merci d'être autant sans filtre et avec une telle franchise, ça te va tellement bien !!! Je te souhaite bon courage pour la suite, mais je sais que tout ira bien, il faut juste que toi tu t'en rends compte !!! ☺

TicTic, alala le nombre de retours de labo, de temps à chercher les cadeaux d'anniversaire, de shopping, de magasins, de pique-niques que nous avons fait ensemble..... Merci pour tout !!! Merci pour les moments en petit L2 (qui ont disparu au changement d'équipe), pour les « formations pH-mètre », pour toutes les soirées et goûters que tu as organisés, Merci à Marcel !!! ^^ Merci pour ton aide dans mes différentes étapes pour postuler, que ce soit du CV, de la lettre de motivation, du mail, de la motivation jusqu'au choix du tee-shirt et des chaussures !!! Tu es ma conseillère en chef, je n'y serais pas arrivée sans toi !! Merci pour tous les repas et fous-rires qu'on a partagés ensemble !!! Ca va terriblement me manquer !!!! Je te souhaite tout le meilleur pour la suite !!!! Ne te prends pas trop la tête avec le travail et pense à toi !!! Suis les conseils que tu me donnes !!! ☺ Et bonne chance avec les quelques mois que tu auras avec le morveux, qui en plus se prendra pour un vrai thésard !!! ^^

Kris, alors là on ne rigole plus. Je suis tellement fière de toi ! Tu as réussi à avoir tout ce que tu voulais, je suis tellement contente pour toi !!! Tu m'as tout appris au laboratoire !!! J'étais un bébé en arrivant et grâce à toi j'ai appris que malgré ma peur des seringues, les souris c'est la vie dans la science !!! Merci d'avoir été d'un soutien infailible, d'avoir eu la patience de me former, merci pour tous les moments au labo quand tu y étais encore, les journées (même celles avec les manip du siècle était toujours un pur plaisir !!!) Mais merci surtout pour tout le reste !! Merci d'avoir fait de mes 4 ans à Paris une folie et un amusement permanent !!! Tu as toujours été là pour moi, je n'ai même pas les mots pour te remercier. Tu as été une binôme en or au Labo (après ton départ ce n'était vraiment plus la même chose), une binôme d'immeuble, une binôme de vie, une binôme de voyage !! On va s'éloigner encore plus cette année, géographiquement parlant, mais je suis sûre que l'on restera tout aussi proches !! Tu vas tellement me manquer !!!

Merci à tous les membres des **équipes 10, 13 et 15** qui sont actuellement au laboratoire ou qui en sont déjà partis et plus particulièrement : Yann, Ivo, Tania, Lubka, Yasmina, Nicolas G., Etienne, Alia, Sophie..., mais également aux autres **personnes du**

centre qui ont fait que les moments de manip et/ou autres étaient vraiment géniaux (Aizti, Andres, Chema, Federico, Jérôme, Jules, Juliette, Lorenzo (Daddy's hoooooome !!!!!), Sarah, etc.....)!!!

Franchouille, tu n'es plus avec nous depuis un moment mais tu es toujours dans nos cœurs !!! Grâce à toi nous avons formé le T7T de choc !!!! Tu as fait du stage de M2, un stage super et plein de folie !!!! Merci et bon courage pour la fin de ta thèse !!

Thibaut, mon Thibaut d'amour, mon binôme de master !!!! Merci pour tout !! Merci pour ta joie et pour les fous rires incalculables, volontaires ou involontaires (fais attention dans la rue : aux sapins qui s'échappent et aux pieds qui arrêtent de marcher !!!) !!! Qu'est-ce que l'on a pu rigoler !!! Merci pour tes dessins, pour la vidéo du bateau (et hop les lunettes, il n'y a plus de lunettes) !! Accroche-toi pour la fin, tu vas tout déchirer et tu vas avoir des papiers de malade et si tu as un coup de blues, mets-toi sur Youtube et : Dessssspaaaaciiiiito nananana-ito nananana-ito nanananana-burito, sube sube sube sube !!!!! Ou: So Darliiiiing Darliiiiing Staaand by meeeeeeee, Oooh Ohhh Ooooooh Stan By me!!!! Tu vas tellement me manquer !!! Je sais que tu ne prends quasiment jamais de vacances, mais tu as INTERET de venir à Lyon !!! Non !! Tu n'as pas le choix, on ne discute pas !!!!

Merci au Fubar (c'était tout de même une part importante au début), le HideOut, La Tireuse, Le Mayflower, le Caméléon et les Tennessees qui m'ont / nous ont accompagnés au cours de ces années et où j'ai passé de supers moments, surement les meilleurs !!!

Mes amis de Nice (plus vraiment à Nice pour la plupart !!!^^) !!! **Jennifer, Cha, Benichou, Lois, Chaleur, Dod, Didick, Sev, Laurent, Benjamin, Thomas...** On se voit de moins en moins souvent mais vous êtes dans mon cœur et vous me manquez !!!!! Vivement le prochain camping annuel !!! Au fait, Benjamin et Lois, j'ai eu ma thèse et avec le sourire qui plus est !!!! Ahahahah comme quoi vous aviez raison !!!! Un gros bisou et un grand merci tout particulier à **Julie** aux côtés de qui j'ai commencé mes premiers pas dans la science ! On faisait un super binôme en Licence !!!!! A Paris, on ne se voyait pas tant que cela, mais chaque moment avec toi est rafraichissant et pétillant!!! Merci pour tout !!! Merci à tous d'avoir supporté et cultivé ma folie !!! Oui oui vous n'y êtes pas pour rien, avec des amis comme ça on ne peut pas s'en sortir sans séquelles !!!!!

Fabien, merci merci merci !! Merci d'être là chaque jour à mes côtés, de supporter mes excès d'énergie, de folie, de rage et de tristesse !!! Merci pour ton soutien, ta douceur, ta gentillesse, ta folie (oui oui comme dirait Kris, je suis contagieuse !!!! ^^), ton amour... Tu es parfait !!! Vivement la suite, ça va être merveilleux, j'ai tellement hâte !! ☺ Merci également à **Pascal** et **Françoise** pour leur soutien, leur enthousiasme et leur bonne humeur !!

Gaëtane et **Maman**, merci pour votre soutien inconditionnel même si je ne donne pas beaucoup de nouvelles !!! Vous me manquez beaucoup !! Je m'excuse de ne pas être rentré très souvent, j'espère qu'en étant à Lyon ça sera plus facile et pour moi de descendre et pour vous de monter !!! En plus, on aura un ascenseur !!! Merci maman pour tes heures d'écoute et de soutien même si tu ne comprenais pas grand-chose à mes histoires de TLR7, merci de m'avoir donné la force de caractère pour ne pas abandonner à certains moments et de m'avoir ramassé quand j'étais en petit morceau !! Gaëtane, merci de croire autant en moi (je ne sais pas du tout comment tu fais !!! ^^) !! Tu es la meilleure petite sœur du monde et de l'univers !!! ☺ Maintenant il faut que tu croies en toi !! Tu mérites le meilleur et tu es la plus forte donc tu peux y arriver, il suffit juste que tu t'en rendes compte !!! Je vous aime très fort !! **Mamie/Nona/Yaya** merci pour ton soutien !! Je suis désolée du peu de nouvelles que je t'ai donné mais chaque mail et moment que je passe avec toi me font chaud au cœur !!!! **Papa, Bergitt** et **Lucas** merci pour votre aide, vos encouragements et votre soutien !! J'espère à très vite pour d'autres Brunchs (avec pain perdu obligatoire) !!!

Pour finir je remercie **Sasa**. Merci de te battre chaque jour pour toi et pour nous !!! Tu as une force et une rage de vivre admirables, que peu de personnes ont !! J'ai hâte de te retrouver et de partager de merveilleux moments avec toi, qui, je l'espère, seront nombreux !! J'y crois, tu es un battant et surtout un gagnant !!! A très vite !!! Ti voglio molto bene !!

Je dédie cette thèse à Sasa...

Résumé :

De nombreuses études ont impliqué des TLR dans le développement et la progression tumorale. Précédemment, il a été démontré que les cellules tumorales expriment TLR7, un récepteur à ARNsb, et qu'une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales de patients atteints de cancer du poumon est associée à un mauvais pronostic. Dans un modèle murin de cancer du poumon, cet effet pro-tumoral a été reproduit lors de l'injection d'agoniste de TLR7.

Mes travaux de thèse ont eu pour objectif de déterminer les mécanismes impliqués dans les effets pro-tumoraux de TLR7. La stimulation de ce récepteur au niveau des cellules tumorales induit une production plus importante de CCL2 et GM-CSF, ainsi qu'un fort recrutement de MDSC au site de la tumeur. Ces MDSC, de par leurs propriétés immunosuppressives sont responsables de l'effet pro-tumoral à la suite de la stimulation de TLR7. Nous avons également mis évidence que la stimulation de TLR7 était pro-métastatique dans un modèle murin de cancer du poumon et que les MDSC étaient également impliquées dans cet effet. Ces effets pro-métastatiques associés au TLR7 ont été confirmés chez l'homme, grâce à l'étude de transcrits de molécules associées à l'invasion, l'angiogénèse, la transition épithélio-mésenchymateuse et les métastases.

Enfin nous avons démontré la présence de ligand de TLR7 chez les patients atteints de cancer du poumon et démontré que l'injection intratumorale de virus respiratoires, IAV et RSV, a un effet pro-tumoral dans notre modèle de cancer du poumon. Ces virus respiratoires pourraient donc être à l'origine de la surexpression de TLR7 et du mauvais pronostic associé à ce récepteur chez les patients atteints de cancer du poumon.

Ces recherches ont donc permis de mettre en évidence de nouveaux facteurs aggravants dans le cancer du poumon, dont les virus respiratoires, et de découvrir les mécanismes impliqués.

Mots clefs : Cancer du Poumon, TLR7, MDSC, Virus Respiratoire, IAV, RSV

Abstract:

Numerous studies have implicated some TLR in tumor development. Previously, we have demonstrated that lung tumor cells express TLR7, a receptor for ssRNA, and that high TLR7 expression confers to NSCLC patients bad clinical outcome. In mice models of lung cancer, we further demonstrated that the injection of TLR7 agonists led to a pro-tumoral effect.

My thesis work has firstly demonstrated the mechanisms involved in the pro-tumoral effects of TLR7 in lung cancer: TLR7 stimulation on tumor cells induces a high production of CCL2 and GM-CSF, as well as a sharp MDSC recruitment within the tumor. These MDSC, by their immunosuppressive properties, are implicated in the pro-tumoral effect upon TLR7 stimulation. We also demonstrated that TLR7 stimulation was pro-metastatic in a mice model of lung cancer and that MDSC were also involved in this effect. These pro-metastatic effects associated with TLR7 have been confirmed in humans through the studies of transcripts and proteins involved in invasion, angiogenesis, Epithelial–mesenchymal transition and metastasis.

Finally, we demonstrated that TLR7 ligands are present in tumor microenvironment of lung cancer patients and that intratumoral injection of respiratory viral infections such as IAV and RSV, have a pro-tumoral effect in lung cancer mice model. These respiratory viruses could therefore be at the origin of the overexpression of TLR7 and the poor clinical outcome associated with this receptor in lung cancer patients.

This research has thus made possible to highlight new aggravating factors in lung cancer, including respiratory viruses, and to discover the mechanisms involved.

Keywords: Lung Cancer, TLR7, MDSC, Respiratory Viruses, IAV, RSV

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyRibonucléique
AEP	Asparagine EndoPeptidase
Akt	Protein kinase B
AP1	Activator Protein 1
ARG1	Arginase 1
ARN	Acide RiboNucléique
ARNdb	Acide RiboNucléique double brin
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNsb	Acide RiboNucléique simple brin

B

Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2- associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-xL	B cell lymphoma-extra large
Bcl-w	B cell lymphoma w
Bid	BH3 interacing-domain death agonist
Bim	Bcl-2 like protein 11
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
BPCO	BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

C

CCL	C-C motif chemokine Ligand
CD	Cluster of Differentiation
cDC	conventional Dendritic Cells
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX-2	Cyclooxygénase-2
CpG	Cytosine phosphodiester Guanine
CPNPC	Cancer du Poumon Non à Petites Cellules

CPPC	Cancer du Poumon à Petites Cellules
Cre	Causes recombination
CREB	C-AMP Response Element-Binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CXCL	C-X-C chemokine Ligand

D

DAMP	Damaged-Associated Molecular Pattern
DC	Dendritic Cell

E

EBV	Epstein-Barr Virus
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT	Transition épithelio-mésenchimaleuse
Erk	Extracellular signal-Regulated Kinase

G

GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
gr-MDSC	Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell

H

H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEK	Human Embryonic Kidney
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HHV	Human HerpesVirus
HIF	Hypoxia growth Factor
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus type 1

HMGB1	High Mobilitiy Group Box-1
HPV	Human PapillomaVirus
HSP	Heat Shock Protein
HTLV	Human T-cell Leukemia Virus

I

IAV	Influenza A Virus
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN	Interféron
IkB	Inhibitor of NF-κB
IKK	I kappa B kinase
IL	Interleukine
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory transcription Factor
IRS	ImmunoRegulatory Sequence

J

JNK	c-Jun N-terminal Kinase
-----	-------------------------

K

KRAS	Kristen sarcoma virus
KRT	Kératine
KSHV	Kaposi's associated sarcoma virus

L

LAG3	Lymphocyte Activation Gene-3
LLC	Lewis Lung Carcinoma
LoxP	Locus of X-over P1
LPS	LipoPolySaccharides
LRR	Leucin-Rich Repeat
LT	Lymphocyte T

M

M1	Macrophage de type 1
M2	Macrophage de type 2
MAD-5	Melanoma differentiation-associated proteins
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAPK	Mitogen-Associated Protein Kinase
mDC	Cellules Dendritiques myéloïdes
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
miARN	micro-ARN
MIP-2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
MMP	MetalloProtéase Matricielle
mo-MDSC	Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell
MUC1	Mucin 1
MYC	bHLH transcription factor
MyD88	Myeloid Differentiation factor 88

N

NF- κ B	Nuclear factor κ B
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NME1	Nucleoside diphosphate kinase A
NOD/SCID	Non Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficient
NS	Non Significatif

O

ODN	Oligonucleotide
ONOO ⁻	Peroxynitrite

P

PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffer Saline

PD-1	Programmed cell Death 1
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cells
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PD-L2	Programmed Death-Ligand 2
pfu	Plaque-forming unit
PGE2	ProstaGlandine E2
PGN	PeptidoGlycaN
Poly (I-C)	Acide polyinosinique-polycytidylique
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog

R

Rag2	Recombination activating gene 2
RIG-1	Retinoic acid Inducible Gene-1
RIP	Receptor-Interacing Protein
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RSV	Virus Respiratoire Syncytial

S

SCID	Severe Combined ImmunoDeficient
SDC4	SynDeCan 4
SEAP	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase
siARN	small interfering ARN
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

T

TAB	TGF β -activated kinase 1 (TAK1)-Binding proteins
TAK	Transforming growth factor beta-Activated Kinase
TCR	T-Cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper

TIGIT	T cell ImmunoGlobulin-3
TIM3	T cell Immunoglobulin and ITIM domain
TIR	Toll-IL1 Receptor
TIRAP	TIR-domain containing Adaptor Protein
TLR	Toll-Like Receptor
TLS	Structure Lymphoïde Tertiaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAM	TIRF-Related Adaptor Molecule
Treg	Cellule T régulateur
TRIF	TIR-domain containing adaptor inducing Interferon β

U

UNC93B1 Unc-93 homolog B1

V

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le rôle de l'inflammation dans le développement et la progression tumorale.

Figure 2 : La structure des TLR.

Figure 3 : Les voies de signalisation induites lors de la stimulation des TLR.

Figure 4 : Les voies de signalisation impliquées dans la signalisation de TLR7 après stimulation.

Figure 5 : Les différentes caractéristiques d'une cellule tumorale, selon Hanahan et Weiberg.

Figure 6 : L'absence du système immunitaire adaptatif conduit à un développement de tumeur plus important.

Figure 7 : La théorie des 3E.

Figure 8 : Le contexte immunitaire au sein du microenvironnement tumoral.

Figure 9 : L'impact de l'infiltrat immunitaire sur le pronostic des patients pour différents types de cancer.

Figure 10 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des MDSC.

Figure 11 : Les effets anti- et pro-tumoraux des TLR.

Figure 12 : La présence du TLR7 fonctionnel chez les patients atteints de cancer du poumon, ainsi qu'au niveau de lignées cellulaires humaines de cancer du poumon.

Figure 13 : Une forte expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales chez les patients atteints de cancer du poumon est associée à un mauvais pronostic de survie et une réponse moindre aux chimiothérapies.

Figure 14 : La stimulation de TLR7 dans un modèle *in vivo* de cancer du poumon induit un effet pro-tumoral et de la chimiorésistance.

Figure 15 : Le pourcentage de MDSC chez des patients atteints de cancer du poumon et chez des donneurs sains.

Figure 16 : La présence de ligand de TLR7 dans le microenvironnement tumoral de certains patients atteints de cancer du poumon.

Figure 17 : Le développement d'une bronchite chronique est associé à une plus forte expression de TLR7 par les cellules tumorales, chez des patients atteints de cancer du poumon.

Figure 18 : L'infection par l'IAV induit un effet pro-tumoral.

Figure 19 : L'infection par le RSV induit un effet pro-tumoral.

Figure 20 : Schéma bilan des mécanismes mis en évidence dans l'effet pro-tumoral après stimulation de TLR7.

Figure 21 : Schéma bilan de l'effet pro-métastatique induit par la stimulation de TLR7.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : L'expression et la localisation des différents TLR chez l'homme et chez la souris.

Tableau 2 : Les principaux ligands endogènes, exogènes et synthétiques des TLR.

Tableau 3 : L'expression des TLR par les cellules du système immunitaire.

Tableau 4 : L'expression des TLR par les cellules tumorales.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS	12
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES TABLEAUX	22
Table des matières	24
Préambule	27
INTRODUCTION.....	29
L'inflammation pro-tumorale	30
Les Toll-Like Receptors.....	33
1. Découverte et structure des TLR.....	33
2. Localisation et ligands des TLR.....	34
3. Profil d'expression des TLR	37
4. Voies de signalisation des TLR.....	39
5. Le TLR7	41
Le microenvironnement tumoral : un environnement complexe	44
1. Les cellules tumorales	44
2. L'infiltrat immunitaire.....	46
2.1. Rôle du système immunitaire inné	50
2.1.1. Les cellules dendritiques	50
2.1.2. Les macrophages.....	51
2.1.3. Les cellules NK.....	52
2.1.4. Les MDSC	53
2.1.4.1. Description générale et phénotype des MDSC.....	53
2.1.4.2. Les fonctions immunosuppressives des MDSC	54
2.1.4.3. Recrutement et activation des MDSC	57
2.2. Rôle du système immunitaire adaptatif.....	59
2.2.1. Les lymphocytes T.....	59
2.2.2. Les lymphocytes B.....	60
3. Les autres composants du microenvironnement tumoral	61

Rôle des TLR dans les cancers	63
1. Effets de TLR1/2 dans les cancers	63
2. Effets de TLR3 dans les cancers	64
3. Effets de TLR4 dans les cancers	65
4. Effets de TLR5 dans les cancers	67
5. Effets de TLR7 dans les cancers	68
6. Effets de TLR9 dans les cancers	69
Le TLR7 et le cancer du poumon	72
1. Le cancer du poumon	72
1.1. Epidémiologie	72
1.2. Etiologie et traitements.....	73
1.3. Les métastases	74
2. Le TLR7 dans le cancer du poumon	76
OBJECTIFS.....	80
RESULTATS	83
Projet d'Article	84
Résultats non publiés 1 : Etude des MDSC chez les patients atteints de cancer du poumon.....	124
Résultats non publiés 2 : Etude des ligands naturels de TLR7 dans le cancer du poumon.....	128
CONCLUSIONS.....	134
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	139
Partie I : Effet pro-tumoral et pro-métastatique de TLR7 médié par les MDSC dans le cancer du poumon	140
1. Effet de la stimulation directe de TLR7 au niveau des cellules tumorales	141
2. Implication des MDSC dans l'effet pro-tumoral après stimulation du TLR7.....	143
4. Résultats préliminaires chez les patients atteints de cancer du poumon	147
5. Limite de notre modèle d'étude	147
Partie II : Etude des agonistes naturels de TLR7 dans le cancer du poumon.....	150
1. Présence d'agoniste de TLR7 dans le microenvironnement tumoral des patients atteints de cancer du poumon	151
2. Origine des agonistes naturels présents dans le microenvironnement tumoral de patients atteints de cancer du poumon.....	151

2.1. Les virus et les cancers	152
2.2.1. Le Respiratory Syncytial Virus :	154
2.2.2. Le virus Influenza A	155
2.3. Impact du TLR7 et du modèle murin dans les effets induits par les infections virales	157
REFERENCES	158
ANNEXES	196
Revue 1: Dual roles of TLR7 in lung cancer microenvironment	197
Revue 2: Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double- edged sword	Erreur ! Signet non défini.

Préambule

Le développement et la progression tumorale résultent de mécanismes multiples : la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale est un processus long et complexe, qui met en jeu des facteurs génétiques et/ou environnementaux. Concernant les facteurs génétiques, 5 à 10% des cancers sont dus à des mutations génétiques héréditaires (www.e-cancer.fr). Parmi les facteurs environnementaux, on estime que 20% des cancers sont liés à des infections chroniques, 30% à la consommation de tabac et à l'inhalation de polluants, et 35% à des facteurs alimentaires (dont 20% dus à l'obésité) (Aggarwal et al., 2009).

Parmi les facteurs environnementaux, une majeure partie des facteurs pro-tumoraux ont comme point commun l'induction d'un environnement inflammatoire. Le premier lien entre l'inflammation et les cancers a été effectué en 1863 par Rudolf Virchow, démontrant la présence de leucocytes dans les tissus néoplasiques. Il supposait que la présence de cet infiltrat leucocytaire reflétait l'origine du cancer au site d'une inflammation chronique. Ce n'est que dans les années 2000 que de réelles démonstrations de l'implication de l'inflammation dans le développement et la progression tumorale sont effectuées. L'équipe de Samson démontre en 2008 que l'inflammation chronique (médiée par l'administration de Dextran Sodium Sulfate) induit le relargage d'espèces réactives d'oxygènes (ROS) et de nitrogènes (RNS) chez la souris. Ces molécules induisent des dommages au niveau de l'ADN, conduisant au développement de cancer du colon chez la souris (Meira et al., 2008). Depuis, différentes recherches ont confirmé ces observations et vérifié qu'il existe un lien fort entre l'inflammation et le cancer (Coussens and Werb, 2002; Rakoff-Nahoum, 2006).

Au sein de cette inflammation pro-oncogénique, le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle central et est retrouvé activé dans de nombreuses tumeurs (Cogswell et al., 2000; Nakshatri et al., 1997). L'activation de ce facteur de transcription dépend de nombreuses voies de signalisation et de récepteurs, tels que le récepteur du « Tumor Necrosis Factor » (TNF) ou les récepteurs Toll-Like (TLR). Les TLR sont des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) permettant d'initier une réponse immunitaire contre des pathogènes ou des signaux de dangers (Janeway, 1989). Parmi les motifs moléculaires reconnus par les TLR, on retrouve les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs),

qui sont dérivés de pathogènes, et les motifs moléculaires associés à des dangers (DAMPs), qui sont des molécules provenant du « soi », telles que des débris cellulaires induits par de la nécrose ou des messages de danger relargués par les cellules du « soi » (Newton and Dixit, 2012). Les TLR ont donc un rôle central dans l'initiation de la réponse immune et sont principalement exprimés par les cellules immunitaires (Beg, 2002). Toutefois, ils peuvent être exprimés par certaines cellules épithéliales normales ou tumorales (Cherfils-Vicini et al., 2010; Dajon et al., 2016; González-Reyes et al., 2011). Le fait que ces récepteurs soient exprimés à la fois par les cellules immunitaires et les cellules tumorales a introduit de nombreuses recherches sur l'impact de ces récepteurs dans le développement et la progression tumorale. Il a été démontré que ces récepteurs peuvent être impliqués à la fois dans des effets pro-tumoraux et anti-tumoraux, impliquant des mécanismes variés qui sont décrits dans cette introduction (Dajon et al., 2016).

C'est dans ce contexte que mon projet de thèse a été construit, en prenant comme modèle d'étude le cancer du poumon, pour lequel un rôle pro-tumoral de l'inflammation est démontré (Li et al., 2016). Au laboratoire, il avait été montré que TLR7 est associé à un effet pro-tumoral dans le cancer du poumon. Mes recherches ont permis de mettre en évidence les mécanismes expliquant cet effet pro-tumoral. Par la suite, j'ai également étudié les ligands qui, dans le microenvironnement tumoral, pourraient conduire à la stimulation du récepteur et induire un effet pro-tumoral chez les patients.

INTRODUCTION

L'inflammation pro-tumorale

L'inflammation est une réponse du système immunitaire suite à une lésion tissulaire : elle détruit la source de la lésion, puis permet la réparation des tissus endommagés. Différents médiateurs cellulaires et moléculaires sont impliqués, comme les neutrophiles polymorphonucléés, les macrophages, les cellules dendritiques et certaines cytokines et chimiokines (telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , le « C-C motif Chemokine Ligand -2 » (CCL2) ou le CCL10). La production de ces médiateurs est contrôlée par des facteurs de transcription dont NF- κ B (Karin, 2006).

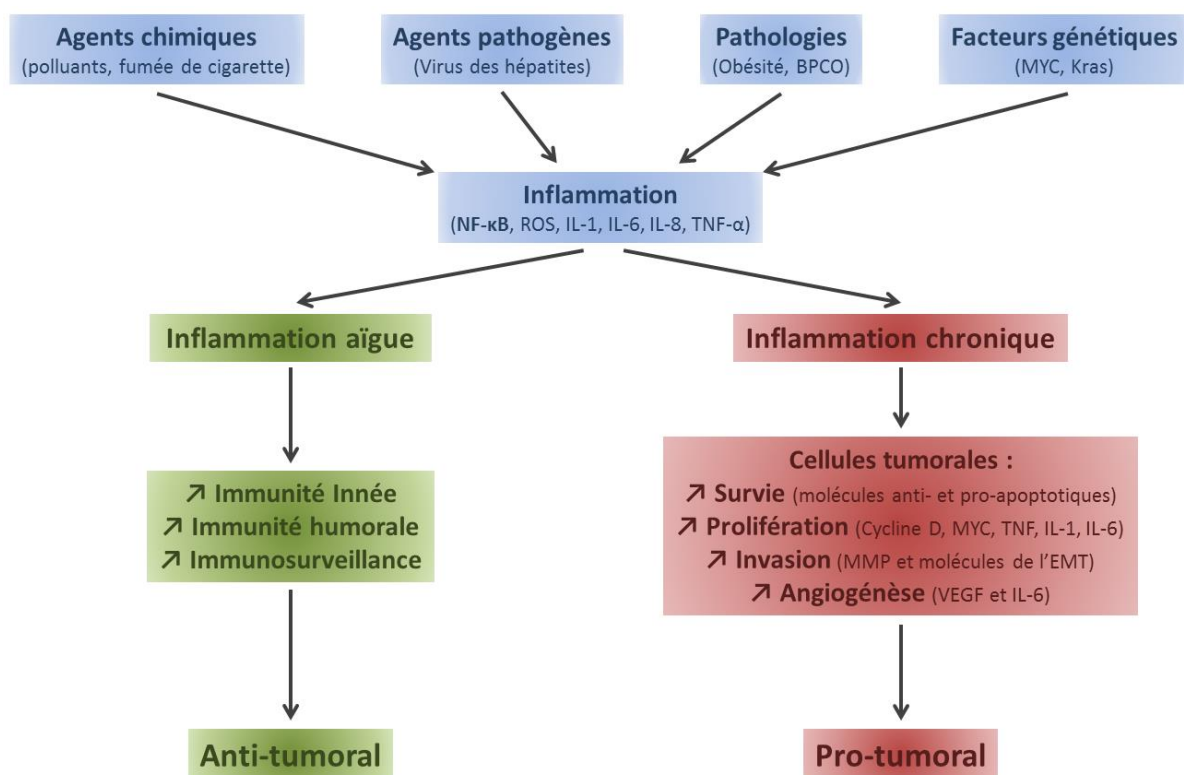


Figure 1 : Le rôle de l'inflammation dans le développement et la progression tumorale.

Un inducteur induit de l'inflammation qui peut être aiguë ou chronique. Selon la type d'inflammation, cela conduit à des effets anti- ou pro-tumoraux.

La réponse inflammatoire médiée contre les agents pathogènes fait partie intégrante d'une réponse immunitaire classique de l'hôte, et correspond à de l'inflammation aiguë. Cette inflammation aiguë peut être bénéfique dans le cadre du cancer. En effet, certains pathogènes ont été utilisés à des fins thérapeutiques chez des patients atteints de cancer de la vessie (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009). Lorsque les pathogènes persistent et échappent au

système immunitaire de l'hôte, cela peut induire une inflammation chronique, qui peut être pro-tumorale. Parmi les principaux agents infectieux incriminés pouvant induire des cancers par l'induction d'inflammation, il est démontré que l'infection par *Helicobacter pylori* est associée aux cancers gastriques et aux lymphomes des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) (Helicobacter and Cancer Collaborative Group, 2001). Les infections par des virus hépatiques (tels que le virus de l'Hépatite B (HBV) ou le virus de l'hépatite C (HCV)) augmentent également le risque de développer un carcinome hépatocellulaire, par l'induction d'une forte réponse inflammatoire contre les cellules infectées par le virus. Les infections par des espèces *Schistosoma* ou *Bacteroides* peuvent également être liées au cancer de la vessie ou du colon (Karin, 2006; Wu et al., 2009). Enfin, le « Human PapillomaVirus » (HPV), en plus de ses propriétés oncogéniques, peut induire de l'inflammation, ce qui est un facteur aggravant dans le développement de lésions au sein du col de l'utérus (Hammes et al., 2007; Yang et al., 2001) (**Figure 1**).

Certains agents chimiques peuvent également induire une inflammation chronique pro-tumorale. Il a été démontré que la fumée de cigarette induit (1) le relargage de ROS dans le tractus respiratoire et (2) l'activation de K-ras au sein des cellules épithéliales pulmonaires. Ces effets conduisent à la transcription de gènes pro-inflammatoires, tels que l'IL-8 ou le TNF- α , favorisant le recrutement de cellules inflammatoires et donc l'inflammation chronique, ce qui promeut le développement tumoral dans le cancer du poumon (Chung, 2005; Churg et al., 2002; Huang et al., 2005b; Takahashi et al., 2010). L'exposition à l'amiante induit des effets similaires dans le poumon, grâce à un recrutement accru de cellules inflammatoires, majoritairement des neutrophiles polymorphonucléés produisant des RNS, conduisant à l'établissement d'une inflammation chronique (Haegens et al., 2005; Norbet et al., 2015).

Certaines pathologies peuvent induire de l'inflammation chronique pro-tumorale, dont l'obésité qui est liée au développement de cancer du foie et du pancréas (Khasawneh et al., 2009; Park et al., 2010). Cette pathologie conduit à une forte production d'IL-6 et de TNF, causant une inflammation hépatique et activant des facteurs de transcription oncogéniques, induisant une augmentation du risque de développement de carcinome hépatocellulaire. De même, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est un facteur de risque pour le cancer du poumon (Young and Hopkins, 2010). Lors de BPCO, une production de ROS et d'IL-17 ainsi qu'une surexpression de NF- κ B sont observées, ce qui pourrait accentuer le

développement de cancer du poumon (Chang et al., 2014; Hoffmann et al., 2013; Shen and Tergaonkar, 2009).

Enfin, lorsque la tumeur est établie, cette dernière peut induire de l'inflammation par elle-même, grâce à la production de certaines cytokines, telles que l'IL-6 ou l'IL-8, permettant la mise en place d'un microenvironnement pro-cancérogène (Mantovani et al., 2008). Cette production de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules tumorales peut être induite par certains oncogènes, dont *RAS* et *MYC*, qui induisent la transcription de facteurs pro-inflammatoires, comme l'IL-8 (Karin, 2006; Sparmann and Bar-Sagi, 2004). De même, les cellules tumorales peuvent sur-activer le facteur de transcription NF- κ B, afin d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Pikarsky et al., 2004).

Dès sa découverte, NF- κ B est supposé impliqué dans le développement de cancer, de par son lien avec l'oncogène v-Rel (Gilmore, 2003). Par la suite, NF- κ B est démontré comme pouvant avoir un rôle majeur dans le développement d'un grand nombre de cancers. La surexpression ou la sur-activation de ce facteur de transcription est liée à un effet oncogénique dans le cancer du sein, le cancer hépatique et le cancer du poumon (Chen et al., 2011; Cogswell et al., 2000; Nakshatri et al., 1997; Pikarsky et al., 2004; Sovak et al., 1997). Ainsi, NF- κ B peut être activé par des médiateurs pro-inflammatoires mais également induire leur production. L'activation de ce facteur de transcription est également régulée par des récepteurs dont les TLR, qui peuvent donc avoir un impact dans l'inflammation chronique et le développement et la progression tumorale.

Les Toll-Like Receptors

1. Découverte et structure des TLR

Le gène Toll a initialement été découvert en 1979, comme impliqué dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale chez la drosophile. En 1996, l'équipe du Dr Hoffmann met en évidence qu'en plus de son rôle dans le développement de la drosophile, le gène Toll est impliqué dans l'immunité chez la drosophile adulte (Lemaitre et al., 1996). Lorsque la voie de signalisation Toll chez la Drosophile est mutée, les auteurs observent une chute drastique de la survie des drosophiles à la suite d'une infection fongique, accompagnée d'une diminution de la production de Drosomycine (fragment anti-microbien). Ils en concluent donc pour la première fois, que des gènes antibactériens sont induits par la voie de signalisation Toll.

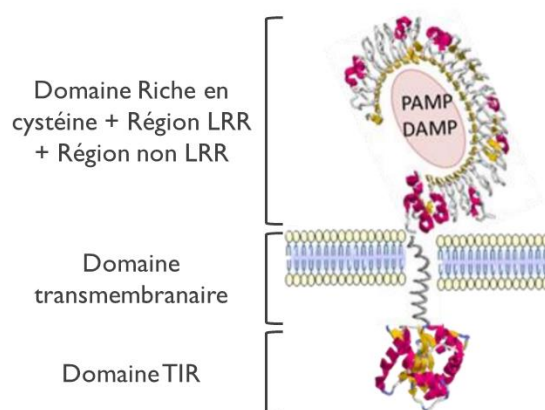


Figure 2 : La structure des TLR.

Les TLR sont composés de trois parties : une partie extracellulaire qui comprend un domaine riche en cystéine, des domaines riches en leucine (LRR) et des régions non LRR, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire, qui contient le domaine « Toll-Interleukin 1 Receptor » (TIR).

En 1997, un homologue humain de la protéine Toll de la Drosophile (maintenant appelé TLR4) est cloné, caractérisé et démontré comme permettant l'expression de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires (Medzhitov et al., 1997) : TLR. Comme chez la drosophile, cette protéine est une protéine transmembranaire de type I, avec au niveau extracellulaire des régions riches en leucine séparées par des régions non riches en leucine et flanquées en C-terminal par un domaine riche en cystéine. Ce domaine permet la reconnaissance des signaux de danger (Rock et al., 1998). Ce récepteur est également composé d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire appelé Toll-

interleukin 1 receptor (TIR) qui est nécessaire pour induire la transduction du signal (**Figure 2**) (Bowie and O'Neill, 2000; Kawai and Akira, 2010; Martin and Wesche, 2002).

2. Localisation et ligands des TLR

Il existe 10 types de TLR chez l'homme, et des pseudogènes pour les TLR11, 12 et 13 qui ne sont pas fonctionnels (**Tableau 1**) (Akira et al., 2001). Les TLR11 et TLR12, ne sont retrouvés que chez la souris, alors que le TLR13 est retrouvé chez la souris, le rat et l'opossums (Roach et al., 2005).

La localisation des TLR au niveau cellulaire dépend des ligands reconnus par ces récepteurs (**Tableau 1**). Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 et TLR11 sont exprimés au niveau de la membrane plasmique, tandis que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont retrouvés au niveau des endolysosomes (**Tableau 1**).

TLR	Expression chez l'homme	Expression chez la souris	Localisation
TLR1	+	+	Membrane plasmique
TLR2	+	+	Membrane plasmique
TLR3	+	+	Endolysosome
TLR4	+	+	Membrane plasmique
TLR5	+	+	Membrane plasmique
TLR6	+	+	Membrane plasmique
TLR7	+	+	Endolysosome
TLR8	+	-	Endolysosome
TLR9	+	+	Endolysosome
TLR10	+	Forme inactive	Membrane plasmique
TLR11	Forme Inactive	+	Membrane plasmique

Tableau 1 : L'expression et la localisation des différents TLR chez l'homme et chez la souris.

Les TLR sont en majorité exprimés à la fois chez l'homme et chez la souris. La localisation de ces récepteurs dépend des ligands reconnus.

Les TLR sont des PRRs et ont la capacité de reconnaître des PAMPs ou des DAMPs. Les ligands possibles des TLR sont des lipides, des lipoprotéines, des protéines ou des acides nucléiques dérivés de virus, de bactéries, de parasites, de champignons ou du soi (**Tableau 2**) (Ozinsky et al., 2000). Des études sur des souris déficientes pour les différents TLR montrent

que chaque TLR a une fonction distincte en termes de reconnaissance de PAMPs et de DAMPs.

TLR	Ligands exogènes	Ligands endogènes	Ligands synthétiques
TLR1	Lipopeptides	-	Triacyl lipopeptides
TLR2	Acide lipotectoïque, Glycolipide, Glycoinositolphospholipide, Hémagglutinine, Lipoarabinomannane, Lipopolysaccharide atypique, Lipoprotéine, Moduline phenol-soluble, Peptidoglycane, Phospholipomannane, Porine, Zymosan	Acide hyaluronique, HMGB1, HSP60, HSP70, HSP96	Diacyl lipopeptide, Triacyl lipopeptide
TLR3	ARN double brin	ARNm	Poly(I :C)
TLR4	Glycoinositolphospholipide, Lipopolysaccharide (LPS), Protéine de fusion virale, Protéine d'enveloppe virale, Taxol	Acide Hyaluronique, Beta-defensine 2, Extra-domaine de la fibronectine, HSP22, HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1, Protéine du surfactant A, Sulfate d'héparane	Lipide mimétique A
TLR5	Flagelline	-	-
TLR6	Acide lipotectoïque, Diacyl lipopeptide bactérien, Moduline phenol-soluble, Zymosan	-	Diacyl lipopeptides
TLR7	ARN simple brin	ARN endogène	Bropirimine, Imidazoquinoline, Nucléotides de Guanosine, Oligonucléotides
TLR8	ARN simple brin	ARN endogène	Imidazoquinoline
TLR9	Hémozoïne, Motifs CpG hypométhylé	ADN endogène	CpG oligodeoxynucléotide
TLR10	Dérivé de listeria monocytogene	-	-
TLR11	Flagelline, Profiline	-	-

Tableau 2 : Les principaux ligands endogènes, exogènes et synthétiques des TLR.

Chaque TLR reconnaît des ligands spécifiques. Les ligands reconnus sont des PAMPs ou des DAMPs et sont majoritairement des lipides, des lipoprotéines, des protéines ou des acides nucléiques dérivés de pathogènes ou du soi.

Parmi les TLR exprimés à la surface des cellules, différents ligands exogènes et endogènes sont reconnus et permettent leur activation (**Tableau 2**) :

- TLR2 : associé au TLR1 ou TLR6, il reconnaît les lipoprotéines (dont celles dérivées des mycoplasmes), les peptidoglycanes (PGN), les acides lipotéichoïques et le zymosan (Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999; Kawai and Akira, 2010; Takeuchi et al., 1999, 1999, 2001; Underhill et al., 1999).
- TLR4 : il reconnaît principalement les liposaccharides bactériens (LPS) (Beutler, 2000; Hoshino et al., 2016; Miyake, 2004; Poltorak et al., 1998). Ce récepteur est également capable de capter des protéines chaperones, dont les protéines «Heat Shock» (HSP70) libérées dans le milieu extracellulaire (Asea, 2008).
- TLR5 : il permet la reconnaissance de la flagelline (Akira et al., 2006; Hayashi et al., 2001).
- TLR10 : étant un pseudogène chez la souris (dû à la présence d'un codon stop), il n'est actif que chez l'homme. Lorsqu'il est associé au TLR2, il permet la reconnaissance de ligands provenant de *listeria monocytogenes* ou du virus Influenza A (IAV) (Regan et al., 2013) (Lee et al., 2014).

Les TLR exprimés au niveau intracellulaire reconnaissent les acides nucléiques dérivés de bactéries, et de virus, mais également les acides nucléiques du soi (Kawai and Akira, 2010) (**Tableau 2**) :

- TLR3 : ce récepteur reconnaît les ARN double brin (ARNdb) viraux ainsi que des ARN du soi dérivés de cellules endommagées (Alexopoulou et al., 2001; Bernard et al., 2012; Takemura et al., 2014).
- TLR7 : il reconnaît les ARN simple brin (ARNsb) provenant principalement de virus ou du soi.
- TLR8 : non exprimé par les cellules murines, chez l'homme, il reconnaît des ARNsb bactériens, viraux ou du soi (Guiducci et al., 2013).
- TLR9 : il est activé par les ADN viraux et bactériens qui sont riches en motifs ADN-CpG hypométhylés (Hemmi et al., 2000).

Un seul des TLR est retrouvé exprimé à la fois au niveau de la membrane cellulaire et au niveau des endolysosomes : le TLR11. Ce TLR permet la reconnaissance de la profiline et de la flagelline (**Tableaux 1 et 2**).

3. Profil d'expression des TLR

Les TLR sont exprimés par différents types cellulaires, dont les cellules du système immunitaire et les cellules épithéliales, afin de permettre une reconnaissance optimale des agents pathogènes. Cette expression varie selon le type cellulaire, mais également selon l'état d'activation de la cellule.

TLR	Cellules immunitaires innées	Cellules immunitaires adaptatives	Références
TLR1	cDC et pDC Cellules NK Monocytes/Macrophages	Lymphocytes B	(Adams, 2009; Hausmann et al., 2002; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003)
TLR2	cDC Cellules NK Monocytes/Macrophages MDSC	Lymphocytes B Lymphocytes T	(Adams, 2009; Hausmann et al., 2002; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003; Wang et al., 2010)
TLR3	cDC Cellules NK MDSC		(Adams, 2009; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014)
TLR4	cDC Monocytes/Macrophages		(Adams, 2009; Hausmann et al., 2002; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003; Wang et al., 2010)
TLR5	cDC Cellules NK Monocytes/Macrophages	Lymphocytes T	(Adams, 2009; Hausmann et al., 2002; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003)
TLR6	cDC et pDC Cellules NK Monocytes/Macrophages	Lymphocytes B	(Adams, 2009; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003)
TLR7	cDC et pDC	Lymphocytes B	(Adams, 2009; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003)
TLR8	cDC Monocytes/Macrophages MDSC	Lymphocytes T Lymphocytes T reg	(Adams, 2009; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003)
TLR9	pDC Monocytes/Macrophages MDSC	Lymphocytes B	(Adams, 2009; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003)
TLR10	pDC Monocytes/Macrophages	Lymphocytes B Lymphocytes T Lymphocytes T reg	(Adams, 2009; Hornung et al., 2002; Huen and Rook, 2014; Nagase et al., 2003; Oosting et al., 2014)

Tableau 3 : L'expression des TLR par les cellules du système immunitaire.

Les TLR sont exprimés de façon différentielle selon le type de cellules immunitaires. En effet, certaines cellules (les cDC), expriment quasiment tous les TLR, alors que d'autres (les cellules T reg) en expriment peu.

Parmi les cellules immunitaires, ce sont principalement les cellules présentatrices d'antigènes qui expriment des TLR, telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B (**Tableau 3**) (Beg, 2002). Les TLR sont également exprimés par les mastocytes, les cellules « natural killer » (NK), les cellules T régulatrices, les neutrophiles

polymorphonucléés et les basophiles. L'expression des TLR sur ces dernières sera moindre. Toutes ces populations cellulaires n'ont donc pas le même profil d'expression des TLR (**Tableau 3**) (Hopkins and Sriskandan, 2005).

Au sein des cellules myéloïdes, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) expriment quasiment tous les TLR, mais elles expriment de façon prédominante le TLR1, TLR6, TLR7 et TLR9. Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) expriment principalement le TLR1, TLR6 et TLR8. Les monocytes et macrophages expriment fortement le TLR2, de façon intermédiaire le TLR1 et le TLR4 et modérément le TLR5, TLR6, TLR8 et TLR9. Parmi les lymphocytes, les cellules B expriment le TLR1, TLR2, TLR6, TLR7, TLR9 et TLR10, alors que les cellules T ont une expression relativement faible des TLR (Adams, 2009; Hornung et al., 2002). Enfin, les cellules NK expriment fortement le TLR1 mais un niveau modéré de TLR2, TLR3, TLR5 et TLR6.

L'expression des TLR n'est pas fixe, elle peut varier selon les conditions. Ainsi, lorsque les cellules sont activées, les profils d'expression des TLR peuvent évoluer et l'expression de certains TLR peut apparaître. Par exemple, la stimulation avec un agoniste de TLR7 induit une augmentation de son expression par les pDC (Miettinen et al., 2001).

Les TLR sont également exprimés par les cellules épithéliales. Cela permet aux cellules des muqueuses de capter les différents PAMPs, et ainsi de former une première ligne de défense contre les pathogènes (Hopkins and Sriskandan, 2005; Medzhitov et al., 1997). Ainsi, il a été démontré que les cellules épithéliales bronchiques expriment plusieurs TLR (avec ou sans stimulation spécifique), permettant au tractus respiratoire de reconnaître les différents pathogènes, tels que les virus respiratoires (Hertz et al., 2003; Muir et al., 2004). De même, il a été clairement démontré que les cellules épithéliales intestinales expriment le TLR4 afin de limiter les infections bactériennes (Hornef et al., 2003).

Actuellement, il est clairement établi que de nombreuses cellules tumorales peuvent exprimer un ou plusieurs TLR, ce qui peut contribuer au développement ou à la progression tumorale (**Tableau 4**). Par exemple, il est démontré que les cellules tumorales du sein expriment le TLR2, le TLR3, le TLR4 et le TLR9, alors que les cellules tumorales du poumon expriment le TLR3, le TLR4, le TLR7, le TLR8 et le TLR9. Ces expressions de TLR peuvent être variables selon les espèces (homme/souris) ou les lignées cellulaires tumorales étudiée. Elles peuvent également être variables d'un patient à l'autre, malgré le fait qu'ils soient

atteints de la même pathologie. Enfin, l'expression des TLR peut être présente au niveau des tissus sains ou n'apparaître que dans les tissus cancéreux, comme cela est le cas pour le TLR7 dans le cancer pancréatique ou du poumon (Cherfils-Vicini et al., 2010; Ochi et al., 2012).

TLR	Type de cancer			Références
TLR1	Myélome			(Basith et al., 2012)
TLR2	Gastrique Hépatocellulaire	Intestinal Leucémie myéloïde chronique	Larynx Sein	(Basith et al., 2012; Castaño-Rodríguez et al., 2014; He et al., 2007; Szczepeński et al., 2007; Theodoropoulos et al., 2012; Tye et al., 2012; Xie et al., 2009)
TLR3	Colorectal Col utérin Gastrique Hépatocellulaire Larynx	Leucémie myéloïde chronique Mélanome Neuroblastome Oesophage Ovaire	Pharynx Poumon Prostate Sein	(Basith et al., 2012; Castaño-Rodríguez et al., 2014; Fernandez-García et al., 2014; González-Reyes et al., 2011; He et al., 2007; Jiang et al., 2008; Matijevic et al., 2009; Muccioli and Benencia, 2014; Nomi et al., 2010; Paone et al., 2008; Salaun et al., 2007; Yoneda et al., 2008)
TLR4	Col utérin Colorectal Gastrique Hépatocellulaire Intestinal Larynx	Leucémie myéloïde chronique Mélanome Neuroblastome Ovaire Pancréas	Peau Prostate Poumon Sein Tête et cou	(Basith et al., 2012; Cammarota et al., 2010; Castaño-Rodríguez et al., 2014; Fernandez-García et al., 2014; Fukata et al., 2007; González-Reyes et al., 2011; He et al., 2007; Kelly et al., 2006; Mai et al., 2013; Molteni et al., 2006; Muccioli and Benencia, 2014; Pimentel-Nunes et al., 2011; Rhee et al., 2008; Schmausser et al., 2005; Theodoropoulos et al., 2012; Yesudhas et al., 2014)
TLR5	Colorectal Gastrique	Intestinal Ovaire	Sein	(Basith et al., 2012; Castaño-Rodríguez et al., 2014; Hussein-zadeh and Davenport, 2014; Schmausser et al., 2005)
TLR7	Colorectal, Myélome	Oesophage Pancréas	Poumon	(Basith et al., 2012; Cherfils-Vicini et al., 2010; Grimm et al., 2010; Jago et al., 2006; Ochi et al., 2012)
TLR8	Colorectal	Poumon		(Basith et al., 2012; Grimm et al., 2010)
TLR9	Colorectal Col utérin Gastrique	Myélome Oesophagien Ovarien	Poumon Rein Sein	(Basith et al., 2012; Berger et al., 2010; Castaño-Rodríguez et al., 2014; Droemann et al., 2005; Fernandez-García et al., 2014; González-Reyes et al., 2011; Grimm et al., 2010; He et al., 2007; Hussein-zadeh and Davenport, 2014; Muccioli and Benencia, 2014; Pimentel-Nunes et al., 2011)
TLR10	Colorectal			(Grimm et al., 2010)

Tableau 4 : Expression des TLR par les cellules tumorales.

Certaines cellules tumorales expriment un ou plusieurs TLR. Cette expression peut être présente au sein du tissu sain ou apparaître après la transformation de la cellule.

4. Voies de signalisation des TLR

Les TLR induisent de l'inflammation et des réponses immunes adaptées au ligand qu'ils reconnaissent, grâce à l'activation de différentes voies de signalisation qui conduisent à la transcription de nombreux gènes, dont ceux impliqués dans la réponse inflammatoire. Ces voies de signalisation sont multiples et redondantes : un TLR peut activer plusieurs voies de signalisation et une voie de signalisation peut être activée par plusieurs TLR (**Figure 3**).

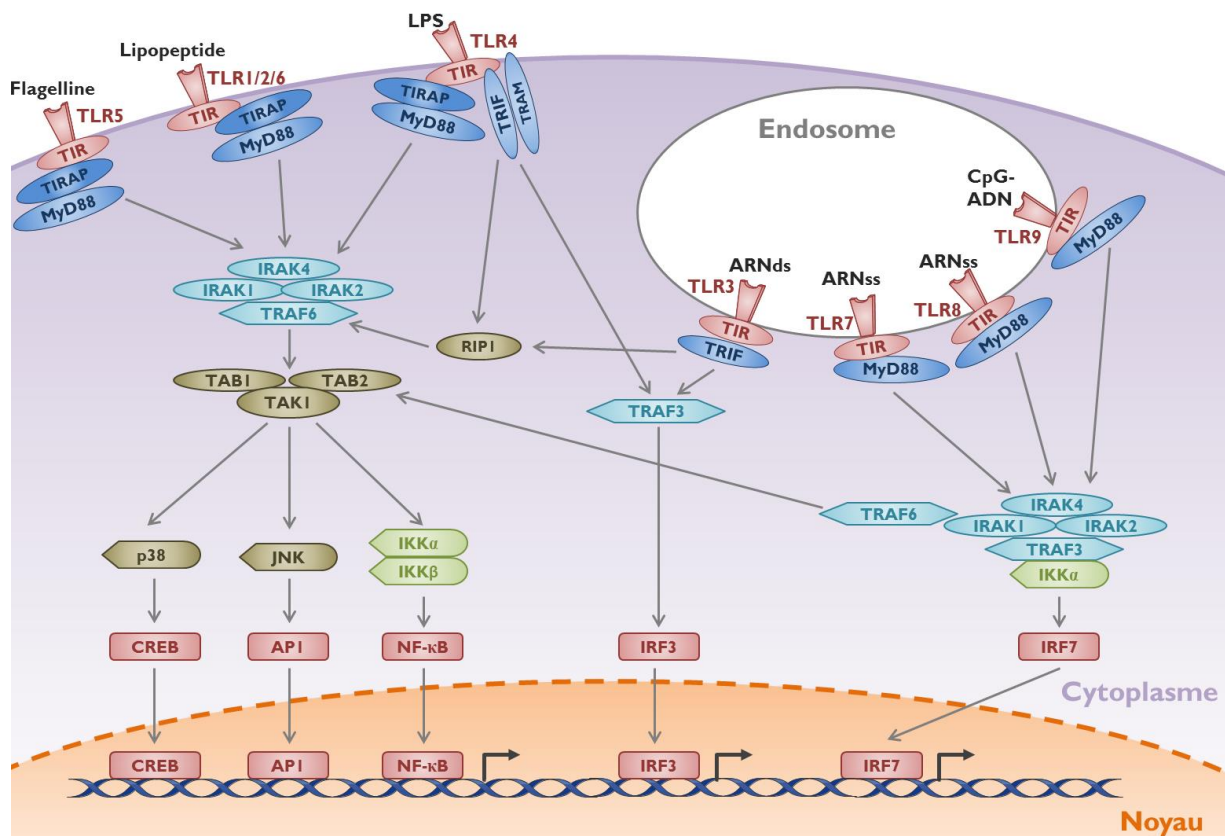


Figure 3 : Les voies de signalisation induites lors de la stimulation des TLR.

La reconnaissance d'un ligand par un TLR conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation, permettant l'activation de facteurs de transcription, tels que CREB, AP1, NF-κB, IRF-3 et IRF-7.

Lors de la liaison du ligand spécifique au TLR, la transduction du signal se fait par la dimérisation de deux chaînes du récepteur permettant l'association des domaines TIR. Concernant les TLR7, TLR8 et TLR9, ils peuvent être présents sous forme de dimère inactif, et c'est seulement lors de la fixation d'un ligand qu'il y a une réorientation des domaines TIR (Latz et al., 2007). Dans tous les cas, l'association des domaines TIR des TLR induit une nouvelle conformation qui permet le recrutement de protéines adaptatrices pour la formation d'un complexe de signalisation post-récepteur.

Les 5 molécules adaptatrices qui s'associent aux TIR pour induire les voies de signalisation induites par les TLR sont : Myd88 (MYeloid Differenteniyation primary response gene 88), TIRAP (TIR domain-containing Adapter molecule 1, aussi appelé Mal), TRIF (TIR domain containing adaptor inducing IFN-β), TRAM (TRIF-related Adaptor Molecule) et une protéine contenant des armadillo-motifs et des motifs α-stériles.

Tous les TLR activent la voie de signalisation inflammatoire classique par Myd88 (à l'exception de TLR3 et de certains signaux de TLR4), conduisant à l'activation de NF- κ B et des MAPK (Medzhitov et al., 1997). L'activation des IRF (IFN Regulatory Factors) par TLR7, TLR8 et TLR9 se produit également par des voies de signalisation dépendantes de Myd88. Il n'existe qu'une voie de signalisation alternative activant NF- κ B et n'impliquant pas Myd88 : elle est induite par TLR3 et certains signaux de TLR4. Cette voie est dépendante de TRIF et peut également induire l'activation d'IRF3, impliqué dans la production d'Interféron (IFN) de type 1 (**Figure 3**) (Basith et al., 2012).

5. Le TLR7

Le TLR7, dont le gène est localisé sur le chromosome X, a eu sa fonctionnalité découverte en 2004. Il a été démontré, par l'équipe de Sousa, que le TLR7 permet la reconnaissance des ARN simple brin et conduit à la production d'IFN à la suite de son activation par un virus (Diebold et al., 2004). Les auteurs ont tout d'abord démontré que l'IAV vivant, l'ARN génomique d'IAV purifié ainsi que de l'ARN simple brin synthétique induisent la production d'IFN- α par les pDC. Lorsque le virus est chauffé à 65 degrés, ce qui détruit l'ARN génomique, le virus n'est plus capable d'induire la production d'IFN- α . Par la suite, les auteurs comparent la production d'IFN- α par des pDC de type sauvage et déficientes pour TLR7, et démontrent que cette production est due à la stimulation de TLR7. Ainsi lorsque les pDC n'expriment pas TLR7, l'IAV vivant, l'ARN génomique d'IAV purifié et l'ARN simple brin synthétique n'induisent plus la production d'IFN- α . Cette équipe a donc mis en évidence, pour la première fois, que l'ARN simple brin est le ligand de TLR7.

Par la suite, les ligands de TLR7 ont été mieux définis. Nous savons actuellement que le TLR7 peut reconnaître des composants synthétiques antiviraux imidazoquinoline (tels que le R848, l'Imiquimod et le CL264), des analogues du nucléotide guanine (comme la loxoribine) ainsi que des ARN simple brin enrichis en uridine ou uridine/guanine, d'origine virale ou du soi, dont les siARN (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2002; Hornung et al., 2005).

TLR7 est exprimé au niveau des endolysosomes, compartiment au sein duquel il interagit avec son ligand. Avant d'être situé dans les endolysosomes, TLR7 est exprimé au

niveau du réticulum endoplasmique, où il est inactif. Pour permettre le trafic du TLR7 du réticulum endoplasmique aux endolysosomes, une molécule est indispensable : UNC93B1. Cette molécule est une protéine peu caractérisée qui comprend de nombreux domaines transmembranaires. Chez des souris déficientes pour UNC93B1, un défaut du trafic de TLR7 vers les endolysosomes est observé. Ce défaut de trafic induit une perte de la reconnaissance du ligand par TLR7 et donc une perte de la signalisation de ce récepteur (Kim et al., 2008). UNC93B1, grâce à une interaction directe avec le TLR7, est donc nécessaire, et permet le transport du TLR7 du réticulum endoplasmique aux endolysosomes (Tabeta et al., 2006).

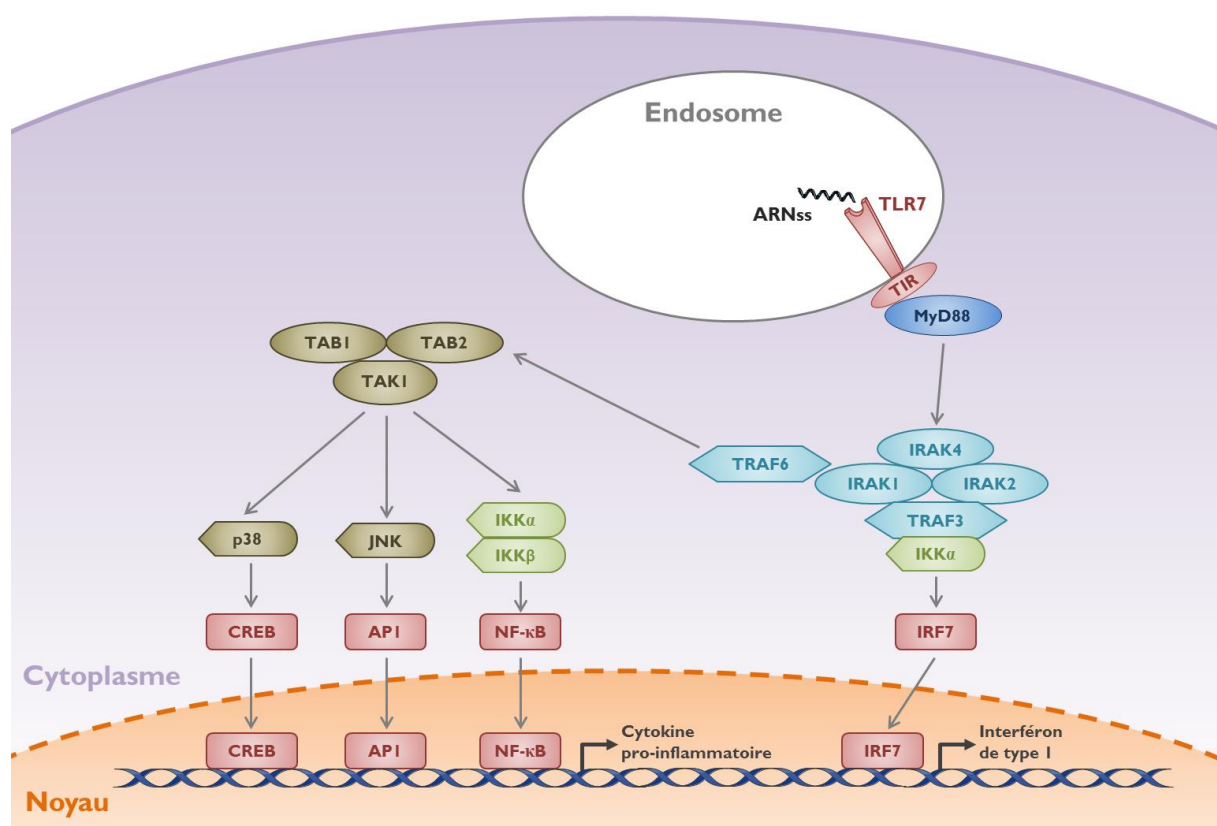


Figure 4 : Les voies de signalisation impliquées dans la signalisation de TLR7 après stimulation. Lorsque le TLR7 est activé, le domaine TIR induit l'activation de MyD88, qui va interagir avec un complexe de molécules composé de : TRAF6, IRAK1, IRAK2 et TRAF3. Ces différentes molécules permettent l'activation de facteurs de transcription, tels que CREB, AP1, NF- κ B et IRF7, qui induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type 1.

Une fois dans l'endolysosome, avant de pouvoir être activé, d'autres modifications du TLR7 sont nécessaires. Il a été démontré qu'une signalisation correcte de TLR7 nécessite un clivage d'un fragment de la partie C-terminal du récepteur. Ce clivage s'effectue grâce à une cystéine protéase : l'asparagine endopeptidase (AEP), présente dans les endolysosomes. Si

cette protéase est mutée, limitant ses capacités de clivage, une forte diminution de la signalisation de TLR7 au sein des cellules dendritiques est observée (Maschalidi et al., 2012).

Lors de la reconnaissance d'ARN simple brin, l'activation du TLR7 conduit à l'activation d'un complexe contenant MyD88, TRAF3, TRAF6, IRAK1, IRAK2, IRAK4 et IKK α (**Figure 4**) (Hemmi et al., 2002).

Myd88 interagit avec IRAK4 (Suzuki et al., 2002), puis IRAK4 induit la phosphorylation d'IRAK1 et IRAK2 (Kawagoe et al., 2008), qui à leur tour activent TRAF6. TRAF6 active des protéines adaptatrices : TAB1 et TAB2, permettant l'activation de TAK1 (Siggs et al., 2010; Skaug et al., 2009). L'activation de ces molécules conduit : (1) à la phosphorylation d'IKK β puis I κ B conduisant à la translocation nucléaire de NF- κ B ; et (2) à l'activation de cascades de MAPK, permettant la phosphorylation des JNK et p38, conduisant à l'activation d'AP1 et CREB. Ces différents facteurs de transcription vont permettre la production de médiateurs inflammatoires. Le complexe contenant MyD88, phosphoryle également IRF7 grâce à IRAK1 et/ou IKK α , IRF7 va être transloqué dans le noyau et régule l'expression d'IFN de type 1 (**Figure 4**).

En conclusion, l'activation des IRFs, NF- κ B et des voies MAPK, après stimulation du TLR7, conduit à la transcription de gènes de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type 1 (**Figure 4**).

Le microenvironnement tumoral : un environnement complexe

Le microenvironnement tumoral est un environnement complexe composé d'un grand nombre d'acteurs cellulaires, qui peuvent exprimer certains TLR. Parmi ces acteurs, on retrouve les cellules tumorales, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules stromales.

1. Les cellules tumorales

Les caractéristiques des cellules tumorales ont été finement définies en 2000 puis 2011 par Hanahan et Weinberg (**Figure 5**) (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

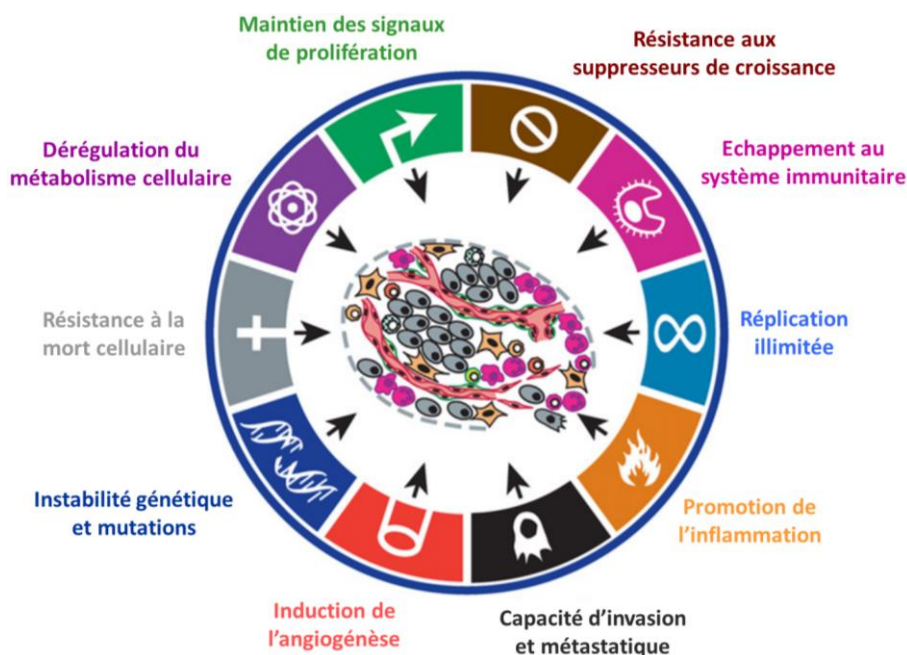


Figure 5: Les différentes caractéristiques d'une cellule tumorale, selon Hanahan et Weinberg.

Lorsqu'une cellule normale devient transformée, elle acquiert de nouvelles caractéristiques : maintien des signaux de prolifération, résistance aux suppresseurs de croissance, échappement au système immunitaire, réplication illimitée, promotion de l'inflammation, capacité d'invasion et métastatique, induction de l'angiogénèse, instabilité génétique et mutations, résistance à la mort cellulaire et dérégulation du métabolisme cellulaire. Adaptée de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Les cellules tumorales ont la capacité de maintenir leur production de signaux de prolifération et de croissance et peuvent résister aux signaux suppresseurs de croissance, ce qui leur confère la capacité de maintenir une prolifération chronique. Ce maintien de la prolifération chronique est également induit par une expression augmentée des récepteurs aux

facteurs de croissance (tel que le « Epithelial Growth Factor Receptor » (EGF-R) dans les cancers du cerveau, de l'estomac et du sein, ou le récepteur HER2/neu dans les cancers de l'intestin et du sein) permettant la mise en place d'une boucle de stimulation autocrine (Slamon et al., 1987; Yarden and Ullrich, 1988), Par ailleurs, certains gènes suppresseurs de tumeur (tel que p53) sont inactivés par mutation ou inhibition.

Les cellules tumorales acquièrent également des capacités de résistance à l'apoptose. La mort cellulaire programmée est un processus d'autodestruction en réponse à des signaux de danger provenant de dommages subis par l'ADN ou d'une diminution de la signalisation des facteurs de croissance. Dans le cas des cellules tumorales, afin de limiter ces signaux de danger pouvant activer la mort cellulaire, les cellules vont augmenter l'expression de facteurs anti-apoptotiques (tels que Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Nr13) et/ou diminuer l'expression de facteurs pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim).

Les cellules tumorales possèdent également des capacités répliquatives illimitées. Au sein d'une cellule saine, le nombre de répliquations possibles est limité par la longueur des télomères qui diminue à chaque division. Une fois que les télomères ont atteint une certaine taille, des programmes vont se mettre en place, tels que l'apoptose et la sénescence, afin d'induire la mort cellulaire. Au sein d'une cellule tumorale, la dégradation des télomères est faible, limitant leur raccourcissement, maintenant donc le potentiel de division de ces cellules.

En plus de ces mécanismes, les cellules tumorales induisent l'angiogenèse et développent des capacités d'invasion et métastatique. L'angiogenèse est nécessaire à la croissance des tumeurs, afin d'éviter la nécrose. En effet, sans le développement de vascularisation au sein de la tumeur, à partir d'une certaine taille, un manque d'apport en oxygène sera observé, conduisant à de la nécrose. Ainsi la néo-vascularisation va permettre l'apport de nutriments et d'oxygène nécessaires à la croissance tumorale. Les capacités d'invasion et métastatique s'effectuent grâce au détachement de cellules tumorales. Ce détachement est médié grâce à des modifications d'expression de protéines liées à l'adhésion, ainsi que d'enzymes digérant la matrice extracellulaire (dont les Métalloprotéase Matricielle (MMP)).

Enfin, les cellules tumorales ont la capacité d'échapper au système immunitaire et de promouvoir l'inflammation au sein de la tumeur. Lorsqu'une cellule se transforme, elle est reconnue par le système immunitaire puis éliminée, afin de maintenir l'homéostasie du tissu.

En revanche, certaines cellules tumorales peuvent échapper au contrôle de l'immunité grâce à des modifications permettant à ces cellules de ne pas être détectées par le système immunitaire. De plus, l'inflammation chronique promeut le développement et la progression tumorale, c'est pourquoi les cellules tumorales peuvent induire cette inflammation chronique, grâce à la production de certains médiateurs pro-inflammatoires.

2. L'infiltrat immunitaire

C'est en 1909 que Paul Ehrlich fait pour la première fois, l'hypothèse d'un système immunitaire capable de surveiller et dégrader les cellules transformées avant qu'elles ne soient détectables cliniquement. Les preuves de l'implication du système immunitaire dans la dégradation des cellules tumorales n'ont été apportées que plus tard, grâce à des modèles murins de transplantation de tumeur. En 2001, Shankaran V et al. démontrent que les souris immunodéficientes (telles que des souris déficientes pour Rag2 ou déficientes pour Rag2 et Stat 1) développent un plus grand nombre de tumeurs que les souris immunocompétentes (**Figure 6A-B**) (Shankaran et al., 2001). De même, il est démontré, chez des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN α/β , que le risque de développement de tumeur est augmenté (Dunn et al., 2005), démontrant donc l'importance de la réponse immune anti-tumorale.

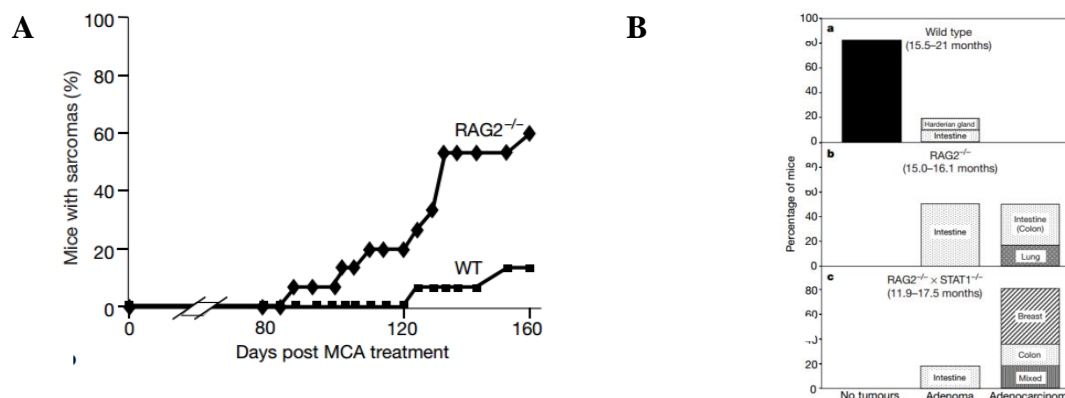


Figure 6 : L'absence du système immunitaire adaptatif conduit à un développement de tumeur plus important.

(A) Pourcentage de souris qui développent un sarcome en fonction du temps, chez des souris RAG2^{-/-} ou 129/SvEv de type sauvage injectées avec 100 μ g de MCA.

(B) Développement spontanée de maladies néoplasiques chez des souris RAG2^{-/-}, RAG2^{-/-} et STAT1^{-/-} ou 129/SvEv de type sauvage. Adaptée de (Shankaran et al., 2001).

Par la suite, la notion d'« immuno-editing » est apparue avec la théorie des 3E : Elimination, Equilibre et Echappement (**Figure 7**) (Dunn et al., 2004), décrivant l'évolution des interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires au cours du développement tumoral.

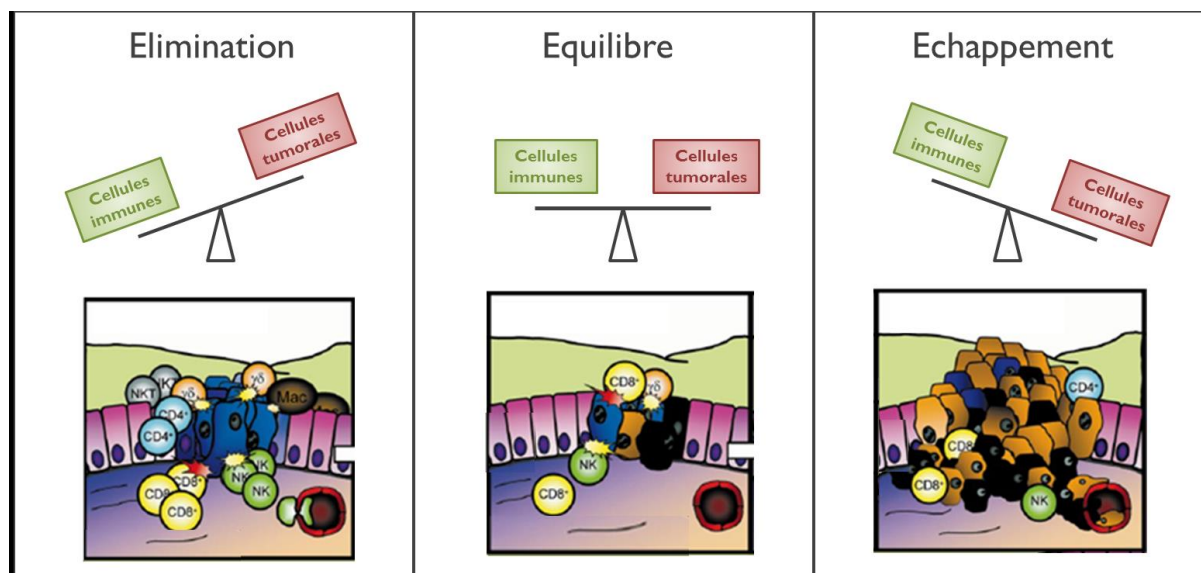


Figure 7 : La théorie des 3E.

Théorie expliquant le développement tumoral au cours du temps en trois phases :

- 1- Elimination : les cellules immunitaires détruisent les cellules tumorales ;
 - 2- Equilibre : les cellules immunitaires n'arrivent plus à détruire toutes les cellules tumorales mais conservent un contrôle ;
 - 3- Echappement : les cellules tumorales prolifèrent et échappent au système immunitaire.
- Adaptée de (Dunn et al., 2004)

La première étape, l'élimination, consiste en la mise en place d'une immunité efficace contre les cellules transformées. Le système immunitaire éradique les cellules tumorales par la production de molécules pro-inflammatoires et un recrutement massif de cellules immunitaires innées et adaptatives (telles que des neutrophiles, des macrophages de type 1 (M1), des cellules dendritiques, des cellules T cytotoxiques, des cellules B). La seconde étape est l'équilibre : des variants génétiques émergent et les cellules tumorales modifiées survivent à l'élimination induite par le système immunitaire, conduisant à un équilibre dynamique entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires (Dunn et al., 2004). En dépit d'un infiltrat immunitaire capable de contrôler le développement de la tumeur et la dissémination métastatique, il existe un phénomène d'échappement des tumeurs au système immunitaire. Cet échappement est la troisième étape de la théorie des trois E. A ce stade, les cellules tumorales, du fait de changements génétiques ou épigénétiques, perdent leur immunogénicité

leur conférant une résistance à la détection et à l'élimination par les cellules immunitaires. Ces cellules tumorales deviennent donc cliniquement détectables (Dunn et al., 2004). Au cours de cette troisième étape, il est retrouvé dans l'environnement tumoral des cellules immunitaires ayant un rôle pro-tumoral et/ou des fonctions immunosuppressives, comme les cellules T régulatrices, les macrophages de type 2 (M2) ou les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC).

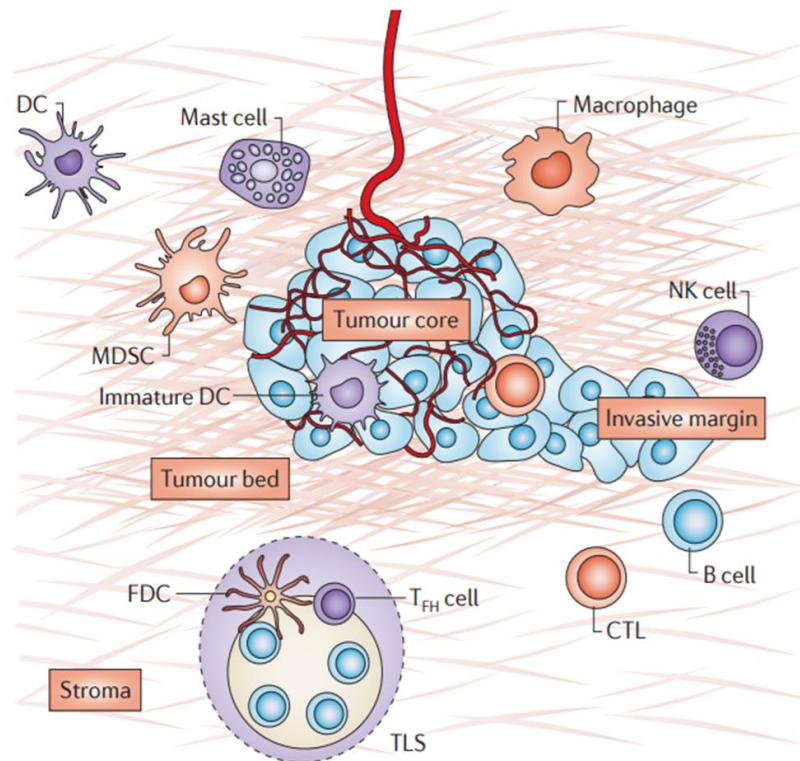


Figure 8 : Le contexte immunitaire au sein du microenvironnement tumoral.

La tumeur est composée de différentes zones : le centre de la tumeur, la marge d'invasion, le lit de la tumeur et le stroma. Dans chacune de ces zones, on retrouve des cellules immunitaires qui sont impliquées dans le développement tumoral. (Fridman et al., 2012)

Parmi les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, on retrouve : les macrophages, les cDC, les pDC, les lymphocytes B, les lymphocytes T cytotoxiques et helper (incluant les Th1, les Th2, les Th17 et les T régulateurs), les mastocytes, les cellules NK et les MDSC (**Figure 8**) (Fridman et al., 2012). Au cours de ces dernières années, la quantité et la qualité de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral ont été finement étudiées. Les études qualitatives ont démontré la fonction, le rôle et l'impact de certaines de ces populations immunitaires dans les cancers, qui seront développés dans la suite de cette introduction. Des études qualitatives ont également permis de mettre en évidence la présence de structures lymphoïdes tertiaires (TLS)

dans la marge d'invasion de certaines tumeurs (comme dans le cancer du poumon) (Dieu-Nosjean et al., 2014). Ces TLS sont composées de cellules dendritiques de cellules B et T et sont probablement importantes dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale locale.

De nombreuses études quantitatives ont permis d'associer la densité de certaines cellules du système immunitaire présentes dans le microenvironnement tumoral à des valeurs pronostics chez les patients (**Figure 9**). Ainsi, certaines populations sont associées à de bon pronostic de survie, telles que les lymphocytes Th1, les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules NK, les pDC et cDC activées et les M1 (**Figure 9**) (Al-Shibli et al., 2008; Dieu-Nosjean et al., 2008; Goc et al., 2014; Ito et al., 2005; Kawai et al., 2008). Tandis que d'autres cellules immunitaires sont associées à un mauvais pronostic de survie, dont les M2, les MDSC, les lymphocytes de type Th17 ou les lymphocytes T régulateurs (**Figure 9**) (Chen et al., 2010; Fridman et al., 2012; Petersen et al., 2006; Shimizu et al., 2010; Tao et al., 2012).

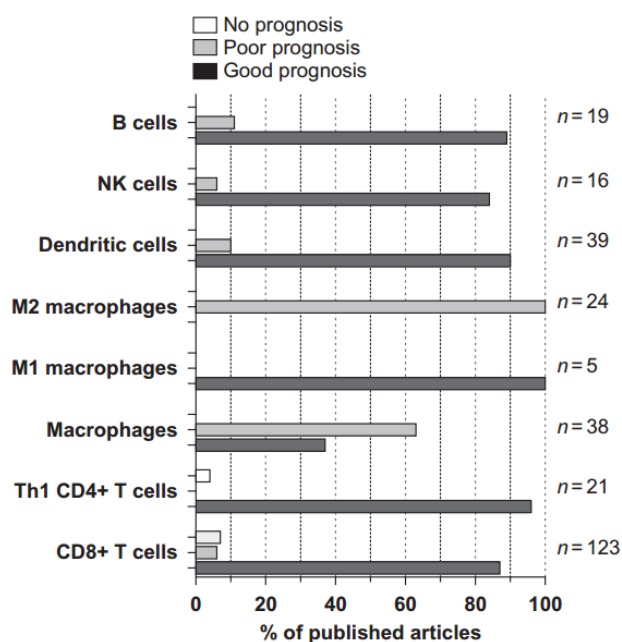


Figure 9 : L'impact de l'infiltrat immunitaire sur le pronostic des patients pour différents types de cancers.

Représentation du pourcentage d'articles publiés associant différentes populations immunitaires au pronostic des patients atteints de cancer, pour différents types de cancers. « Good prognosis » signifie population cellulaire associée à un bon pronostic, « No prognosis » signifie population cellulaire sans corrélation avec le pronostic, et « Poor prognosis » signifie population cellulaire associée à un mauvais pronostic. (Becht et al., 2016)

Certaines molécules appelées « Immune Checkpoint », sont également associées à des effets pro-tumoraux. Ces points de contrôle, tels que « Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 » (CTLA-4), « T cell immunoglobulin-3 » (TIM-3), « Lymphocyte Activation Gene-3 » (LAG-3), « T cell immunoglobulin and ITIM domain » (TIGIT) et « Programmed cell death 1 » (PD-1), sont normalement exprimés pour limiter les réponses immunitaires après infection par un pathogène, afin de réduire l'activation du système immunitaire après qu'il ait effectué sa fonction. Dans le cancer, ces molécules sont sur-exprimées résultant en une inactivation des cellules immunes et en induction d'une tolérance du système immunitaire face aux cellules tumorales (Chen et al., 2012; Cooper et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Velcheti et al., 2014). Ces molécules sont d'une importance capitale dans les recherches actuelles car des thérapies ciblées sont développées contre ces molécules et donnent de bons résultats thérapeutiques (Brahmer et al., 2010; Di Giacomo et al., 2010; Lynch et al., 2012; Topalian et al., 2012).

Toutes ces populations immunitaires intra-tumorales peuvent donc impacter sur le développement et la progression tumorale, en induisant des effets pro- ou anti-tumoraux.

2.1. Rôle du système immunitaire inné

2.1.1. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative : après internalisation du pathogène (par phagocytose ou endocytose), les cellules dendritiques migrent jusqu'aux organes lymphatiques secondaires (grâce à l'influence de différents facteurs) et interagissent avec les cellules T pour permettre leur activation (Banchereau and Steinman, 1998). Il existe différents types de cellules dendritiques : les cDC et les pDC, ayant chacune des caractéristiques bien particulières.

Les cDC (ou mDC), sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Elles sont retrouvées à la fois dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires et peuvent être migratoires, dans les tissus périphériques. Ces cellules expriment un grand nombre de TLR, leur permettant de répondre à un grand nombre de signaux de danger.

Les pDC sont spécialisées dans la réponse antivirale. Elles expriment très fortement les récepteurs TLR7 et TLR9. A la suite d'une stimulation, les pDC ont la particularité de produire une grande quantité d'IFN de type 1, ce qui explique leur rôle important dans la réponse antivirale.

Dans le microenvironnement tumoral, les DC infiltrant la tumeur possèdent un rôle majeur de par leur capacité à capter les antigènes venant des débris cellulaires et des lysats ou des corps apoptotiques des cellules cancéreuses. Elles permettent la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace contre les cellules tumorales (Kalb et al., 2012; Liu et al., 2008; Sary et al., 2007). En effet, il est démontré qu'un fort infiltrat en DC matures dans les tumeurs est associé à un bon pronostic de survie, dans le cancer du poumon, le lymphome folliculaire ou le mélanome (Butsch et al., 2011; Elliott et al., 2007; Goc et al., 2014).

Malheureusement, la majorité des DC infiltrant les tumeurs ont un profil immature, avec des difficultés à activer les cellules T, ou sont retrouvées préférentiellement en périphérie des tumeurs (Aspard et al., 2007; Labidi-Galy et al., 2011; Le Mercier et al., 2013; Perrot et al., 2007; Tjomsland et al., 2010). L'état immature des DC et le fait qu'elles aient des difficultés à infiltrer la tumeur conduisent à des réponses antigéniques faibles contre les tumeurs. De plus, le fait que ces cellules dendritiques soient immatures, promeut l'apparition de cellules T régulatrices, conduisant à des effets pro-tumoraux (Conrad et al., 2012; Sisirak et al., 2012). Enfin, les cellules tumorales peuvent produire des molécules qui perturbent la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires ou leurs capacités à apprêter des antigènes, réduisant donc leurs capacités anti-tumorales (Tyurin et al., 2011; Villablanca et al., 2010).

2.1.2. Les macrophages

Les macrophages ont un rôle important dans les défenses non spécifiques du système immunitaire et peuvent également aider à initier la réponse immunitaire adaptative en permettant le recrutement et l'activation des lymphocytes. Certains TLR sont exprimés par les macrophages, tels que les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8, TLR9 et TLR10. Il existe deux sous types de macrophages : les M1 et les M2.

Les M1, une fois activés, expriment un fort niveau de cytokines pro-inflammatoires (dont le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 ou l'IL-23), des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Ils sont capables de dégrader des pathogènes mais également d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale très efficace (Yuan et al., 2015).

Les M2 ont une faible expression des molécules du CMH de classe II et de l'IL-12. Par ailleurs, ils ont une forte expression de cytokines anti-inflammatoires (dont l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13), du récepteur scavenger A et de l'arginase. Ainsi, ce type de macrophage, de par ses propriétés immunosuppressives, est associé à des effets pro-tumoraux (Yuan et al., 2015).

Les macrophages associés aux tumeurs représentent un infiltrat très important dans le microenvironnement tumoral (Mantovani et al., 1992). Dans certaines conditions, les macrophages dégradent les cellules tumorales ou l'endothélium vasculaire conduisant à des effets anti-tumoraux (Sinha et al., 2005). Dans ces conditions, ces cellules seront majoritairement des M1.

Les macrophages associés aux tumeurs M2 stimulent la prolifération des cellules tumorales, dégradent la matrice extracellulaire, promeuvent l'angiogenèse ainsi que l'invasion et les métastases. Ils sont donc associés à des effets pro-tumoraux (Biswas et al., 2006; Sica et al., 2000, 2008). Ces effets pro-tumoraux sont médiés par la production de facteurs de croissance et d'angiogenèse, dont des protéases (exemple : MMP9) (Condeelis and Pollard, 2006; Coussens and Werb, 2002; Coussens et al., 2000; Lin et al., 2006; Pollard, 2004; Zeisberger et al., 2006). Ainsi, un fort infiltrat en M2 peut être associé à un mauvais pronostic de survie, à un fort pouvoir angiogénique et métastatique chez les patients atteints de cancer (Leek et al., 2002; Murdoch et al., 2008; Schoppmann et al., 2002).

2.1.3. Les cellules NK

Les cellules NK ont un rôle cytotoxique, car elles possèdent dans leur cytoplasme des granules qui contiennent des granzymes (une enzyme protéolytique) et de la perforine (une protéine capable de dégrader la membrane plasmique) (Voskoboinik et al., 2015). Les cellules NK reconnaissent les cellules cibles qui n'expriment pas les ligands des récepteurs inhibiteurs des cellules NK (tels que les molécules du CMH I) ou les cellules exprimant les ligands

récepteurs activateurs des cellules NK (dont NKG2D). De plus, les cellules NK ont les capacités, une fois activées, de produire des cytokines, parmi lesquels l'IFN- γ , le « Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor » (GM-CSF), le CCL3, le CCL4 ou le CCL5, qui permettent le recrutement d'autres cellules immunitaires ainsi que leur prolifération pouvant impacter la progression tumorale (Vivier et al., 2011). Les cellules NK expriment certains TLR comme le TLR1, le TLR2, le TLR3, le TLR5 et le TLR6.

Dans les années 1980, pour la première fois ces cellules ont été montrées comme ayant un rôle dans le développement des tumeurs. Les patients ayant des déficiences au niveau des fonctions de leurs cellules NK avaient un risque plus important de développer un cancer (Roder et al., 1980; Sullivan et al., 1980). Depuis, il a été clairement démontré, dans de nombreux articles, qu'un manque de cellules NK ou une diminution de leur fonction cytotoxique est associé à des effets pro-tumoraux (Gorelik et al., 1982; Talmadge et al., 1980). Dans le microenvironnement tumoral, les cellules cancéreuses peuvent sous-exprimer les ligands des récepteurs inhibiteurs ou sur-exprimer les ligands des récepteurs activateurs des cellules NK ce qui les sensibilise à la cytotoxicité des cellules NK. De plus, ces cellules NK peuvent produire du TNF ainsi qu'exprimer des FAS ligand permettant de tuer les cellules tumorales (Smyth et al., 2005; Wallin et al., 2003).

Les cellules NK sont une population assez rare dans le microenvironnement tumoral. Ce faible recrutement au sein des tumeurs est actuellement peu documenté. Il semblerait que les cellules tumorales produisent des facteurs limitant le recrutement des cellules NK. Chez les patients atteints de cancer, les cellules NK ont généralement des fonctions cytotoxiques altérées et une diminution de l'expression des récepteurs activateurs (Imai et al., 2000; Nakajima et al., 1986; Negus et al., 1997; Platonova et al., 2011; Schantz et al., 1986).

2.1.4. Les MDSC

2.1.4.1. Description générale et phénotype des MDSC

Les MDSC, une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures et de progéniteurs myéloïdes ayant des propriétés immunosuppressives, sont décrites chez l'homme et chez la souris. Elles se divisent en deux sous-groupes : les MDSC granulocytiques et les

MDSC monocytiques. Les MDSC granulocytiques ayant une structure polynucléée peuvent également être appelées des MDSC polymorphonucléées.

Chez la souris, les MDSC sont caractérisées par deux marqueurs : CD11b⁺ et Gr1⁺ (Kusmartsev et al., 2000). Le CD11b est une intégrine α M et le Gr1 une reductase glutathione. Il existe deux sous-formes de Gr1 : Ly6C et Ly6G. Ces deux sous-formes permettent, chez la souris de différencier les deux sous-types de MDSC : les MDSC monocytiques sont Ly6C⁺ et Ly6G⁻, tandis que les MDSC granulocytiques sont Ly6C^{low} et Ly6G⁺ (Bronte et al., 2016). En plus d'avoir des profils d'expression de marqueurs de surface différents, ces deux sous-populations ont également des propriétés différentes.

Chez l'homme, la caractérisation phénotypique des MDSC nécessite un nombre important de marqueurs : CD45⁺ CD3⁻ CD19⁻ CD56⁻ CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR⁻ (Bronte et al., 2016). On retrouve également les deux sous-types de MDSC : les MDSC monocytiques seront : CD14⁺ CD15⁻ CD66b⁻, alors que les MDSC granulocytiques seront CD14^{low} CD15⁺ CD66b⁺ (Bronte et al., 2016). Au vu du grand nombre de marqueurs, le meilleur marqueur des MDSC reste actuellement la démonstration de leurs fonctions immunosuppressives (Bronte et al., 2016).

Les MDSC expriment certains TLR, tels que les TLR2, TLR3, TLR8 et TLR9. Et la stimulation de certains de ces récepteurs, comme le TLR2, augmente les capacités immunosuppressives des MDSC et peut conduire à des effets pro-tumoraux (Chalmin et al., 2010).

2.1.4.2. Les fonctions immunosuppressives des MDSC

Ces cellules possèdent les capacités de supprimer les réponses immunes et notamment les défenses anti-tumorales, en limitant les fonctions des cellules T, des cellules NK et des cellules présentatrices d'antigènes. L'augmentation des MDSC corrèle avec une diminution du nombre de cellules T et de leurs fonctions (Donkor et al., 2009). Inversement, une déplétion des MDSC, dans des modèles murins de cancer du poumon, du foie et de mélanome, corrèle avec une augmentation des cellules cytotoxiques et un rétablissement de leur propriétés dans le foie et la rate (Li et al., 2009; Marigo et al., 2010).

Les fonctions d'immunosuppression des MDSC sont associées à la production de facteurs solubles, dont : les ROS, l'iNOS et l'arginase-1 (**Figure 10**). Ces différents facteurs solubles sont différenciellement exprimés selon les deux sous types de MDSC : les MDSC monocytiques expriment préférentiellement iNOS et ont une activité suppressive très forte contre les cellules T, alors que les MDSC granulocytiques expriment plus fortement l'Arginase 1.

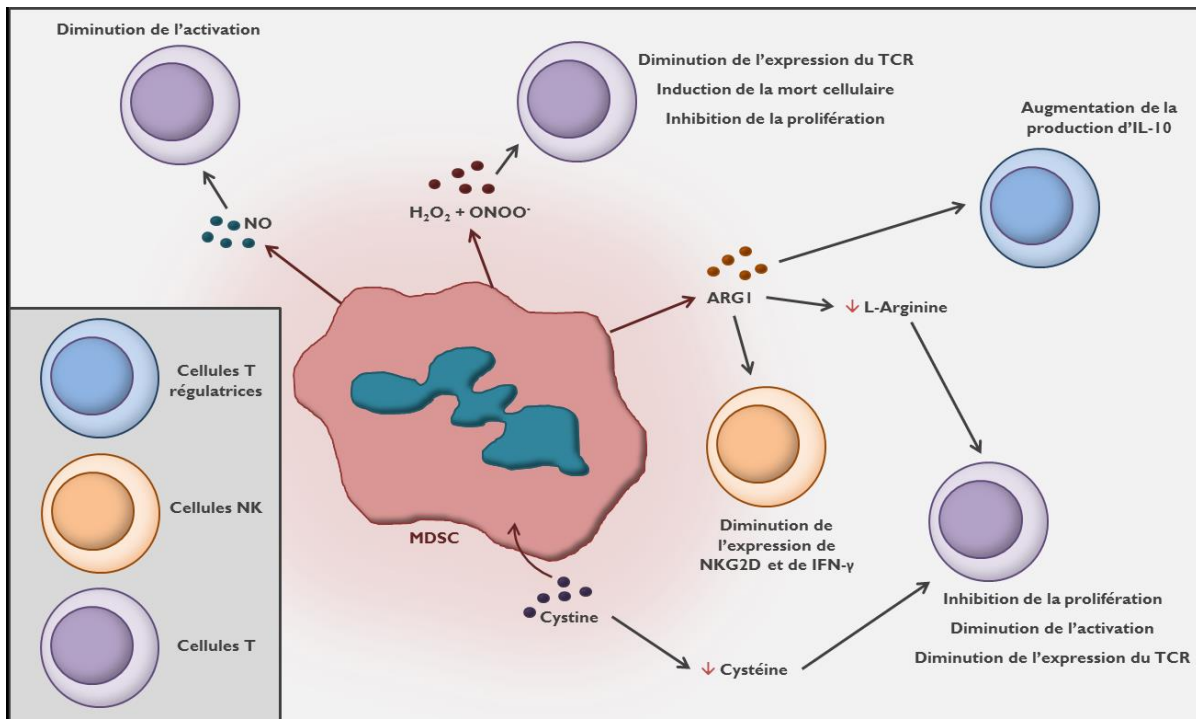


Figure 10 : Les principaux mécanismes d'immunosuppression des MDSC.

Les MDSC produisent différentes molécules solubles immunosuppressives, qui agissent sur les cellules T, les cellules T régulatrices et les cellules NK. Ces molécules diminuent l'activation et l'expression du TCR des cellules T, inhibent leur prolifération et induisent leur mort cellulaire. Elles conduisent également à une plus forte production d'IL-10 par les cellules T régulatrices et à une inactivation des cellules NK.

Le métabolisme de la L-arginine joue un rôle central dans l'activité immunosupresseur des MDSC. La L-arginine est nécessaire pour la prolifération et l'expression de la chaîne ζ du « T cell receptor » (TCR) des cellules T ainsi qu'à la maturation des lymphocytes B (de Jonge et al., 2002; Ochoa et al., 2001). Or les cellules T ne sont pas capables de produire la L-arginine et ont besoin de celle présente dans le milieu extracellulaire. Par conséquent, la régulation de la L-arginine dans le microenvironnement peut entraver les voies de signalisation et moduler les fonctions des cellules T. Ainsi

l'arginase 1 produit par les MDSC est capable d'induire la privation de L-arginine dans l'environnement extracellulaire et donc entraîner la perte de l'expression du CD3 des cellules T et limiter leur prolifération (Rodriguez et al., 2004; Zea et al., 2005). De plus, la production d'arginase-1 par les MDSC peut conduire à une production plus importante d'IL-10 par les cellules T régulatrices. La production d'oxyde nitrique (grâce à iNOS) par les MDSC est également suffisante pour bloquer les réponses des cellules T (Huang et al., 2006).

L'expression simultanée des deux enzymes (Arginase 1 et iNOS) peut entraîner une production de superoxyde, engendrant finalement des ROS et RNS. Ces différentes molécules réduisent l'habilité des cellules myéloïdes immatures à se différencier en macrophages et en cellules dendritiques. Elles induisent également la nitration du TCR, empêchant ainsi les interactions entre cellule T, peptides et complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et donc l'activation des cellules T (Angulo et al., 2000; Koblish et al., 1998; Mazzoni et al., 2002). Les deux composés principalement produits sont : le peroxynitrite (ONOO^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le ONOO^- joue un rôle au niveau intracellulaire et extracellulaire. Au niveau intracellulaire, il induit des modifications post-traductionnelles des protéines en permettant la nitrosylation des résidus tyrosine, ce qui induit des perturbations de la différenciation et de la prolifération cellulaire (Bronte et al., 2003; Radi, 2004; Schopfer et al., 2003). Lorsqu'il est à l'extérieur des cellules, le ONOO^- va également interagir avec les cellules T et induire la mort cellulaire de ces dernières (Brito et al., 1999). Concernant l' H_2O_2 , il joue également un rôle en intracellulaire et extracellulaire. En effet, il affecte l'expression et la fonction du CD3 ζ des cellules T mais induit également de l'apoptose au niveau des cellules T, en diminuant la concentration de molécules anti-apoptotiques au niveau intracellulaire (**Figure 10**) (Hildeman et al., 2003; Kusmartsev et al., 2004).

Les MDSC peuvent également être responsables de la perte des fonctions cytotoxiques des cellules T (Bronte et al., 1998, 1999, 2000) ou conduire à une diminution de leur production d'IFN- γ , grâce à l'expression du CMH I à leur surface (Gabrilovich et al., 2001, 2001; Song et al., 2005).

Les cellules T sont dépendantes de la cystéine présente dans le milieu : elles ne sont pas capables de la synthétiser. Dans un microenvironnement normal, les cellules présentatrices d'antigènes captent de la cystine, la métabolisent et sécrètent de la cystéine, qui sera captée par les cellules T. En présence de MDSC, ces dernières vont également capter la

cystine, la métaboliser, mais ne vont pas exporter de cystéine, conduisant à son appauvrissement dans le milieu extracellulaire et à la réduction de l'activation et des fonctions des cellules T (Srivastava et al., 2010).

En plus de leur capacité à inhiber la réponse T, les MDSC réduisent le développement et les fonctions des cellules NK et NKT (**Figure 10**) (Elkabets et al., 2010; Hongo et al., 2014; Li et al., 2009). En présence de MDSC, une diminution du nombre de cellules NK est observée, due à une diminution de l'expression de NKG2D sur les cellules NK et de leur production d'IFN- γ (Elkabets et al., 2010; Li et al., 2009). Concernant la suppression des NKT, elle serait médiée par une augmentation de l'expression d'arginase-1, d'IL-4R α et de PD-L1 (Hongo et al., 2014).

Au vu de leurs nombreux mécanismes permettant d'induire l'immunosuppression, les MDSC sont très importantes dans le microenvironnement tumoral où elles ont un rôle pro-tumoral majeur. Cette population est aujourd'hui démontrée comme responsable de l'augmentation de la croissance tumorale dans de nombreux modèles de cancer, comme dans l'adénocarcinome pancréatique ou le cancer du sein (Abe et al., 2010; Porembka et al., 2012). De même, chez des patients atteints de cancer du sein, de l'œsophage, du colon, du pancréas, du poumon, de la prostate ou gastrique, l'augmentation de MDSC corrèle avec le stade clinique du cancer, le développement des métastases et la réponse aux chimiothérapies (Diaz-Montero et al., 2009; Wang et al., 2013).

2.1.4.3. Recrutement et activation des MDSC

Un grand nombre de médiateurs inflammatoires sont impliqués dans le recrutement, l'activation et la prolifération des MDSC (parmi lesquels le GM-CSF, CCL2, IL-6 et IL-1 β). Ces médiateurs inflammatoires, dans le contexte d'une tumeur, sont généralement produits par les cellules tumorales (Navarini-Meury and Conrad, 2009).

Le GM-CSF produit par la tumeur joue un rôle majeur dans la génération de MDSC à la fois *in vivo* et *in vitro* (Dolcetti et al., 2010; Morales et al., 2010). De plus, le GM-CSF en combinaison avec l'IL-6, l'IL-1 β , la prostaglandine (PG) E2, le TNF- α et le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) permet la génération de MDSC ayant des propriétés immunosuppressives très importantes (Lechner et al., 2010; Marigo et al., 2010).

L'IL-1 β accumulée au site de la tumeur est impliquée dans la génération de MDSC dans la moelle osseuse et dans leur migration vers des lésions tumorales (Bunt et al., 2006, 2009; Elkabets et al., 2010). L'IL-1 β induit l'expression de la cyclooxygénase (COX)-2 (Kao et al., 2011) qui, comme la PGE₂, induit l'accumulation des MDSC au site de la tumeur mais empêche également la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (Eruslanov et al., 2010; Sinha et al., 2007). L'IL-1 β régule également la production de TNF- α par les cellules tumorales ce qui active fortement les fonctions immunosuppressives des MDSC (Ledesma et al., 2004; Sade-Feldman et al., 2013; Yang et al., 2016). Enfin, l'IL-1 β induit la production d'IL-10 par les MDSC et joue un rôle dans l'induction de l'IL-13, qui semble stimuler le recrutement des MDSC dans le microenvironnement tumoral (Gabitass et al., 2011).

L'IL-6 est généralement associée à l'inflammation chronique et à des effets pro-tumoraux (Neurath and Finotto, 2011). Cette cytokine est d'une importance cruciale pour la génération et la survie de MDSC, car elle active STAT3, qui empêche la différenciation des MDSC et favorise leur prolifération (Sonda et al., 2011; Yu et al., 2009). Dans un modèle de cancer de la prostate hormono-dépendant, une corrélation existe entre la concentration d'IL-6 circulant et le recrutement des MDSC (Wu et al., 2012). De plus, le blocage de l'IL-6 ou de son récepteur dans des modèles murins de cancer de la prostate et de carcinome épidermoïde réduit de façon importante les MDSC infiltrant les tumeurs ainsi que le développement tumoral (Sumida et al., 2012; Wu et al., 2012).

Enfin, le CCL2 joue un rôle important dans l'attraction des MDSC conduisant à des effets pro-tumoraux et pro-métastatiques. Dans un modèle de cancer de la prostate ou de l'ovaire, le CCL2 entraîne une accumulation importante de MDSC dans le microenvironnement tumoral (Obermajer et al., 2011; Zhang et al., 2010).

Enfin, d'autres équipes ont démontré un rôle de CCL5, CCL7 et « C-X-C chemokine-1 » (CXCL1) dans la migration et l'enrichissement des MDSC dans différents modèles de cancer (Gama et al., 2012; Ichikawa et al., 2011). Ensemble, ces médiateurs inflammatoires régulent l'expansion, la migration et l'activation des MDSC de façon combinatoire (Filipazzi et al., 2012).

2.2. Rôle du système immunitaire adaptatif

2.2.1. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules qui jouent un rôle majeur dans l'immunité adaptative. Il existe plusieurs types de cellules T ayant des fonctions différentes, telles que les cellules T helpers, T cytotoxiques, T régulatrices ou les cellules T $\gamma\delta$. Dans le microenvironnement tumoral, selon leurs fonctions et l'état d'activation de ces cellules, elles peuvent être associées à un effet pro- ou anti-tumoral.

Une augmentation du nombre de cellules T, et plus spécifiquement de cellules T helpers et cytotoxiques, corrèle avec un meilleur pronostic de survie dans de nombreux types de cancers, tels que le cancer du colon, le mélanome, le myélome multiple et le cancer pancréatique (Galon et al., 2006; Laghi et al., 2009; Swann and Smyth, 2007). Chez les patients, il existe également une corrélation entre la quantité de cellules T activées et la survie des patients : une forte densité en cellules T mémoires ($CD3^+ CD45RO^+$) corrèle avec une meilleure survie des patients (Fridman et al., 2012). Chez la souris, une déficience en cellules T ou en mécanisme cytotoxique est associée à une plus forte susceptibilité au développement de cancer spontané ou d'origine chimique (Shankaran et al., 2001; Swann and Smyth, 2007). Cela est dû au fait que les cellules T cytotoxiques sont très importantes dans la réponse anti-tumorale, car elles ont la capacité de lyser les cellules cancéreuses de par leur production de perforine et de granzyme, ou d'induire de l'apoptose.

Dans certains cas, les cellules T aux propriétés anti-tumorales peuvent être associées à des effets pro-tumoraux, comme dans le cancer de la peau où les cellules T cytotoxiques sont associées à une augmentation de la carcinogénèse à cause de l'inflammation induite (Roberts et al., 2007). De même, dans des modèles du cancer du sein, les cellules T de type Th2 peuvent être associées à une augmentation de la progression tumorale, grâce à deux mécanismes : (1) par leur production d'IL-13 qui pourrait jouer directement sur les cellules tumorales et (2) grâce à une modulation des macrophages vers un phénotype M2, produisant des facteurs pro-angiogéniques et pro-métastatiques (Aspord et al., 2007; DeNardo et al., 2009). De par leur production d'IL-23, les cellules T $CD4^+$ peuvent augmenter la production de molécules impliquées dans l'angiogénèse (telle que MMP-9) ou réduire l'infiltrat de cellules T $CD8^+$ dans le microenvironnement tumoral, conduisant à une augmentation de la

progression tumorale (Langowski et al., 2006). Enfin, les cellules T de type Th17, de par leur production d'IL-17, peuvent induire une augmentation de la production d'IL-6, augmentant l'expression de gènes de survie et pro-angiogéniques, conduisant à une augmentation de la progression tumorale (Wang et al., 2009).

Les cellules T régulatrices (Treg) sont préférentiellement associées à des effets pro-tumoraux grâce à leurs capacités à supprimer les réponses immunitaires anti-tumorales (dont les cellules T cytotoxiques, les cellules T CD4⁺ et les cellules NK) dans de nombreux types de cancer (Gallimore and Simon, 2008; Golgher et al., 2002; Onizuka et al., 1999; Shimizu et al., 1999). Dans de rares cas, cette population peut être associée à des fonctions anti-tumorales en diminuant l'inflammation induite par la tumeur, comme dans le cancer colorectal ou le cancer tête et cou (Badoual et al., 2006; Erdman et al., 2005).

2.2.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont associées à de bon pronostic de survie dans le cancer colorectal, le cancer ovarien, le cancer du poumon et le cancer du sein (Berntsson et al., 2016; Germain et al., 2014; Kroeger et al., 2016; Milne et al., 2009; Schmidt et al., 2012). Le rôle anti-tumoral principal des cellules B est médié par leur production d'anticorps : les antigènes sont reconnus par les cellules immunitaires et permettent la production d'anticorps spécifiques par les cellules B, les cellules tumorales pourront donc être ciblées et tuées via l'ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity).

En plus de la capacité des cellules B à produire des anticorps, ces cellules amplifient et coordonnent la réponse immunitaire (particulièrement en promouvant les activités cytotoxiques des cellules T) via leurs productions cytokiniques et chimiokines. Intrinsèquement, les cellules dendritiques sont les cellules les plus impliquées dans la présentation antigénique aux cellules T, mais, dans le cadre d'une tumeur, le recrutement des cellules dendritiques et leurs capacités de présentation antigénique sont en général diminuées. Les cellules B peuvent donc aider à l'activation des cellules T via leur propre capacité de présentation antigénique. En effet, les cellules B infiltrant la tumeur sont retrouvées à proximité des cellules T CD8⁺ dans le cancer ovarien. Cette présence, à la fois des cellules B et des cellules T CD8⁺, est associée à un meilleur pronostic de survie, comparé aux patients qui ont un fort infiltrat en cellule T CD8⁺, mais pas en cellules B (Nielsen et al., 2012).

Enfin, les cellules B peuvent induire des effets anti-tumoraux via leurs capacités à former des TLS ou à produire de la granzyme B.

Il existe un sous-type de cellules B, appelé cellules B régulatrices (Breg), qui est associé à des effets pro-tumoraux. Cette population produit des cytokines, dont l'IL-10, le TGF- β , et/ou exprime certains ligands immunorégulateurs, tel que PD-L1, qui induisent une diminution des réponses des cellules T et des cellules NK (Olkhanud et al., 2011; Qin et al., 1998; Shah et al., 2005; Tadmor et al., 2011). Les cellules B régulatrices ont aussi la capacité d'interagir et promouvoir d'autres populations, comme les MDSC ou les M2 (Wang et al., 2015; Wei et al., 2016; Zhou et al., 2016). Chez les patients atteints de cancer ovarien, gastrique, pulmonaire, colorectal, pancréatique, hépatocellulaire ou de cancers du sein, de la vessie et de l'œsophage, la présence de cellules B régulatrices est associée à un mauvais pronostic de survie (Liu et al., 2016; Qian et al., 2015; Shao et al., 2014; Shimabukuro-Vornhagen et al., 2014; Woo et al., 2014; Zhou et al., 2014).

3. Les autres composants du microenvironnement tumoral

Il existe de nombreux autres types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral, dont les fibroblastes et les cellules endothéliales.

Les fibroblastes associés aux cancers sont différents des fibroblastes normaux et ont des capacités totalement modifiées. Ils permettent la production de nombreuses molécules pro-tumorales et pro-angiogéniques, tel que CXCL12 qui permet de recruter des cellules endothéliales (Orimo et al., 2005). Les fibroblastes associés aux cancers ont également les capacités de dégrader la matrice extracellulaire, grâce à la production de nombreux MMP, facilitant la mobilité des cellules tumorales et conduisant donc à des effets pro-métastatiques (Boire et al., 2005; Stetler-Stevenson et al., 1993). Enfin, les fibroblastes associés aux tumeurs peuvent impacter le métabolisme tumoral et l'infiltrat immunitaire intra-tumoral (Guido et al., 2012).

Les cellules endothéliales jouent également un rôle important dans le microenvironnement tumoral. Lorsque la tumeur est de petite taille, l'apport en nutriment et en oxygène environnant est suffisant. En revanche, lorsque la tumeur atteint une certaine taille, afin d'éviter la nécrose, la tumeur induit la formation de nouveaux vaisseaux grâce à

l'angiogénèse. Ainsi les cellules tumorales vont produire de l'HIF (Hypoxia Growth Factor), conduisant à la production de VEGF, un facteur de prolifération des cellules endothéliales, qui permet la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Au vu de l'importance de cette angiogénèse dans le développement tumoral, de nombreux essais cliniques ont été effectués afin de limiter la communication entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales, tels que les essais avec le bévacicumab (anticorps monoclonal se liant au VEGF) chez des patients atteints de cancer du poumon où des effets bénéfiques ont été observés (Ichihara et al., 2015; Seto et al., 2014).

Rôle des TLR dans les cancers

La modulation des TLR peut induire des effets anti- ou pro-tumoraux au niveau de l'initiation ou de la progression tumorale, dépendant de plusieurs facteurs : le TLR, le type de tumeur et la qualité du système immunitaire infiltrant la tumeur.

La stimulation de certains TLR conduit à des effets anti-tumoraux (1) en activant les cellules immunitaires, conduisant à une réponse immunitaire anti-tumorale plus effective et/ou (2) en agissant directement sur les cellules tumorales, induisant leur apoptose. Par ailleurs, la stimulation des TLR peut également conduire à des effets pro-tumoraux, essentiellement dus à l'expression des TLR par les cellules tumorales. Certaines études montrent toutefois que les effets pro-tumoraux peuvent également être médiés par les TLR exprimés par les cellules immunitaires.

1. Effets de TLR1/2 dans les cancers

Dans un modèle murin de cancer du poumon, l'injection d'agoniste de TLR1/2 induit une forte diminution de la progression tumorale et augmente la survie des souris. Ces effets sont médiés par une réduction des capacités immunosuppressives des cellules T régulatrices et par une augmentation des capacités cytotoxiques des cellules T CD8⁺ (Zhang et al., 2011).

Dans un modèle induit de cancer du côlon, lorsque les souris sont déficientes pour TLR2, un développement plus important du nombre de tumeurs est observé, comparé à des souris de type sauvage. Chez les souris déficientes pour TLR2, la prolifération des cellules tumorales est augmentée et l'apoptose de ces cellules est diminuée. De plus, une augmentation de la production de l'IL-17A et une diminution de la production d'IFN- γ sont observées. Les auteurs considèrent que l'effet pro-tumoral observé chez les souris déficientes pour TLR2 résulte d'un changement des cellules T de type Th1 en type Th17 (Lowe et al., 2010).

Enfin, la présence de TLR2 est associée à des effets anti-tumoraux dans des modèles murins d'hépatocarcinome puisque chez des souris déficientes pour TLR2, une augmentation du nombre de tumeurs dans le foie et une diminution de la survie des souris sont observées (Lin et al., 2013). De plus, la stimulation de TLR2 chez des souris de type sauvage inhibe la

production d'IL-18 par les hépatocytes, diminue le recrutement des MDSC et augmente la cytotoxicité des cellules T CD8⁺ (Li et al., 2015).

D'autres auteurs démontrent que le TLR2 est associé à un effet pro-tumoral dans des modèles murins de cancers tête et cou et d'hépatocarcinome où le TLR2 est exprimé par les cellules tumorales. Ces effets pro-tumoraux sont abolis lors de l'utilisation de lignées tumorales déficientes pour TLR2 ou lors de l'utilisation d'anticorps bloquants de TLR2 (Farnebo et al., 2015; Huang et al., 2007; Shi et al., 2014). Dans l'un des modèles, les auteurs supposent que le mécanisme impliqué est une augmentation de l'expression de facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques lorsque le TLR2 est stimulé (Farnebo et al., 2015).

Dans d'autres modèles de cancer, des effets pro-tumoraux sont observés dus à la présence ou à la stimulation du TLR2 au sein des cellules de l'hôte : dans un modèle de cancer gastrique chez la souris, la stimulation de TLR2 augmente la progression tumorale. Lorsque les souris sont déficientes pour TLR2, cet effet pro-tumoral est aboli, démontrant l'implication du TLR2 exprimé par les cellules de l'hôte dans cet effet (Tye et al., 2012). Dans des modèles de cancers intestinaux et du sein, la déplétion du TLR2 au niveau de l'épithélium réduit le développement spontané de tumeur (Scheeren et al., 2014). Enfin, dans un modèle murin de lymphome, la stimulation de TLR2 augmente la fréquence des MDSC dans la rate, conduisant à un effet pro-tumoral. Il faut noter que ces effets ne sont pas observés lorsque les expériences sont réalisées chez des souris déficientes pour TLR2 (Maruyama et al., 2015).

2. Effets de TLR3 dans les cancers

Le TLR3 est majoritairement associé à des effets anti-tumoraux. Une seule étude démontre que la surexpression de TLR3 par les cellules tumorales chez des patients atteints de carcinome de la prostate est associée à un mauvais pronostic de survie (González-Reyes et al., 2011). Tandis que dans une cohorte de patients atteints d'hépatocarcinome, la surexpression de TLR3 par les cellules tumorales est associée à un bon pronostic de survie (Chew et al., 2012).

Les effets anti-tumoraux médiés par TLR3 sont majoritairement dus à un effet direct sur les cellules tumorales, conduisant à la mort cellulaire. En effet, l'injection d'agoniste de

TLR3, dans des expériences *in vitro* réalisées avec diverses lignées tumorales (cancer tête et cou, carcinome pharyngien, mélanome, hépato-carcinome et cancer de colon), montre une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales médiée par une diminution des molécules anti-apoptotiques et une augmentation des molécules pro-apoptotiques (Matijevic et al., 2009; Nomi et al., 2010; Salaun et al., 2007; Takemura et al., 2015; Yoneda et al., 2008).

Les mêmes observations ont été faites dans un modèle de rat d'hépatocarcinome, avec un effet anti-tumoral médié par une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération des cellules tumorales. Dans ce modèle, la stimulation de TLR3 conduit à une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques (parmi lesquelles la caspase 3 et la caspase 8) et une diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques (telles que survivine et Bcl-2) (Xu et al., 2013). De façon similaire, TLR3 est retrouvé exprimé par les cellules humaines de cancer de la prostate, et leur stimulation dans un modèle murin induit un effet anti-tumoral, médié par l'activation de la voie apoptotique dépendante d'IRF3, impliquant les caspases 3, 8 et 9 (Gambara et al., 2015; Paone et al., 2008).

En plus d'un effet anti-tumoral direct sur les cellules tumorales, le TLR3 joue sur le compartiment immunitaire. Dans des modèles murins d'hépatocarcinome, l'injection d'agoniste de TLR3 conduit à des effets anti-tumoraux médiés par un recrutement de cellules NK et de cellules T CD8⁺ et par l'activation des cellules T CD4⁺ (Chew et al., 2012; Ho et al., 2015; Takemura et al., 2015). Enfin, dans un modèle murin de cancer du poumon, l'effet anti-tumoral à la suite de l'injection d'agoniste de TLR3 est médié par une modification du phénotype des macrophages : les M2, après stimulation de TLR3, deviennent des M1, avec des propriétés tumoricides (Shime et al., 2012).

3. Effets de TLR4 dans les cancers

De nombreuses études ont démontré que le TLR4 est impliqué dans des effets anti-tumoraux. Lorsque les souris sont déficientes pour TLR4, un nombre augmenté de tumeurs est observé dans des modèles inductibles de cancer du poumon, de la peau et du sein (Bauer et al., 2005; Naseemuddin et al., 2012; Yusuf et al., 2008). Dans le modèle du cancer de la peau, les cellules tumorales déficientes pour TLR4 ont des capacités prolifératives et de production cytokiniques (IL-8, IL-17, IL-23, VEGF, MIP-2) augmentées, et des capacités de production

diminuées pour l'IFN- γ . Dans le modèle du cancer du sein, cette diminution de production d'IFN- γ par les cellules T est également observée et est accompagnée d'un nombre plus important de cellules T régulatrices et d'une augmentation de la sécrétion du VEGF par les cellules tumorales.

Les études portant sur des modèles murins greffés avec des cellules tumorales montrent que lorsque les souris sont déficientes pour TLR4, une augmentation du nombre de tumeurs et de métastases est observée. Ces effets sont justifiés par une diminution des capacités tumoricides des cellules T cytotoxiques, ainsi que par une augmentation de la prolifération des cellules tumorales (Ahmed et al., 2013; Lin et al., 2013).

Lorsque les auteurs injectent un agoniste de TLR4, des effets anti-tumoraux sont également observés. L'injection d'agoniste de TLR4 dans un modèle de mélanome conduit à une augmentation du nombre et des propriétés des cellules NK et des cellules T cytotoxiques (D'Agostini et al., 2005). Ces effets sont également obtenus dans un modèle de cancer du poumon et de glioblastome (Chicoine et al., 2007; Okamoto et al., 2003). Dans ces deux études, il est démontré que l'effet anti-tumoral est médié par une stimulation directe des cellules de l'hôte et non des cellules tumorales, grâce à l'utilisation de souris déficientes pour TLR4.

La majorité des études portant sur les effets pro-tumoraux de TLR4 implique l'expression de TLR4 par les cellules tumorales. Ainsi, dans le cancer du sein, la stimulation de TLR4 promeut la tumorigénèse, en augmentant la sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-8 par les cellules tumorales (Yang et al., 2010, 2014). De même, dans des modèles de cancers tête et cou, du poumon, de la prostate et hépatocellulaire, la stimulation de TLR4 augmente la prolifération des cellules tumorales et/ou la résistance à l'apoptose (Gu et al., 2015; Hsiao et al., 2015; Jain et al., 2015; Kundu et al., 2008) et augmente la production de certains facteurs, dont le TGF- β , le VEGF, l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF par les cellules tumorales (He et al., 2007; Szczepanski et al., 2009). Enfin, dans un modèle de cancer du côlon, la stimulation de TLR4 induit la production d'IL-6 et d'oxyde nitrique par les cellules tumorales, induisant une réduction de la prolifération des cellules T et des capacités cytotoxiques des cellules NK. Par ailleurs, la stimulation de TLR4 induit une diminution de l'expression de Fas et une augmentation de l'expression de B7-H1, B7-H2 et CD40 par les cellules tumorales induisant une résistance des cellules tumorales aux cellules cytotoxiques (Huang et al., 2005a).

Les effets pro-tumoraux de TLR4 peuvent également être médiés par une stimulation directe du TLR4 au niveau des cellules de l'hôte : dans des modèles de cancer colorectal et d'hépatocarcinome induits, TLR4 est nécessaire pour le développement des tumeurs (Dapito et al., 2012; Fukata et al., 2007).

Enfin, des études chez les patients atteints de cancer du sein, de cancer colorectal ou d'adénocarcinome pancréatique démontrent que la surexpression de TLR4 par les cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic (Cammarota et al., 2010; Chen et al., 2015; Ma et al., 2014; Zhang et al., 2010).

4. Effets de TLR5 dans les cancers

Un certain nombre d'études démontre que la stimulation de TLR5 induit des effets anti-tumoraux. En effet, il est démontré dans le cancer du sein, le cancer colorectal, le cancer du poumon et dans le lymphome des cellules B et T, que la stimulation de TLR5 conduit à une réduction du volume tumoral (Burdelya et al., 2012; Cai et al., 2011; Leigh et al., 2014; Rhee et al., 2008; Zhou et al., 2012). La majorité de ces effets anti-tumoraux sont médiés par une augmentation de la nécrose tumorale et de l'infiltrat en neutrophile. Dans un modèle de mélanome, dans lequel les auteurs génèrent des cellules T qui ont la capacité de produire du ligand de TLR5, les auteurs sont capables d'induire un effet anti-tumorale en augmentant les capacités cytotoxiques de ces cellules T contre les cellules tumorales (Geng et al., 2015).

Enfin, dans une cohorte de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, une surexpression de TLR5 est associée à un bon pronostic de survie. Les auteurs suggèrent que cet effet « bon pronostic » est dû à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales induite après stimulation de TLR5 (Zhou et al., 2014).

Il n'y a que très peu d'études qui associent le TLR5 à un effet pro-tumoral. Dans le cancer gastrique et l'adénocarcinome des glandes salivaires, la stimulation des cellules tumorales avec un agoniste de TLR5 induit une augmentation de la production d'IL-8, de l'activation de NF- κ B et de la prolifération cellulaire (Park et al., 2011; Song et al., 2011). Dans un modèle murin de sarcome, le TLR5 est associé à un effet pro-tumoral grâce à une augmentation de la production d'IL-6 et du recrutement des MDSC (Rutkowski et al., 2015).

5. Effets de TLR7 dans les cancers

Certaines études démontrent que la stimulation de TLR7 conduit à des effets anti-tumoraux. Ces effets sont médiés par une augmentation des capacités de reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires. Après injection d'agoniste de TLR7, les cellules de leucémie lymphocytaire produisent de façon plus importante des molécules de co-stimulation et des cytokines pro-inflammatoires, permettant une plus forte sensibilité des cellules tumorales aux cellules cytotoxiques effectrices (Spaner et al., 2006). De même, dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique, la stimulation des cellules tumorales avec un agoniste de TLR7 induit une diminution de l'expression des molécules de CMH I par les cellules tumorales, conduisant à l'activation des effets cytotoxiques des cellules NK (Shojaei et al., 2009). Dans un modèle murin de cancer du sein et du mélanome, il est démontré que l'injection d'agoniste de TLR7 active les pDC intra-tumorales et conduit à une réduction de la taille des tumeurs (Aspord et al., 2014; Le Mercier et al., 2013). En effet, les DC étant souvent immatures au sein de la tumeur, la stimulation de TLR7 permet à ces cellules d'être activées et de devenir matures, leur permettant de remplir leur fonction première d'activation du système immunitaire adaptatif. Dans un modèle de lymphome à cellules T, l'activation de TLR7 induit des effets anti-tumoraux, probablement grâce à une augmentation de la cytotoxicité des cellules T (Zhu et al., 2015).

De nombreux essais cliniques sont en cours afin de tester l'impact de l'injection d'agoniste de TLR7 dans différents types de tumeurs. L'Imiquimod (Aldara, 3M) est un agoniste de TLR7 déjà homologué pour une utilisation topique contre le carcinome basocellulaire et la kératose actinique (Lebwohl et al., 2004; Schulze et al., 2005). L'Imiquimod topique a également été testé en combinaison avec plusieurs vaccins contre le cancer. Lorsqu'il est utilisé avec un vaccin composé de plusieurs peptides de mélanome et un ligand Flt3 (facteur de croissance hématopoïétique), l'Imiquimod augmente la fraction de patients qui développent des réponses T cytotoxiques spécifiques de peptide. Cependant, aucun effet sur la progression de la maladie n'a été observé (Shackleton et al., 2004). Une autre étude utilise la protéine NY-ESO-1 en association avec de l'Imiquimod, administré par voie topique, pour le traitement du mélanome malin (stade II-III). L'application de la crème Imiquimod au site du vaccin stimule les réponses anticorps et/ou les cellules T CD4⁺ chez la moitié des participants à l'essai. Les biopsies des peaux traitées par l'Imiquimod ont montré une amélioration

significative des infiltrats de cellules T, de cellules présentatrices d'antigènes et de cellules NK par rapport aux peaux non traitées (Adams et al., 2008). Actuellement, un essai clinique de Phase I est en cours pour étudier l'effet de l'injection d'agoniste de TLR7 en intra-tumoral dans différents types de cancers solides (NCT02556463).

TLR7 peut être retrouvé exprimé par des cellules tumorales. La stimulation *in vitro* de lignées cellulaires de myélome humain, avec un agoniste de TLR7, induit une augmentation de la production d'IL-6 induisant une augmentation de la survie cellulaire (Jego et al., 2006). La stimulation des cellules de leucémie lymphocytaire chronique avec un agoniste de TLR7, induit également l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de la prolifération des cellules tumorales (Li et al., 2015).

Chez les patients atteints de cancer pancréatique, une forte expression de TLR7 est retrouvée au niveau des cellules tumorales comparé au tissu sain. Ces mêmes observations ont été obtenues dans un modèle inductible de cancer pancréatique chez la souris. Dans ce modèle murin, la stimulation de TLR7 accélère la progression tumorale, accompagnée d'une augmentation de la fibrose, de l'inflammation et de la prolifération cellulaire. La stimulation de TLR7 induit également la diminution de l'expression de molécules anti-apoptotiques, telles que p16, PTEN et la cycline D, ainsi que l'augmentation de l'expression de molécules pro-tumorales, parmi lesquelles p53, p21, p27, TGF- β , la cycline B1 et c-Myc (Grimmig et al., 2015; Ochi et al., 2012). De même, une forte expression de TLR7 par les cellules souches tumorales CD133⁺ chez les patients atteints de cancer colorectal est associée à un mauvais pronostic par rapport aux patients à faible expression de TLR7 (Grimmig et al., 2010). Cette corrélation entre une forte expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales et le mauvais pronostic de survie a également été retrouvée chez des patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules (Chatterjee et al., 2014; Cherfils-Vicini et al., 2010).

6. Effets de TLR9 dans les cancers

Dans de nombreux types de tumeurs, telles que le neuroblastome, le gliome et la leucémie lymphocytaire chronique de type B, la stimulation des cellules tumorales avec un agoniste de TLR9 diminue la prolifération des cellules tumorales et augmente la proportion de

cellules apoptotiques réduisant le nombre de cellules tumorales (Brignole et al., 2010; El Andaloussi et al., 2006; Jahrsdörfer et al., 2005).

Dans des modèles murins de neuroblastome et de carcinome ovarien, la stimulation de TLR9 augmente également la survie des souris (Brignole et al., 2010; De Cesare et al., 2008; Gershan et al., 2015). Les effets anti-tumoraux associés à la stimulation de TLR9, dans un modèle orthotopique de carcinome ovarien, sont médiés par une augmentation de l'infiltrat en cellules NK et en granulocytes dans la cavité péritonéale (De Cesare et al., 2008). Dans un modèle de cancer pulmonaire, les effets anti-tumoraux de la stimulation de TLR9 sont associés à une augmentation du nombre de cellules T CD8⁺ et de M1, ainsi qu'à une diminution du nombre de cellules T régulatrices et de M2 (Sato et al., 2015).

Enfin, une étude sur des patients atteints de carcinome rénal démontre que : la réduction de l'expression de TLR9 par les cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic de survie (Ronkainen et al., 2011). Les auteurs supposent que cet effet est dû à une immuno-surveillance plus faible ainsi qu'à un recrutement des cellules immunitaires moindre, permettant un développement des tumeurs plus rapide. A contrario, chez des patients atteints de glioblastome ou de carcinome de la prostate, une surexpression de TLR9 par les cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic de survie (González-Reyes et al., 2011; Luo et al., 2015; Wang et al., 2010). De même, l'expression de TLR9 par les cellules tumorales est associée à une augmentation de la tumeur dans les cancers du sein et de l'ovaire (Berger et al., 2010).

Dans le cas du cancer du sein, la stimulation de TLR9 augmente les capacités migratoires des lignées cancéreuses (Berger et al., 2010). Chez les patients, la stimulation de TLR9 pourrait être induite par de l'ADN hypométhylé, qui est trouvé plus élevé dans le sérum de patients atteints de cancer (Berger et al., 2010). Dans le cancer de l'œsophage, de la prostate et dans le myélome, la stimulation de TLR9 augmente également la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la résistance à l'apoptose des cellules tumorales (Jego et al., 2006; Kundu et al., 2008; Zhang et al., 2014).

En outre, l'expression de TLR9 par des cellules tumorales dans un modèle de souris de carcinome de prostate a un effet pro-tumoral associé à des marqueurs liés à l'inflammation (Moreira et al., 2015). De même, dans un modèle spontané de carcinome de la prostate, la stimulation de TLR9 induit une signalisation pro-inflammatoire au niveau des cellules

épithéliales transformées, conduisant au recrutement de cellules T régulatrices et à la prolifération de MDSC (Zambirinis et al., 2015). Enfin, dans un modèle d'hépatocarcinome de souris, la stimulation TLR9 a un effet pro-tumoral en raison de la formation d'un complexe entre l' « High mobility group box-1 » (HMGB1) et l'ADN mitochondrial pendant l'hypoxie (Liu et al., 2015).

Les TLR sont donc impliqués à la fois dans des effets pro- et anti-tumoraux, par des mécanismes d'action multiples, de par leur expression à la fois par les cellules immunitaires et les cellules tumorales (**Figure 11**).

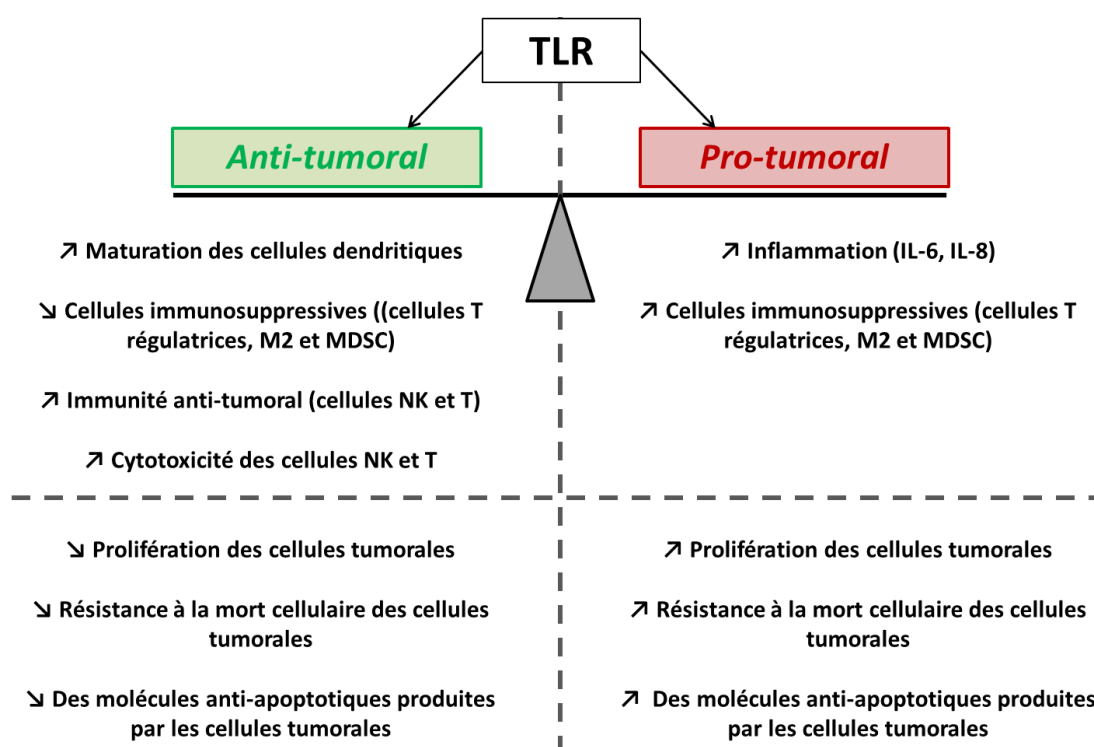


Figure 11 : Les effets anti- et pro-tumoraux des TLR.

Les TLR sont impliqués dans des effets pro- ou anti-tumoraux, cela étant dépendant du TLR et du type de cancer. Ces effets sont médiés par des modifications du système immunitaire intra-tumoral et/ou par des variations au sein des cellules tumorales.

Le TLR7 et le cancer du poumon

1. Le cancer du poumon

1.1. Epidémiologie

Les dernières statistiques mondiales sur le cancer ont mis en évidence qu'en 2012, il y a eu 14,1 millions nouveaux cas de cancer dans le monde et 8,2 millions de décès liés au cancer (OMS, Communiqué de presse numéro 223). Le cancer du poumon est le cancer le plus diagnostiqué dans le monde (1,8 millions de cas, soit 13% des cancers totaux) ainsi que la première cause de décès par cancer, avec une estimation de 1,5 million de morts en 2012 (OMS, Communiqué de presse numéro 223).

Il existe un grand nombre de facteurs conduisant au développement du cancer du poumon, dont le plus important est le tabagisme (Takahashi et al., 2010). Il est responsable d'environ 85% des cancers du poumon. La fumée du tabac contient de nombreuses substances chimiques nuisibles qui peuvent être cancérigènes, provoquant des modifications génétiques au sein des cellules pulmonaires responsables du développement de cancer du poumon. Il est à noter que la durée du tabagisme, l'âge auquel la personne a commencé à fumer et le nombre de cigarettes fumées chaque jour sont des paramètres qui font varier le risque de développer un cancer du poumon (www.cancer.ca).

D'autres facteurs pourraient être responsables du développement de ce type de cancer, comme l'exposition à certaines substances cancérigènes (dont le goudron, le chrome, le nickel, l'arsenic, le radon ou l'amiante) ou la pollution (ligue-cancer.net). Ainsi, l'exposition domestique au radon représente la deuxième cause de cancer du poumon en France, soit entre 6 et 15% des nouveaux cas et 5% à 12% des décès par cancer du poumon en France (OMS, Communiqué de presse numéro 223).

Au-delà des facteurs environnementaux, on retrouve également des facteurs génétiques pouvant être impliqués dans le développement de cancer du poumon. Certains gènes sont retrouvés modifiés chez des patients atteints de cancer du poumon, tels qu'une activation anormale du gène KRAS, une surexpression de MYC ou une inactivation de gènes suppresseurs de tumeur comme TP53 ou RB.

1.2. Etiologie et traitements

Il existe deux catégories de cancer de poumon, classées selon des critères histologiques : les cancers pulmonaires « à petites cellules » (CPPC) et ceux « non à petites cellules » (CPNPC), (ligue-cancer.net). Le CPPC représente 20% des cancers du poumon et le tabac est le facteur principal d'induction. Les CPNPC représentent 80% des cancers du poumon et il en existe trois grands types : l'adénocarcinome bronchique (40%), le carcinome épidermoïde (40%) et le carcinome à grandes cellules (20%). Les adénocarcinomes bronchiques sont jusqu'à présent généralement observés chez les non-fumeurs et les femmes, mais cette forme est de plus en plus retrouvée chez les fumeurs. Au sein de ce type, on distingue encore quatre sous-types : papillaire, solide, acinaire et bronchiolo-alvéolaire. Les carcinomes épidermoïdes, fortement liés au tabac, se développent en général dans les grosses bronches situées dans la partie centrale du poumon, et sont généralement composés d'une partie de tissu nécrosé. Enfin, les carcinomes à grandes cellules sont également causés par le tabac (90%) et peuvent être retrouvés dans n'importe quelle zone du poumon.

Lors du diagnostic, il existe différents types de classification pour les cancers, afin d'établir le pronostic et de déterminer des stratégies thérapeutiques. Tout d'abord, il existe la classification TNM selon la taille de la tumeur primaire (T), l'envahissement aux ganglions (N) ainsi que la formation de métastases (M) (Goldstraw et al., 2007). Il existe également d'autres systèmes de classification, tel que la classification par stade (Stade IA à Stade IV), dépendant de la taille de la tumeur et de la dissémination des métastases.

Il y a différents types de traitements selon les types de tumeurs. Le traitement est adapté selon le patient (état général, capacité respiratoire...), les caractéristiques de la maladie (type, localisation, évolution) et la classification.

Concernant le traitement des cancers pulmonaires non à petites cellules, le traitement de référence sera l'ablation chirurgicale de la tumeur, si cela est possible (ablation d'un lobe du poumon (lobectomie) ou de tout un poumon (pneumectomie)). Le choix de l'acte chirurgical dépend de l'aptitude physiologique du patient à supporter une intervention chirurgicale ainsi que l'accessibilité de la tumeur. Cet acte chirurgical est complété par une ablation des ganglions drainants et un traitement complémentaire adjuvant par radiothérapie

et/ou chimiothérapie (Ligue-cancer.net). Lorsque la tumeur est trop grosse et associée à des atteintes ganglionnaires et à des métastases, seules la chimiothérapie et la radiothérapie conduisent à de bons résultats thérapeutiques.

En parallèle, il existe des thérapies ciblées, avec l'utilisation d'anticorps inhibiteurs contre les « immunes checkpoints », tels que l'Ipilimumab et le nivolumab, qui sont des anticorps bloquant des molécules impliquées dans la suppression de l'immunité anti-tumorale (tel que CTLA-4 et PD-1) (Adachi and Tamada, 2015). Ces traitements ont montré un effet significatif dans plusieurs études menées chez des patients atteints du cancer du poumon (Brahmer et al., 2010; Di Giacomo et al., 2010; Lynch et al., 2012; Topalian et al., 2012). Au sein des thérapies ciblées, on retrouve également l'utilisation de Bevacuzimab, un anticorps monoclonal anti-VEGFR, qui limite la croissance anormale des vaisseaux sanguins (Liu et al., 2015). Des inhibiteurs de tyrosine kinase (dont le gefitinib ou l'erlotinib) existent également et peuvent être utilisés chez certains patients atteints de CPNPC dont le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) est surexprimé (Mok et al., 2009; Okon et al., 2015; Rosell et al., 2009, 2012; Zhou et al., 2011). Enfin, il existe de nombreux essais cliniques portant sur des vaccins basés sur des peptides ou des protéines dans le cancer du poumon. Des essais cliniques de phases II et III, portent sur des vaccins peptidiques visant par exemple MUC1 (L-BLP25). MUC1, une glycoprotéine transmembranaire, qui peut être surexprimée dans le cancer du poumon, et qui favorise l'angiogenèse, via l'activation des voies de signalisation Akt et Erk (Yao et al., 2011). Ces essais cliniques démontrent une meilleure survie des patients (Butts et al., 2011, 2014).

Malgré les traitements existants, le taux de survie reste faible. Cela est principalement dû au fait que le diagnostic de ce type de cancer est tardif. Ainsi, lors de la détection, les tumeurs sont déjà beaucoup trop avancées pour qu'un traitement soit totalement curatif.

1.3. Les métastases

Les métastases sont des tumeurs secondaires qui se développent à distance de la tumeur primaire et nécessitent des modifications au niveau cellulaire comme des modifications des capacités d'adhésion, de l'expression génique, de la morphologie, de la motilité ou des voies de signalisation des facteurs de croissance.

Les cellules épithéliales, ont une mobilité réduite de par leurs jonctions cellule-cellule, grâce à l'expression de cadhérines et de glycoprotéines transmembranaires. Une dérégulation de l'expression de ces protéines, particulièrement l'E-cadhérine, est observée dans les cellules cancéreuses invasives, lors de la transition épithéliomésenchymateuse (EMT). L'EMT est effectuée par les tissus sains lors de l'embryogenèse. Mais dans un contexte tumoral, elle induit une migration des cellules tumorales. Au cours de ce processus, les cellules vont réorganiser leur cytosquelette et leur expression des protéines, avec une perte de leur phénotype épithélial (sous-expression de l'E-cadhérine) et un gain des caractéristiques mésenchymateuses (surexpression de la vimentine et des facteurs de transcription (dont Snail, Twist et ZEB)) (Leber and Efferth, 2009; Thiery et al., 2009).

Au cours de ces mécanismes d'invasion, des protéases et des chimiokines vont également être produites, afin de dégrader l'endothélium des vaisseaux sanguins et lymphatiques et permettre la dissémination des cellules tumorales par la circulation sanguine et lymphatique. Les cellules tumorales vont exprimer à leur surface des molécules parmi lesquelles des intégrines ou des sélectines, qui vont leur permettre d'adhérer à l'endothélium des vaisseaux sanguins et lymphatiques et d'atteindre les organes distants.

Les cellules immunitaires limitent généralement la dissémination des cellules tumorales, mais certaines vont promouvoir la formation de métastases, telles que les macrophages, les MDSC ou les neutrophiles polymorphonucléés, en sécrétant des facteurs de croissance (EGF) ou des protéases (MMP9) qui augmentent les capacités migratoires des cellules tumorales (Grivennikov et al., 2010; Joyce and Pollard, 2009; Kitamura et al., 2015; Long and Beatty, 2013; Schmid and Varner, 2010). Dans un modèle murin de cancer du poumon, il est montré que la déplétion des MDSC diminue la migration cellulaire ainsi que le nombre de métastases (Kitamura et al., 2015; Schmid and Varner, 2010; Srivastava et al., 2012).

Les TLR peuvent être impliqués dans la formation de métastases : l'équipe de Goto démontre que la stimulation du TLR2, TLR3 et TLR4 augmente la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires activant la migration des cellules tumorales de mélanome (Goto et al., 2008). De même, l'activation du TLR9 exprimé par une lignée cellulaire de cancer du sein (MDA-MB-231) ou de la prostate augmente l'expression de MMP-13 et l'invasion tumorale (Huang et al., 2008; Sato et al., 2009). Dans le cancer du sein, l'activation du TLR4,

exprimé par les cellules tumorales, induit la surexpression de MMP-2, MMP-9 et du VEGF, ainsi que l'augmentation de l'invasion et de la migration cellulaire. De plus, chez les patients, l'expression de TLR4 est corrélée avec la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques (Yang et al., 2014). Enfin, la stimulation de TLR4 augmente la migration de lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire (A549 et H59) (Chow et al., 2015).

2. Le TLR7 dans le cancer du poumon

Le laboratoire a précédemment démontré que le TLR7 pouvait être exprimé par des cellules tumorales pulmonaires. En effet, chez des patients atteints de cancer du poumon, le TLR7 est exprimé par les cellules immunitaires intratumorales, les cellules bronchiques ainsi que par les cellules tumorales (**Figure 12A-B**) (Cherfils-Vicini et al., 2010). Il a également été démontré *in vitro* que certaines lignées cellulaires humaines de cancer du poumon expriment TLR7, telles que les A549 (lignée d'adénocarcinome) et les SK-MES (lignée de carcinome épidermoïde) (**Figure 12C**).

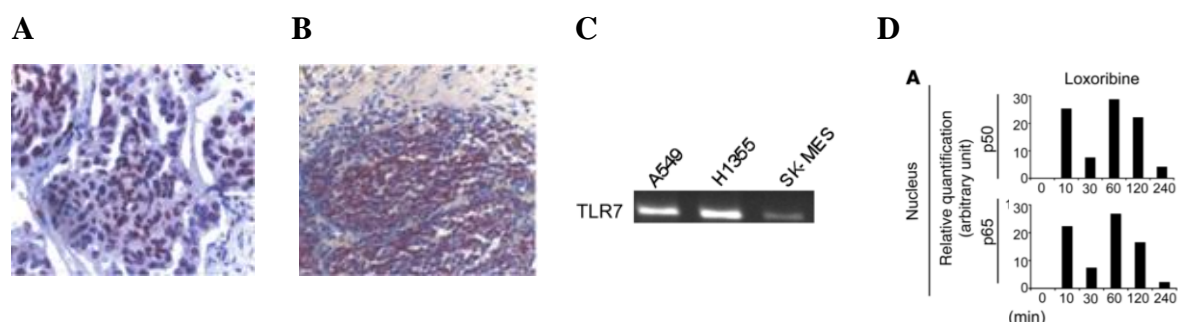


Figure 12 : La présence du TLR7 fonctionnel chez des patients atteints de cancer du poumon, ainsi qu'au niveau de lignées cellulaires humaines de cancer du poumon.

(A) Expression de TLR7 déterminée par immunohistochimie dans une tumeur pulmonaire humaine de type adénocarcinome (X40).

(B) Expression de TLR7 déterminée par immunohistochimie au niveau d'une structure lymphoïde tertiaire dans un poumon humain (X40).

(C) Expression de TLR7 par des lignées humaines de cancers pulmonaires (A549, H1355 et SK-MES) analysées par RT-PCR.

(D) Analyse de la quantité relative des sous-unités de NF-κB p50 et p65 dans le noyau par ELISA après stimulation des cellules A549 avec un agoniste de TLR7 (Loxoribine, 10μg/ml). Figure adaptée de (Cherfils-Vicini et al., 2010).

Par la suite, la fonctionnalité de ce récepteur a été vérifiée (**Figure 12D**) : la stimulation d'une lignée humaine de cancer du poumon par un agoniste synthétique

spécifique de TLR7 (la loxoribine) conduit à une translocation des protéines NF- κ B dans le noyau des cellules (Cherfils-Vicini et al., 2010). La stimulation de TLR7 *in vitro* sur des lignées humaines de cancer du poumon, a permis de démontrer que cette stimulation conduit à une augmentation de la survie des cellules tumorales. Cette meilleure survie de la lignée humaine de cancer du poumon, peut être expliquée par une plus forte expression de Bcl-2 (protéine régulatrice, qui a pour caractéristique principale d'être anti-apoptotique). Cette molécule à elle seule n'est pas oncogénique, mais peut aider à la mise en place d'un effet pro-tumoral (Vaux et al., 1988). Des effets sur les mécanismes de chimiorésistances ont également été étudiés. En effet, lorsque les cellules tumorales sont traitées avec des sels de platine (chimiothérapies couramment utilisées dans le cadre de traitement de patients atteints de cancer du poumon), l'ajout d'un agoniste de TLR7 augmente la survie cellulaire (Cherfils-Vicini et al., 2010). Enfin, les lignées humaines de cancer du poumon ont été transfectées avec des siARN TLR7, conduisant à une diminution drastique de l'expression de TLR7. Lorsque l'expression de TLR7 est fortement diminuée, les effets de chimiorésistance en présence d'agoniste de TLR7 sont drastiquement diminués. Le TLR7 est donc essentiel à ces effets pro-tumoraux et de chimiorésistance.

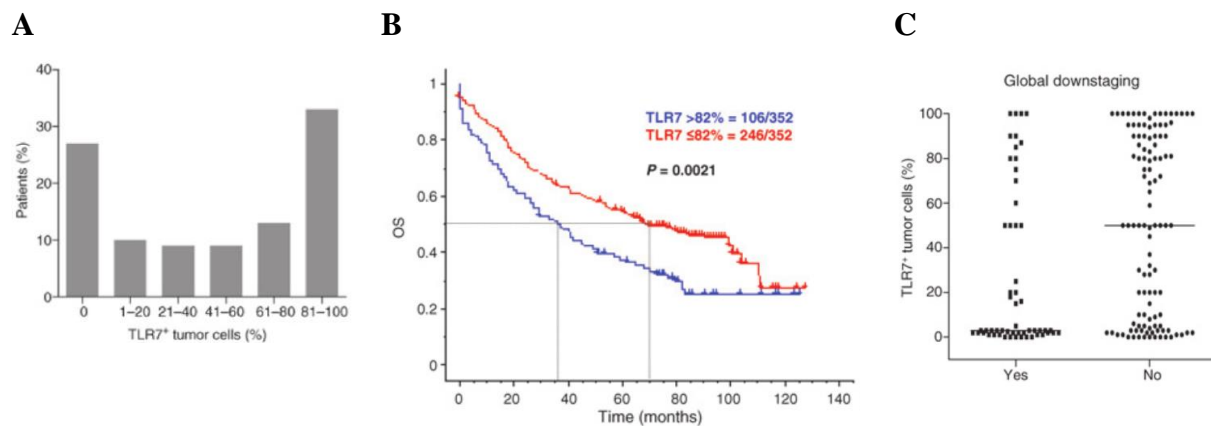


Figure 13 : Une forte expression du TLR7 au niveau des cellules tumorales chez les patients atteints de cancer du poumon est associée à un mauvais pronostic de survie et une réponse moindre aux chimiothérapies.

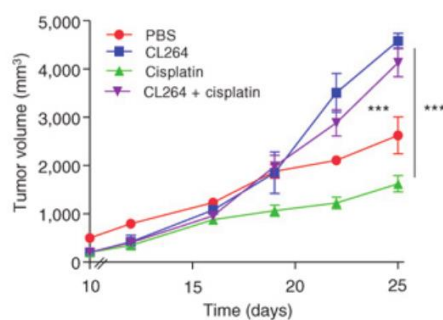
(A) Distribution du pourcentage d'expression de TLR7 par les cellules tumorales parmi une cohorte de patients atteints de cancer du poumon de stade I à IIIb non traités avant chirurgie (n=352).

(B) Courbe de survie Kaplan-Meier de la survie globale des 352 patients en fonction de la stratification de l'expression de TLR7 par les cellules tumorales, en utilisant l'optimal cut off à 82%.

(C) Distribution du pourcentage des cellules tumorales TLR7 positives pour les 55 patients avec un décalage global et des 111 patients sans décalage global. Figure adaptée de (Chatterjee et al., 2014).

Par la suite, des cohortes de patients atteints de cancer du poumon ont été étudiées, afin de déterminer si l'expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales corrélait avec un pronostic de survie des patients. La première cohorte étudiée comprend 352 patients atteints de cancer du poumon non traités de stade I à IIIb. Le marquage de TLR7 par immunohistochimie démontre qu'il y a une forte hétérogénéité d'expression de TLR7 par les cellules tumorales entre les patients : un tiers des patients ne possède pas de cellules tumorales qui expriment le TLR7, un tiers des patients a des cellules tumorales qui expriment à plus de 80% le TLR7, et le dernier tiers se trouve réparti entre les deux extrêmes (**Figure 13A**). Cette expression de TLR7 a été corrélée avec le pronostic de survie des patients : une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales (plus de 82%) est associée à un mauvais pronostic de survie, comparé aux patients qui ont une plus faible expression du TLR7 au niveau des cellules tumorales (**Figure 13B**) (Chatterjee et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés sur une deuxième cohorte, composée de 210 patients de stade III traités par chimiothérapie néoadjuvante. Sur cette seconde cohorte, il a également été démontré qu'une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales corrèle avec une moins bonne réponse aux chimiothérapies néo-adjuvantes (**Figure 13C**) (Chatterjee et al., 2014).

A



B

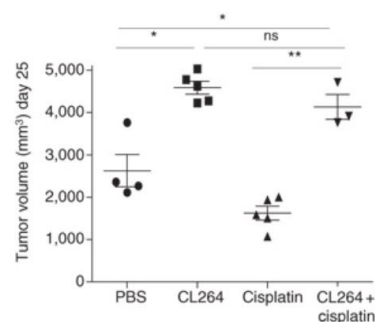


Figure 14 : La stimulation du TLR7 dans un modèle *in vivo* de cancer du poumon induit un effet pro-tumoral et de chimiorésistance.

(A) Progression tumorale chez des souris C57Bl/6 greffées avec des LLC avec ou sans injection d'agoniste de TLR7 (CL264) et avec ou sans chimiothérapie (Cisplatine).

(B) Mesures des tumeurs de l'expérience représentée en (A) au jour 25.

Par la suite, des modèles murins de cancer du poumon ont été utilisés, avec injection d'une lignée murine d'adénocarcinome de poumon (Lewis Lung Carcinoma : LLC) exprimant fortement le TLR7. L'injection d'agoniste de TLR7 en intra-tumoral, chez des souris immunocompétentes ayant reçu une greffe de la lignée tumorale, conduit à un effet pro-

tumoral et à un effet de chimiorésistance (**Figure 14A-B**) (Chatterjee et al., 2014). Ces effets ont également été obtenus lors de l'injection de lignée tumorale pulmonaire humaine chez des souris immunodéficientes. Enfin, l'injection d'antagoniste de TLR7 (IRS661) permet de diminuer l'effet pro-tumoral induit par la stimulation de TLR7 dans ce modèle murin de cancer du poumon (Chatterjee et al., 2014).

Tous ces résultats démontrent que TLR7 induit un effet pro-tumoral, à la fois chez l'homme et dans un modèle murin de cancer du poumon. Les mécanismes impliqués dans ces effets restent à découvrir, ainsi que ce qui pourrait expliquer, chez l'homme, l'expression et la stimulation de TLR7 au niveau des cellules tumorales.

OBJECTIFS

Au vu des données de la littérature ainsi que celles obtenues au laboratoire chez les patients atteints de cancer du poumon (l'expression de TLR7 associé à un effet pro-tumoral), ainsi qu'à la reproduction de ces effets dans un modèle de cancer du poumon murins, les différents objectifs de ma thèse ont été de comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet pro-tumoral associé au TLR7 :

- **Déterminer quelles sont les cellules directement stimulées par l'agoniste de TLR7 dans le modèle murin de cancer du poumon.**

A la fois les cellules tumorales et les cellules immunitaires peuvent exprimer le TLR7. C'est pourquoi, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets pro-tumoraux observés, il est important de savoir au niveau de quelle(s) cellule(s) agit l'agoniste de TLR7. Pour cela, nous avons à notre disposition des souris C57Bl/6 de type sauvage ainsi que des souris déficientes pour TLR7. Cela nous a permis de distinguer si ce sont les cellules de l'hôte ou les cellules tumorales greffées qui sont responsables de l'effet pro-tumoral obtenu à la suite de l'injection d'agoniste de TLR7.

- **Comprendre comment est médié l'effet pro-tumoral de TLR7 après sa stimulation dans un modèle murin et déterminer si le système immunitaire a une implication directe ou indirecte.**

Des expériences *in vitro* nous indiquent que la stimulation directe de TLR7 de notre lignée murine de cancer du poumon, n'induit pas d'augmentation de la prolifération ni de la survie cellulaire. C'est pourquoi, nous pouvons nous demander si *in vivo*, l'effet pro-tumoral ne pourrait pas inclure des modifications du système immunitaire. Grâce à la cytométrie en flux, nous avons étudié les profils immunitaires intra-tumoraux afin d'établir si certaines de ces populations immunitaires pourraient être impliquées dans cet effet pro-tumoral.

- **Déterminer si les mécanismes observés chez les souris sont retrouvés chez les patients atteints de cancer du poumon.**

L'expression de TLR7 par les cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de cancer du poumon. Nous avons eu accès à des échantillons frais (tumeur, poumon distant et sang) provenant de patients. Nous avons donc étudié le microenvironnement tumoral et plus particulièrement l'infiltrat immunitaire par cytométrie en flux. Des marquages de TLR7 par immunohistochimie nous ont permis de différencier les

patients ayant une forte ou une faible expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales. Ainsi, nous avons pu déterminer si les mécanismes observés chez la souris sont retrouvés chez les patients et faire le lien entre le niveau d'expression de TLR7 par les cellules tumorales et l'infiltrat immunitaire.

- **Etudier la présence de ligands qui pourraient induire la stimulation de TLR7 chez les patients atteints de cancer du poumon.**

L'injection d'antagoniste de TLR7 chez les patients atteints de cancer du poumon n'est pas envisageable au vu du rôle de TLR7 dans la réponse antivirale. De plus, il est connu qu'une stimulation de ce récepteur entraîne sa surexpression. Il est donc nécessaire de déterminer si, chez les patients atteints de cancer du poumon, des ligands de TLR7 sont présents dans le microenvironnement tumoral. Ces expériences peuvent encore une fois être réalisées grâce à l'utilisation d'échantillons provenant de patients atteints du cancer du poumon. Ainsi, nous avons testé la présence de ligand de TLR7 dans ces échantillons grâce à l'utilisation de lignée reportrice de l'activation de TLR7.

- **Etudier l'origine des ligands de TLR7 chez ces patients.**

Afin d'approfondir la question des ligands présents dans le microenvironnement tumoral, nous avons également commencé à étudier l'effet de certains ligands potentiels de TLR7 sur la croissance tumorale. TLR7 étant un récepteur à ARN simple brin viral, nous avons étudié l'effet de l'infection par deux virus à ARN simple brin (Virus Respiratoire Syncytial (RSV) et de l'IAV) sur la croissance tumorale.

RESULTATS

Projet d'Article

Dans cet article nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'effet pro-tumoral induit par la stimulation de TLR7 dans un modèle murin de cancer du poumon. Nous avons également démontré que la stimulation de TLR7 induit un effet pro-métastatique et les mécanismes impliqués dans cet effet ont été investigués. Enfin, chez des patients atteints de cancer du poumon, nous avons démontré qu'une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales est associée à un profil pro-métastatique, avec une signature d'EMT.

Pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'effet pro-tumoral induit par la stimulation de TLR7, nous avons utilisé un modèle murin sous cutané de cancer du poumon : une lignée de cellules tumorales pulmonaires murines (LLC-luc) exprimant TLR7, a été injectée en sous cutané à des souris immunocompétentes de type sauvage et/ou déficientes pour TLR7. Des injections d'agoniste synthétique spécifique de TLR7 (CL264, 40µg par injection) ont été effectuées en intra-tumoral aux jours 0, 3 et 6. Des expériences précédentes, au laboratoire, démontraient que l'injection d'agoniste de TLR7 conduisait à un effet pro-tumoral. Nous démontrons tout d'abord que cet effet pro-tumoral est médié par une stimulation directe du TLR7 présent au niveau des cellules tumorales, grâce à des expériences réalisées avec des souris déficientes pour TLR7. Précédemment, il avait été démontré que la stimulation *in vitro* de la lignée LLC-luc, avec un agoniste synthétique spécifique de TLR7, n'induit aucune modification de la survie et de la prolifération cellulaires (Chatterjee et al., 2014). Nous avons donc étudié si l'infiltrat immunitaire intra-tumoral jouait un rôle indirect. Pour cela nous avons prélevé les tumeurs au jour 10, puis étudié les cellules immunitaires intra-tumorales par cytométrie en flux. Nous avons mis en évidence que, lorsque les souris sont traitées avec l'agoniste de TLR7, une augmentation du pourcentage et du nombre absolu de MDSC est observé dans le microenvironnement tumoral.

Afin d'étudier si cette population est impliquée dans notre effet pro-tumoral à la suite de la stimulation de TLR7, nous avons réalisé des expériences de déplétion des MDSC, grâce à l'utilisation d'anticorps déplétant anti-Gr1. Lors de la déplétion de ces cellules, une disparition de l'effet pro-tumoral est observée. Nous avons donc conclu que cette population est impliquée dans l'effet pro-tumoral médié par la stimulation de TLR7.

Les marqueurs utilisés pour caractériser les MDSC n'étant pas exclusifs, nous avons vérifié les capacités immunosuppressives de cette population. Pour cela nous avons trié les MDSC et étudié leurs productions de ROS, Nitrate, H₂O₂ et Arginase 1, ainsi que leurs

capacités à inhiber la prolifération des cellules T. Ainsi, nous avons démontré que la population responsable de l'effet pro-tumoral, à la suite de la stimulation de TLR7, produit des molécules immunosuppressives et inhibe la prolifération des cellules T. Ces expériences nous ont également permis de mettre en évidence que les capacités immunosuppressives des MDSC n'étaient pas augmentées lorsque les souris étaient traitées avec un agoniste de TLR7. La stimulation de TLR7 induit donc une augmentation du nombre de MDSC dans la tumeur, mais pas de leurs fonctions.

Par la suite, nous avons essayé de comprendre les mécanismes impliqués dans l'augmentation du nombre de MDSC dans la tumeur. Pour cela, nous avons analysé la production de certaines cytokines par le microenvironnement tumoral (démontrées comme impliquées dans le recrutement et la prolifération des MDSC) par «enzyme-linked immunosorbent assay» (ELISA), telles que l'IL-6, le CCL2 et le GM-CSF. Lorsque les souris sont traitées avec l'agoniste de TLR7, les concentrations de CCL2 et GM-CSF dans les tumeurs sont plus importantes dans la tumeur que chez les souris contrôles. Nous supposons donc que ces deux cytokines sont responsables de l'augmentation du recrutement des MDSC.

Dans notre modèle murin, nous avons également étudié l'effet de la stimulation de TLR7 sur le développement des métastases. Pour cela nous avons compté les métastases pulmonaires et nous avons mis en évidence que la stimulation de TLR7 induit une augmentation significative du nombre de métastases pulmonaires. De plus, nous avons mis en évidence qu'une absence de MDSC (suite à la déplétion de ces cellules) diminuait fortement le nombre de métastases pulmonaires. Les MDSC sont donc aussi impliquées dans l'effet pro-métastatique induit par la stimulation de TLR7.

Chez les patients atteints de cancer du poumon, le laboratoire avait déjà démontré qu'une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales est associée à un mauvais pronostic de survie (Chatterjee et al., 2014). Chez des patients, nous avons étudié les transcrits de 770 gènes impliqués dans l'angiogénèse, l'EMT et les métastases, grâce à la technologie Nanostring. Dans ces expériences, 6 patients n'ayant pas d'expression de TLR7 au niveau de leurs cellules tumorales et 6 patients ayant 100% de leurs cellules tumorales exprimant TLR7 ont été analysés. Nous avons mis en évidence une signature pro-métastatique associée à une forte expression de TLR7, avec notamment une augmentation des transcrits pour les gènes

« Intercellular adhesion molecule » (ICAM), Kératine 7 (KRT7), KRT19, SDC4 et « Nucleoside diphosphate kinase A » (NME1).

En parallèle, nous avons étudié, au niveau protéique, l'EMT par immunohistochimie dans notre cohorte de patients. Notre étude a porté sur deux molécules en particulier: l'E-cadherine et la Vimentine, qui sont impliquées dans l'EMT. Lorsque des cellules épithéliales entament l'EMT, elles perdent l'expression d'E-cadherine et augmentent l'expression de Vimentine. Ainsi, nous avons mis en évidence que les patients ayant une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales ont une plus faible expression d'E-Cadherine et une plus forte expression de Vimentine au niveau des cellules tumorales que les patients n'exprimant pas le TLR7 au niveau de leurs cellules tumorales. Les patients ayant une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales ont donc une EMT plus importante, ce qui corrèle avec nos résultats obtenus lors de l'étude des transcrits.

En conclusion, cet article met en évidence les mécanismes impliqués dans les effets pro-tumoraux et pro-métastatiques de TLR7 dans le cancer du poumon, jusqu'alors inconnus. Par la suite, il serait intéressant de comprendre ce qui, chez l'homme, induit la surexpression de TLR7 par les cellules tumorales afin de développer de nouvelles thérapies permettant de limiter les effets pro-tumoraux et pro-métastatiques de TLR7.

Increased metastasis occurrence of lung cancer through TLR7-mediated recruitment of myeloid suppressor cells

Marion Dajon^{1,2,3,§}, Kris Iribaren^{1,2,3,§}, Florent Petiprez^{1,2,3}, Audrey Lupo^{1,2,3,4}, Hanane Ouakrim^{1,2,3}, Victor Navas⁵, Vincenzo Di Bartolo⁵, Pierre Emmanuel Joubert^{1,2,3}, Marco Alifano⁴, Diane Damotte^{1,2,3,4}, Isabelle Cremer^{1,2,3}

Affiliations

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006, France; ²Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMRS 1138, Paris F-75006, France; ³Université Paris Descartes, UMRS 1138, Paris F-75006, France; ⁴Services d'anatomie-pathologie et de chirurgie thoracique, Hôpital Hôtel Dieu AP-HP, Paris, F-75004, France; ⁵Institut Pasteur.

Corresponding author: Isabelle Cremer, INSERM U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France.

Phone: +33 1 44279083

Fax: +33 1 44278117

e-mail: isabelle.cremer@crc.jussieu.fr

Additional Footnotes- § These authors contributed equally to this work

The authors declare that no conflict of interests exists

Non standard abbreviations: ADC, adenocarcinoma; DAMP, Damaged-Associated Molecular Patterns; NSCLC, Non-Small-Cell Lung Cancer; PAMP, Pathogen- Associated Molecular Patterns; SCC, squamous cell carcinoma; ssRNA, single-stranded RNA.

Results

Intratumoral TLR7 agonist injection induces pro-tumoral effect and modulation of intratumoral immune infiltrates

We have previously shown that intratumoral injection of the TLR7 agonist CL264 led to a pro-tumoral effect *in vivo* (1) on grafted adenocarcinoma LLC lung tumor cells, that constitutively co-express TLR4, TLR7 and TLR9 (**Fig. S1A-D**). This effect is specific to TLR7 stimulation, as we did not observe any increased tumor progression after stimulation of TLR3, TLR4 or TLR9 (**Fig. S1E, G, H**). On the contrary, we observed an anti-tumoral effect of PolyI:C or CpG injection (**Fig. S1E, H**).

TLR stimulation is known to modify the inflammatory microenvironment in tumors. We therefore analyzed whether TLR7 stimulation in the tumor microenvironment had an impact on the recruitment of immune cells. We determined by flow cytometry the percentages of T, B and NK cells, macrophages, conventional dendritic cells (cDC), plasmacytoid dendritic cells (pDC), and myeloid-derived suppressor cells (MDSC), including granulocytic and monocytic subpopulations, after optimization of the gating strategy for intratumoral immune cells (**Fig S2**). The intratumoral immune infiltrates in wild-type (WT) mice was mostly composed of myeloid cells including 48% of MDSC, 15% of cDC, and 5% of macrophages and adaptive immune cells including 10% T cells, 5% NK cells, and 3% regulatory T cells (Tregs) (**Fig 1A**). The intratumoral injection of CL264 induced a modification of percentages and cells numbers of immune cells, with a significant increase of MDSC (from 49.3% (\pm 7.1) to 65.5% (\pm 9.8), a decrease of cDC (from 15 to 9%) and of pDC (from 3 to 1.5%) (**Fig 1A-E**). MDSC were mainly composed of monocytic subpopulation in PBS treated mice, whereas it changed in favor to the granulocytic compartment in CL264 treated mice (**Fig 1F-G**). On the contrary, no modifications in macrophages, T, Treg, B and NK cells infiltration were observed (**Fig 1A, Fig S3A**).

Pro-tumoral effect and MDSC recruitment within the tumor is mediated by TLR7 stimulation on tumor cells:

TLR7 expression was determined on immune cells infiltrating tumors, as well as circulating and spleen immune cells. As expected, TLR7 was mainly expressed by pDC and macrophages, and by cDC, in the spleen (**Fig S4A**), the blood (**Fig S4B**) and the tumor (**Fig S4C**). Therefore, given the fact that TLR7 is expressed by both LLC tumor cells (**Fig. S1D**) and immune cells, we investigated if the increased recruitment of intratumoral MDSC was a consequence of TLR7 stimulation on tumor cells or on immune cells. CL264 was injected in LLC tumors that were grafted in WT and in TLR7 knock-out (TLR7 KO) mice in which immune cells do not express TLR7.

We first compared the immune compartments in WT and in TLR7 KO mice, to determine the impact of TLR7 loss on immune cell subtypes in blood, spleen, and tumor, having a role in tumor progression or regression. We observed low frequencies of MDSC, cDC and macrophages in the blood and spleen of both TLR7 KO and WT mice, and that TLR7 KO mice exhibited a lower proportion of MDSC, cDC, NK and T cells and increased proportion of B cells in the spleen and the blood compared to WT mice (**Fig. S5A, B**). On the contrary, tumors are characterized by high frequencies of MDSC, both in TLR7 KO and in WT mice, and higher proportions of macrophages and T cells were detected in the tumors of TLR7 KO compared to WT mice (**Fig. S5C**).

As observed in tumors from WT mice, the injection of TLR7 agonist induced an increased proportion and cell numbers of MDSC, concomitant with a decreased proportion of cDC (**Fig 1H-N**), but did not modified macrophages, NK, T and B cells compartments (**Fig. S3B**).

Collectively, these data show that TLR7 stimulation of tumor cells induced changes in the intra-tumoral immune cell compartment with a sharp increase of intratumoral MDSC.

MDSC are involved in the pro-tumoral effect mediated by TLR7 stimulation

To decipher the possible role of MDSCs on the pro-tumoral effect mediated by TLR7 stimulation of tumor cells, we performed MDSC depletion experiments. Tumor harboring mice, treated or not with CL264, received intraperitoneal injection of anti-Gr1 monoclonal antibody (mAb) every 48 hours (**Fig 2A**). During the experiment, less than 0.4% of MDSC were detectable in the blood of mice, confirming the efficacy of MDSC depletion (**Fig 2B-C**).

The injection of TLR7 agonist resulted in increased tumor progression, as we already previously demonstrated (1) (**Fig. 2D**). MDSC depletion resulted in a drastic reduction of tumor progression both in PBS- and in CL264-treated mice (**Fig. 2E**), and the pro-tumoral effect induced by TLR7 agonist was completely lost in the absence of MDSC (**Fig. 2E**). Similar results were obtained in TLR7-deficient mice (**Fig. 2F, G**).

These results clearly demonstrate that the pro-tumoral effect of TLR7 stimulation is mediated by MDSC recruitment into the tumor microenvironment.

TLR7 stimulation induced an increased production of CCL2 and GM-CSF within the tumor microenvironment

Given the involvement of MDSC in the pro-tumoral effect upon TLR7 stimulation, we investigated the mechanisms that could be involved in MDSC recruitment following the injection of TLR7 agonist. In the literature, there are evidences that several cytokines are involved in the MDSC recruitment and proliferation, such as IL-6, GM-CSF or CCL2 (2-9), and that some of them can be produced by tumor cells (6, 10). To decipher the possible role of these cytokines and chemokines in intratumoral recruitment of MDSC following TLR7 stimulation, we quantified by ELISA the production of CCL2, GM-CSF and IL-6 by tumors extracted from PBS- or TLR7-treated mice. The average concentration of CCL2 and GM-CSF increased significantly in the group of TLR7-stimulated mice (**Fig. 2H, I**). The average concentration of CCL2 and GM-CSF was 10407 pg/ml ($\pm 1\ 326$) and 255.6 pg/ml (± 14.94), respectively in mice were treated with CL264, and 7453 pg/ml (± 1380) and 186 pg/ml (± 14.63), respectively in control mice receiving PBS (**Fig 2H, I**). By contrast, no significant variation of IL-6 concentration was found in tumor supernatant from mice treated or not with CL264 (**Fig 2J**). These results show that TLR7 stimulation of tumor cells led to increased secretion of CCL2 and GM-CSF in the tumor microenvironment and, as a consequence, increased MDSC recruitment in the tumors.

TLR7 agonist injection does not modify the immunosuppressive capacities of MDSC

To decipher the possible impact of TLR7 stimulation on MDSC functions, we measured the production of molecules implicated in immunosuppressive properties. The production of Nitrate, H₂O₂, and Arginase 1 by MDSC was similar in intratumoral MDSC, as well as the proportion of ROS secreting cells, purified from tumors of PBS- or CL264-treated mice (**Fig**

S6A). In addition, the capacity of MDSC to suppress T cell proliferation was also similar between these MDSC (**Fig. S6B-C**). These results demonstrate that intratumoral injection of TLR7 agonist does not modify the immunosuppressive properties of intra-tumoral MDSC.

MDSC are involved in the pro-metastatic effect induced by TLR7 stimulation

To further dissect if the pro-tumoral effect of TLR7 stimulation was also associated with a pro-metastatic effect, we analyzed lung metastasis occurrence in mice treated with TLR7 agonist. The mice were sub-cutaneously grafted with LLC-Luc tumor cells expressing Luciferase, and the apparition of metastasis was followed over time, by bioluminescence measurement. Lung metastasis were detected earlier in TLR7 agonist injected mice compared to control mice (**Fig. 3A**), and at a given time point, the metastasis were larger in CL264-treated mice. We further confirmed that the bioluminescence in the thorax was due to lung metastasis by labeling the lung with Feket solution (**Fig. 3B**).

The number of metastasis was determined in PBS- and CL264-treated mice. We observed the presence of lung metastases in both groups of mice, but the mice having received three injections of TLR7 agonist had a significantly higher number of metastasis with a mean of 10 metastasis per lungs in CL264-treated mice, compared to 5 metastasis per lungs in the control group (**Fig. 3C**). We also observed that repeated injections of CL264 (every three days during all the experiment) led to even higher number of lung metastasis (19 metastasis per lungs) (**Fig. 3C**). These results show that TLR7 stimulation leads to increased number and size of lung metastases.

Given the implication of MDSC in metastasis occurrence (11-14) and the importance of MDSC in the pro-tumoral effect of TLR7 stimulation, we investigated the potential role of MDSC in the occurrence of metastases. For this, MDSC were depleted by the injection of anti-Gr1 mAbs, and number of metastasis was quantified. MDSC depletion led to a significant decrease in the number of metastases (mean of 2.5 metastasis per lungs) in TLR7-stimulated mice compared to mice that did not receive depleting antibody (mean of 6.5 metastasis per lungs) (**Fig. 3D**), showing that TLR7 stimulation increases the number of lung metastases through a mechanism involving MDSC.

High expression of TLR7 in tumor cells of adenocarcinoma patients is associated with increased metastasis gene expression signature

To determine the impact of TLR7 expression on metastasis process, we determined the prognostic value of TLR7 on a cohort of 144 adenocarcinoma patients (**Table 1**) displaying less than 5% of tumor cells expressing TLR7 or in which 100% tumor cells express TLR7. We found that, in this cohort of 144 patients, high TLR7 expression was associated with bad clinical outcome compared to low TLR7 expression, with a median OS of 45 months, compared to 90 months (**Fig. 4A**). We then selected twelve patients from this cohort, including six patients having low (less than 5%) and six having high TLR7 expression (100%), and performed gene expression analysis, using nanostring technology and pan cancer progression panel. We compared global gene expression, by using volcano plot analysis, and showed that among 770 genes analyzed, six were significantly over-expressed and five less expressed in TLR7 high patients compared to TLR7 low patients (**Fig. 4B**). Unsupervised clustering of differentially expressed genes between TLR7^{low} and TLR7^{high} patients, performed using heatmap, revealed a small cluster of three genes that are overexpressed in TLR7^{high} patients, that included ICAM1, KRT19, and KRT7. Additionally, NME1 and SDC4 were also found overexpressed in this group of patients (**Fig. 4C**). All of these genes are associated with tumor aggressiveness and invasive properties of tumor cells (15). Box plot analysis of these genes confirmed their overexpression (**Fig. 4D**). Interestingly, p53 was also found highly expressed in TLR7^{high} patients (**Fig. 4D**). We then searched for correlation between the level of gene expression and survival of adenocarcinoma lung cancer patients, using the public software KM plotter (16), and found that high expression of KRT7 and KRT19, as well as NME1 and p53 is significantly correlated with poor clinical outcome (**Fig. 4D**). Collectively, these data allow the identification of a gene signature associated to TLR7 tumoral expression, associated with poor clinical outcome, tumor aggressiveness and metastasis.

In patients, strong expression of TLR7 in tumor cells is associated to epithelio-mesenchymal transition:

To further investigate the possible involvement of EMT in patients with NSCLC, we investigated by immunohistochemistry E-cadherin expression, a protein associated to epithelial cells phenotype, and vimentin, a protein expressed by mesenchymal cells. The loss

of E-cadherin expression in cells is considered as an important step in EMT. Forty five patients with adenocarcinoma were analyzed for the expression of TLR7, E-cadherin and vimentin. Representative labeling are shown in **Fig. 5A**. Patients were split into two groups, expressing (TLR7⁺) or not TLR7 on tumor cells (TLR7⁻). A semi-quantitative count was performed to determine the expression of E-cadherin and vimentin. In TLR7⁺ patients, the expression of E-cadherin was significantly lower (31% of tumor cells expressing E-Cadherin) than in TLR7⁻ patients (46% of tumor cells expressing E-Cadherin) (**Fig. 5B**). Concomitantly, in TLR7⁺ patients, the expression of vimentin was higher (37% of tumor cells expressed Vimentin), than in TLR7⁻ patients (21% of tumor cells expressed Vimentin), (**Fig. 5C**). These results allow us to conclude that the strong expression of TLR7 on tumor cells in patients with NSCLC is associated with EMT.

Materials and Methods

Cell lines

LLC (Lewis Lung Carcinoma, ATCC CRL-1642) cells were supplied from American Type Culture Collection (ATCC). LLC-Luc cells were obtained from the laboratory of A. Alcover (Institut Pasteur, Paris). LLC were cultured in DMEM+GlutaMax (Gibco) with 10% heat-inactivated FCS and 1% Penicilin/streptomycin mixture. LLC-luc cells were cultured in same medium supplemented with 0.5mg/ml Hygromicine B. The cumulative culture length of the cells was fewer than 6 months after resuscitation. Early passage cells were used for all experiments and they were not reauthenticated.

Mice

The mouse strains used included WT C57Bl/6J, TLR7-deficient C57Bl/6J mice (B6.129S1-Tlr7tm1Flv/J strain) and NOD/SCID mice, purchased from Charles River Laboratories. These mice were maintained in the Central Animal facilities of the Centre de Recherche des Cordeliers, in standard pathogen-free conditions. Female mice, 6- to 8-week-old, were used for all experiments. All experiments were performed in accordance with European Union guidelines, and were approved by the Charles Darwin Ethics Committee in Animal Experiment, Paris, France (permit number: Ce5/2010/057 and 6629).

Reagents

CL264 (TLR7 agonist), Poly (I:C) (TLR3 agonist) and LPS (TLR4 agonist) (InvivoGen) were used at 400µg/mL and CpG (ODN 1826) (TLR9 agonist) (InvivoGen) was used at 300µg/mL of PBS for *in vivo* experiments. Anti-Gr1 antibodies (Clone RB6-8C5) and control antibody (LTF-2) from BioXCell were used at 200µg per injection in 100µl of PBS. D-luciferine K⁺ salt (Interchim) was used at 225mg/kg in 100µl of PBS.

Tumor progression and metastasis

To induce tumor formation, 1×10^6 cells LLC or LLC-Luc cells in PBS were grafted subcutaneously on day 0 into mice. Mice received injections of TLR7, TLR3, TLR4 or TLR9 agonist in the tumor (CL264 (40 µg/injection), Poly (I:C) (40 µg/injection), LPS (40

µg/injection) and CpG (30 µg/injection)) at day 0, 3 and 6 after grafting of tumor cells or every 3 days according to the experiments. Intraperitoneal injections of anti-Gr1 (200µg/injection, Clone RB6-8C5) or control antibody was performed every 48 hours when the tumors were palpable in mice (between day 6 and 10).

Tumor growth was measured every 2-3 days. The length (l), breath (b), depth (d) of the subcutaneous tumor in mice were measured with a caliper and the tumor volume calculated taking into account all the three values according to the ellipsoid volume calculation formula: tumor volume = $4/3 \times \pi \times l/2 \times b/2 = 0.5236 \times l \times b \times d$.

Metastases detection

In vivo imaging: Measurement of tumors and metastases was performed every 72 hours. Mice received an intraperitoneal injection of 100µL of D-luciférine K⁺ salt (Interchim) (225mg/kg) and after they were asleep by using Isofluran. Five minutes after injection of D-luciférine K⁺ salt, the signal was analyze by IVIS (Lumina II of Caliper).

Alternatively, the mice were sacrificed between days 22 and 24. The rib cage is excised and 1 ml of India ink (7.5% solution) was injected into the trachea. The lung was harvested and washed with 1X PBS. Separation of lobes and connectives tissues elimination was performed. The lungs are immersed and stored in 1ml of Feket solution (300ml of 70% ethanol, 30ml of 37% formaldehyde and 5 ml of glacial acetic acid). The counting of metastasis was then performed.

MDSC depletion validation:

Blood sample was recovered from mice via the retro-orbital sinus. The blood was placed in 50µl of heparin. A red blood cell lysis was carried out by adding 1mL ACK for 5 min, stopped by adding PBS-BSA-EDTA solution, followed by centrifugation. The supernatant was removed and 500µL of ACK are added, stopped by adding PBS-BSA-EDTA solution and followed by a second centrifugation. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 1ml of PBS 0.5% BSA 2 mM EDTA. The solution was filtered (70µm) and the cells are placed in 96-well plate (V-bottom) to perform the labeling. To verify MDSC depletion, membrane staining was performed with PECy7 anti-CD45 (Clone 30-F11, BD Pharmingen, 1/800), eF450 anti-CD11b (Clone M1/70, eBioscience, 1/100), PerCPCy5.5 anti-Gr1 (Clone RB6-8C5, BD Pharmingen, 1/100), PE anti-CD11c (Clone N418,

eBioscience, 1/100) and LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Life Technologies, L34959, 1/100).

Analysis of intra-tumor and spleen immunity by flow cytometry:

The mice were sacrificed at day 10 and the tumors and the spleens were harvested. They were cut into pieces and incubated for 30 min in 1 mL of a solution containing DNase I (10 μ L of a solution at 1mg/ml, Roche) and liberase TM (31 μ L of a solution at 2,5mg/ml, Roche). The solution was filtered (70 μ m) and the cells were placed in 96-well plate (V-bottom) to perform the labelling (2.10⁶ cells/well).

Cells were firstly incubated in blocking solution (24G2, 1mg/ml, 1/100), and the membrane staining was performed. For the FoxP3 and TLR7 analysis, this step was followed by a Fixation/Permabilisation step (eBiosciences Kit), used as recommended by the manufacturer of the kit and stained with the primary AF647 anti-FoxP3 antibody (Biolegend) or PE anti-TLR7 antibody (BD Pharmingen).

To identify the immune cell populations, membrane staining were performed with PECy7 anti-CD45 (Clone 30-F11, BD Pharmingen, 1/800), APC-eF780 anti-CD3 (Clone UCHT1, eBioscience, 1/100), PETR anti-CD4 (Clone GK1.5, Caltag, 1/100), AF700 anti-CD8 (Clone 53-6.7, eBioscience 1/100), PE anti-CD19 (Clone 1D3, BD Pharmingen, 1/100), BV605 anti-NK1.1 (Clone PK136, Biolegend, 1/50), FITC anti-CD11b (Clone M1/70, BD Pharmingen, 1/100), eF450 anti-CD11b (Clone M1/70, eBioscience, 1/100), BV786 anti-CD11c (Clone HL3, BD Pharmingen, 1/50), BV605 anti-Gr1 (Clone RB6-5C8, BD Pharmingen, 1/100), AF700 anti-F4/80 (Clone CI:A3-1, AbD serotec) and LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Life Technologies, L34959).

Staining was assessed with a FACS Fortessa cytometer, and flow cytometry data were analyzed using FACSDiva software (BD Biosciences) and FlowJO (Tree Star) software.

ELISA:

At day 10 after tumor inoculation, mice were sacrificed and tumors harvested, cut into pieces of 1 mm³ and weighed to the culturing plate in RPMI medium with 1% Penicilin/streptomycin and 1% Glutamine, in an amount of 6ml per gram of tumor. Tumors were cultured for 24h at 37°C with 5% CO₂. Then the supernatants were collected and stored at -80°C. Cytokine

production was then analyzed by using GM-CSF ELISA Ready-SET-Go! (88-7334-22), mouse CCL2 (MCP-1) ELISA Ready-SET-Go! (88-7391-22) and mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go! (88-7064-22) from eBiosciences respecting the protocols provided by the manufacturer.

MDSC sorting:

To perform MDSC sorting, membrane staining were performed with PECy7 anti-CD45 (Clone 30-F11, BD Pharmingen, 1/800), eF450 anti-CD11b eF450 anti-CD11b (Clone M1/70, eBioscience, 1/100), PerCPCy5.5 anti-Gr1 (Clone RB6-8C5, BD Pharmingen, 1/100) and LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit Life Technologies, L34959, 1/100). Sorting was assessed with a FACS Aria cytometer. During the sorting MDSC cells were received in 800µl of FCS. Cells were then centrifuged and cultured overnight in RPMI 1640 with 10% FBS, 2mM L-Glutamine, 50U/ml Penicilin, 50µg/ml Streptomycine, 5% NaPyruvate, 0.1% B-Mercaptoéthanol and 10% hepes.

Nitrate, ROS and H2O2 assay:

After culture overnight at 37°C 5%CO₂, the supernatant of MDSC was used for a Nitric oxide assay, by using the kit KGE001 from RnDSystems respecting the kit protocol, and for H₂O₂ assay, by using the Kit No A22188 (Invitrogen, Molecular Probes) respecting the kit protocol. Finally, cells were used to perform ROS assay by using Cell ROX Oxidative Stress Reagent (ThermoFisher Scientific) respecting the kit protocol.

T cells were purified from spleens using the T cell isolation columns respecting the kit protocol (Pan T cell Isolation Kit II, mouse, from Miltenyi). Following centrifugation, purified T cells were resuspended at 10⁶ cells/ml 5µM CFSE PBS BSA 0.1% solution for 10 min (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen). The reaction was terminated by the addition of 10 volumes of cold RPMI 1640 with 10% FBS, 2mM L-Glutamine, 50U/ml Penicilin, 50µg/ml Streptomycine, 5% NaPyruvate, 0.1% B-Mercaptoéthanol and 10% hepes. Labeled cells were washed twice with the same medium. In a U-bottom 96-well cell culture plate with or without anti-Biotin MACSiBead particles coupled with CD3ε-Biotin and CD28-Biotin (T Cell Activation/Expansion Kit, mouse, Miltenyi) for 72 h. To determine the impact of MDSC on T cell proliferation, CFSE labeled T cells were co-cultured with sorted Gr1+

CD11b+ tumor MDSC from LLC-luc bearing mice treated with or without TLR7 agonist and changes in proliferation was assessed by flow cytometry.

Patients:

A retrospective series of 144 NSCLC stage I-III patients who underwent primary surgery (without neoadjuvant chemotherapy) and who were operated between 2001 and 2005 was obtained from Hotel-Dieu hospital (Paris, France). Pathologic staging of lung cancer was reviewed and classified according to the new tumor–node–metastasis (TNM) classification 2009 (17), and histologic types were determined according to the classification of the World Health Organization (WHO; (18)). Lung tumor samples were analyzed with the agreement of the French ethic committee (agreement2008-133and201206-12) in accordance with article L.1121-1 of French law.

Immunohistochemistry:

Human tumor samples were fixed in neutral-buffered 10% formalin solution and paraffin embedded. TLR7 staining was performed as previously described (19) using TLR7-specific polyclonal antibody (ENZO Lifesciences) at 10 mg/mL. Positive staining was identified as a clear red perinuclear staining of the tumor cells. The expression level of TLR7 for each patient was determined as the average percentage of TLR7 expression by tumor cells for 10 fields at X20 magnification under a light microscope (Nikon eclipse, 80i).

The expression and subcellular localization of E-cadherin (Dako M3613, 1/100 dilution) and vimentin (Cells Signaling 5741, 1/100) by tumor cells was performed as follows. Serial 5- μ m tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and pretreated in 10 mM citrate buffer, pH 6, for antigen retrieval. Sections were incubated with hydrogen peroxide for 15 minutes, then blocked in 5% human serum for 30 minutes at room temperature. The slides were then incubated with a primary antibody (diluted in Dako real solution, antibody diluent) anti-E-cadherin (Dako M3613, 1/100 dilution) for one hour at room temperature or anti-vimentin (Cells Signaling 5741, 1/100) overnight. Slides were then incubated for 30 minutes at room temperature with the secondary antibody (anti-rabbit coupled to biotin, 1/200, JIR 715-066-150), followed by 30 minutes incubation with streptavidin-HRP (Dako, 1/300). After each incubation, the slides were washed 5 minutes with 1x TBS+0.04% Tween. Revelation was performed with the DAB kit (Dako, K3468) and stopped by placing slides in 1X TBS and

distillated water. Counter coloration was performed with hematoxylin (2 minutes) and mounted in glycergel (Dako, C0563).

Gene expression analysis:

Gene expression analysis was performed using nanostring technology. 20 µm of FFPE sections were obtained from paraffin blocks. The desparaffination was made adding 1 mL 100% clearene for 5 min at room temperature. After centrifugation the pellet was washed twice with 1 mL 100% ethanol. Protease digestion was performed by adding digestion buffer and protease form RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (AM1975), then samples were incubated 3h at 50°C and for 15 min at 80°C for RNA isolation. Nucleic Acid Isolation, Nuclease Digestion and Nucleic Acid Purification were made respecting the kit protocol of RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (AM1975). RNA quantification was performed by NanoDrop. 100ng of each sample were analyzed for PanCancer Progression Panel respecting the kit protocol of nCounter XT Gene Expression Assays of Nanosting.

Statistical analysis:

Statistical analysis for in vivo experiments was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) and using the R software (RFoundation for Statistical Computing; www.r-project.org).

All mice experiments were analyzed using two-way ANOVA method. Post hoc analysis with Bonferroni corrections were applied for pair-wise comparisons of tumor growth over time in different groups of mice. Tumor volumes at the endpoint of each experiment were compared using a nonparametric Mann–Whitney test with Bonferroni corrections for pair-wise comparisons. Mann–Whitney tests were also used to compare percentages and numbers of immune cells infiltrating the tumors in mice.

Overall survival (OS) curves were estimated by the Kaplan– Meier method and compared by the log-rank test. Survival comparison was adjusted for either imbalanced or prognostic baseline covariates using a Cox model. The OS was defined from the date of the surgery until the date of death or the last day of the patient's visit to the hospital.

Comparisons of the expression of Vimentin and E-Cadherin in TLR7⁺ ad TLR7⁻ patients were performed using a Mann–Whitney test, respectively.

References

1. Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, et al. TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2014 Sep 15;74(18):5008–18.
2. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 2004 Sep 1;64(17):6337–43.
3. Chun E, Lavoie S, Michaud M, Gallini CA, Kim J, Soucy G, et al. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep.* 2015 Jul 14;12(2):244–57.
4. Li Z-L, Ye S-B, OuYang L-Y, Zhang H, Chen Y-S, He J, et al. COX-2 promotes metastasis in nasopharyngeal carcinoma by mediating interactions between cancer cells and myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology.* 2015 Nov;4(11):e1044712.
5. Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1995 Jan;1(1):95–103.
6. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999 May 15;162(10):5728–37.
7. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Jun 20;25(18):2546–53.

8. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):10019–26.
9. Fridlender ZG, Buchlis G, Kapoor V, Cheng G, Sun J, Singhal S, et al. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 2010 Jan 1;70(1):109–18.
10. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 2004 Dec;4(12):941–52.
11. De Sanctis F, Solito S, Ugel S, Molon B, Bronte V, Marigo I. MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan;1865(1):35–48.
12. Kitamura T, Qian B-Z, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2015 Feb;15(2):73–86.
13. Schmid MC, Varner JA. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol.* 2010;2010:201026.
14. Srivastava MK, Zhu L, Harris-White M, Kar UK, Kar U, Huang M, et al. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PloS One.* 2012;7(7):e40677.
15. Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT, Seftor RE. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1996 Dec;15(4):507–25.
16. Szász AM, Lánckzy A, Nagy Á, Förster S, Hark K, Green JE, et al. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget.* 2016 Aug 2;7(31):49322–33.
17. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest.* 2009 Jul;136(1):260–71.
18. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J.* 2001 Dec;18(6):1059–68.

19. Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, et al. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest.* 2010 Apr;120(4):1285–97.

Figures

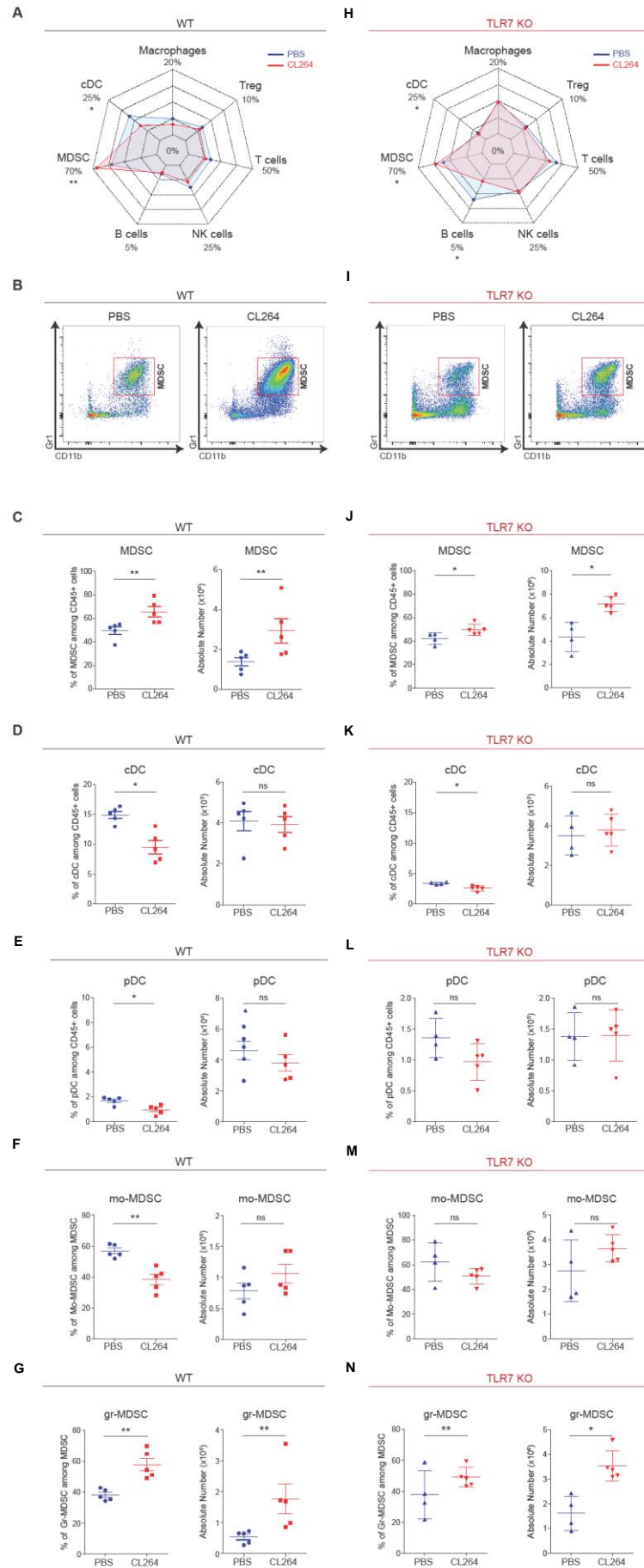


Figure 1: TLR7 stimulation leads to modification of intratumoral immune infiltrates

WT (**A-G**) or TLR7 KO (**H-N**) C57BL/6 mice were subcutaneously grafted with LLC cells, followed by 4 injections of CL264 (red) or PBS (blue), on days 0, 3, 6 and 9. At day 10, mice were sacrificed and tumors were harvested. Percentages and absolute numbers of immune cells were analyzed. Radar plots representation for immune cell subpopulations (**A**) and (**H**). Representative flow cytometry image of Gr1⁺CD11b⁺ MDSC cells in WT (**B**) and TLR7 KO mice (**I**), having received PBS or CL264. Percentages and absolute numbers of each cell population analyzed in WT (**C-G**) and in TLR7 KO mice (**J-N**). *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,0001. Data are mean ± SEM (5 mice/group). p values were calculated by Mann-Whitney test. ns = not significant. Each experiment was repeated three times.

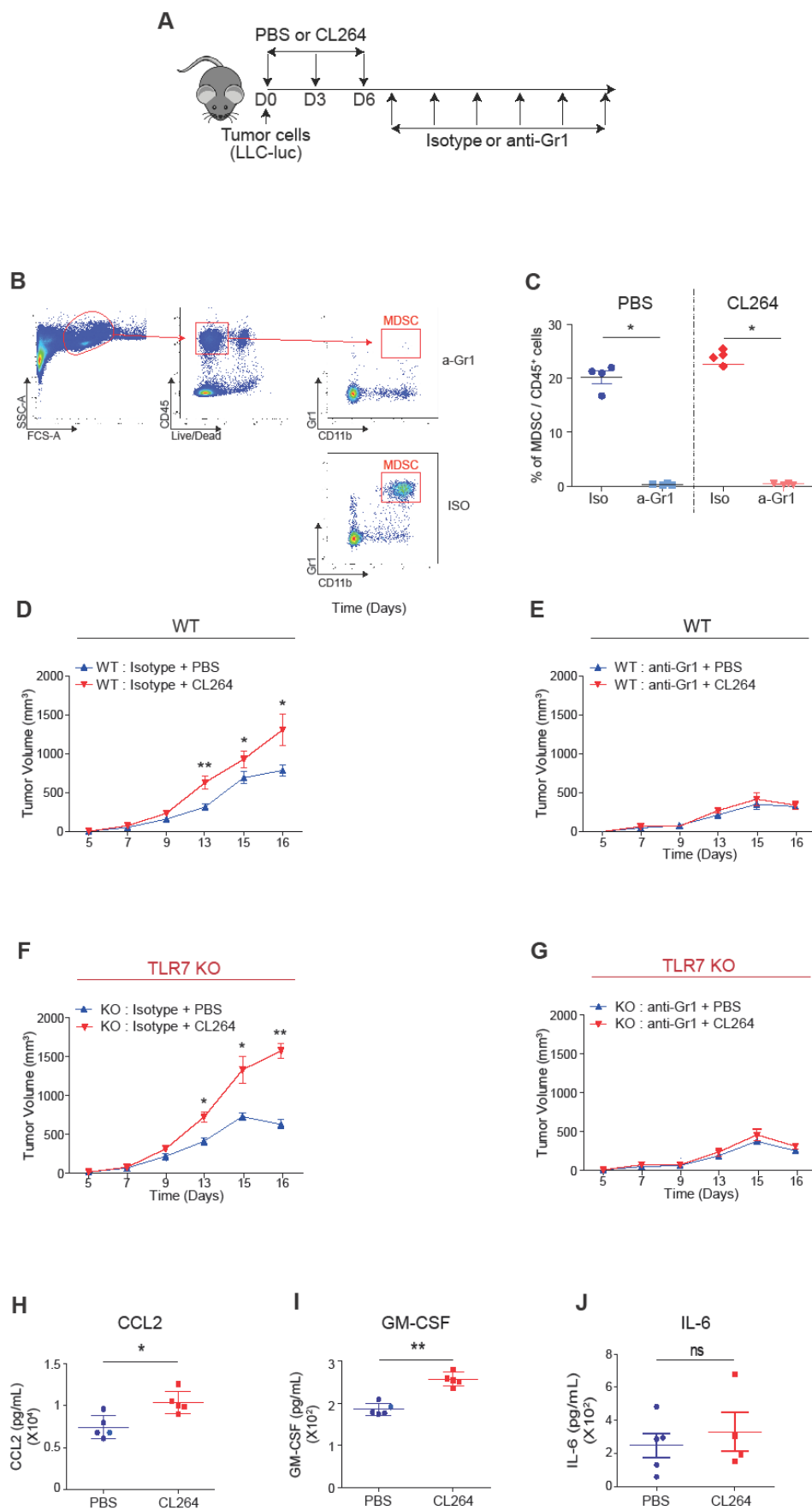


Figure 2: TLR7 stimulation leads to a pro-tumoral effect which is abrogated by MDSC depletion

Experimental design: WT C57BL/6 or TLR7 KO mice received subcutaneous injection of LLC cells, followed by intratumoral injections of CL264 or PBS, and intraperitoneal injections of anti-Gr1 or control antibody every 48 hours from the time the tumor is palpable in mice (between day 6 and 10) (A). Gating strategy for MDSC staining and representative FACS image showing the efficacy of MDSC depletion in the blood (B). Percentages of MDSC among total CD45⁺ cells in the blood is shown for all treated mice (C). Tumor growth in WT C57Bl/6 mice grafted with LLC cells after CL264 or PBS treatment and isotype antibody injections (D) or anti-Gr1 antibody injections (E). Tumor growth in TLR7 KO mice grafted with LLC cells after CL264 or PBS treatment and isotype antibody injections (F) or anti-Gr1 antibody injections (G). CCL2 (H), GM-CSF (I), and IL-6 (J) titrations. ELISA assays were performed on tumors harvested at day 10 from C57Bl/6 mice injected with LLC having received injections of CL264 (red) or PBS (blue), at days 0, 3, 6 and 9. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,0001. Data are mean ± SEM (5 mice/group). p values were calculated by Mann-Whitney test. ns = not significant. Each experiment was repeated three times.

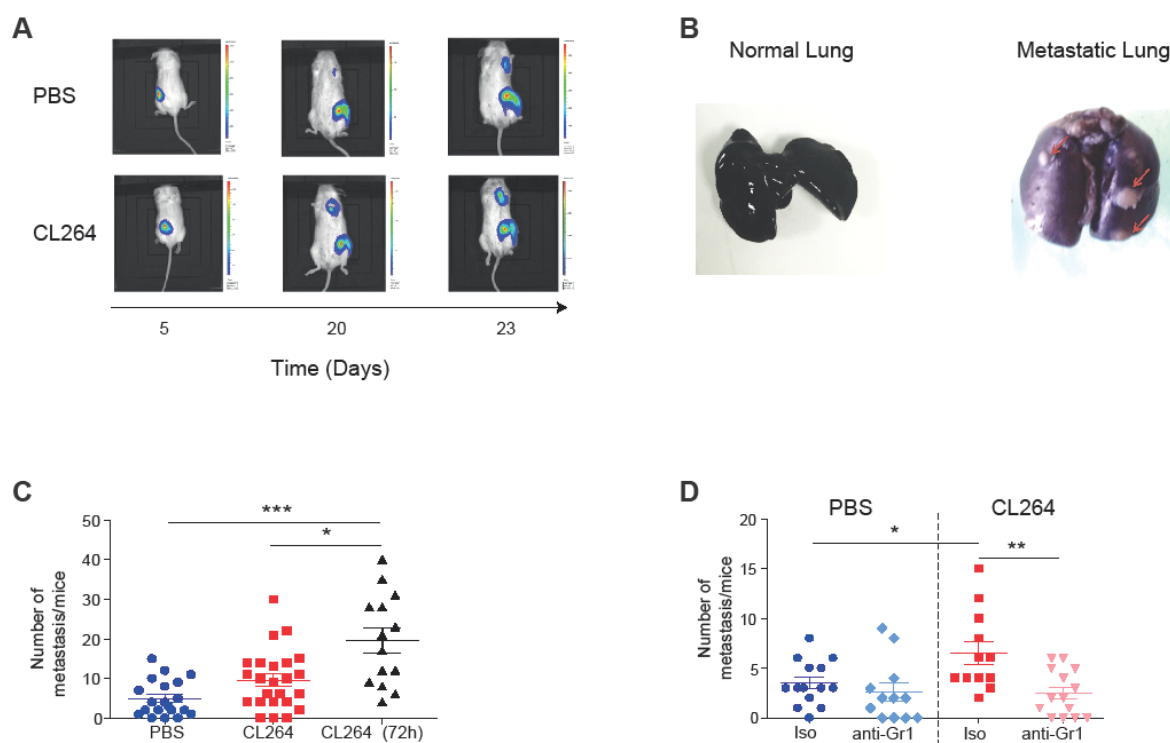


Figure 3: TLR7 stimulation leads to increased metastasis occurrence through MDSC recruitment.

NOD/SCID mice received subcutaneous injection of LLC-luc cells, followed by 4 injections of CL264 (red) or PBS (blue), on days 0, 3, 6 and 9. During all the experiment, in vivo tumor progression was analyzed by the measurement of bioluminescence. Mice received an intraperitoneal injection of D-luciférine K⁺ salt and after they were asleep by using Isofluran (**A**). C57Bl/6 mice received subcutaneous injection of LLC cells, followed by 4 injections of CL264 (red) or PBS (blue), on days 0, 3, 6 and 9, or injections of CL264 every 72 hours (black). Lungs were harvested at day 25 and stained with Indian ink to distinguish metastasis, which stay white after bath in Feket solution (**B**). Number of metastasis per lungs, determined in WT mice with CL264 or PBS injections (**C**). Number of metastasis per lungs, determined in WT mice treated with CL264 or PBS and with anti-Gr1 or control antibody every 48 hours from the time the tumor is palpable in mice (between day 6 and 10) (**D**). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$. Data are mean \pm SEM (10-25 mice/group). p values were calculated by Mann-Whitney test. ns = not significant. Each experiment was repeated three times.

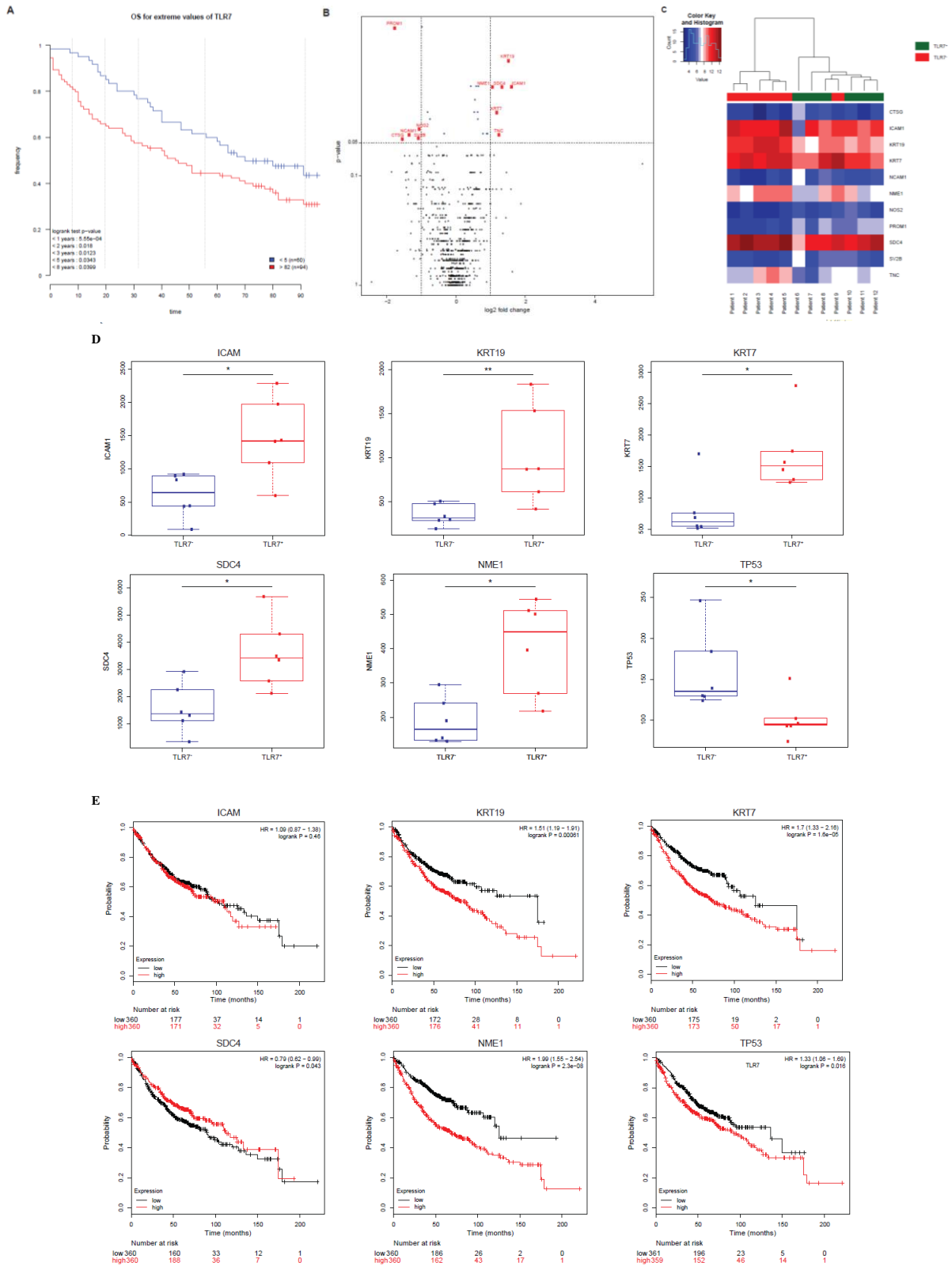


Figure 4: Metastatic gene signature associated to high TLR7 expression in a cohort of adenocarcinoma NSCLC patients

Kaplan-Meier survival curve for overall survival (OS) for the 144 adenocarcinoma patients divided in two groups according to the stratification of TLR7 expression. Optimal cutoff of 82% was previously determined (1). Patients are now divided into TLR7^{hi} group (>82% expression of TLR7) and TLR7^{low} (<5% TLR7 expression). *P* value was determined by log-rank test **(A)**. Gene expression analysis was performed in 12 adenocarcinoma patients including 6 with no TLR7 expression (TLR7⁻) and 6 with 100% TLR7 expression in tumor cells (TLR7⁺), by Nanostring technology. Volcano plot comparison of differentially expressed genes between TLR7⁺ and TLR7⁻ patients (n=6 patients per group). Genes are arranged along dimensions of biological and statistical significance. The horizontal dimension is the variation of gene expression (log₂ (ratio)) between the 2 groups, and the vertical axis represents the *p* value. In red are represented genes that are over- or under-expressed in TLR7⁺ patients, with a fold-change superior to 2 (11 genes among 770 studied) **(B)**. Hierarchical clustering of the 11 differentially expressed genes in TLR7⁺ compared to TLR7⁻ patients. Individual patients are oriented in columns and expression level for each gene is oriented in rows. Red, green and black colours of the heat-map represent the expression levels that are greater than, equal to, or less than the mean expression levels, respectively, in all samples **(C)**. Box plot representation of ICAM1, NME1, KRT19, P53, KRT7 and SCD4 gene expression in TLR7⁻ and in TLR7⁺ patients **(D)**. Kaplan-Meier survival curve for overall survival (OS) for adenocarcinoma NSCLC patients divided in two groups according to the stratification of ICAM1, NME1, KRT19, P53, KRT7 and SCD4 gene expression, using online survival analysis software KM plotter. *P* value was determined by log-rank test **(E)**.

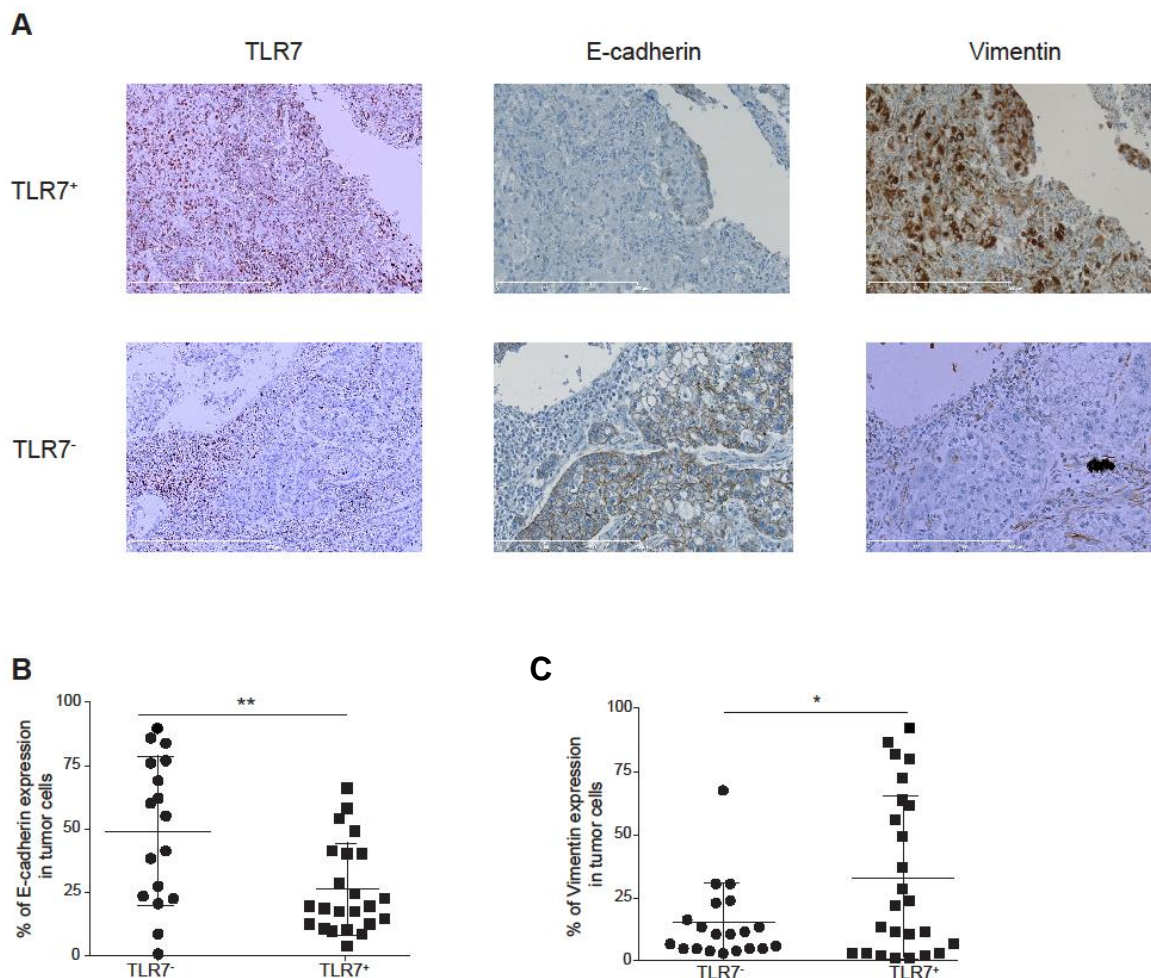


Figure 5: High expression of TLR7 by tumor cells is associated with the EMT in NSCLC patients.

Representative images of IHC staining of TLR7, E-Cadherin and Vimentin on tumor cells among patients with NSCLC. Images were taken at x20 magnification (A). Percentages of E-Cadherin- (B) and Vimentin- (C) expressing tumor cells in TLR7⁺ and TLR7⁻ patients among the cohort of NSCLC stage I to III patients who did not receive any treatment before the surgery (n=43). *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001. Data are mean ± SEM. p values were calculated by Mann-Whitney test.

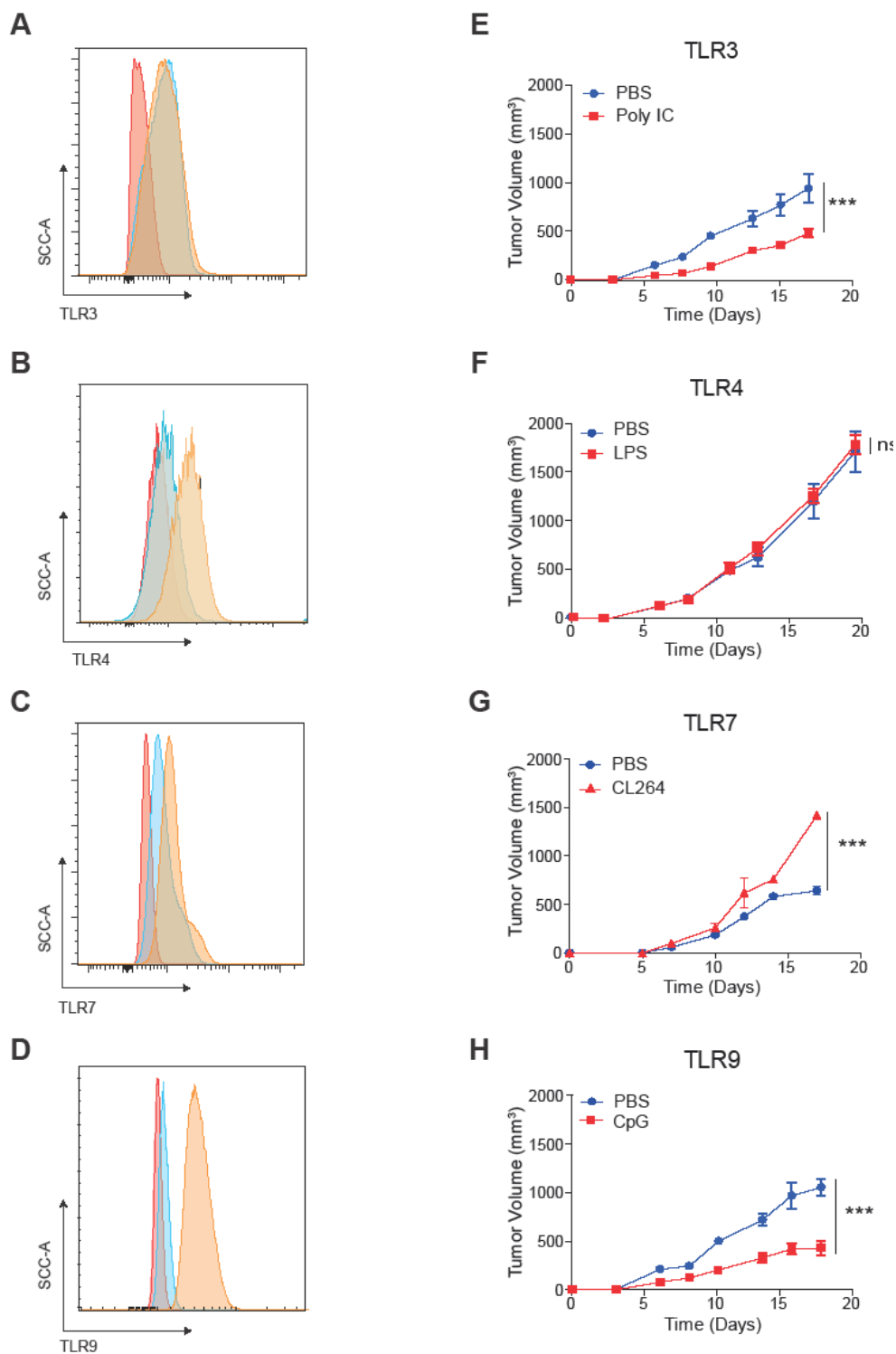


Figure S1: Pro- or anti-tumoral effects of different TLR stimulation

TLR3 (A), TLR4 (B), TLR7 (C) and TLR9 (D) expression profile by LLC cells, with unstain cells (red), isotype (blue) and stain cells (orange). Tumor progression in WT C57Bl/6 mice

grafted with LLC cells and injected with Poly (I:C) (**E**), LPS (**F**), CL264 (**G**) or CpG (**H**), at days 0, 3 and 6 (n=5 mice per experimental group). Each experiment was repeated three times. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001. Data are mean \pm SEM (5 mice/group). p values were calculated by Mann-Whitney test. ns = not significant. Each experiment was repeated three times.

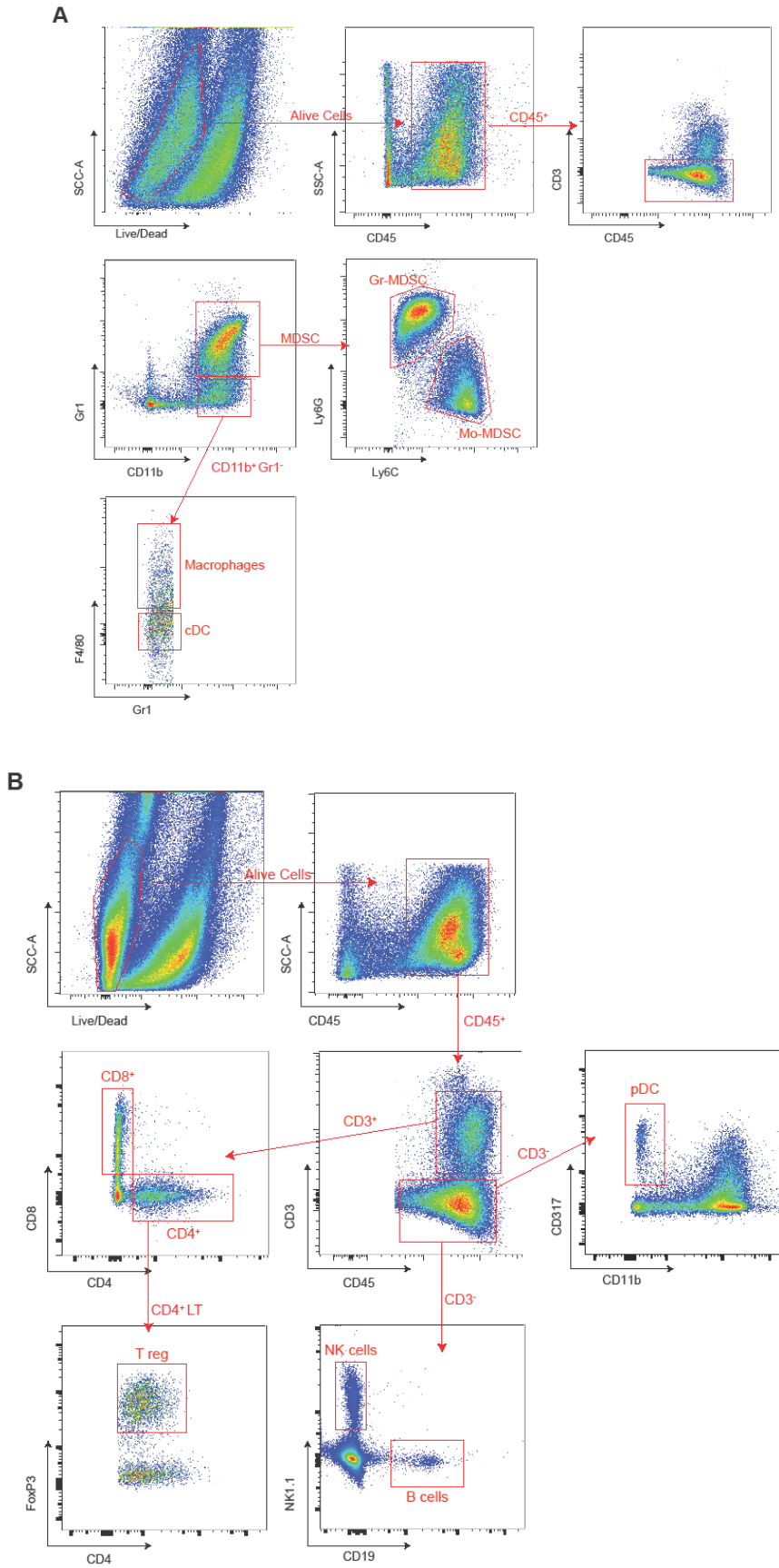


Figure S2: Gating strategy for panels of flow cytometry

For the different studies of immune system by flow cytometry, this gating strategy was used for the panel 1 **(A)** and panel 2 **(B)**. Alive cells and after immune cells (CD45⁺) were gated. Among the immune cells, CD3⁻ cells were gated and from these cells, MDSC and CD11b⁺ Gr1⁻ populations were determined. From CD11b⁺ Gr1⁻ populations we determined Macrophages and cDC, by using the F4/80 marker. From MDSC we differentiated two subpopulations: Mo-MDSC and Gr-MDSC, by using Ly6C and Ly6G markers **(A)**. Alive cells and after immune cells (CD45⁺) were gated. Among the immune cells, CD3⁻ cells and CD3⁺ cells were gated. Among CD3⁻ cells we gated on pDC (with CD11b and CD317 markers), NK cells (with NK1.1 marker) and B cells (with CD19 marker). Among the immune cells, CD3⁺ cells we gated on CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells (with CD4 and CD8 markers). Finally from CD4⁺ T cells we determined regulatory T cells by using FoxP3 marker **(B)**.

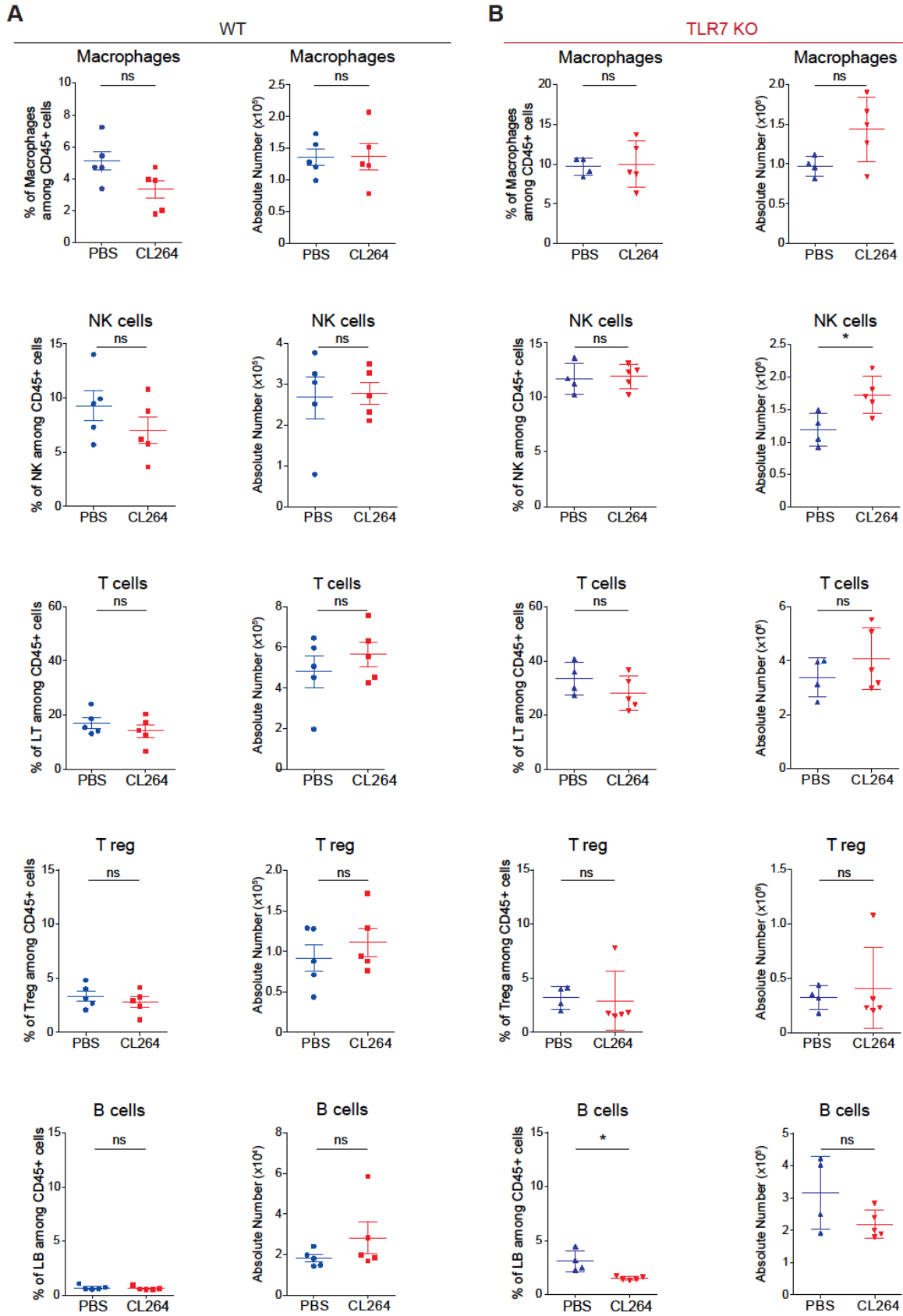


Figure S3: Analysis of immune infiltrates in tumors from WT and TLR7 KO mice with or without TLR7 stimulation

WT (A) or TLR7 KO (B) C57BL/6 mice received subcutaneous injection of LLC cells, followed by 4 injections of CL264 (red) or PBS (blue), on days 0, 3, 6 and 9. At day 10, mice were scarified and tumors were harvested and used for flow cytometry analyzes. Percentage and absolute number of immune cells were analyzed. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$. Data are mean \pm SEM (5 mice/group). p values were calculated by Mann-Whitney test. ns = not significant. Each experiment was repeated three times.

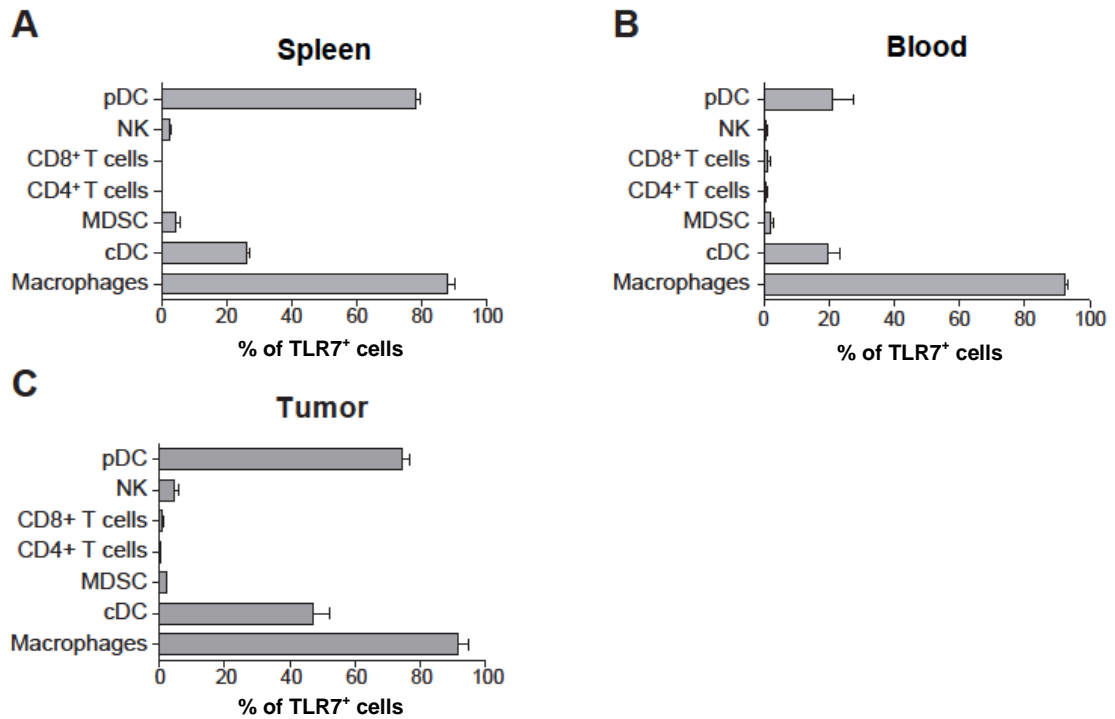


Figure S4: TLR7 expression by immune cells

Percentage of TLR7 expression was determined in immune cells in spleen (A), in blood (B) and in tumors (C) by flow cytometry in WT mice. Experiments were repeated at least two times.

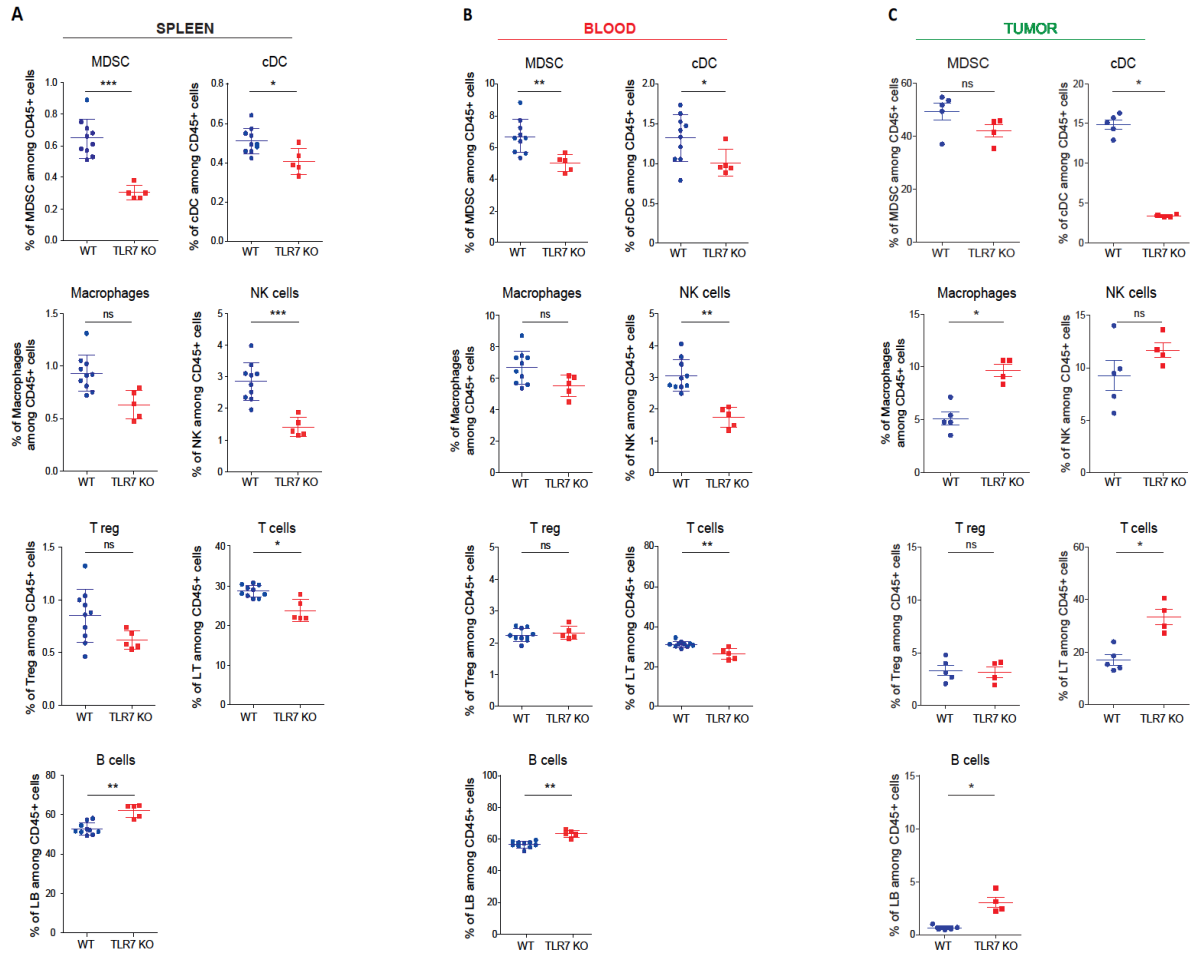


Figure S5: Immune cell compartments in spleen, blood and tumors of WT and TLR7 KO C57Bl/6 mice

Percentages of immune cell subpopulations among total CD45 cells in WT (blue) and in TLR7 KO (red) mice, determined in spleen (A), blood (B), and tumors (C). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$. Data are mean \pm SEM (5 mice/group). p values were calculated by Mann-Whitney test. ns = not significant. Each experiment was repeated three times.

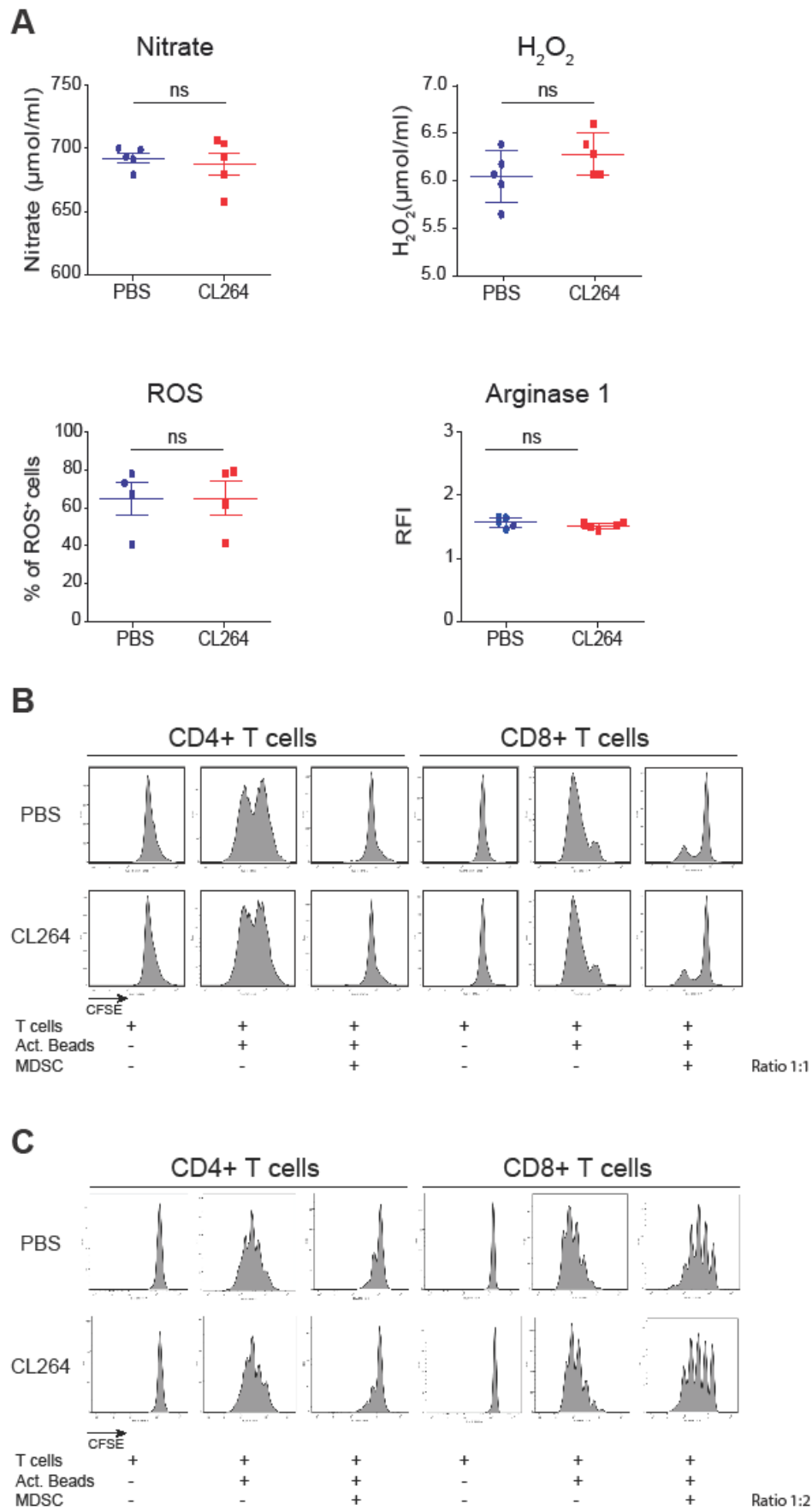


Figure S6: TLR7 stimulation doesn't modify the immunosuppressive properties of MDSC

WT C57BL/6 mice received subcutaneous injection of LLC cells, followed by intratumoral injections of CL264 (red) or PBS (blue). At day 10, MDSC were sorted from harvested tumors. Nitrate, H₂O₂, ROS and Arginase 1 production by MDSC sorted from tumors (**A**). Analyze of CD4 and CD8 T cell proliferation by CFSE labeling with or without activation beads (2 beads per cells) and with or without coculture with intra-tumoral MDSC (1:1) (**B**) or (1:2) (**C**) from mice injected with LLC-luc with or without CL264 treatment.

Résultats non publiés 1 : Etude des MDSC
chez les patients atteints de cancer du
poumon

Au cours de ces travaux, j'ai démontré les mécanismes impliqués dans l'effet pro-tumoral liés à la stimulation de TLR7 dans un modèle murin de cancer du poumon. L'injection d'agoniste de TLR7 induit l'activation du TLR7 présent au niveau des cellules tumorales, conduisant à une plus forte production de CCL2 et GM-CSF dans le microenvironnement tumoral. Ces productions induisent un fort recrutement de MDSC au sein de la tumeur, avec un fort infiltrat en MDSC granulocytiques. Ce recrutement de MDSC est nécessaire et primordial pour induire l'effet pro-tumoral, grâce aux propriétés immunosuppressives de ces cellules.

Au vu de l'importance des MDSC au sein de l'effet pro-tumoral à la suite de la stimulation de TLR7 dans notre modèle murin de cancer du poumon, nous avons souhaité vérifier si les mêmes observations étaient obtenues chez les patients. Nous avons donc utilisé des échantillons provenant de 7 patients atteints de cancer du poumon. A partir de ces échantillons, nous avons étudié le pourcentage de MDSC dans le microenvironnement tumoral, le poumon distant et le sang des patients par cytométrie en flux. Le pourcentage de MDSC a également été étudié dans le sang de 3 donneurs sains (**Figure 15**). Les résultats préliminaires montrent qu'il n'y a pas de variation du pourcentage de MDSC, de gr-MDSC et de mo-MDSC entre la tumeur et le poumon distant de patients (**Figure 15A, C, E**). De plus, lorsque nous comparons le pourcentage de MDSC, de gr-MDSC ou de mo-MDSC dans le sang de patients et de donneurs sains, aucune variation n'est observée (**Figure 15B, D, F**).

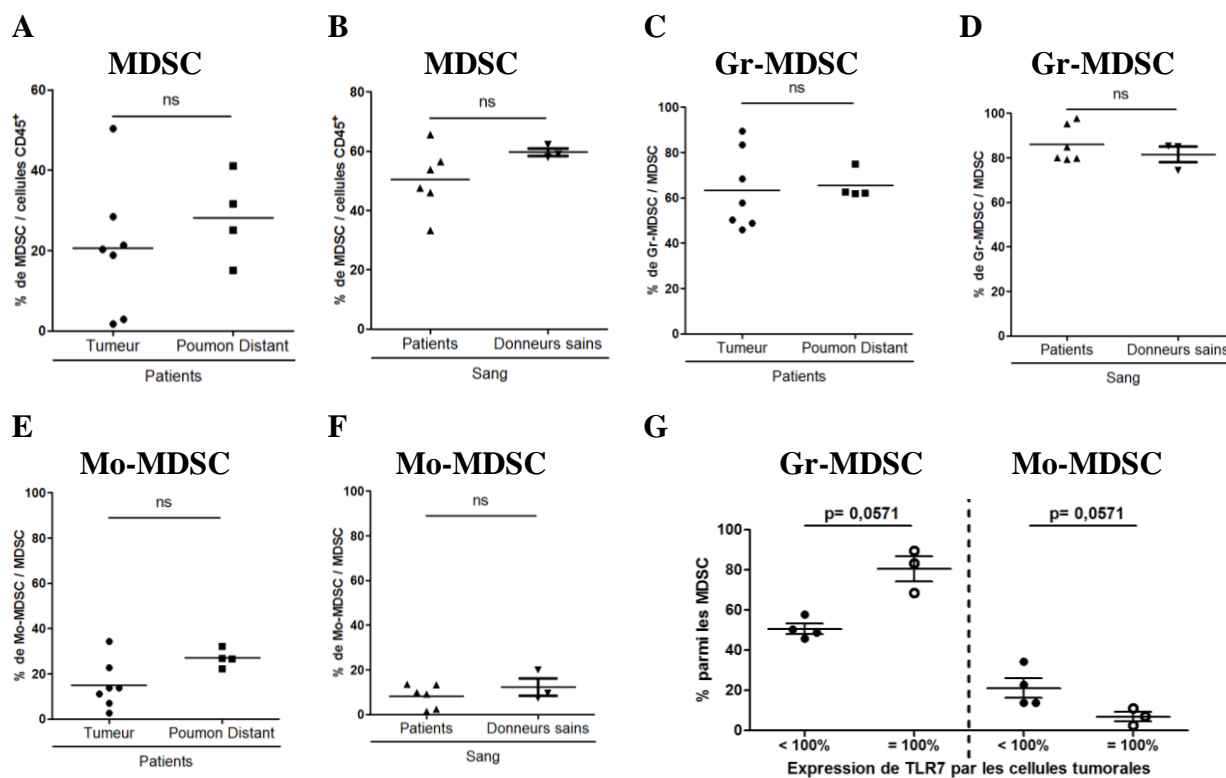


Figure 15 : Le pourcentage de MDSC chez des patients atteints de cancer du poumon et chez des donneurs sains.

Les tumeurs et les poumons distants de patients ont été dilacérés. Puis les tumeurs, les poumons distants et le sang ont été enrichis en cellules immunitaires, grâce à un gradient de densité (Polymorphprep). Les cellules immunitaires enrichies ont été récupérées, une lyse des globules rouges a été effectuée et les cellules ont été marquées afin de les analyser par cytométrie en flux.

(A) Pourcentage des MDSC dans les tumeurs et les poumons distants de patients.

(B) Pourcentage des MDSC dans le sang de patients et de donneurs sains.

(C) Pourcentage des Gr-MDSC dans les tumeurs et les poumons distants de patients.

(D) Pourcentage des Gr-MDSC dans le sang de patients et de donneurs sains.

(E) Pourcentage des Mo-MDSC dans les tumeurs et les poumons distants de patients.

(F) Pourcentage des Mo-MDSC dans le sang de patients et de donneurs sains.

(G) Distribution du pourcentage de Gr-MDSC et de Mo-MDSC dans la tumeur selon si les patients ont 100% ou moins de 100% d'expression du TLR7 au niveau de leurs cellules tumorales. Analyse statistique : Mann-Whitney

Nous avons également, pour les patients atteints de cancer du poumon, étudié l'expression de TLR7 par les cellules tumorales. Pour ce faire nous avons eu accès à des coupes en paraffine des tumeurs des patients, que nous avons marquées pour TLR7 par immunohistochimie. A la suite de quoi nous avons étudié s'il y avait un lien entre le niveau d'expression de TLR7 et le pourcentage de MDSC au sein de la tumeur. Il semblerait qu'il y ait une tendance à un plus fort recrutement de MDSC au sein de la tumeur lorsque les patients expriment à 100% le TLR7 au niveau des cellules tumorales, comparé aux patients qui l'expriment moins, mais cela n'est pas significatif. Nous avons également pu démontrer que

ces MDSC au sein de la tumeur sont plus enrichis en type granulocytique lorsque le TLR7 est exprimé par 100% des cellules tumorales (**Figure 15G**). De même, lorsque 100% des cellules tumorales expriment le TLR7, la proportion de MDSC de type monocytique est moindre (**Figure 15G**). Cette plus forte proportion de MDSC granulocytiques et cette diminution des MDSC monocytiques sont également retrouvées dans notre modèle murin de cancer du poumon à la suite de la stimulation de TLR7. Cela sous-entend que les résultats obtenus chez les souris peuvent être comparables à ce qu'il se passe chez les patients atteints de cancer du poumon. Ces résultats sont préliminaires et nous sommes actuellement en train d'augmenter le nombre de patients étudiés.

**Résultats non publiés 2 : Etude des ligands
naturels de TLR7 dans le cancer du
poumon**

A la suite de la démonstration des mécanismes expliquant les effets pro-tumoraux après la stimulation ou l'expression de TLR7, la seconde partie de mon projet portait sur l'identification des ligands agonistes de TLR7 dans le microenvironnement tumoral chez les patients atteints de cancer du poumon. Chez la souris, nous avons injecté de l'agoniste de TLR7, et chez l'homme, il est démontré qu'une stimulation de TLR7 conduit à une surexpression de TLR7 (Miettinen et al., 2001). Nous avons donc étudié si, dans le microenvironnement des patients atteints de cancer du poumon, cette surexpression de TLR7 pouvait s'expliquer par la présence de ligands de TLR7.

Pour cela, nous avons mis en culture des morceaux de tumeurs provenant de patients atteints de cancer du poumon dans du milieu pendant 24 heures à 37°C, 5% de CO₂. Nous avons récupéré les surnageants et nous les avons testés sur des lignées reportrices HEK-Blue TLR7 et Null1k (Invivogen). Ces lignées ont la particularité d'avoir, sous la dépendance de NF-κB, l'expression d'une enzyme reportrice : la SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase). Lorsque cette enzyme est produite, le dépôt du substrat de la SEAP permet de suivre l'activation de NF-κB grâce à des dosages par colorimétrie. La lignée HEK-Blue Null1k n'exprime pas le TLR7, tandis que la lignée HEK-Blue TLR7 exprime de façon stable le TLR7. C'est pourquoi, en comparant l'activation de ces deux lignées lors de la mise en présence d'agoniste de TLR7 ou de surnageant de culture des tumeurs, nous pouvons quantifier l'activation de TLR7.

Nous avons testé 18 patients (**Figure 16**). Certains de ces patients ne semblent pas avoir de ligands de TLR7 au sein de leur microenvironnement tumoral (8/18), car le niveau d'activation de TLR7 est en dessous du seuil de positivité (équivalent à 5 écart-types). En revanche, chez les 10 autres patients, le surnageant de culture de la tumeur active le TLR7. Il est à noter que cette activation est variable selon les patients. En effet, chez le patient 10 (P10), par exemple, l'activation de TLR7 est extrêmement importante. Nous démontrons donc clairement que, chez certains patients, du ligand de TLR7 est présent dans le microenvironnement tumoral. Ces travaux sont en cours et il nous faut maintenant déterminer le niveau d'expression de TLR7 par les cellules tumorales chez ces patients et étudier s'il y a une corrélation entre la présence de ligand et le niveau d'expression de TLR7.

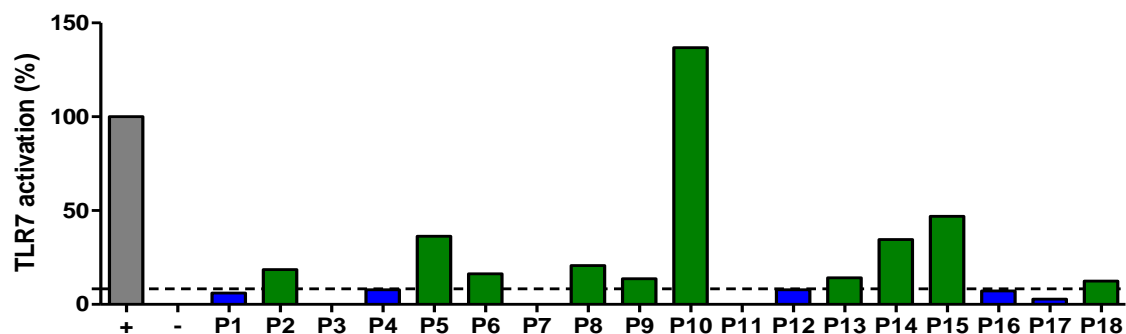


Figure 16: La présence de ligand de TLR7 dans le microenvironnement tumoral de certains patients atteints de cancer du poumon.

Etude de l'induction de l'activation de TLR7 (en pourcentage) grâce à l'utilisation de lignées reportrices contrôles et de TLR7 (HEK-Blue Null1k et HEK-Blue TLR7). (+) : contrôle positif : agoniste spécifique de TLR7 (CL264). Il est considéré comme 100% de l'activation du TLR7. (-) : contrôle négatif : milieu de culture seul. Il est considéré comme 0% de l'activation de TLR7. Pour chaque patient un morceau de tumeur est mis en culture dans du milieu pendant 24 heures à 37°C 5% CO₂. Puis le surnageant est prélevé et testé sur les lignées reportrices (HEK-Blue Null1k et HEK-Blue TLR7). Les patients atteints de cancer du poumon considérés comme ayant un ligand de TLR7 présent dans le microenvironnement tumoral sont représentés en vert et sont identifiés grâce au seuil de positivité, soit 5 écart-types.

A la suite de cela, nous avons poursuivi nos investigations sur l'origine de ces ligands. Nos études démontrent que le TLR7 est impliqué dans des effets pro-tumoraux chez les patients atteints de cancer du poumon. Le TLR7 est un récepteur de motifs moléculaires associés aux pathogènes ou aux signaux de danger. C'est pourquoi nous avons tout d'abord souhaité savoir si certains pathogènes pouvaient être à l'origine de cet effet pro-tumoral chez les patients.

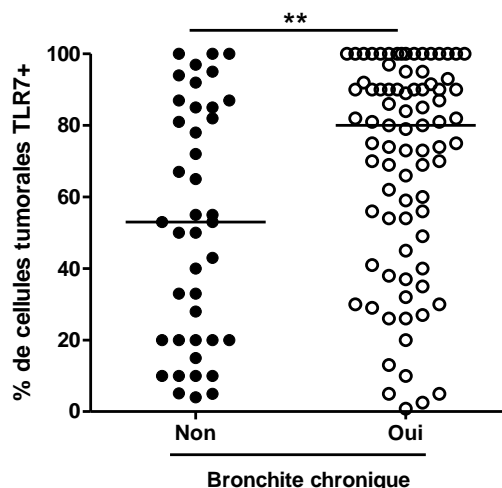


Figure 17 : Le développement d'une bronchite chronique est associé à une plus forte expression de TLR7 par les cellules tumorales, chez les patients atteints de cancer du poumon.

Distribution du pourcentage de cellules tumorales TLR7 positives pour 123 patients, selon qu'ils ont développé une bronchite chronique ou pas. Analyse statistique : Mann-Whitney.

L'analyse des données cliniques des patients montre que certains d'entre eux développent une bronchite chronique. Nous avons cherché à analyser si l'infection par un pathogène pouvait influencer l'expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales (**Figure 17**). Ainsi, nous avons mis en évidence que, chez les patients atteints d'un cancer du poumon exprimant TLR7, le développement d'une bronchite chronique était associé à une plus forte expression de TLR7 par les cellules tumorales.

Au vu des résultats obtenus à partir des données sur les infections bronchiques et compte tenu du fait que le récepteur que nous étudions est connu comme un récepteur à ARNs b d'origine virale, nous avons étudié l'impact de virus à ARN simple brin sur le cancer du poumon. Nous avons sélectionné deux virus à ARNs b : l'IAV et le RSV qui ont les capacités d'activer le TLR7. Ces deux virus se développent dans les voies respiratoires et affectent des tranches d'âge qui sont concordantes avec celles des patients atteints de cancer du poumon.

Nous avons utilisé notre modèle de cancer du poumon murin. Les souris immunocompétentes ont été greffées avec 10^6 cellules tumorales (LLC-luc) en sous cutanée. Par la suite, lorsque les tumeurs sont palpables, les souris ont reçu une injection intratumorale de PBS (contrôle négatif), d'agoniste de TLR7 (contrôle positif), ou de virus. Pour chaque virus, deux doses ont été testées. Les doses utilisées ont été déduites des expériences

in vitro réalisées en parallèle. Ainsi nous avons infecté les souris avec 100 000 pfu et 350 000 pfu pour le RSV et avec 1 000 pfu et 10 000 pfu pour l’IAV.

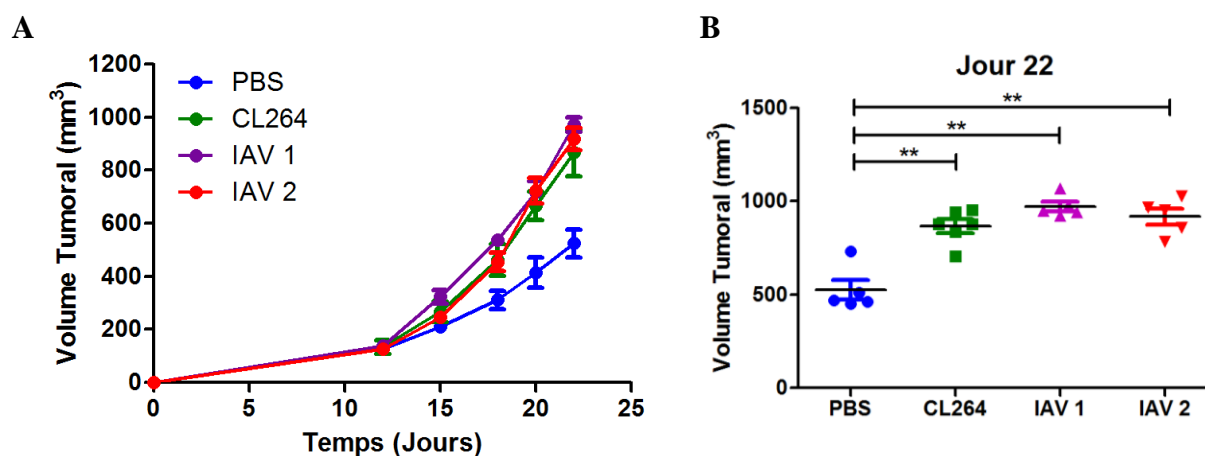


Figure 18: L’infection par l’IAV induit un effet pro-tumoral.

(A) Etude de la pousse tumorale au cours du temps chez des souris immunocompétentes greffées avec 10^6 cellules tumorales (LLC-luc) et injectées avec du PBS (contrôle -), du CL264 (contrôle +), 1 000 pfu (IAV 1) ou 10 000 pfu (IAV 2) d’IAV.

(B) Etude de la pousse tumorale au jour 22 de l’expérience présentée en (A)

Analyse statistique : Mann-Whitney.

Lorsque les souris sont infectées en intra-tumoral par différentes doses d’IAV, une augmentation significative de la croissance tumorale est observée au cours du temps (**Figure 18A**). Ces deux doses conduisent à des effets pro-tumoraux équivalents entre eux mais également équivalents aux effets pro-tumoraux induits par l’injection d’agoniste de TLR7 (**Figure 18B**). Nous avons également testé des doses plus faibles d’IAV (100 pfu et 350 pfu), mais aucun effet sur la pousse tumorale n’a été observé sur des études d’environ 30 jours (données non montrées). Une forte dose d’IAV est donc nécessaire pour induire une augmentation du volume tumoral comparé aux souris contrôles.

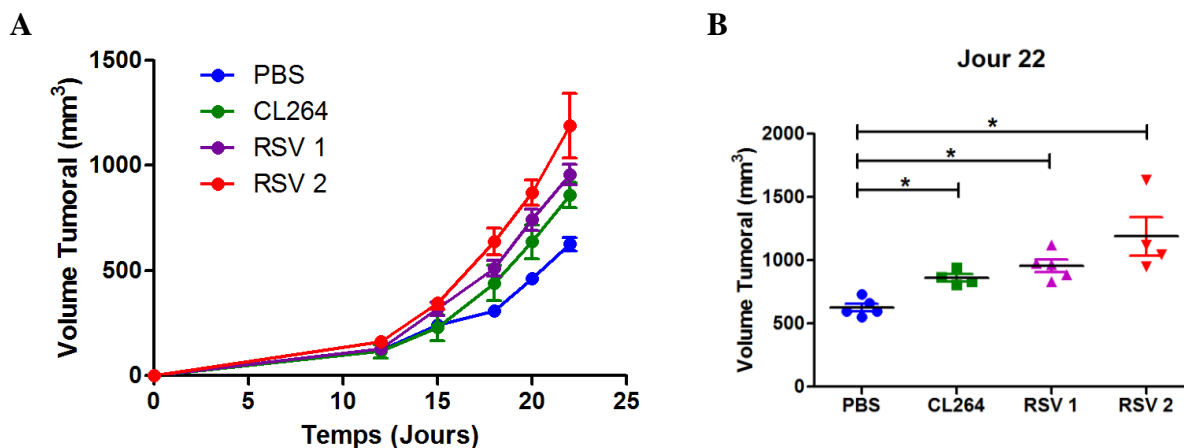


Figure 19 : L'infection par le RSV induit un effet pro-tumoral.

(A) Etude de la pousse tumorale au cours du temps chez des souris immunocompétentes greffées avec 10^6 cellules tumorales (LLC-luc) et injectées avec du PBS (contrôle -), du CL264 (contrôle +), 100 000 pfu de RSV (RSV 1) ou 350 000 pfu de RSV (RSV 2).

(B) Etude de la pousse tumorale au jour 22 de l'expérience présentée en (A)

Analyse statistique : Mann-Whitney.

Lorsque les souris sont infectées en intra-tumoral avec différentes doses de RSV, une augmentation significative de la croissance tumorale est observée au cours du temps (**Figure 19A**). En effet, l'infection par le RSV conduit à un plus gros volume tumoral mesuré et cet effet est d'ailleurs supérieur à l'effet pro-tumoral observé lors de l'injection d'agoniste de TLR7 en intra-tumoral (**Figure 19B**).

Nous nous sommes donc intéressés au microenvironnement tumoral lors de l'infection avec le RSV afin d'étudier ce qui pourrait expliquer cette augmentation de la pousse tumorale. Une étude préliminaire du compartiment des cellules T au sein du microenvironnement tumoral chez les souris contrôles et infectées avec le RSV, semble indiquer qu'il y a moins de cellules T au sein du microenvironnement tumoral lorsque les souris sont infectées avec le RSV. De plus, parmi ces cellules T, il semblerait que le pourcentage de cellules T $CD4^+$ soit moins important que chez les souris contrôles, alors que le pourcentage de cellules T $CD8^+$ semble lui plus important.

Nous démontrons donc ici que l'infection par ces virus (IAV et RSV) conduit à une augmentation significative de la pousse tumorale. Il semblerait également que l'infection par le RSV *in vivo* induise des modifications du système immunitaire intra-tumoral.

CONCLUSIONS

Les travaux que je viens de présenter m'ont permis de comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet pro-tumoral et pro-métastatique dû à la stimulation de TLR7 (**Figure 20-21**). De plus, j'ai mis en évidence la présence de ligand chez certains patients atteints de cancer du poumon et j'ai commencé à investiguer les ligands qui pourraient, chez les patients, expliquer qu'une forte expression de TLR7 soit associée à un mauvais pronostic de survie.

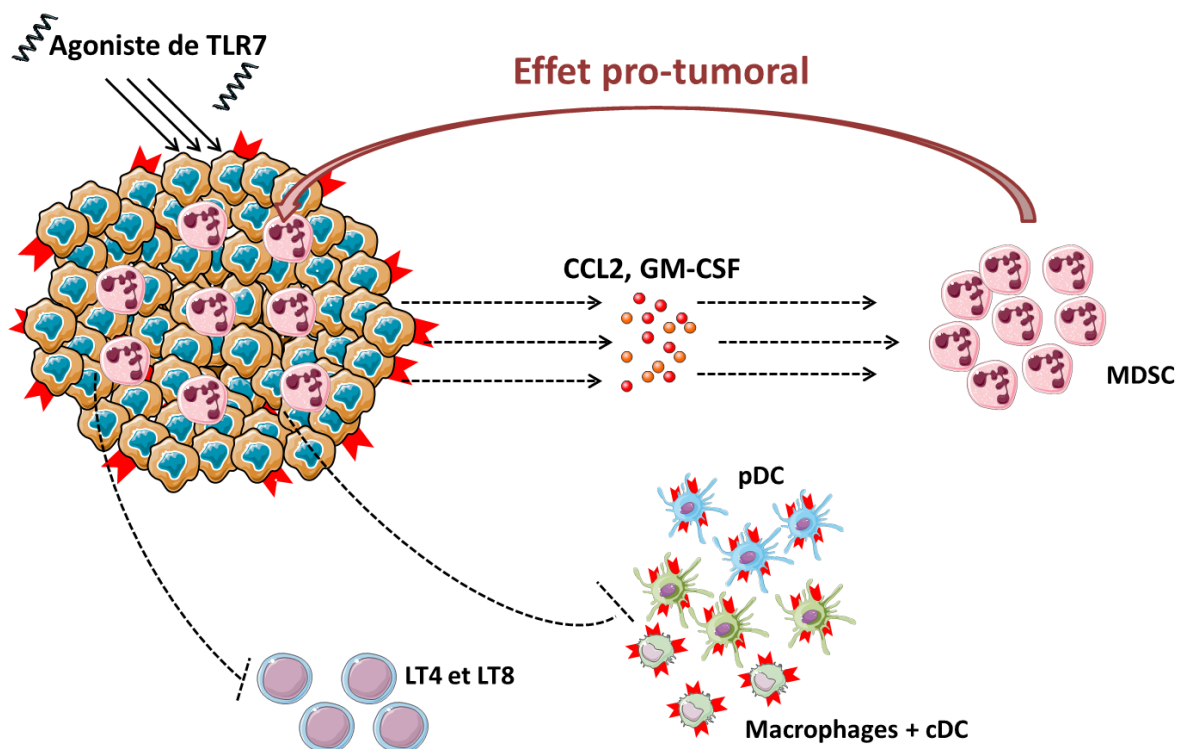


Figure 20 : Schéma bilan des mécanismes mis en évidence dans l'effet pro-tumoral après stimulation de TLR7.

La stimulation du TLR7 présent sur les cellules tumorales induit une production plus importante de CCL2 et GM-CSF, ce qui permet un recrutement plus important de MDSC dans le microenvironnement tumoral. Au sein de la tumeur, grâce à leurs propriétés immunosuppressives les MDSC vont induire un effet pro-tumoral.

Dans un modèle murin de cancer du poumon, j'ai démontré que l'injection d'agoniste de TLR7 induit un effet pro-tumoral, dû à la stimulation directe des cellules tumorales. Ces cellules tumorales stimulées vont avoir une production plus importante de CCL2 et GM-CSF, cytokines connues comme impliquées dans le recrutement des MDSC. Elles vont, dans notre modèle, conduire à un plus fort recrutement de MDSC dans le microenvironnement tumoral. Au vu des propriétés immunosuppressives de ces MDSC et de l'impact sur l'effet pro-tumoral lorsque nous les déplaçons, nous pouvons affirmer que c'est leur présence en plus grand nombre au sein de la tumeur qui conduit à cet effet pro-tumoral à la suite de la stimulation de

TLR7. Enfin, j'ai démontré que les propriétés immunosuppressives de ces MDSC, avec ou sans stimulation de TLR7, ne sont pas augmentées (**Figure 20**).

Chez l'homme, la poursuite des expériences nous permettra de dire si une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales serait associée à un plus fort recrutement des MDSC au sein de la tumeur. Actuellement, nous pouvons affirmer que chez les patients atteints de cancer du poumon dont 100% des cellules tumorales expriment le TLR7, une proportion de MDSC granulocytiques plus importante et une proportion de MDSC monocytiques moins importante sont observées.

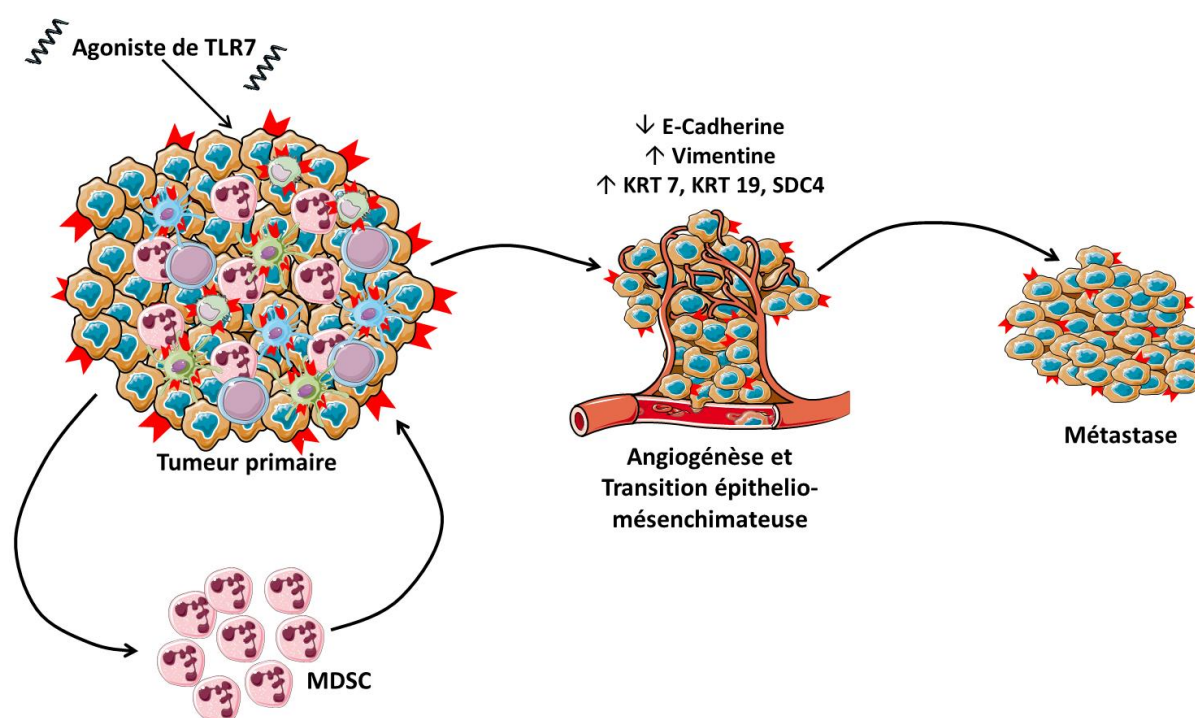


Figure 21 : Schéma bilan de l'effet pro-métastatique induit par la stimulation de TLR7.

Le TLR7 exprimé au niveau des cellules tumorales est stimulé par l'agoniste, permettant à un recrutement plus important des MDSC au sein de la tumeur, initiant l'EMT (diminution de l'expression d'E-Cadherine et augmentation de l'expression de Vimentine, associée à l'expression de facteurs pro-métastatiques, tels que Kératine 7 et 19, ainsi que Syndecan-4), induisant le développement de métastases à distance.

Nous avons également démontré que le TLR7 conduit à un effet pro-métastatique, avec un nombre plus important de métastases pulmonaires lorsque le TLR7 est stimulé (**Figure 21**). Cet effet implique également le recrutement de MDSC au sein de la tumeur, puisque lorsque nous déplaçons cette population, le nombre de métastases pulmonaires diminue.

Chez les patients, nous avons également démontré qu'une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales est associée à une plus faible expression d'E-Cadherine et une plus forte expression de Vimentine, comparé aux patients exprimant faiblement le TLR7. Cette forte expression de TLR7 est également associée à un profil pro-métastatique, avec une augmentation, au niveau transcriptionnel, de l'expression de KRT19, KRT7, NME1 et SDC4, qui sont des molécules associées à l'invasion et au développement de métastases (Hendrix et al., 1996).

Enfin, dans la seconde partie de mon projet, j'ai essayé de comprendre ce qui pourrait induire la stimulation de TLR7 chez les patients. J'ai tout d'abord démontré que chez certains patients, des ligands de TLR7 sont présents dans le microenvironnement tumoral, alors que chez d'autres aucun agoniste de TLR7 n'est détecté.

En étudiant les possibles origines des ligands, j'ai démontré que les patients atteints d'un cancer du poumon, ayant eu une bronchite chronique, ont un pourcentage d'expression de TLR7 par les cellules tumorales plus important que les patients n'ayant pas développé de bronchites chroniques. Cela pourrait indiquer que ces bronchites chroniques peuvent avoir un lien avec l'expression de TLR7 par les cellules tumorales. Nous ne connaissons pas la nature de ces bronchites, virales ou bactériennes, car ces données ne sont pas accessibles. Nous ne pouvons donc pas savoir si l'origine de l'infection bronchite chronique a un impact sur l'expression du TLR7.

Mon travail se concentrant sur le TLR7 (récepteur à ARNs d'origine viral), j'ai étudié l'impact de différentes infections virales sur la progression tumorale dans notre modèle de cancer du poumon. J'ai démontré que l'infection par l'IAV ou par le RSV, conduisait à une augmentation de la croissance tumorale. Il se pourrait donc que des virus respiratoires soient responsables de l'effet pro-tumoral observé chez les patients avec une forte expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales.

Chez les souris, il semblerait également que l'infection par le RSV conduise à : (1) une diminution du pourcentage de cellules T dans la tumeur, (2) un plus faible infiltrat en cellules T CD4⁺ et (3) un infiltrat en cellules T CD8⁺ plus important. Il est donc nécessaire d'approfondir ces recherches afin de comprendre le mode d'action de ce virus.

Mes travaux de thèse ont donc permis de mettre en évidence les mécanismes associés aux effets pro-tumoraux de TLR7 dans le cancer du poumon. Ils ont également permis de commencer à comprendre ce qui, chez l'homme, pourrait conduire à la stimulation de TLR7 au sein du cancer du poumon. Enfin, ces travaux ont ouvert un champ de recherches sur l'impact des virus respiratoires sur la progression tumorale dans le cancer du poumon, ce qui n'avait jamais été étudié.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Partie I : Effet pro-tumoral et pro-métastatique de TLR7 médié par les MDSC dans le cancer du poumon

1. Effet de la stimulation directe de TLR7 au niveau des cellules tumorales

Il a été démontré au laboratoire qu'au sein du microenvironnement tumoral du cancer du poumon, ce trouvé un infiltrat immunitaire intra tumoral comprenant des cellules T et B, des MDSC, des DC, des macrophages et des cellules NK. Certaines cellules immunitaires sont organisées en TLS, retrouvées en périphérie des tumeurs et associées à un bon pronostic de survie, tout comme la présence des cellules T CD8⁺ (Goc et al., 2014). Le TLR7 est exprimé par certaines de ces cellules, telles que les cellules B et les pDC, mais chez certains patients le récepteur est également exprimé par les cellules tumorales et est associé à un mauvais pronostic de survie (Chatterjee et al., 2014; Cherfils-Vicini et al., 2010). Nous avons développé un modèle murin de cancer du poumon afin d'étudier les mécanismes pouvant expliquer l'effet pro-tumoral associé à TLR7.

Dans notre modèle, nous démontrons que la stimulation de TLR7 est associée à un effet pro-tumoral. L'équipe d'Ochi travaillant sur le carcinome pancréatique démontre également un effet pro-tumoral associé à TLR7. Chez les patients atteints de carcinome pancréatique, l'expression de TLR7 est observée au niveau des cellules tumorales, alors que celle-ci n'est pas retrouvée au niveau des tissus sains. Dans cette étude, les auteurs étudient également un modèle inductible murin de carcinome pancréatique, dans lequel l'expression anormale de TLR7 au niveau des cellules tumorales est également retrouvée. Enfin, la stimulation de TLR7 dans ce modèle conduit à une accélération de la croissance tumorale (Ochi et al., 2012). Ces résultats sont donc comparables à ce que nous observons dans notre modèle de cancer du poumon. Dans les articles associant TLR7 à un effet anti-tumoral, le TLR7 n'est pas exprimé par les cellules tumorales et sa stimulation conduit à une meilleure maturation des cellules dendritiques, conduisant à des réponses anti-tumorales plus efficaces (Aspord et al., 2014; Le Mercier et al., 2013; Zhou et al., 2015; Zhu et al., 2015). Dans notre modèle les mécanismes sont différents, c'est pourquoi nous ne retrouvons pas les mêmes résultats.

L'utilisation de souris déficientes pour TLR7, nous a permis de mettre en évidence que ce sont les cellules tumorales qui sont directement stimulées par l'agoniste de TLR7. Par la suite, nous souhaiterions réaliser ces expériences en utilisant des lignées de cancer du poumon

déficientes pour TLR7. Nous sommes actuellement en train de produire ce type de lignées cellulaires grâce à l'utilisation de la technologie CRISPR (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats). Cette technique permet de manipuler le génome grâce à une séquence d'ARN guide qui conduit à la découpe de l'ADN correspondant cible, rendant le gène déficient. Une fois la lignée tumorale mise en place, nous testerons l'injection de lignées cellulaires murines de cancer du poumon de type sauvage et déficientes pour TLR7 chez des souris de type sauvage et déficientes pour TLR7. Ainsi nous pourrions confirmer que c'est le TLR7 présent au sein des cellules tumorales qui est nécessaire à l'effet pro-tumoral.

L'injection d'agoniste de TLR7 dans le carcinome baso-cellulaire et la kératose actinique est très efficace et autorisée à des fins thérapeutiques chez les patients (Lebwohl et al., 2004; Schulze et al., 2005). De nouveaux essais cliniques sont actuellement en cours afin d'étudier l'impact de l'injection d'agoniste de TLR7 dans un grand nombre de tumeurs solides. Au vu de nos résultats et ceux de l'équipe d'Ochi, il serait intéressant, d'étudier au préalable l'expression de ce récepteur par les cellules tumorales. Les patients exprimant le TLR7 au sein de leurs cellules tumorales pourraient ne pas recevoir d'agoniste de TLR7 ou être surveillés de façon plus importante, au risque de voir apparaître des effets pro-tumoraux.

Enfin, chez des patients atteints de cancer dont les cellules tumorales expriment le TLR7, l'utilisation d'antagoniste de TLR7 pourrait être un traitement efficace, puisqu'au sein du laboratoire, nous avons démontré que l'injection d'IRS661 (un oligonucléotide synthétique inhibiteur de TLR7) dans notre modèle murin de cancer du poumon induisait un effet anti-tumoral (Chatterjee et al., 2014). Des résultats similaires ont été décrits par l'équipe d'Ochi qui observe que l'inhibition de TLR7 par le même antagoniste (IRS661) diminue la progression du cancer pancréatique (Ochi et al., 2012). Cet IRS661 inhibe l'activation de TLR7, diminue l'activation des DC et la production de cytokines, dont IL-6, le TNF- α et IL-1 β par des macrophages ou des neutrophiles polymorphonucléés (Feng et al., 2015; Pawar et al., 2007). Il est à noter que le mode d'action de cet IRS est encore inconnu, mais, en 2007, Latz et al. ont proposé une hypothèse de fonctionnement des IRS : cet antagoniste pourrait limiter les changements de conformation du récepteur lors de son activation et donc empêcher la liaison des protéines adaptatrices au domaine TIR (Latz et al., 2007). Toutefois, l'utilisation de ce type d'antagoniste pourrait être néfaste pour les patients, lors de la mise en place des réponses immunitaires contre des virus respiratoires.

2. Implication des MDSC dans l'effet pro-tumoral après stimulation du TLR7

Les MDSC sont maintenant clairement reconnues comme associées à des effets pro-tumoraux. De nombreuses études démontrent qu'une augmentation de cette population dans le microenvironnement tumoral par rapport aux tissus sains est associée à un effet pro-tumoral dans différents modèles de cancer murin (Dolcetti et al., 2008; Feng et al., 2012; Liu et al., 2016; Srivastava et al., 2012; Toh et al., 2011; Youn and Gabrilovich, 2010; Zilio and Serafini, 2016).

Des études avaient déjà mis en évidence que l'injection d'agoniste de TLR4 conduisait à une augmentation du recrutement de MDSC au sein de la tumeur (Ray et al., 2013). Dans ces études, il était également démontré que l'agoniste de TLR4 stimulait directement les MDSC qui expriment ce récepteur. Or, le TLR7, n'étant pas exprimé par les MDSC, nous sommes les premiers à démontrer que la stimulation d'un TLR au niveau des cellules tumorales peut conduire à un plus fort recrutement des MDSC au sein de la tumeur.

Dans notre modèle, lors de la stimulation de TLR7, une plus forte concentration de CCL2 et GM-CSF est retrouvée au sein des tumeurs. Ces deux cytokines sont clairement démontrées dans la littérature comme impliquées dans le recrutement des MDSC (Bronte et al., 1999; Chun et al., 2015; Filipazzi et al., 2007; Fridlender et al., 2010; Hale et al., 2015; Pak et al., 1995; Serafini et al., 2004). Nous supposons donc que ces deux cytokines sont responsables du recrutement des MDSC au site de la tumeur dans notre modèle. Afin de vérifier l'exactitude du rôle de ces cytokines dans le recrutement des MDSC dans le microenvironnement tumoral, il faudrait les dépler et étudier l'impact à la fois (1) sur le recrutement des MDSC dans la tumeur et (2) sur la pousse tumorale. Il serait intéressant de les dépler à la fois une par une et en combinaison, car nous ne pouvons pas exclure le fait que ces deux cytokines soient responsables du fort recrutement de MDSC au sein de la tumeur à la suite de la stimulation de TLR7.

Il est à noter que ces cytokines peuvent également permettre le recrutement d'autres populations immunitaires, dont les pDC, les monocytes, les lymphocytes ou les basophiles (Bonicchi et al., 1998; Gomez-Cambronero et al., 2003; Gonzalo et al., 1999; Holcman et al., 2012; Leonard et al., 1991; Rollins et al., 1990). C'est pourquoi la déplétion de ces

cytokines pourrait conduire à des résultats non cohérents du fait d'une modification complète du système immunitaire intra-tumoral, indépendamment des MDSC.

Concernant l'origine de la production de ces cytokines, cela reste encore à définir. Il est démontré dans la littérature que des cellules tumorales ont la capacité de produire ce type de cytokines (Bayne et al., 2012; Brault and Kurt, 2005; Hale et al., 2015), mais elles peuvent également être produites par d'autres types cellulaires, comme les macrophages, les lymphocytes, les basophiles, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Bagby et al., 1986; Bonocchi et al., 1998; Gonzalo et al., 1999; Seitz et al., 1995; Sironi et al., 1993; Zucali et al., 1986) qui sont tous présents dans le microenvironnement tumoral (Fridman et al., 2012). Dans notre modèle, nous observons une augmentation générale de la concentration du CCL2 et GM-CSF dans le microenvironnement tumoral. Cela ne signifie pas pour autant que ce sont les cellules tumorales qui produisent en plus grande quantité ces cytokines. Il serait donc intéressant de trier les différents types cellulaires présents dans la tumeur afin de déterminer quelles sont les cellules qui à la suite de la stimulation de TLR7, produisent plus fortement le CCL2 et le GM-CSF. Nous avons tout de même divers arguments qui nous permettent de supposer que ces cytokines sont produites par les cellules tumorales : (1) ce sont les cellules tumorales qui sont directement stimulées par l'agoniste de TLR7, (2) la stimulation du TLR7 peut induire la production de CCL2 et GM-CSF, (Holcman et al., 2012; Testerman et al., 1995) et (3) la production de CCL2 par les cellules tumorales est fortement impliquée dans le recrutement des MDSC dans des tumeurs (Chun et al., 2015).

Les MDSC sont associées à des effets pro-tumoraux de par leurs propriétés immunosuppressives (Condamine et al., 2015; Srivastava et al., 2012). La vérification de ces propriétés est donc nécessaire, étant le seul marqueur clairement reconnu pour démontrer que les cellules étudiées sont des MDSC. Nous avons donc vérifié dans notre modèle de cancer du poumon que les MDSC étaient capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et qu'elles produisaient des molécules immunosuppressives, comme l' H_2O_2 , l'Arginase 1, le Nitrate et des ROS. Les quantités de molécules immunosuppressives produites par les MDSC dans notre étude sont concordantes avec celles retrouvées dans la littérature (Beury et al., 2016). Nous avons également démontré que l'injection d'agoniste de TLR7 ne modifie pas la production de molécules immunosuppressives par les MDSC, ni leur capacité à inhiber la prolifération des cellules T. La stimulation du TLR7 conduit donc à une augmentation du

nombre de MDSC présents au sein des tumeurs mais pas de leurs capacités fonctionnelles. L'agoniste de TLR7 n'activant pas directement les MDSC mais les cellules tumorales, cette absence de modification des propriétés immunosuppressives des MDSC était attendue. En effet, lors de l'utilisation de souris déficientes pour TLR7, l'effet pro-tumoral est toujours observé.

Il est intéressant de noter que, malgré un plus grand nombre de MDSC dans la tumeur, le nombre de cellules T reste inchangé. Au vu des données dans la littérature, nous pourrions nous attendre à une diminution des cellules T ainsi qu'à une augmentation des cellules T régulatrices dans la tumeur. Les MDSC ont la capacité d'inhiber la prolifération des cellules T et d'induire leur mort, mais également de les rendre inactives. Dans notre modèle, il se pourrait donc que les MDSC ne conduisent pas à une mort des cellules T mais à leur inactivation. Il serait donc intéressant par la suite d'étudier l'état d'activation de la population T au sein de la tumeur (en analysant les niveaux d'expression de CD44 et CD62L, qui nous permettront de différencier les différents stades d'activation des cellules T : les cellules T naïves sont CD3⁺ CD62L⁺ CD44⁻, les cellules T centrales mémoires sont CD3⁺ CD62L⁺ CD44⁺ et les cellules T effectrices mémoires sont CD3⁺ CD62L⁻ CD44⁺).

3. Effets pro-métastatiques de TLR7 :

L'expression dérégulée des TLRs par les cellules cancéreuses joue un rôle important dans la progression tumorale et dans la formation des métastases. Dans notre modèle de cancer du poumon, la stimulation de TLR7 est associée à un effet pro-métastatique : lorsque les souris sont traitées avec un agoniste de TLR7, une augmentation du nombre de métastases pulmonaires est observée. Nous avons également démontré que les MDSC ont un rôle majeur dans ces effets pro-métastatiques. Ces résultats concordent avec la littérature car cette population a déjà été démontrée comme impliquée dans des effets pro-métastatiques. Par exemple, dans un modèle murin de cancer du poumon, la déplétion des MDSC réduit la migration des cellules tumorales et le nombre de métastases (De Sanctis et al., 2016; Kitamura et al., 2015; Schmid and Varner, 2010; Srivastava et al., 2012).

D'autres mécanismes pourraient contribuer à l'effet pro-métastatique induit par la stimulation de TLR7. La stimulation *in vitro* de certains TLR, comme le TLR4, augmente les

capacités invasives des cellules tumorales grâce à une augmentation de l'expression de molécules impliquées dans la destruction de la matrice extracellulaire (telles que MMP-2, MMP-9 et VEGF) (Yang et al., 2014). De plus, chez des patients atteints de cancer du sein, l'expression de TLR4 par les cellules tumorales corrèle avec la présence de métastases (Yang et al., 2014).

Chez les patients atteints de cancer du poumon, nous avons mis en évidence une plus faible expression d'E-cadhérine et une plus forte expression de Vimentine lorsque les patients ont une forte expression de TLR7 au sein des cellules tumorales. La diminution de l'expression de l'E-cadhérine est liée à la perte de l'adhésion cellulaire et à un changement morphologique cellulaire (Leber and Efferth, 2009). L'équipe d'Ochi a également mis en évidence, dans le cancer du pancréas, que la stimulation de TLR7 augmente la phosphorylation du facteur de transcription STAT3 au sein des cellules tumorales. Or l'activation de STAT3 a été démontrée comme inductible de l'invasion cellulaire dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire humaine (A549), *in vitro*, avec une perte de l'expression de l'E-Cadherine et une augmentation de l'expression de Vimentine (Zhao et al., 2014). Il se pourrait donc que la stimulation de TLR7 induise l'activation de STAT3 chez les patients et explique la perte de l'expression d'E-Cadherine et l'augmentation de l'expression de Vimentine lorsque les patients ont une forte expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales. Lors de notre analyse de transcrits grâce à la technologie Nanostring, d'autres marqueurs d'un état pro-métastatique ont été retrouvés augmentés chez les patients ayant une forte expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales, avec une augmentation de l'expression de KRT19, KRT7, NME1 et SDC4, qui sont des molécules associées à une moins bonne survie chez les patients atteints de cancer du poumon. Cette technologie a consisté à étudier l'expression de 770 gènes impliqués dans l'angiogénèse, l'EMT et les métastases (Hendrix et al., 1996). Nous avons donc étudié les ARNm du microenvironnement tumoral de 6 patients ayant une forte expression de TLR7 au niveau de leurs cellules tumorales et de 6 patients ayant une faible expression de TLR7 au niveau de leurs cellules tumorales. Par la suite nous allons vérifier ce profil pro-métastatique au niveau protéique au sein de notre cohorte.

4. Résultats préliminaires chez les patients atteints de cancer du poumon

Chez des patients atteints de différents cancers (cancer rénal, colorectal, gastrique ou mélanome), les MDSC ou des marqueurs présents sur ce type cellulaire (tel que le CD66b) sont démontrés comme associés à un mauvais pronostic de survie (Rao et al., 2012; Sperduto et al., 2012). De plus, chez les patients atteints de cancer, le nombre de MDSC dans le sang peut être beaucoup plus important que celui retrouvé chez des donneurs sains (Diaz-Montero et al., 2009; Filipazzi et al., 2007; Hoechst et al., 2008). Dans notre cohorte de patients atteints de cancer du poumon, nos résultats ne sont que préliminaires, car nous n'avons que sept patients et trois donneurs sains inclus dans notre étude actuellement. Nous n'observons actuellement aucune variation du pourcentage de MDSC entre le sang des patients et celui de donneurs sains. Toutefois, lorsque l'expression de TLR7 est retrouvée sur 100% des cellules tumorales, les patients ont plus de MDSC granulocytiques et moins de MDSC monocytiques dans le microenvironnement tumoral. Ces dernières observations sont en concordance avec les résultats que nous avons obtenus dans notre modèle murin de cancer du poumon. L'ajout de nouveaux patients dans cette étude nous permettra d'étudier plus clairement s'il y a des différences entre donneurs sains et patients et s'il y a une corrélation entre le recrutement des MDSC dans la tumeur et le niveau d'expression de TLR7 par les cellules tumorales.

5. Limite de notre modèle d'étude

Au cours de ces diverses expériences, nous n'avons utilisé qu'une seule lignée tumorale murine de cancer du poumon. Il serait donc intéressant d'étudier si ces effets sont également observés avec d'autres lignées de cancer du poumon exprimant TLR7. Nous avons déjà utilisé une lignée cellulaire humaine de cancer du poumon *in vivo* : A549. Cette lignée étant une lignée humaine, nous n'avons pu l'injecter qu'à des souris immunodéficientes (souris NOD/SCID). Dans ce modèle de cancer du poumon, l'injection de TLR7 conduit également à un effet pro-tumoral. Concernant les lignées cellulaires murines, nous pourrions tester l'expression de TLR7 sur d'autres lignées (comme LA-4 et KLN 205 de fond génétique C57Bl/6) puis tester l'impact de la stimulation de TLR7 sur ces lignées *in vivo*.

D'autre part, toutes nos études ont porté sur un modèle murin sous cutané de cancer du poumon, or il est clairement démontré que la localisation de la tumeur peut fortement modifier le microenvironnement tumoral. Il sera donc nécessaire de reproduire ces résultats dans des modèles murins spontanés, induits ou orthotopiques afin de se rapprocher au maximum de la pathologie humaine, à la fois pour la localisation de la tumeur, mais également pour le voie d'administration de l'agoniste de TLR7 (avec une administration de l'agoniste par voie intranasale).

Tout d'abord, nous pourrions utiliser un modèle murin inductible de cancer du poumon (Tyler Jacks) grâce à une collaboration avec l'équipe d'Olivier Lantz. Ces souris sont porteuses de deux mutations : une mutation constitutive hétérozygote du gène Kras et une mutation conditionnelle du gène p53 (gène suppresseur de tumeur) sur fond génétique C57Bl/6 (DuPage et al., 2009). Le gène codant pour p53 est flanqué deux sites LoxP, permettant sa délétion en présence de recombinaison. La recombinaison CRE est insérée dans des lentivirus ou adénovirus qui seront administrés aux souris par instillation nasale ou par intubation intratrachéale, pour ne déléter p53 que dans leur poumon. Pour l'utilisation de ce modèle dans ce projet, il nous faudra tout d'abord vérifier que les cellules tumorales expriment TLR7. De plus, la limite de ce modèle est l'utilisation de virus pour administrer la recombinaison. Notre projet d'étude porte sur l'impact du TLR7 dans le cancer du poumon, or le TLR7 est un récepteur aux ARNs viraux, et il est démontré que le « human immunodeficiency virus type 1 » (HIV-1), qui est un lentivirus, peut activer le TLR7 des pDC (Beignon et al., 2005). Il faudra donc vérifier que les virus utilisés pour l'administration de la Cre n'induisent pas l'activation de TLR7. Pour cela, nous pourrions tester les virus sur des lignées reportrices de TLR7 (HEK-Blue TLR7) et analyser s'il y a une activation.

Nous avons également la possibilité d'utiliser un modèle murin spontané de cancer du poumon grâce à une collaboration avec l'équipe de Marie Wislez. Les souris sont K-ras^{LA1} sur fond génétique C57Bl/6. Elles possèdent un allèle de type sauvage du gène K-ras et un allèle possédant la mutation G12D (Johnson et al., 2001). Grâce à une recombinaison homologue, la forme oncogénique (avec la mutation G12D) va être exprimée, permettant l'apparition d'adénocarcinome pulmonaire autour de 6 à 8 mois chez 100% des souris. Il est à noter que d'autres lésions apparaissent également, telles que des lymphomes thymiques et des papillomes chez environ 20% des souris, mais les souris décèdent des lésions pulmonaires qui

sont majoritaires (Johnson et al., 2001). Dans ce modèle il faudra également vérifier que les cellules tumorales expriment le TLR7.

Enfin, nous avons la possibilité d'utiliser un modèle murin orthotopique de cancer du poumon. Les cellules murines de cancer du poumon (LLC-luc) qui expriment la luciférase, seront injectées par voie intra-trachéale à des souris anesthésiées, permettant le développement de la tumeur au sein des poumons. La croissance tumorale pourra être suivie par imagerie *in vivo* grâce à l'expression de la luciférase par les cellules tumorales. La luciférase est une enzyme qui, lorsqu'elle dégrade son substrat (la luciférine), induit le dégagement d'un photon. Cette bioluminescence pourra donc être mesurée au cours de ces expériences grâce à de l'imagerie *in vivo* (Lumina II, IVIS, Perkin Elmer).

**Partie II : Etude des agonistes naturels de
TLR7 dans le cancer du poumon**

1. Présence d'agoniste de TLR7 dans le microenvironnement tumoral des patients atteints de cancer du poumon

Une fois les mécanismes permettant de comprendre les effets pro-tumoraux du TLR7 dans le cancer du poumon découverts, l'étape suivante de mon projet a été de comprendre ce qui pouvait induire la stimulation du TLR7 présent au niveau des cellules tumorales chez les patients. Il est démontré que lorsque le TLR7 est stimulé, ce récepteur va être surexprimé. De plus, dans notre cohorte de patients atteints de cancer du poumon, les patients ayant une forte expression de TLR7 ont une signature génique similaire à celle obtenue lorsqu'une lignée de cancer du poumon humaine est stimulée avec un agoniste de TLR7 (Cherfils-Vicini et al., 2010; Miettinen et al., 2001). Ces deux informations nous ont amené à penser qu'il y avait, chez les patients, la présence d'un agoniste de TLR7 naturel. J'ai pu démontrer, chez certains patients, la présence de ligand de TLR7 dans le microenvironnement tumoral. Cette présence de ligand n'est pas observée chez tous les patients, ce qui démontre la diversité existante entre les patients, comme celle observée pour l'expression de TLR7 par les cellules tumorales. Par la suite, nous souhaiterions étudier l'expression de TLR7 par les cellules tumorales chez ces patients afin d'analyser si la présence de ligand de TLR7 dans le microenvironnement tumoral corrèle avec le niveau d'expression de TLR7 au niveau des cellules tumorales.

2. Origine des agonistes naturels présents dans le microenvironnement tumoral de patients atteints de cancer du poumon

Notre modèle d'étude portant sur l'impact du TLR7 (récepteur à ARNs) dans le cancer du poumon, deux hypothèses principales d'agonistes naturels de TLR7 sont possibles : les miARN et les ARN provenant de virus respiratoires.

L'équipe de Croce démontrait, en 2012, qu'une lignée de cancer du poumon humaine peut produire des exosomes comprenant des miARN, que ces exosomes ont la capacité de fusionner avec les macrophages et que certains des miARN présents au sein de ces exosomes fusionnés activent le TLR7 des macrophages (Fabbri et al., 2012). C'est pourquoi la première de nos hypothèses était que les cellules tumorales des patients produisent ce type d'exosomes comprenant des miARN. Cette production conduirait à la stimulation du TLR7 présent au

niveau des cellules tumorales voisines, permettant la mise en place d'une boucle d'autostimulation. Cette hypothèse devra être étudiée par la suite.

2.1. Les virus et les cancers

Les virus sont depuis longtemps connus comme pouvant jouer un rôle dans le développement et la progression tumorale, en ayant des effets anti- ou pro-tumoraux. Les virus peuvent induire des effets pro-tumoraux grâce à des propriétés oncogéniques ou non. En effet, 15 à 20% des cancers sont associés à des infections virales (Parkin, 2006).

Depuis 1958, il a été démontré que de nombreux virus possèdent des capacités carcinogènes chez la souris et chez l'homme (Stewart et al., 1958). Chez l'homme, les premiers virus carcinogènes découverts sont l'Epstein-Barr virus (EBV) dans le lymphome malin de Burkitt, et l'hépatite B (HBV) dans le carcinome hépatocellulaire (Beasley et al., 1981; Dane et al., 1970; Epstein et al., 1964). Par la suite, d'autres virus associés au développement de cancers ont été mis en évidence, comme le papillomavirus humain (HPV 16 et 18) impliqué dans le développement du cancer du col de l'utérus (Boshart et al., 1984; Dürst et al., 1983), le Human T-cell leukemia virus (HTLV-1) présent chez des patients atteints de leucémie des cellules T (Poiesz et al., 1980; Yoshida et al., 1982), l'hépatite C (HCV), le virus de l'herpès (HHV-8) (Chang et al., 1994; Choo et al., 1989) et le KSHV (Kaposi's associated Sarcoma Virus). Ces effets cancérigènes des virus peuvent impliquer divers mécanismes :

- Les virus intégratifs peuvent avoir directement dans leur génome des gènes pro-oncogéniques, comme cela est le cas pour le HPV, avec les protéines transformantes E6 et E7 (Ghittoni et al., 2010).
- Les virus intégratifs peuvent ne pas exprimer de gènes oncogènes, mais lors de leur intégration dans le génome des cellules hôtes, ils peuvent se placer au voisinage de gènes pro-oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur, les mettant sous le contrôle de séquences régulatrices virales, conduisant à une activation ou une inactivation anormale de ces gènes de l'hôte.
- Les virus peuvent également produire des molécules jouant sur des voies de signalisation leur permettant une meilleure dissémination. De manière indirecte, ces molécules peuvent également jouer sur des voies de signalisation impliquées

dans l'activation ou l'inactivation de gènes oncogéniques, tels que TP53 et MAD, ou dans l'induction d'inflammation chronique, par l'activation de la voie NF- κ B, par exemple (Jin et al., 1998; Pise-Masison et al., 1998).

- Les virus peuvent également biaiser ou épuiser le système immunitaire, ce qui conduira à une réponse immunitaire anti-tumorale moins efficace (Kohlhapp et al., 2016).

2.2. Les virus et le cancer du poumon

En 1979, une possible implication d'un virus dans le développement de cancer du poumon est émise : il est suggéré que le papillomavirus humain (HPV) pourrait être impliqué dans le développement de carcinomes squameux bronchiques (Syrjänen, 1979). Par la suite, de nombreuses études suggèrent un rôle important de l'HPV dans le développement du cancer du poumon grâce à un processus intégratif conduisant à de l'apoptose défectueuse, de la néovascularisation et de l'immortalité cellulaire (Pillai et al., 1999).

Dans notre projet, nous ne nous sommes pas intéressés aux virus oncogéniques, ni aux virus intégratifs. En effet, les virus intégratifs ont déjà été étudiés sur notre cohorte de patients : la présence de matériels génétiques viraux a été étudiée par multiplex chez 30 patients, mais peu de virus intégratifs ont été détectés. Nous n'avons donc pas poursuivi cette hypothèse et nous nous sommes intéressés aux virus non oncogéniques pouvant infecter le tractus respiratoire.

Les infections virales respiratoires ne sont pas les mêmes selon les saisons : en été et en automne, on retrouve plutôt des infections par les entérovirus et les rhinovirus, alors que l'hiver, ce sont plus le RSV, le métapneumovirus humain et les virus grippaux qui sont détectés (Wu et al., 2008). Au cours de ces travaux nous nous sommes tout particulièrement intéressés à deux virus respiratoires, en particulier, qui sont connus comme capables d'activer le TLR7 : le RSV et l'IAV.

2.2.1. Le Respiratory Syncytial Virus :

Le RSV appartient à la famille des Paramyxoviridae de genre pneumoviridae et fait entre 120 et 200 nm. Ce virus est enveloppé et possède des glycoprotéines de surface, dont la glycoprotéine G qui permet l'attachement du virus à la cellule hôte, et la glycoprotéine F qui permet la fusion des membranes cellulaires et cytoplasmiques lors de l'entrée du virus. L'ARN génomique est constitué d'ARNsb négatif non segmenté et, en plus de coder pour les glycoprotéines G et F, il code pour des protéines impliquées dans la transcription du génome, la réplication et le bourgeonnement des particules virales, nommées N (nucléoprotéine), P (Phosphoprotéine), M (protéine de matrice), L (protéine comprenant des motifs catalytiques d'ARN polymérase), ainsi que pour deux protéines non structurales (NS1 et NS2). L'ARN génomique est couplé avec la protéine N afin de former un complexe ribonucléoprotéine hélicoïdal (Tawar et al., 2009).

Lorsque que le RSV pénètre dans un organisme, il se multiplie dans l'épithélium respiratoire au niveau du naso-pharynx et atteint l'arbre respiratoire inférieur par diffusion de cellule à cellule. L'infection par le RSV reste localisée dans l'arbre respiratoire, sans virémie, d'où une maladie locale à incubation courte (4 à 5 jours). Lors de l'infection, il est observé une destruction des cellules ciliées (avec l'apparition de syncytia), des infiltrats péri-bronchiques de lymphocytes et de macrophages, ainsi qu'un œdème de la sous-muqueuse avec une sécrétion excessive de mucus. L'infection par le RSV induit la stimulation de divers récepteurs, tels que le TLR3 et le TLR7, pouvant conduire à une surexpression de ces récepteurs au niveau des cellules infectées (Huang et al., 2009).

Dans la littérature il est clairement établi que l'infection de cellules épithéliales avec du RSV induit une mort cellulaire importante, grâce à l'apparition de syncytium (Tian et al., 2013). Ces effets sont médiés par la production de la protéine F par le virus qui lui permet de faire fusionner l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Après infection des cellules, cette protéine F est retrouvée à la surface des cellules et induit la fusion de la membrane plasmique de la cellule infectée avec les cellules adjacentes, conduisant à la formation d'un syncytium multinucléé. De même, chez les patients atteints de RSV, une destruction de l'épithélium cilié est observée dans le tractus respiratoire. Ce qui corrèle avec ce que nous observons *in vitro* : après un certain temps en culture (supérieur à 72 heures), les cellules tumorales infectées par le RSV ont une survie cellulaire diminuée avec l'apparition de

syncytium (données non montrées). De plus, l'équipe de Bose, démontrent que le RSV a un effet anti-tumoral dans un modèle de cancer de la prostate par l'induction d'apoptose au sein des cellules tumorales (Echchgadda et al., 2009, 2011) or nos résultats démontrent que l'injection de RSV en intra-tumoral dans notre modèle murin de cancer du poumon induit une augmentation du volume de la tumeur. Il est compliqué, actuellement, d'apporter une explication à cette augmentation de la croissance tumorale car nos études du microenvironnement tumoral ne sont que préliminaires. Il nous faut donc poursuivre nos recherches sur le microenvironnement tumoral afin de comprendre les différents mécanismes impliqués dans cet effet pro-tumoral.

2.2.2. Le virus Influenza A

L'IAV appartient à la famille des Orthomyxoviridae et mesure entre 80 et 120 nm. Ce virus est enveloppé et possède deux sortes de glycoprotéines virales à sa surface : l'hémagglutinine, qui permet l'attachement du virus à la membrane plasmique des cellules cibles et la fusion des membranes, et la neuraminidase, qui joue un rôle lors du détachement des bourgeons à la suite de la production de nouveaux virus. Cette neuraminidase permet également la lyse du mucus bronchique, qui possède des propriétés antivirales. La face interne de l'enveloppe virale est composée d'une membrane interne constituée de deux protéines de membrane : M1 et M2. La nucléocapside de ce virus est à symétrie hélicoïdale et est composée de 8 segments distincts d'ARN simple brin négatifs associés à des sous-unités protéiques.

Ce virus se dissémine dans l'arbre respiratoire cilié qui va du nez jusqu'aux bronchioles. Il ne va que très rarement au-delà car il ne se multiplie pas dans les alvéoles et ne dépasse pas la membrane basale. Il n'affecte que les cellules épithéliales et certaines cellules hématopoïétiques, telles que les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules B, les cellules NK et les cellules T (Manicassamy et al., 2010). En général il n'y a pas de virémie, d'où la brièveté d'incubation, de un à trois jours. Cette infection locale donne une nécrose de l'épithélium respiratoire cilié réversible accompagnée d'hypersécrétion de mucus bronchique.

L'IAV induit l'activation du système immunitaire inné grâce à l'activation des TLR7 et TLR8 présents dans les endosomes et grâce à RIG-1 (Retinoic Acid Inducible Gene-1) présent dans le cytosol (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hornung et al., 2006; Lund et al., 2004; Pichlmair et al., 2006). La reconnaissance de l'IAV par RIG-I est intrinsèque à la cellule et repose sur la détection d'intermédiaires de réplication viraux dans des cellules infectées, telles que les cellules épithéliales des voies aériennes. La détection d'IAV par TLR7 est extrinsèque à la cellule, avec la détection d'un ARN monocaténaire (ARN simple brin) qui peut se produire en l'absence de réplication du virus dans des types cellulaires spécialisés, comme les pDC. Les deux voies convergent vers l'activation de NF- κ B et IRF7 pour induire, respectivement, la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I, importantes pour induire l'expression de gènes antiviraux. En plus d'induire l'activation du TLR7, l'infection par l'IAV augmente aussi son expression (Miettinen et al., 2001).

Dans notre modèle de cancer du poumon, l'infection par l'IAV à faible dose ne modifie pas la progression tumorale. En revanche, lors de l'injection de doses plus importantes, un effet pro-tumoral est observé avec une augmentation de la progression tumorale. Dans ce modèle d'infection, aucune nécrose anormale n'est observée au sein des tumeurs provenant des souris infectées. Cet effet pro-tumoral de l'IAV dans un modèle murin de cancer avait déjà été observé dans un modèle de mélanome: l'équipe de Zloza démontre que l'infection par la grippe en intranasal, conduit à un effet pro-tumoral médié par un recrutement plus important des cellules T CD8⁺ au site de l'infection, réduisant leur nombre au site de la tumeur (Kohlhapp et al., 2016). De plus, les cellules T CD8⁺ ont une expression plus importante de PD-1 lorsque les souris sont infectées.

Dans notre modèle de cancer du poumon, nous ne pouvons pas pour le moment, déterminer si notre effet pro-tumoral est dû à un effet local (médié par une stimulation directe des cellules tumorales) ou systémique du virus (médié par un épuisement du système immunitaire essayant de contrôler l'infection virale). Pour cela, nous pourrions injecter deux tumeurs aux souris (une dans chaque flanc), puis nous injecterions une des tumeurs avec du PBS et l'autre avec du virus. Ainsi nous pourrions étudier la progression tumorale des deux tumeurs : (1) si dans les deux tumeurs un effet pro-tumoral équivalent est observé, nous pourrions en conclure que l'IAV induit un effet pro-tumoral systémique, (2) si un effet pro-tumoral n'est observé que dans la tumeur injectée avec le virus, nous pourrions conclure que l'effet pro-tumoral est induit par une stimulation locale des cellules tumorales. Afin de mettre

en évidence le fait que le virus peut à la fois jouer en systémique et en local, il nous faudra comparer ces résultats avec des souris qui n'ont pas reçu de virus, dans aucune des tumeurs.

2.3. Impact du TLR7 et du modèle murin dans les effets induits par les infections virales

Les expériences que nous avons réalisées pour le moment *in vivo* avec les différents virus ne sont effectuées qu'avec des souris de type sauvage et une lignée cellulaire murine de cancer du poumon exprimant le TLR7. Nous ne pouvons donc en aucun cas certifier que ces effets sont médiés par une activation du TLR7 par les virus. Il nous faudra donc réaliser ces mêmes expériences chez des souris déficientes pour TLR7 et avec des lignées cellulaires murines de cancer du poumon déficientes pour TLR7. Il se peut que ces effets impliquent la stimulation du TLR7 mais pas seulement : ces virus ont la capacité d'activer un grand nombre d'autres récepteurs, comme RIG-I. Si nous souhaitons comprendre les mécanismes impliqués dans ces effets, il faudra tester l'invalidation de différents récepteurs, tels que MAD-5, TLR-7 et RIG-I, afin de découvrir quels sont ceux impliqués dans les effets induits par les différents virus.

Comme dans la première partie de mes recherches, toutes nos études ont porté sur un modèle murin sous cutané de cancer du poumon. Il sera donc nécessaire de tester les effets de ces virus sur les modèles murins spontanés, inductibles et orthotopiques décrits précédemment. Cela nous permettra de mettre en évidence l'impact des infections virales sur la pousse tumorale dans le poumon et nous donnera des pistes sur comment appréhender l'impact d'infections virales sur la survie et la croissance tumorale chez des patients atteints de cancer du poumon.

REFERENCES

- Abe, F., Dafferner, A.J., Donkor, M., Westphal, S.N., Scholar, E.M., Solheim, J.C., Singh, R.K., Hoke, T.A., and Talmadge, J.E. (2010). Myeloid-derived suppressor cells in mammary tumor progression in FVB Neu transgenic mice. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 59, 47–62.
- Adachi, K., and Tamada, K. (2015). Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy. *Cancer Sci.* 106, 945–950.
- Adams, S. (2009). Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* 1, 949–964.
- Adams, S., O'Neill, D.W., Nonaka, D., Hardin, E., Chiriboga, L., Siu, K., Cruz, C.M., Angiulli, A., Angiulli, F., Ritter, E., et al. (2008). Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 776–784.
- Aggarwal, B.B., Vijayalekshmi, R.V., and Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 425–430.
- Ahmed, A., Wang, J.H., and Redmond, H.P. (2013). Silencing of TLR4 increases tumor progression and lung metastasis in a murine model of breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 20 Suppl 3, S389-396.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675–680.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736–739.
- Al-Shibli, K.I., Donnem, T., Al-Saad, S., Persson, M., Bremnes, R.M., and Busund, L.-T. (2008). Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 5220–5227.
- Angulo, I., Rullas, J., Campillo, J.A., Obregón, E., Heath, A., Howard, M., Muñoz-Fernández, M.A., and Subiza, J.L. (2000). Early myeloid cells are high producers of nitric oxide upon CD40 plus IFN-gamma stimulation through a mechanism dependent on endogenous TNF-alpha and IL-1alpha. *Eur. J. Immunol.* 30, 1263–1271.
- Asea, A. (2008). Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* 111–127.
- Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E.C., Su, D., Marches, F., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime

- interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J. Exp. Med.* 204, 1037–1047.
- Aspord, C., Tramcourt, L., Leloup, C., Molens, J.-P., Leccia, M.-T., Charles, J., and Plumas, J. (2014). Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC cytotoxic functions and impeding tumor vascularization. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2551–2561.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay, N.E.H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W.H., et al. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 465–472.
- Bagby, G.C., Dinarello, C.A., Wallace, P., Wagner, C., Hefeneider, S., and McCall, E. (1986). Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 78, 1316–1323.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T.H., Kim, S.G., and Choi, S. (2012). Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch. Pharm. Res.* 35, 1297–1316.
- Bauer, A.K., Dixon, D., DeGraff, L.M., Cho, H.-Y., Walker, C.R., Malkinson, A.M., and Kleeberger, S.R. (2005). Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1778–1781.
- Bayne, L.J., Beatty, G.L., Jhala, N., Clark, C.E., Rhim, A.D., Stanger, B.Z., and Vonderheide, R.H. (2012). Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 21, 822–835.
- Beasley, R.P., Hwang, L.Y., Lin, C.C., and Chien, C.S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1129–1133.
- Becht, E., Giraldo, N.A., Germain, C., de Reyniès, A., Laurent-Puig, P., Zucman-Rossi, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2016). Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Adv. Immunol.* 130, 95–190.
- Beg, A.A. (2002). Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol.* 23, 509–512.
- Beignon, A.-S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* 115, 3265–3275.
- Berger, R., Fiegl, H., Goebel, G., Obexer, P., Ausserlechner, M., Doppler, W., Hauser-Kronberger, C., Reitsamer, R., Egle, D., Reimer, D., et al. (2010). Toll-like receptor 9

expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. *Cancer Sci.* *101*, 1059–1066.

Bernard, J.J., Cowing-Zitron, C., Nakatsuji, T., Muehleisen, B., Muto, J., Borkowski, A.W., Martinez, L., Greidinger, E.L., Yu, B.D., and Gallo, R.L. (2012). Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.* *18*, 1286–1290.

Berntsson, J., Nodin, B., Eberhard, J., Micke, P., and Jirström, K. (2016). Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* *139*, 1129–1139.

Beury, D.W., Carter, K.A., Nelson, C., Sinha, P., Hanson, E., Nyandjo, M., Fitzgerald, P.J., Majeed, A., Wali, N., and Ostrand-Rosenberg, S. (2016). Myeloid-Derived Suppressor Cell Survival and Function Are Regulated by the Transcription Factor Nrf2. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *196*, 3470–3478.

Beutler, B. (2000). Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 20–26.

Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., et al. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* *107*, 2112–2122.

Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., and Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* *120*, 303–313.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D’Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* *187*, 129–134.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* *3*, 1151–1157.

Bowie, A., and O’Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* *67*, 508–514.

Brahmer, J.R., Drake, C.G., Wollner, I., Powderly, J.D., Picus, J., Sharfman, W.H., Stankevich, E., Pons, A., Salay, T.M., McMiller, T.L., et al. (2010). Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 3167–3175.

Brault, M.S., and Kurt, R.A. (2005). Impact of Tumor-Derived CCL2 on Macrophage Effector Function. *J. Biomed. Biotechnol.* *2005*, 37–43.

- Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., et al. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285, 732–736.
- Brignole, C., Marimpietri, D., Di Paolo, D., Perri, P., Morandi, F., Pastorino, F., Zorzoli, A., Pagnan, G., Loi, M., Caffa, I., et al. (2010). Therapeutic targeting of TLR9 inhibits cell growth and induces apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res.* 70, 9816–9826.
- Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A.C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R., and Cayota, A.M. (1999). Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 3356–3366.
- Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W.W., Surman, D.R., Pericle, F., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (1998). Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 5313–5320.
- Bronte, V., Chappell, D.B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., and Restifo, N.P. (1999). Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 5728–5737.
- Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R., Serafini, P., Zamboni, P., Restifo, N.P., and Zanovello, P. (2000). Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96, 3838–3846.
- Bronte, V., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Tosello, V., Mazzoni, A., Segal, D.M., Staib, C., Lowel, M., Sutter, G., et al. (2003). IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 270–278.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* 7, 12150.
- Bunt, S.K., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 284–290.
- Bunt, S.K., Clements, V.K., Hanson, E.M., Sinha, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2009). Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* 85, 996–1004.
- Burdelya, L.G., Gleiberman, A.S., Toshkov, I., Aygun-Sunar, S., Bapardekar, M., Manderscheid-Kern, P., Bellnier, D., Krivokrysenko, V.I., Feinstein, E., and Gudkov, A.V. (2012). Toll-like receptor 5 agonist protects mice from dermatitis and oral mucositis caused by local radiation: implications for head-and-neck cancer radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 83, 228–234.

- Butsch, R., Lukas Waelti, S., Schaerer, S., Braun, J., Korol, D., Probst-Hensch, N., Moch, H., and Kurrer, M. (2011). Intratumoral plasmacytoid dendritic cells associate with increased survival in patients with follicular lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 52, 1230–1238.
- Butts, C., Maksymiuk, A., Goss, G., Soulières, D., Marshall, E., Cormier, Y., Ellis, P.M., Price, A., Sawhney, R., Beier, F., et al. (2011). Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIIB randomized, multicenter, open-label trial. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 1337–1342.
- Butts, C., Socinski, M.A., Mitchell, P.L., Thatcher, N., Havel, L., Krzakowski, M., Nawrocki, S., Ciuleanu, T.-E., Bosquée, L., Trigo, J.M., et al. (2014). Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 59–68.
- Cai, Z., Sanchez, A., Shi, Z., Zhang, T., Liu, M., and Zhang, D. (2011). Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Res.* 71, 2466–2475.
- Cammarota, R., Bertolini, V., Pennesi, G., Bucci, E.O., Gottardi, O., Garlanda, C., Laghi, L., Barberis, M.C., Sessa, F., Noonan, D.M., et al. (2010). The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J. Transl. Med.* 8, 112.
- Castaño-Rodríguez, N., Kaakoush, N.O., and Mitchell, H.M. (2014). Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front. Immunol.* 5, 336.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.-P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., et al. (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* 120, 457–471.
- Chang, S.H., Mirabolfathinejad, S.G., Katta, H., Cumpian, A.M., Gong, L., Caetano, M.S., Moghaddam, S.J., and Dong, C. (2014). T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 5664–5669.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865–1869.
- Chatterjee, S., Crozet, L., Damotte, D., Iribarren, K., Schramm, C., Alifano, M., Lupo, A., Cherfils-Vicini, J., Goc, J., Katsahian, S., et al. (2014). TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 74, 5008–5018.
- Chen, W., Li, Z., Bai, L., and Lin, Y. (2011). NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 16, 1172–1185.

- Chen, X., Wan, J., Liu, J., Xie, W., Diao, X., Xu, J., Zhu, B., and Chen, Z. (2010). Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer Amst. Neth.* 69, 348–354.
- Chen, X., Zhao, F., Zhang, H., Zhu, Y., Wu, K., and Tan, G. (2015). Significance of TLR4/MyD88 expression in breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 7034–7039.
- Chen, Y., Mu, C.-Y., and Huang, J.-A. (2012). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori* 98, 751–755.
- Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M.-C., Fridman, W.-H., et al. (2010). Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J. Clin. Invest.* 120, 1285–1297.
- Chew, V., Tow, C., Huang, C., Bard-Chapeau, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Weber, A., Lim, K.H., Toh, H.C., Heikenwalder, M., et al. (2012). Toll-like receptor 3 expressing tumor parenchyma and infiltrating natural killer cells in hepatocellular carcinoma patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1796–1807.
- Chicoine, M.R., Zahner, M., Won, E.K., Kalra, R.R., Kitamura, T., Perry, A., and Higashikubo, R. (2007). The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by Toll-like receptor 4. *Neurosurgery* 60, 372–380; discussion 381.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.
- Chow, S.C., Gowing, S.D., Cools-Lartigue, J.J., Chen, C.B., Berube, J., Yoon, H.-W., Chan, C.H.F., Rousseau, M.C., Bourdeau, F., Giannias, B., et al. (2015). Gram negative bacteria increase non-small cell lung cancer metastasis via Toll-like receptor 4 activation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *Int. J. Cancer* 136, 1341–1350.
- Chun, E., Lavoie, S., Michaud, M., Gallini, C.A., Kim, J., Soucy, G., Odze, R., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2015). CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep.* 12, 244–257.
- Chung, K.F. (2005). Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4, 619–625.
- Churg, A., Dai, J., Tai, H., Xie, C., and Wright, J.L. (2002). Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 849–854.
- Cogswell, P.C., Guttridge, D.C., Funkhouser, W.K., and Baldwin, A.S. (2000). Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 19, 1123–1131.

- Condamine, T., Ramachandran, I., Youn, J.-I., and Gabrilovich, D.I. (2015). Regulation of Tumor Metastasis by Myeloid-derived Suppressor Cells. *Annu. Rev. Med.* 66, 97–110.
- Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266.
- Conrad, C., Gregorio, J., Wang, Y.-H., Ito, T., Meller, S., Hanabuchi, S., Anderson, S., Atkinson, N., Ramirez, P.T., Liu, Y.-J., et al. (2012). Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res.* 72, 5240–5249.
- Cooper, W.A., Tran, T., Vilain, R.E., Madore, J., Selinger, C.I., Kohonen-Corish, M., Yip, P., Yu, B., O’Toole, S.A., McCaughan, B.C., et al. (2015). PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer Amst. Neth.* 89, 181–188.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., and Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103, 481–490.
- D’Agostini, C., Pica, F., Febbraro, G., Grelli, S., Chiavaroli, C., and Garaci, E. (2005). Antitumor effect of OM-174 and cyclophosphamide on murine B16 melanoma in different experimental conditions. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1205–1212.
- Dajon, M., Iribarren, K., and Cremer, I. (2016). Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*.
- Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet Lond. Engl.* 1, 695–698.
- Dapito, D.H., Mencin, A., Gwak, G.-Y., Pradere, J.-P., Jang, M.-K., Mederacke, I., Caviglia, J.M., Khiabani, H., Adeyemi, A., Bataller, R., et al. (2012). Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 21, 504–516.
- De Cesare, M., Calcaterra, C., Pratesi, G., Gatti, L., Zunino, F., Mènard, S., and Balsari, A. (2008). Eradication of ovarian tumor xenografts by locoregional administration of targeted immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 5512–5518.
- De Sanctis, F., Solito, S., Ugel, S., Molon, B., Bronte, V., and Marigo, I. (2016). MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* 1865, 35–48.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 16, 91–102.
- Di Giacomo, A.M., Biagioli, M., and Maio, M. (2010). The emerging toxicity profiles of anti-CTLA-4 antibodies across clinical indications. *Semin. Oncol.* 37, 499–507.

- Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *58*, 49–59.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529–1531.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 4410–4417.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Goc, J., Giraldo, N.A., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2014). Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol.* *35*, 571–580.
- Dolcetti, L., Marigo, I., Mantelli, B., Peranzoni, E., Zanovello, P., and Bronte, V. (2008). Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett.* *267*, 216–225.
- Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Fernandez Gomez, A., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiai, E., Casati, A., et al. (2010). Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* *40*, 22–35.
- Donkor, M.K., Lahue, E., Hoke, T.A., Shafer, L.R., Coskun, U., Solheim, J.C., Gulen, D., Bishay, J., and Talmadge, J.E. (2009). Mammary tumor heterogeneity in the expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Int. Immunopharmacol.* *9*, 937–948.
- Droemann, D., Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A.J., Branscheid, D., Vollmer, E., Dalhoff, K., Zabel, P., and Goldmann, T. (2005). Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir. Res.* *6*, 1.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 329–360.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C.F., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., et al. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* *6*, 722–729.
- DuPage, M., Dooley, A.L., and Jacks, T. (2009). Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nat. Protoc.* *4*, 1064–1072.
- Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 3812–3815.

- Echchgadda, I., Kota, S., DeLa Cruz, I., Sabbah, A., Chang, T., Harnack, R., Mgbemena, V., Chatterjee, B., and Bose, S. (2009). Anticancer oncolytic activity of respiratory syncytial virus. *Cancer Gene Ther.* *16*, 923–935.
- Echchgadda, I., Chang, T.-H., Sabbah, A., Bakri, I., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Chatterjee, B., and Bose, S. (2011). Oncolytic targeting of androgen-sensitive prostate tumor by the respiratory syncytial virus (RSV): consequences of deficient interferon-dependent antiviral defense. *BMC Cancer* *11*, 43.
- El Andaloussi, A., Sonabend, A.M., Han, Y., and Lesniak, M.S. (2006). Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* *54*, 526–535.
- Elkabetz, M., Ribeiro, V.S.G., Dinarello, C.A., Ostrand-Rosenberg, S., Di Santo, J.P., Apte, R.N., and Vosshenrich, C.A.J. (2010). IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3347–3357.
- Elliott, B., Scolyer, R.A., Suci, S., Lebecque, S., Rimoldi, D., Gugerli, O., Musat, E., Sharma, R.N., Lienard, D., Keilholz, U., et al. (2007). Long-term protective effect of mature DC-LAMP⁺ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 3825–3830.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 702–703.
- Erdman, S.E., Sohn, J.J., Rao, V.P., Nambiar, P.R., Ge, Z., Fox, J.G., and Schauer, D.B. (2005). CD4⁺CD25⁺ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* *65*, 3998–4004.
- Eruslanov, E., Daurkin, I., Ortiz, J., Vieweg, J., and Kusmartsev, S. (2010). Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE₂ catabolism in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 839–848.
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., et al. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2110–2116.
- Farnebo, L., Shahangian, A., Lee, Y., Shin, J.H., Scheeren, F.A., and Sunwoo, J.B. (2015). Targeting Toll-like receptor 2 inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* *6*, 9897–9907.
- Feng, P.-H., Lee, K.-Y., Chang, Y.-L., Chan, Y.-F., Kuo, L.-W., Lin, T.-Y., Chung, F.-T., Kuo, C.-S., Yu, C.-T., Lin, S.-M., et al. (2012). CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *186*, 1025–1036.
- Feng, Y., Chen, H., Cai, J., Zou, L., Yan, D., Xu, G., Li, D., and Chao, W. (2015). Cardiac RNA induces inflammatory responses in cardiomyocytes and immune cells via Toll-like receptor 7 signaling. *J. Biol. Chem.* *290*, 26688–26698.

- Fernandez-Garcia, B., Eiró, N., González-Reyes, S., González, L., Aguirre, A., González, L.O., Del Casar, J.M., García-Muñiz, J.L., and Vizoso, F.J. (2014). Clinical significance of toll-like receptor 3, 4, and 9 in gastric cancer. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *37*, 77–83.
- Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2007). Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 2546–2553.
- Filipazzi, P., Bürdek, M., Villa, A., Rivoltini, L., and Huber, V. (2012). Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 342–349.
- Fridlender, Z.G., Buchlis, G., Kapoor, V., Cheng, G., Sun, J., Singhal, S., Crisanti, M.C., Crisanti, C., Wang, L.-C.S., Heitjan, D., et al. (2010). CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res.* *70*, 109–118.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 298–306.
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A.S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A.J., et al. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* *133*, 1869–1881.
- Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A., and Middleton, G.W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *60*, 1419–1430.
- Gabrivovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., and Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 5398–5406.
- Gallimore, A.M., and Simon, A.K. (2008). Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene* *27*, 5886–5893.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* *313*, 1960–1964.
- Gama, L., Shirk, E.N., Russell, J.N., Carvalho, K.I., Li, M., Queen, S.E., Kalil, J., Zink, M.C., Clements, J.E., and Kallas, E.G. (2012). Expansion of a subset of CD14^{high}CD16^{neg}CCR2^{low}/neg monocytes functionally similar to myeloid-derived suppressor cells during SIV and HIV infection. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 803–816.
- Gambara, G., Desideri, M., Stoppacciaro, A., Padula, F., De Cesaris, P., Starace, D., Tubaro, A., Del Bufalo, D., Filippini, A., Ziparo, E., et al. (2015). TLR3 engagement induces IRF-3-

- dependent apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumour growth in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 327–339.
- Geng, D., Kaczanowska, S., Tsai, A., Younger, K., Ochoa, A., Rapoport, A.P., Ostrand-Rosenberg, S., and Davila, E. (2015). TLR5 Ligand-Secreting T Cells Reshape the Tumor Microenvironment and Enhance Antitumor Activity. *Cancer Res.* 75, 1959–1971.
- Germain, C., Gnjjatic, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., et al. (2014). Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 832–844.
- Gershan, J.A., Barr, K.M., Weber, J.J., Jing, W., and Johnson, B.D. (2015). Immune modulating effects of cyclophosphamide and treatment with tumor lysate/CpG synergize to eliminate murine neuroblastoma. *J. Immunother. Cancer* 3, 24.
- Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., and Tommasino, M. (2010). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 40, 1–13.
- Gilmore, T.D. (2003). The Rel1/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat. Res.* 115, 241–265.
- Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 74, 705–715.
- Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D.J., Groome, P.A., Rami-Porta, R., Postmus, P.E., Rusch, V., Sobin, L., International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee, et al. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 2, 706–714.
- Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T., and Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur. J. Immunol.* 32, 3267–3275.
- Gomez-Cambronero, J., Horn, J., Paul, C.C., and Baumann, M.A. (2003). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 6846–6855.
- González-Reyes, S., Fernández, J.M., González, L.O., Aguirre, A., Suárez, A., González, J.M., Escaff, S., and Vizoso, F.J. (2011). Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 60, 217–226.

- Gonzalo, J.A., Pan, Y., Lloyd, C.M., Jia, G.Q., Yu, G., Dussault, B., Powers, C.A., Proudfoot, A.E., Coyle, A.J., Gearing, D., et al. (1999). Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 403–411.
- Gorelik, E., Wiltrout, R.H., Okumura, K., Habu, S., and Herberman, R.B. (1982). Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer* *30*, 107–112.
- Goto, Y., Arigami, T., Kitago, M., Nguyen, S.L., Narita, N., Ferrone, S., Morton, D.L., Irie, R.F., and Hoon, D.S.B. (2008). Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 3642–3653.
- Grimm, M., Kim, M., Rosenwald, A., Heemann, U., Germer, C.-T., Waaga-Gasser, A.M., and Gasser, M. (2010). Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumourigenesis and tumour progression. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* *46*, 2849–2857.
- Grimmig, T., Matthes, N., Hoeland, K., Tripathi, S., Chandraker, A., Grimm, M., Moench, R., Moll, E.-M., Friess, H., Tsaour, I., et al. (2015). TLR7 and TLR8 expression increases tumor cell proliferation and promotes chemoresistance in human pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* *47*, 857–866.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883–899.
- Gu, J., Sun, R., Shen, S., and Yu, Z. (2015). The influence of TLR4 agonist lipopolysaccharides on hepatocellular carcinoma cells and the feasibility of its application in treating liver cancer. *OncoTargets Ther.* *8*, 2215–2225.
- Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Capparelli, C., Balliet, R., Lin, Z., Pestell, R.G., Howell, A., Aquila, S., Andò, S., Martinez-Outschoorn, U., et al. (2012). Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- β drives tumor growth: connecting TGF- β signaling with “Warburg-like” cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 3019–3035.
- Guiducci, C., Gong, M., Cepika, A.-M., Xu, Z., Tripodo, C., Bennett, L., Crain, C., Quartier, P., Cush, J.J., Pascual, V., et al. (2013). RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *210*, 2903–2919.
- Haegens, A., van der Vliet, A., Butnor, K.J., Heintz, N., Taatjes, D., Hemenway, D., Vacek, P., Freeman, B.A., Hazen, S.L., Brennan, M.L., et al. (2005). Asbestos-induced lung inflammation and epithelial cell proliferation are altered in myeloperoxidase-null mice. *Cancer Res.* *65*, 9670–9677.
- Hale, M., Itani, F., Buchta, C.M., Wald, G., Bing, M., and Norian, L.A. (2015). Obesity triggers enhanced MDSC accumulation in murine renal tumors via elevated local production of CCL2. *PloS One* *10*, e0118784.

- Hammes, L.S., Tekmal, R.R., Naud, P., Edelweiss, M.I., Kirma, N., Valente, P.T., Syrjänen, K.J., and Cunha-Filho, J.S. (2007). Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. *Gynecol. Oncol.* *105*, 157–165.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., et al. (2002). Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* *122*, 1987–2000.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099–1103.
- He, W., Liu, Q., Wang, L., Chen, W., Li, N., and Cao, X. (2007). TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol. Immunol.* *44*, 2850–2859.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526–1529.
- Helicobacter and Cancer Collaborative Group (2001). Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* *49*, 347–353.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740–745.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7/MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 196–200.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Chu, Y.W., Trevor, K.T., and Seftor, R.E. (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *15*, 507–525.
- Hertz, C.J., Wu, Q., Porter, E.M., Zhang, Y.J., Weismüller, K.-H., Godowski, P.J., Ganz, T., Randell, S.H., and Modlin, R.L. (2003). Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J. Immunol. Baltim. Md* *171*, 6820–6826.
- Hildeman, D.A., Mitchell, T., Aronow, B., Wojciechowski, S., Kappler, J., and Marrack, P. (2003). Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15035–15040.

- Ho, V., Lim, T.S., Lee, J., Steinberg, J., Szmyd, R., Tham, M., Yaligar, J., Kaldis, P., Abastado, J.-P., and Chew, V. (2015). TLR3 agonist and Sorafenib combinatorial therapy promotes immune activation and controls hepatocellular carcinoma progression. *Oncotarget*.
- Hoechst, B., Ormandy, L.A., Ballmaier, M., Lehner, F., Krüger, C., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* *135*, 234–243.
- Hoffmann, R.F., Zarrintan, S., Brandenburg, S.M., Kol, A., de Bruin, H.G., Jafari, S., Dijk, F., Kalicharan, D., Kelders, M., Gosker, H.R., et al. (2013). Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respir. Res.* *14*, 97.
- Holcman, M., Drobits, B., and Sibilica, M. (2012). How imiquimod licenses plasmacytoid dendritic cells to kill tumors. *Oncoimmunology* *1*, 1661–1663.
- Hongo, D., Tang, X., Baker, J., Engleman, E.G., and Strober, S. (2014). Requirement for interactions of natural killer T cells and myeloid-derived suppressor cells for transplantation tolerance. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *14*, 2467–2477.
- Hopkins, P.A., and Sriskandan, S. (2005). Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin. Exp. Immunol.* *140*, 395–407.
- Hornef, M.W., Normark, B.H., Vandewalle, A., and Normark, S. (2003). Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* *198*, 1225–1235.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 4531–4537.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., et al. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* *11*, 263–270.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* *314*, 994–997.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (2016). Pillars Article: Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol.* *199*, 3749–3752. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *197*, 2563–2566.
- Hsiao, C.-C., Chen, P.-H., Cheng, C.-I., Tsai, M.-S., Chang, C.-Y., Lu, S.-C., Hsieh, M.-C., Lin, Y.-C., Lee, P.-H., and Kao, Y.-H. (2015). Toll-like receptor-4 is a target for suppression

- of proliferation and chemoresistance in HepG2 hepatoblastoma cells. *Cancer Lett.* 368, 144–152.
- Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K.-L., Chen, Y., Chen, S.-H., Mayer, L., Unkeless, J.C., and Xiong, H. (2005a). Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 65, 5009–5014.
- Huang, B., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.-H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 66, 1123–1131.
- Huang, B., Zhao, J., Shen, S., Li, H., He, K.-L., Shen, G.-X., Mayer, L., Unkeless, J., Li, D., Yuan, Y., et al. (2007). *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res.* 67, 4346–4352.
- Huang, B., Zhao, J., Unkeless, J.C., Feng, Z.H., and Xiong, H. (2008). TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 27, 218–224.
- Huang, M.-F., Lin, W.-L., and Ma, Y.-C. (2005b). A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. *Indoor Air* 15, 135–140.
- Huang, S., Wei, W., and Yun, Y. (2009). Upregulation of TLR7 and TLR3 gene expression in the lung of respiratory syncytial virus infected mice. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 49, 239–245.
- Huen, A.O., and Rook, A.H. (2014). Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* 26, 237–244.
- Husseinzadeh, N., and Davenport, S.M. (2014). Role of toll-like receptors in cervical, endometrial and ovarian cancers: a review. *Gynecol. Oncol.* 135, 359–363.
- Ichihara, E., Hotta, K., Nogami, N., Kuyama, S., Kishino, D., Fujii, M., Kozuki, T., Tabata, M., Harada, D., Chikamori, K., et al. (2015). Phase II trial of gefitinib in combination with bevacizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR gene mutations: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1001. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 10, 486–491.
- Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T., and Srikrishna, G. (2011). S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol. Cancer Res. MCR* 9, 133–148.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet Lond. Engl.* 356, 1795–1799.
- Ito, N., Suzuki, Y., Taniguchi, Y., Ishiguro, K., Nakamura, H., and Ohgi, S. (2005). Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 25, 2027–2031.

- Jahrsdörfer, B., Wooldridge, J.E., Blackwell, S.E., Taylor, C.M., Griffith, T.S., Link, B.K., and Weiner, G.J. (2005). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Leukoc. Biol.* 77, 378–387.
- Jain, S., Suklabaidya, S., Das, B., Raghav, S.K., Batra, S.K., and Senapati, S. (2015). TLR4 activation by lipopolysaccharide confers survival advantage to growth factor deprived prostate cancer cells. *The Prostate* 75, 1020–1033.
- Janeway, C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1, 1–13.
- Jego, G., Bataille, R., Geffroy-Luseau, A., Descamps, G., and Pellat-Deceunynck, C. (2006). Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 20, 1130–1137.
- Jiang, Q., Wei, H., and Tian, Z. (2008). Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer* 8, 12.
- Jin, D.Y., Spencer, F., and Jeang, K.T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* 93, 81–91.
- Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., Bronson, R.T., Crowley, D., Tuveson, D.A., and Jacks, T. (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410, 1111–1116.
- de Jonge, W.J., Kwikkers, K.L., te Velde, A.A., van Deventer, S.J.H., Nolte, M.A., Mebius, R.E., Ruijter, J.M., Lamers, M.C., and Lamers, W.H. (2002). Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 110, 1539–1548.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 239–252.
- Kalb, M.L., Glaser, A., Stary, G., Koszik, F., and Stingl, G. (2012). TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN- α -mediated antitumor reactivity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1583–1591.
- Kao, A.-P., Wang, K.-H., Long, C.-Y., Chai, C.-Y., Tsai, C.-F., Hsieh, T.-H., Hsu, C.-Y., Chang, C.-C., Lee, J.-N., and Tsai, E.-M. (2011). Interleukin-1 β induces cyclooxygenase-2 expression and promotes the invasive ability of human mesenchymal stem cells derived from ovarian endometrioma. *Fertil. Steril.* 96, 678–684.e1.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431–436.
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat. Immunol.* 9, 684–691.

- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.
- Kawai, O., Ishii, G., Kubota, K., Murata, Y., Naito, Y., Mizuno, T., Aokage, K., Saijo, N., Nishiwaki, Y., Gemma, A., et al. (2008). Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* *113*, 1387–1395.
- Kelly, M.G., Alvero, A.B., Chen, R., Silasi, D.-A., Abrahams, V.M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T., and Mor, G. (2006). TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* *66*, 3859–3868.
- Khasawneh, J., Schulz, M.D., Walch, A., Rozman, J., Hrabec de Angelis, M., Klingenspor, M., Buck, A., Schwaiger, M., Saur, D., Schmid, R.M., et al. (2009). Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3354–3359.
- Kim, Y.-M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.-E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234–238.
- Kitamura, T., Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 73–86.
- Koblish, H.K., Hunter, C.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., and Lee, W.M. (1998). Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. *J. Exp. Med.* *188*, 1603–1610.
- Kohlhapp, F.J., Huelsmann, E.J., Lacek, A.T., Schenkel, J.M., Lusciks, J., Broucek, J.R., Goldufsky, J.W., Hughes, T., Zayas, J.P., Dolubizno, H., et al. (2016). Non-oncogenic Acute Viral Infections Disrupt Anti-cancer Responses and Lead to Accelerated Cancer-Specific Host Death. *Cell Rep.* *17*, 957–965.
- Kroeger, D.R., Milne, K., and Nelson, B.H. (2016). Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 3005–3015.
- Kundu, S.D., Lee, C., Billips, B.K., Habermacher, G.M., Zhang, Q., Liu, V., Wong, L.Y., Klumpp, D.J., and Thumbikat, P. (2008). The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *The Prostate* *68*, 223–229.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., and Gabrilovich, D.I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol. Baltim. Md* *172*, 989–999.
- Kusmartsev, S.A., Li, Y., and Chen, S.H. (2000). Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J. Immunol. Baltim. Md* *165*, 779–785.

- Labidi-Galy, S.I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I., Bajard, A., Combes, J.-D., Faget, J., Mithieux, F., Cassagnol, A., et al. (2011). Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res.* *71*, 5423–5434.
- Laghi, L., Bianchi, P., Miranda, E., Balladore, E., Pacetti, V., Grizzi, F., Allavena, P., Torri, V., Repici, A., Santoro, A., et al. (2009). CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol.* *10*, 877–884.
- Langowski, J.L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J.D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Oft, M. (2006). IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* *442*, 461–465.
- Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C.M., Klein, D.C.G., Monks, B.G., McKnight, C.J., Lamphier, M.S., Duprex, W.P., et al. (2007). Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* *8*, 772–779.
- Le Mercier, I., Poujol, D., Sanlaville, A., Sisirak, V., Gobert, M., Durand, I., Dubois, B., Treilleux, I., Marvel, J., Vlach, J., et al. (2013). Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res.* *73*, 4629–4640.
- Leber, M.F., and Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int. J. Oncol.* *34*, 881–895.
- Lebwohl, M., Dinehart, S., Whiting, D., Lee, P.K., Tawfik, N., Jorizzo, J., Lee, J.H., and Fox, T.L. (2004). Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials. *J. Am. Acad. Dermatol.* *50*, 714–721.
- Lechner, M.G., Liebertz, D.J., and Epstein, A.L. (2010). Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 2273–2284.
- Ledesma, E., Martínez, I., Córdova, Y., Rodríguez-Sosa, M., Monroy, A., Mora, L., Soto, I., Ramos, G., Weiss, B., and Santiago Osorio, E. (2004). Interleukin-1 beta (IL-1beta) induces tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression on mouse myeloid multipotent cell line 32D cl3 and inhibits their proliferation. *Cytokine* *26*, 66–72.
- Lee, S.M.Y., Kok, K.-H., Jaume, M., Cheung, T.K.W., Yip, T.-F., Lai, J.C.C., Guan, Y., Webster, R.G., Jin, D.-Y., and Peiris, J.S.M. (2014). Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3793–3798.
- Leek, R.D., Talks, K.L., Pezzella, F., Turley, H., Campo, L., Brown, N.S., Bicknell, R., Taylor, M., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2002). Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res.* *62*, 1326–1329.

- Leigh, N.D., Bian, G., Ding, X., Liu, H., Aygun-Sunar, S., Burdelya, L.G., Gudkov, A.V., and Cao, X. (2014). A flagellin-derived toll-like receptor 5 agonist stimulates cytotoxic lymphocyte-mediated tumor immunity. *PloS One* 9, e85587.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.
- Leonard, E.J., Skeel, A., and Yoshimura, T. (1991). Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv. Exp. Med. Biol.* 305, 57–64.
- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 240–249.
- Li, S., Sun, R., Chen, Y., Wei, H., and Tian, Z. (2015). TLR2 limits development of hepatocellular carcinoma by reducing IL18-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 75, 986–995.
- Li, X., Wang, S., Zhu, R., Li, H., Han, Q., and Zhao, R.C. (2016). Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NFκB-TLR signaling pathway. *J. Hematol. Oncol.* 9.
- Lin, E.Y., Li, J.-F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* 66, 11238–11246.
- Lin, H., Yan, J., Wang, Z., Hua, F., Yu, J., Sun, W., Li, K., Liu, H., Yang, H., Lv, Q., et al. (2013). Loss of immunity-supported senescence enhances susceptibility to hepatocellular carcinogenesis and progression in Toll-like receptor 2-deficient mice. *Hepatology* 57, 171–182.
- Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y.-H., Ye, Y., Sikora, A.G., et al. (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 1165–1175.
- Liu, J., Wang, H., Yu, Q., Zheng, S., Jiang, Y., Liu, Y., Yuan, G., and Qiu, L. (2016). Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with Treg and MDSC cells in Non Small Cell Lung Carcinoma patients. *Hum. Immunol.* 77, 84–89.
- Liu, Y., Yan, W., Tohme, S., Chen, M., Fu, Y., Tian, D., Lotze, M., Tang, D., and Tsung, A. (2015). Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *J. Hepatology* 63, 114–121.
- Long, K.B., and Beatty, G.L. (2013). Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2, e26860.

- Lowe, E.L., Crother, T.R., Rabizadeh, S., Hu, B., Wang, H., Chen, S., Shimada, K., Wong, M.H., Michelsen, K.S., and Arditi, M. (2010). Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PloS One* 5, e13027.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5598–5603.
- Luo, Y., Jiang, Q.-W., Wu, J.-Y., Qiu, J.-G., Zhang, W.-J., Mei, X.-L., Shi, Z., and Di, J.-M. (2015). Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. *Oncotarget* 6, 22564–22574.
- Lynch, T.J., Bondarenko, I., Luft, A., Serwatowski, P., Barlesi, F., Chacko, R., Sebastian, M., Neal, J., Lu, H., Cuillerot, J.-M., et al. (2012). Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 2046–2054.
- Ma, F.-J., Liu, Z.-B., Hu, X., Ling, H., Li, S., Wu, J., and Shao, Z.-M. (2014). Prognostic value of myeloid differentiation primary response 88 and Toll-like receptor 4 in breast cancer patients. *PloS One* 9, e111639.
- Mai, C.W., Kang, Y.B., and Pichika, M.R. (2013). Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. *OncoTargets Ther.* 6, 1573–1587.
- Manicassamy, B., Manicassamy, S., Belicha-Villanueva, A., Pisanelli, G., Pulendran, B., and García-Sastre, A. (2010). Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11531–11536.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* 13, 265–270.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
- Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Biccato, S., Falisi, E., et al. (2010). Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 32, 790–802.
- Martin, M.U., and Wesche, H. (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 265–280.
- Maruyama, A., Shime, H., Takeda, Y., Azuma, M., Matsumoto, M., and Seya, T. (2015). Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 445–450.
- Maschalidi, S., Hässler, S., Blanc, F., Sepulveda, F.E., Tohme, M., Chignard, M., van Endert, P., Si-Tahar, M., Descamps, D., and Manoury, B. (2012). Asparagine endopeptidase controls anti-influenza virus immune responses through TLR7 activation. *PLoS Pathog.* 8, e1002841.

- Matijevic, T., Marjanovic, M., and Pavelic, J. (2009). Functionally active toll-like receptor 3 on human primary and metastatic cancer cells. *Scand. J. Immunol.* *70*, 18–24.
- Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J.H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P., and Segal, D.M. (2002). Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 689–695.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394–397.
- Meira, L.B., Bugni, J.M., Green, S.L., Lee, C.-W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Moroski-Erkul, C.A., McFaline, J.L., et al. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 2516–2525.
- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., and Matikainen, S. (2001). IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun.* *2*, 349–355.
- Milne, K., Köbel, M., Kalloger, S.E., Barnes, R.O., Gao, D., Gilks, C.B., Watson, P.H., and Nelson, B.H. (2009). Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PloS One* *4*, e6412.
- Miyake, K. (2004). Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin. Immunol.* *16*, 11–16.
- Mok, T.S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* *361*, 947–957.
- Molteni, M., Marabella, D., Orlandi, C., and Rossetti, C. (2006). Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4. *Cancer Lett.* *235*, 75–83.
- Morales, J.K., Kmiecik, M., Knutson, K.L., Bear, H.D., and Manjili, M.H. (2010). GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1- bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *123*, 39–49.
- Moreira, D., Zhang, Q., Hossain, D.M.S., Nechaev, S., Li, H., Kowolik, C.M., D'Apuzzo, M., Forman, S., Jones, J., Pal, S.K., et al. (2015). TLR9 signaling through NF- κ B/RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells. *Oncotarget* *6*, 17302–17313.
- Muccioli, M., and Benencia, F. (2014). Toll-like Receptors in Ovarian Cancer as Targets for Immunotherapies. *Front. Immunol.* *5*, 341.
- Muir, A., Soong, G., Sokol, S., Reddy, B., Gomez, M.I., Van Heeckeren, A., and Prince, A. (2004). Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *30*, 777–783.

- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631.
- Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Yamaguchi, M., Tomizawa, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., and Hirai, K. (2003). Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J. Immunol. Baltim. Md* 171, 3977–3982.
- Nakajima, T., Mizushima, N., Nakamura, J., and Kanai, K. (1986). Surface markers of NK cells in peripheral blood of patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Immunol. Lett.* 13, 7–10.
- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D.A., Goulet, R.J., and Sledge, G.W. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3629–3639.
- Naseemuddin, M., Iqbal, A., Nasti, T.H., Ghandhi, J.L., Kapadia, A.D., and Yusuf, N. (2012). Cell mediated immune responses through TLR4 prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 130, 765–774.
- Navarini-Meury, A.A., and Conrad, C. (2009). Melanoma and innate immunity--Active inflammation or just erroneous attraction? Melanoma as the source of leukocyte-attracting chemokines. *Semin. Cancer Biol.* 19, 84–91.
- Negus, R.P., Stamp, G.W., Hadley, J., and Balkwill, F.R. (1997). Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am. J. Pathol.* 150, 1723–1734.
- Neurath, M.F., and Finotto, S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 83–89.
- Newton, K., and Dixit, V.M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Nielsen, J.S., Sahota, R.A., Milne, K., Kost, S.E., Nesslinger, N.J., Watson, P.H., and Nelson, B.H. (2012). CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 3281–3292.
- Nomi, N., Kodama, S., and Suzuki, M. (2010). Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway. *Oncol. Rep.* 24, 225–231.
- Norbet, C., Joseph, A., Rossi, S.S., Bhalla, S., and Gutierrez, F.R. (2015). Asbestos-related lung disease: a pictorial review. *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* 44, 371–382.
- Obermajer, N., Muthuswamy, R., Odunsi, K., Edwards, R.P., and Kalinski, P. (2011). PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res.* 71, 7463–7470.

- Ochi, A., Graffeo, C.S., Zambirinis, C.P., Rehman, A., Hackman, M., Fallon, N., Barilla, R.M., Henning, J.R., Jamal, M., Rao, R., et al. (2012). Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 4118–4129.
- Ochoa, J.B., Strange, J., Kearney, P., Gellin, G., Endean, E., and Fitzpatrick, E. (2001). Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 25, 23–29.
- Okamoto, M., Oshikawa, T., Tano, T., Ohe, G., Furuichi, S., Nishikawa, H., Ahmed, S.U., Akashi, S., Miyake, K., Takeuchi, O., et al. (2003). Involvement of Toll-like receptor 4 signaling in interferon-gamma production and antitumor effect by streptococcal agent OK-432. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 316–326.
- Okon, I.S., Coughlan, K.A., Zhang, M., Wang, Q., and Zou, M.-H. (2015). Gefitinib-mediated reactive oxygen specie (ROS) instigates mitochondrial dysfunction and drug resistance in lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 290, 9101–9110.
- Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R.P., and Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* 71, 3505–3515.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 59, 3128–3133.
- Oosting, M., Cheng, S.-C., Bolscher, J.M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T.S., Verschuere, I.C., Arts, P., Garritsen, A., van Eenennaam, H., Sturm, P., et al. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4478–4484.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335–348.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13766–13771.
- Pak, A.S., Wright, M.A., Matthews, J.P., Collins, S.L., Petruzzelli, G.J., and Young, M.R. (1995). Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 1, 95–103.
- Paone, A., Starace, D., Galli, R., Padula, F., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., and Riccioli, A. (2008). Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 29, 1334–1342.

- Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* *140*, 197–208.
- Park, J.-H., Yoon, H.-E., Kim, D.-J., Kim, S.-A., Ahn, S.-G., and Yoon, J.-H. (2011). Toll-like receptor 5 activation promotes migration and invasion of salivary gland adenocarcinoma. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* *40*, 187–193.
- Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* *118*, 3030–3044.
- Pawar, R.D., Ramanjaneyulu, A., Kulkarni, O.P., Lech, M., Segerer, S., and Anders, H.-J. (2007). Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *18*, 1721–1731.
- Perrot, I., Blanchard, D., Freymond, N., Isaac, S., Guibert, B., Pachéco, Y., and Lebecque, S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2763–2769.
- Petersen, R.P., Campa, M.J., Sperlazza, J., Conlon, D., Joshi, M.-B., Harpole, D.H., and Patz, E.F. (2006). Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* *107*, 2866–2872.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* *314*, 997–1001.
- Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutmovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* *431*, 461–466.
- Pillai, M.R., Phanidhara, A., Kesari, A.L., Nair, P., and Nair, M.K. (1999). Cellular manifestations of human papillomavirus infection in the oral mucosa. *J. Surg. Oncol.* *71*, 10–15.
- Pimentel-Nunes, P., Afonso, L., Lopes, P., Roncon-Albuquerque, R., Gonçalves, N., Henrique, R., Moreira-Dias, L., Leite-Moreira, A.F., and Dinis-Ribeiro, M. (2011). Increased expression of toll-like receptors (TLR) 2, 4 and 5 in gastric dysplasia. *Pathol. Oncol. Res. POR* *17*, 677–683.
- Pise-Masison, C.A., Choi, K.S., Radonovich, M., Dittmer, J., Kim, S.J., and Brady, J.N. (1998). Inhibition of p53 transactivation function by the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* *72*, 1165–1170.
- Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., André, P., Dieu-Nosjean, M.-C., Alifano, M., Régnard, J.-F., et al. (2011). Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* *71*, 5412–5422.

- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 7415–7419.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 71–78.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* *282*, 2085–2088.
- Porembka, M.R., Mitchem, J.B., Belt, B.A., Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., Herndon, J., Gillanders, W.E., Linehan, D.C., and Goedegebuure, P. (2012). Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 61*, 1373–1385.
- Qian, L., Bian, G.-R., Zhou, Y., Wang, Y., Hu, J., Liu, X., and Xu, Y. (2015). Clinical significance of regulatory B cells in the peripheral blood of patients with oesophageal cancer. *Cent.-Eur. J. Immunol.* *40*, 263–265.
- Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat. Med.* *4*, 627–630.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4003–4008.
- Rakoff-Nahoum, S. (2006). Why cancer and inflammation? *Yale J. Biol. Med.* *79*, 123–130.
- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 57–63.
- Rao, S.P., Sancho, J., Campos-Rivera, J., Boutin, P.M., Severy, P.B., Weeden, T., Shankara, S., Roberts, B.L., and Kaplan, J.M. (2012). Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Exhibit Heterogeneous CD52 Expression Levels and Show Differential Sensitivity to Alemtuzumab Mediated Cytolysis. *PLoS ONE* *7*.
- Ray, A., Chakraborty, K., and Ray, P. (2013). Immunosuppressive MDSCs induced by TLR signaling during infection and role in resolution of inflammation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *3*, 52.
- Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., Macsharry, J., and Brint, E. (2013). Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 6084–6092.
- Rhee, S.H., Im, E., and Pothoulakis, C. (2008). Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* *135*, 518–528.

- Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9577–9582.
- Roberts, S.J., Ng, B.Y., Filler, R.B., Lewis, J., Glusac, E.J., Hayday, A.C., Tigelaar, R.E., and Girardi, M. (2007). Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6770–6775.
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 588–593.
- Roder, J.C., Haliotis, T., Klein, M., Korec, S., Jett, J.R., Ortaldo, J., Heberman, R.B., Katz, P., and Fauci, A.S. (1980). A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature* *284*, 553–555.
- Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A.H., Piazuelo, M.B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E.M., et al. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* *64*, 5839–5849.
- Rollins, B.J., Yoshimura, T., Leonard, E.J., and Pober, J.S. (1990). Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* *136*, 1229–1233.
- Ronkainen, H., Hirvikoski, P., Kauppila, S., Vuopala, K.S., Paavonen, T.K., Selander, K.S., and Vaarala, M.H. (2011). Absent Toll-like receptor-9 expression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *30*, 84.
- Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., et al. (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *361*, 958–967.
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J.M., et al. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 239–246.
- Rutkowski, M.R., Stephen, T.L., Svoronos, N., Allegrezza, M.J., Tesone, A.J., Perales-Puchalt, A., Brencicova, E., Escovar-Fadul, X., Nguyen, J.M., Cadungog, M.G., et al. (2015). Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell* *27*, 27–40.
- Sade-Feldman, M., Kanterman, J., Ish-Shalom, E., Elnekave, M., Horwitz, E., and Baniyash, M. (2013). Tumor necrosis factor- α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity* *38*, 541–554.

- Salaun, B., Lebecque, S., Matikainen, S., Rimoldi, D., and Romero, P. (2007). Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 4565–4574.
- Sato, T., Shimosato, T., Ueda, A., Ishigatsubo, Y., and Klinman, D.M. (2015). Intrapulmonary Delivery of CpG Microparticles Eliminates Lung Tumors. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 2198–2205.
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N., and Hoon, D.S.B. (2009). Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* *2 Suppl 1*, 205–214.
- Schantz, S.P., Shillitoe, E.J., Brown, B., and Campbell, B. (1986). Natural killer cell activity and head and neck cancer: a clinical assessment. *J. Natl. Cancer Inst.* *77*, 869–875.
- Scheeren, F.A., Kuo, A.H., van Weele, L.J., Cai, S., Glykofridis, I., Sikandar, S.S., Zabala, M., Qian, D., Lam, J.S., Johnston, D., et al. (2014). A cell-intrinsic role for TLR2-MYD88 in intestinal and breast epithelia and oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* *16*, 1238–1248.
- Schmausser, B., Andrusis, M., Endrich, S., Müller-Hermelink, H.-K., and Eck, M. (2005). Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *295*, 179–185.
- Schmid, M.C., and Varner, J.A. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J. Oncol.* *2010*, 201026.
- Schmidt, L.H., Kümmel, A., Görlich, D., Mohr, M., Bröckling, S., Mikesch, J.H., Grünewald, I., Marra, A., Schultheis, A.M., Wardelmann, E., et al. (2015). PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups. *PloS One* *10*, e0136023.
- Schmidt, M., Hellwig, B., Hammad, S., Othman, A., Lohr, M., Chen, Z., Boehm, D., Gebhard, S., Petry, I., Lebrecht, A., et al. (2012). A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin κ C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 2695–2703.
- Schopfer, F.J., Baker, P.R.S., and Freeman, B.A. (2003). NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* *28*, 646–654.
- Schoppmann, S.F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., and Kerjaschki, D. (2002). Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* *161*, 947–956.
- Schulze, H.J., Cribier, B., Requena, L., Reifenberger, J., Ferrándiz, C., Garcia Diez, A., Tebbs, V., and McRae, S. (2005). Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br. J. Dermatol.* *152*, 939–947.

- Seitz, M., Loetscher, P., Dewald, B., Towbin, H., Gallati, H., and Baggiolini, M. (1995). Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* *25*, 1129–1132.
- Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K.A., Tan, G., Bronte, V., and Borrello, I. (2004). High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* *64*, 6337–6343.
- Seto, T., Kato, T., Nishio, M., Goto, K., Atagi, S., Hosomi, Y., Yamamoto, N., Hida, T., Maemondo, M., Nakagawa, K., et al. (2014). Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* *15*, 1236–1244.
- Shackleton, M., Davis, I.D., Hopkins, W., Jackson, H., Dimopoulos, N., Tai, T., Chen, Q., Parente, P., Jefford, M., Masterman, K.-A., et al. (2004). The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immun.* *4*, 9.
- Shah, S., Divekar, A.A., Hilchey, S.P., Cho, H.-M., Newman, C.L., Shin, S.-U., Nechustan, H., Challita-Eid, P.M., Segal, B.M., Yi, K.H., et al. (2005). Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int. J. Cancer* *117*, 574–586.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107–1111.
- Shao, Y., Lo, C.M., Ling, C.C., Liu, X.B., Ng, K.T.-P., Chu, A.C.Y., Ma, Y.Y., Li, C.X., Fan, S.T., and Man, K. (2014). Regulatory B cells accelerate hepatocellular carcinoma progression via CD40/CD154 signaling pathway. *Cancer Lett.* *355*, 264–272.
- Shen, H.-M., and Tergaonkar, V. (2009). NF κ B signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *14*, 348–363.
- Shi, W., Su, L., Li, Q., Sun, L., Lv, J., Li, J., and Cheng, B. (2014). Suppression of toll-like receptor 2 expression inhibits the bioactivity of human hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *35*, 9627–9637.
- Shimabukuro-Vornhagen, A., Schlößer, H.A., Gryschok, L., Malcher, J., Wennhold, K., Garcia-Marquez, M., Herbold, T., Neuhaus, L.S., Becker, H.J., Fiedler, A., et al. (2014). Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* *5*, 4651–4664.
- Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., Tahara, H., Inoue, N., and Seya, T. (2012). Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 2066–2071.

- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 5211–5218.
- Shimizu, K., Nakata, M., Hirami, Y., Yukawa, T., Maeda, A., and Tanemoto, K. (2010). Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *5*, 585–590.
- Shojaei, H., Oberg, H.-H., Juricke, M., Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2009). Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gammadelta T cells. *Cancer Res.* *69*, 8710–8717.
- Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van Damme, J., and Mantovani, A. (2000). Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 762–767.
- Sica, A., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* *267*, 204–215.
- Siggs, O.M., Berger, M., Krebs, P., Arnold, C.N., Eidenschenk, C., Huber, C., Pirie, E., Smart, N.G., Khovananth, K., Xia, Y., et al. (2010). A mutation of Ikbkg causes immune deficiency without impairing degradation of IkappaB alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3046–3051.
- Sinha, P., Clements, V.K., and Ostrand-Rosenberg, S. (2005). Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 636–645.
- Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* *67*, 4507–4513.
- Sironi, M., Muñoz, C., Pollicino, T., Siboni, A., Sciacca, F.L., Bernasconi, S., Vecchi, A., Colotta, F., and Mantovani, A. (1993). Divergent effects of interleukin-10 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* *23*, 2692–2695.
- Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., et al. (2012). Impaired IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res.* *72*, 5188–5197.
- Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z.J. (2009). The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 769–796.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* *235*, 177–182.

- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L.H., Degli-Esposti, M.A., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* *42*, 501–510.
- Sonda, N., Chioda, M., Zilio, S., Simonato, F., and Bronte, V. (2011). Transcription factors in myeloid-derived suppressor cell recruitment and function. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 279–285.
- Song, E.-J., Kang, M.-J., Kim, Y.-S., Kim, S.-M., Lee, S.-E., Kim, C.-H., Kim, D.-J., and Park, J.-H. (2011). Flagellin promotes the proliferation of gastric cancer cells via the Toll-like receptor 5. *Int. J. Mol. Med.* *28*, 115–119.
- Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E., and Apte, R.N. (2005). CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 8200–8208.
- Sovak, M.A., Bellas, R.E., Kim, D.W., Zanieski, G.J., Rogers, A.E., Traish, A.M., and Sonenshein, G.E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.* *100*, 2952–2960.
- Spaner, D.E., Shi, Y., White, D., Mena, J., Hammond, C., Tomic, J., He, L., Tomai, M.A., Miller, R.L., Booth, J., et al. (2006). Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* *20*, 286–295.
- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* *6*, 447–458.
- Sperduto, P.W., Kased, N., Roberge, D., Xu, Z., Shanley, R., Luo, X., Sneed, P.K., Chao, S.T., Weil, R.J., Suh, J., et al. (2012). Summary Report on the Graded Prognostic Assessment: An Accurate and Facile Diagnosis-Specific Tool to Estimate Survival for Patients With Brain Metastases. *J. Clin. Oncol.* *30*, 419–425.
- Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* *70*, 68–77.
- Srivastava, M.K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U.K., Kar, U., Huang, M., Johnson, M.F., Lee, J.M., Elashoff, D., Strieter, R., et al. (2012). Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PloS One* *7*, e40677.
- Stary, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., and Stingl, G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1441–1451.
- Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S., and Liotta, L.A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* *9*, 541–573.
- Stewart, S.E., Eddy, B.E., and Borgese, N. (1958). Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.* *20*, 1223–1243.

- Sullivan, J.L., Byron, K.S., Brewster, F.E., and Purtilo, D.T. (1980). Deficient natural killer cell activity in x-linked lymphoproliferative syndrome. *Science* 210, 543–545.
- Sumida, K., Wakita, D., Narita, Y., Masuko, K., Terada, S., Watanabe, K., Satoh, T., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2012). Anti-IL-6 receptor mAb eliminates myeloid-derived suppressor cells and inhibits tumor growth by enhancing T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 42, 2060–2072.
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., et al. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750–756.
- Swann, J.B., and Smyth, M.J. (2007). Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117, 1137–1146.
- Syrjänen, K.J. (1979). Condylomatous changes in neoplastic bronchial epithelium. Report of a case. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 38, 299–304.
- Szczepański, M., Stelmachowska, M., Stryczyński, L., Golusiński, W., Samara, H., Mozer-Lisewska, I., and Zeromski, J. (2007). Assessment of expression of toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 264, 525–530.
- Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Szajnik, M., Harasymczuk, M., Boyiadzis, M., Kruk-Zagajewska, A., Szyfter, W., Zeromski, J., and Whiteside, T.L. (2009). Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res.* 69, 3105–3113.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E.M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., et al. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* 7, 156–164.
- Tadmor, T., Zhang, Y., Cho, H.-M., Podack, E.R., and Rosenblatt, J.D. (2011). The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 60, 609–619.
- Takahashi, H., Ogata, H., Nishigaki, R., Broide, D.H., and Karin, M. (2010). Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell* 17, 89–97.
- Takemura, N., Kawasaki, T., Kunisawa, J., Sato, S., Lamichhane, A., Kobiyama, K., Aoshi, T., Ito, J., Mizuguchi, K., Karuppuchamy, T., et al. (2014). Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nat. Commun.* 5, 3492.
- Takemura, R., Takaki, H., Okada, S., Shime, H., Akazawa, T., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Teshima, T., and Seya, T. (2015). PolyI:C-Induced, TLR3/RIP3-Dependent Necroptosis Backs Up Immune Effector-Mediated Tumor Elimination In Vivo. *Cancer Immunol. Res.* 3, 902–914.

- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443–451.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13, 933–940.
- Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J., and Starkey, J.R. (1980). Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis: C57BL/6 normal and beige mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 929–935.
- Tao, H., Mimura, Y., Aoe, K., Kobayashi, S., Yamamoto, H., Matsuda, E., Okabe, K., Matsumoto, T., Sugi, K., and Ueoka, H. (2012). Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer Amst. Neth.* 75, 95–101.
- Tawar, R.G., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Varela, P.F., Damier-Piolle, L., Castagné, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., et al. (2009). Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326, 1279–1283.
- Testerman, T.L., Gerster, J.F., Imbertson, L.M., Reiter, M.J., Miller, R.L., Gibson, S.J., Wagner, T.L., and Tomai, M.A. (1995). Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J. Leukoc. Biol.* 58, 365–372.
- Theodoropoulos, G.E., Saridakis, V., Karantanos, T., Michalopoulos, N.V., Zagouri, F., Kontogianni, P., Lymperi, M., Gazouli, M., and Zografos, G.C. (2012). Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. *Breast Edinb. Scotl.* 21, 534–538.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Tian, J., Huang, K., Krishnan, S., Svabek, C., Rowe, D.C., Brewah, Y., Sanjuan, M., Patera, A.C., Kolbeck, R., Herbst, R., et al. (2013). RAGE inhibits human respiratory syncytial virus syncytium formation by interfering with F-protein function. *J. Gen. Virol.* 94, 1691–1700.
- Tjomsland, V., Spångeus, A., Sandström, P., Borch, K., Messmer, D., and Larsson, M. (2010). Semi mature blood dendritic cells exist in patients with ductal pancreatic adenocarcinoma owing to inflammatory factors released from the tumor. *PloS One* 5, e13441.
- Toh, B., Wang, X., Keeble, J., Sim, W.J., Khoo, K., Wong, W.-C., Kato, M., Prevost-Blondel, A., Thiery, J.-P., and Abastado, J.-P. (2011). Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol.* 9, e1001162.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443–2454.

- Tye, H., Kennedy, C.L., Najdovska, M., McLeod, L., McCormack, W., Hughes, N., Dev, A., Sievert, W., Ooi, C.H., Ishikawa, T., et al. (2012). STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell* 22, 466–478.
- Tyurin, V.A., Cao, W., Tyurina, Y.Y., Gabrilovich, D.I., and Kagan, V.E. (2011). Mass-spectrometric characterization of peroxidized and hydrolyzed lipids in plasma and dendritic cells of tumor-bearing animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 149–153.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401, 811–815.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.
- Velcheti, V., Schalper, K.A., Carvajal, D.E., Anagnostou, V.K., Syrigos, K.N., Sznol, M., Herbst, R.S., Gettinger, S.N., Chen, L., and Rimm, D.L. (2014). Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 94, 107–116.
- Villablanca, E.J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentini, B., Bregni, M., et al. (2010). Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat. Med.* 16, 98–105.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44–49.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 388–400.
- Wallin, R.P.A., Screpanti, V., Michaëlsson, J., Grandien, A., and Ljunggren, H.-G. (2003). Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 33, 2727–2735.
- Wang, D., Precopio, M., Lan, T., Yu, D., Tang, J.X., Kandimalla, E.R., and Agrawal, S. (2010). Antitumor activity and immune response induction of a dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1788–1797.
- Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.* 206, 1457–1464.
- Wang, L., Chang, E.W.Y., Wong, S.C., Ong, S.-M., Chong, D.Q.Y., and Ling, K.L. (2013). Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 190, 794–804.

- Wang, W.W., Yuan, X.L., Chen, H., Xie, G.H., Ma, Y.H., Zheng, Y.X., Zhou, Y.L., and Shen, L.S. (2015). CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer. *Oncotarget* 6, 33486–33499.
- Wei, X., Jin, Y., Tian, Y., Zhang, H., Wu, J., Lu, W., and Lu, X. (2016). Regulatory B cells contribute to the impaired antitumor immunity in ovarian cancer patients. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 6581–6588.
- Woo, J.R., Liss, M.A., Muldong, M.T., Palazzi, K., Strasner, A., Ammirante, M., Varki, N., Shabaik, A., Howell, S., Kane, C.J., et al. (2014). Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. *J. Transl. Med.* 12, 30.
- Wu, C.-T., Hsieh, C.-C., Lin, C.-C., Chen, W.-C., Hong, J.-H., and Chen, M.-F. (2012). Significance of IL-6 in the transition of hormone-resistant prostate cancer and the induction of myeloid-derived suppressor cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 90, 1343–1355.
- Wu, P., Dupont, W.D., Griffin, M.R., Carroll, K.N., Mitchel, E.F., Gebretsadik, T., and Hartert, T.V. (2008). Evidence of a causal role of winter virus infection during infancy in early childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 1123–1129.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* 15, 1016–1022.
- Xie, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, H., Wang, J., and Hu, Z. (2009). Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 1027–1032.
- Xu, Y.-Y., Chen, L., Zhou, J.-M., Wu, Y.-Y., and Zhu, Y.-Y. (2013). Inhibitory effect of dsRNA TLR3 agonist in a rat hepatocellular carcinoma model. *Mol. Med. Rep.* 8, 1037–1042.
- Yang, F., Li, Y., Wu, T., Na, N., Zhao, Y., Li, W., Han, C., Zhang, L., Lu, J., and Zhao, Y. (2016). TNF α -induced M-MDSCs promote transplant immune tolerance via nitric oxide. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 94, 911–920.
- Yang, H., Zhou, H., Feng, P., Zhou, X., Wen, H., Xie, X., Shen, H., and Zhu, X. (2010). Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 29, 92.
- Yang, H., Wang, B., Wang, T., Xu, L., He, C., Wen, H., Yan, J., Su, H., and Zhu, X. (2014). Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PloS One* 9, e109980.
- Yang, Y.C., Chang, C.L., Huang, Y.W., and Wang, D.Y. (2001). Possible cofactor in cervical carcinogenesis: proliferation index of the transformation zone in cervicitis. *Chang Gung Med. J.* 24, 615–620.

- Yao, M., Zhang, W., Zhang, Q., Xing, L., Xu, A., Liu, Q., and Cui, B. (2011). Overexpression of MUC1 enhances proangiogenic activity of non-small-cell lung cancer cells through activation of Akt and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Lung* 189, 453–460.
- Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 443–478.
- Yesudhas, D., Gosu, V., Anwar, M.A., and Choi, S. (2014). Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front. Immunol.* 5, 334.
- Yoneda, K., Sugimoto, K., Shiraki, K., Tanaka, J., Beppu, T., Fuke, H., Yamamoto, N., Masuya, M., Horie, R., Uchida, K., et al. (2008). Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF-kappaB activation and apoptosis. *Int. J. Oncol.* 33, 929–936.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2031–2035.
- Youn, J.-I., and Gabrilovich, D.I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* 40, 2969–2975.
- Young, R.P., and Hopkins, R.J. (2010). Link between COPD and lung cancer. *Respir. Med.* 104, 758–759.
- Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798–809.
- Yuan, A., Hsiao, Y.-J., Chen, H.-Y., Chen, H.-W., Ho, C.-C., Chen, Y.-Y., Liu, Y.-C., Hong, T.-H., Yu, S.-L., Chen, J.J.W., et al. (2015). Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. *Sci. Rep.* 5, 14273.
- Yusuf, N., Nasti, T.H., Long, J.A., Naseemuddin, M., Lucas, A.P., Xu, H., and Elmets, C.A. (2008). Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. *Cancer Res.* 68, 615–622.
- Zambirinis, C.P., Levie, E., Nguy, S., Avanzi, A., Barilla, R., Xu, Y., Seifert, L., Daley, D., Greco, S.H., Deutsch, M., et al. (2015). TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 212, 2077–2094.
- Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., et al. (2005). Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 65, 3044–3048.
- Zeisberger, S.M., Odermatt, B., Marty, C., Zehnder-Fjällman, A.H.M., Ballmer-Hofer, K., and Schwendener, R.A. (2006). Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer* 95, 272–281.

- Zhang, J., Patel, L., and Pienta, K.J. (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *21*, 41–48.
- Zhang, Y., Luo, F., Cai, Y., Liu, N., Wang, L., Xu, D., and Chu, Y. (2011). TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 1963–1969.
- Zhang, Y., Wang, Q., Ma, A., Li, Y., Li, R., and Wang, Y. (2014). Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. *Oncol. Rep.* *31*, 2298–2304.
- Zhao, Z., Cheng, X., Wang, Y., Han, R., Li, L., Xiang, T., He, L., Long, H., Zhu, B., and He, Y. (2014). Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. *PloS One* *9*, e95884.
- Zhou, C., Wu, Y.-L., Chen, G., Feng, J., Liu, X.-Q., Wang, C., Zhang, S., Wang, J., Zhou, S., Ren, S., et al. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* *12*, 735–742.
- Zhou, J., Min, Z., Zhang, D., Wang, W., Marincola, F., and Wang, X. (2014). Enhanced frequency and potential mechanism of B regulatory cells in patients with lung cancer. *J. Transl. Med.* *12*, 304.
- Zhou, S.-X., Li, F.-S., Qiao, Y.-L., Zhang, X.-Q., and Wang, Z.-D. (2012). Toll-like receptor 5 agonist inhibition of growth of A549 lung cancer cells in vivo in a Myd88 dependent manner. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *13*, 2807–2812.
- Zhou, X., Su, Y.-X., Lao, X.-M., Liang, Y.-J., and Liao, G.-Q. (2016). 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.
- Zhou, Z., Yu, X., Zhang, J., Tian, Z., and Zhang, C. (2015). TLR7/8 agonists promote NK-DC cross-talk to enhance NK cell anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*
- Zhu, J., He, S., Du, J., Wang, Z., Li, W., Chen, X., Jiang, W., Zheng, D., and Jin, G. (2015). Local administration of a novel Toll-like receptor 7 agonist in combination with doxorubicin induces durable tumouricidal effects in a murine model of T cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *8*, 21.
- Zilio, S., and Serafini, P. (2016). Neutrophils and Granulocytic MDSC: The Janus God of Cancer Immunotherapy. *Vaccines* *4*.
- Zucali, J.R., Dinarello, C.A., Oblon, D.J., Gross, M.A., Anderson, L., and Weiner, R.S. (1986). Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J. Clin. Invest.* *77*, 1857–1863.

Institut National Du Cancer - Accueil.

OMS | Communiqués de presse.

Société canadienne du cancer.

Ligue contre le cancer | Association de lutte contre le Cancer.

ANNEXES

**Revue 1: Dual roles of TLR7 in lung cancer
microenvironment**

Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment

Marion Dajon^{1,2,3}, Kristina Iribarren^{1,2,3}, and Isabelle Cremer^{1,2,3,*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); UMRS1138; Centre de Recherche des Cordeliers; Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; UMRS1138; Paris France; ³Université Paris Descartes; UMRS1138; Paris, France

Keywords: chemoresistance, lung cancer, MDSC, TLR7

Toll-like receptor 7 (TLR7) agonists are under investigation for their ability to enhance antitumor immune responses. However, these agonists can also stimulate TLR7-expressing tumor cells. High TLR7 expression in the primary tumor confers poor clinical outcome and resistance to chemotherapy in lung cancer patients. This protumorigenic effect of TLR7 has been validated in murine models of lung carcinoma.

Introduction

TLR7, a receptor for single stranded RNA, is expressed on endosomes in immune cells including plasmacytoid and conventional dendritic cells (pDC and cDC), macrophages, B lymphocytes and NK cells. Stimulation of these cells with TLR7 ligands induces their maturation and activation, and the secretion of pro-inflammatory cytokines. These properties are currently being exploited in pre-clinical studies to improve antitumor therapies. Contrarily, stimulation of TLR7 on tumor cells can lead to tumor progression and resistance to treatment.

Antitumor effects of TLR7

The use of TLR7 agonists such as imiquimod, loxoribine, CL264, ssRNA40, R848, and SM-276 001, either alone or as vaccine adjuvants, induces potent immunity leading to antitumor therapeutic efficacy in several murine models. In line with these observations, it has been demonstrated that systemic TLR7 agonist injection reduces tumor progression and modulates the systemic and intratumoral immune contexture in colon, renal and mammary carcinomas. This has been illustrated by a decrease in intratumoral regulatory T cells, an increase of

antigen-specific interferon γ (IFN γ) producing effector cells in the spleen,¹ an increased number of natural killer (NK), NKT cells and T lymphocytes,² and by activation and maturation of pDC able to efficiently stimulate antitumoral responses.³ These results observed in animal models demonstrate the use of TLR7 agonists as an attractive strategy to treat several tumor types.

The antitumor effects arising from TLR7 stimulation have also been demonstrated in human skin cancers and cervical intraepithelial neoplasia. It has been shown that TLR7 stimulation by imiquimod is a successful treatment for actinic keratosis (intraepithelial neoplasia), with 27% of patients exhibiting a complete clinical response.⁴ It has also been shown that the application of imiquimod on invasive primary melanoma results in local regression of tumor size, which is associated with increased levels of CD4⁺T and CD8⁺T lymphocytes both in the skin and in lymph nodes.⁵

Protumorigenic effects of TLR7

Contrary to the therapeutic benefits of TLR7 agonists on the immune cells, several studies have shown that TLR7 stimulation augments tumor progression. Previously we have shown that TLR7 is highly expressed on primary tumor cells

from non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) patients.⁶ Furthermore, stimulation with TLR7 agonists induced a strong *in vitro* pro-tumorigenic effect and resistance to chemotherapeutic drugs currently used to treat NSCLC patients.⁶ We recently verified these effects in both immunodeficient (NOD/SCID) and immunocompetent (C57BL/6) murine models, using subcutaneously grafted lung carcinoma cells.⁷ In both models, we showed that repeated administration of CL264, loxoribine or imiquimod leads to increased tumor volume, which was similar to the results we obtained in TLR7-deficient mice. This protumorigenic effect could be mediated either by direct stimulation of TLR7-expressing tumor cells as we observed in experiments *in vitro* or by increased recruitment and differentiation of immunosuppressive cells in the tumor microenvironment. In support of the second scenario, we observed an increased frequency of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and a reduction of CD8⁺T cells in the tumors of mice treated with TLR7 agonists compared to no treatment.⁷ Additional experiments are needed to further characterize the role of MDSCs in the protumorigenic effects of TLR7 stimulation. We hypothesize that the recruitment of MDSCs could be induced by cytokines and/or chemokines produced by tumor cells upon TLR7 stimulation (Fig. 1).

*Correspondence to: Isabelle Cremer; Email: isabelle.cremer@crc.jussieu.fr

Submitted: 11/20/2014; Accepted: 11/21/2014

http://dx.doi.org/10.4161/2162402X.2014.991615

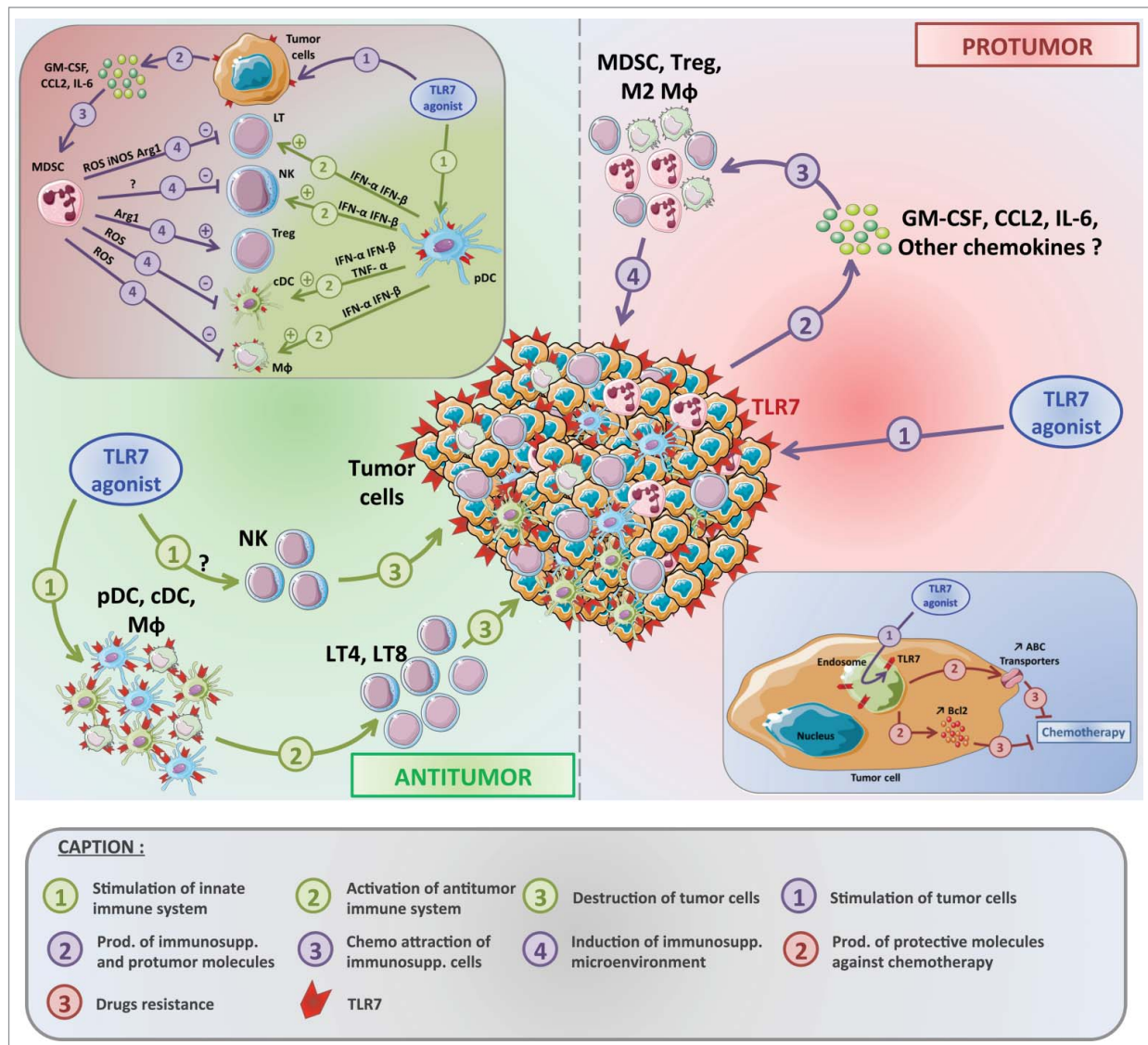


Figure 1. Dichotomous effects of TLR7 stimulation on tumor progression and chemotherapy. Toll-like receptor 7 (TLR7) stimulation can modify the tumor microenvironment. This can induce either an antitumor or a protumorigenic effect via both direct or indirect stimulation of cancer cells or immune cells. TLR7 stimulation can also decrease the efficacy of chemotherapy.

Other groups have shown similar results in additional tumor models. For example, in a pancreatic cancer model composed of TLR7-expressing tumor cells, the stimulation of this receptor was shown to induce an acceleration of tumor growth and reduce the expression of several antitumor molecules such as PTEN, p16 and cyclin D1, concomitantly with an increase of pro-tumoral molecules, including p21, p27, p53, c-Myc and cyclin-B1.⁸ Similarly, in a study of hepatocellular carcinoma tumor cells were shown to express TLR7, the stimulation of which

induced increased proliferation of malignant cells.⁹

In addition to effects on tumor progression, TLR stimulation also impacts the efficacy of cancer treatments, particularly in the case of chemotherapy. We first demonstrated *in vitro* that the addition of TLR7 agonist significantly reduced the effectiveness of different chemotherapeutic drugs (cisplatin, carboplatin, doxorubicin and navelbine), used alone or in combination, to kill human lung adenocarcinoma cells. We later reproduced these effects in murine models of lung carcinoma with the elimination of antitumor

efficacy of cisplatin when co-injected with a TLR7 agonist. Finally, we found that among NSCLC patients those who highly express TLR7 on primary tumor cells have a significantly reduced response to chemotherapy. Drug resistance induced by TLR7 stimulation could, conceptually, be mediated by several distinct mechanisms, such as an increase in expression of anti-apoptotic molecules, an upregulation of members of the ABC drug-transporter family, or a decrease in the levels of apoptotic promoting factors. Such mechanisms have been demonstrated in an ovarian carcinoma model in which

stimulation of another TLR, namely TLR4 induced resistance to paclitaxel treatment through the induction of anti-apoptotic proteins.¹⁰

Conclusions

We have demonstrated that in opposition to the antitumor enhancement of

immune cells, TLR7 stimulation of tumor cells induces tumor progression (summarized in Fig. 1). Multiple parameters could underlie this apparent discrepancy, such as the type of tumor, the level of TLR7 expression, the downstream function of TLR7 signaling in particular tumor cells, or chemotaxis of suppressive cells into the tumor. These major pathways of TLR7

stimulation could act either directly or indirectly on both immune and tumor cells, converging on cancer patient outcome.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Wang D, Precopio M, Lan T, Yu D, Tang JX, Kandimalla ER, Agrawal S. Antitumor activity and immune response induction of a dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8. *Mol Cancer Ther* 2010 Jun; 9(6):1788-97; PMID:20515950; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1198>
2. Koga-Yamakawa E, Dovedi SJ, Murata M, Matsui H, Leishman AJ, Bell J, Ferguson D, Heaton SP, Oki T, Tomizawa H, et al. Intratracheal and oral administration of SM-276001: a selective TLR7 agonist, leads to antitumor efficacy in primary and metastatic models of cancer. *Int J Cancer J Int Cancer* 2013 Feb 1; 132(3):580-90; PMID:22733292; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27691>
3. Le Mercier I, Pujol D, Sanlaville A, Sisirak V, Gobert M, Durand I, Dubois B, Treilleux I, Marvel J, Vlach J, et al. Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res* 2013 Aug 1; 73(15):4629-40; PMID:23722543; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3058>
4. Serra-Guillén C, Nagore E, Hueso L, Traves V, Messeguer F, Sanmartín O, Llombart B, Requena C, Borella-Estrada R, Guillén C. A randomized pilot comparative study of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy versus imiquimod 5% versus sequential application of both therapies in immunocompetent patients with actinic keratosis: clinical and histologic outcomes. *J Am Acad Dermatol* 2012 Apr; 66(4):e131-7; PMID:22226430; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2011.11.933>
5. Narayan R, Nguyen H, Bentow JJ, Moy L, Lee DK, Greger S, Haskell J, Vanchinathan V, Chang PL, Tsui S, et al. Immunomodulation by imiquimod in patients with high-risk primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2012 Jan; 132(1):163-9; PMID:21850019; <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.247>
6. Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliendo R, Magdeleinat P, Mami-Chouaib F, Dieu-Nosjean MC, Fridman WH, et al. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest*. 2010 Apr; 120(4):1285-97; PMID:20237413; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI36551>
7. Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, Lupo A, Cherfils-Vicini J, Goc J, Katsahian S, et al. TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2014 Sep 15; 74(18):5008-18; PMID:25074614 ; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2698>
8. Ochi A, Graffeo CS, Zambirinis CP, Rehman A, Hackman M, Fallon N, Barilla RM, Henning JR, Jamal M, Rao R, et al. Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J Clin Invest*. 2012 Nov 1; 122(11):4118-29; PMID:23023703; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI63606>
9. Mohamed FE, Al-Jehani RM, Minogue SS, Andreola F, Winstanley A, Olde Damink SWM, Habtesion A, Malagó M, Davies N, Luong TV, et al. Effect of toll-like receptor 7 and 9 targeted therapy to prevent the development of hepatocellular carcinoma. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2014 Jul 2; PMID:24990399; 10.1111/liv.12626
10. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi D-A, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 1; 66(7):3859-68; PMID:16585214; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3948>

**Revue 2: Toll-like receptor stimulation
in cancer: A pro- and anti-tumor double-
edged sword**



Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword



Marion Dajon^{a,b,c}, Kristina Iribarren^{a,b,c}, Isabelle Cremer^{a,b,c,*}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris F-75006, France

^b Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMRS1138, Paris F-75006, France

^c Université Paris Descartes, UMRS1138, Paris F-75006, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2015

Received in revised form 6 June 2016

Accepted 10 June 2016

Available online 14 June 2016

Keywords:

TLR

Immune cells

Tumor cells

Pro-tumoral effect

Anti-tumoral effect

TLR signaling

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) are a family of transmembrane receptors that recognize various pathogen- and damage-associated molecular pattern molecules playing an important role in inflammation by activating NF- κ B. TLRs, mainly expressed by innate immune cells, are involved in inducing and regulating adaptive immune responses. However, the expression of TLRs has also been observed in many tumors, and their stimulation results in tumor progression or regression, depending on the TLR and tumor type. Here we review the role of TLRs in conferring anti- or pro-tumoral effects. The anti-tumoral effects can result from direct induction of tumor cell death and/or activation of efficient anti-tumoral immune responses, and the pro-tumoral effects may be due to inducing tumor cell survival and proliferation or by acting on suppressive or inflammatory immune cells in the tumor microenvironment.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	90
2. Toll-like receptors.....	90
2.1. TLR signaling.....	91
2.2. TLR expression profile.....	91
3. Involvement of TLRs in cancers.....	91
3.1. Anti- and pro-tumoral effects of TLR stimulation (Table 2)	91
3.2. TLR1/2	91
3.2.1. Anti-tumoral effect.....	91
3.2.2. Pro-tumoral effect.....	91
3.2.3. Controversies.....	92
3.3. TLR3	93
3.3.1. Anti-tumoral effect.....	93
3.3.2. Pro-tumoral effect	93
3.3.3. Controversies.....	93
3.4. TLR4	93
3.4.1. Anti-tumoral effect.....	93
3.4.2. Pro-tumoral effects of TLR4.....	95
3.4.3. Controversies.....	95
3.5. TLR5	95

* Corresponding author at: INSERM U872, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75006, Paris, France.

E-mail addresses: isabelle.cremer@crc.jussieu.fr, tarik.rerski@crc.jussieu.fr (I. Cremer).

3.5.1.	Anti-tumoral effect	95
3.5.2.	Pro-tumoral effect	95
3.6.	TLR7	95
3.6.1.	Anti-tumoral effect	95
3.6.2.	Pro-tumoral effect	96
3.6.3.	Controversies	96
3.7.	TLR9	96
3.7.1.	Anti-tumoral effect	96
3.7.2.	Pro-tumoral effect	96
3.7.3.	Controversies	97
4.	Conclusions	97
	Conflict of interest	97
	Acknowledgments	97
	References	97

1. Introduction

The immune system contributes to fighting pathogen attack (Akira et al., 2006). The first line of defense involves the innate immune system, with the contribution of various cell types including monocytes and macrophages, dendritic cells (DCs), neutrophils, and natural killer (NK) cells (Janeway and Medzhitov, 2002). These innate immune cells use intracellular or membrane-associated pattern recognition receptors (PRRs) to recognize pathogen-associated molecular pattern (PAMP) or damaged-associated molecular pattern (DAMP) molecules released from dying cells (Newton and Dixit, 2012), then produce inflammatory cytokines and type I interferons (IFNs) to establish an effective defense system (Akira et al., 2006). The PRR family includes several types of recognition receptors: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, C-type lectin receptors and Toll-like receptors (TLRs). The latter receptors are expressed by immune cells but also by epithelial cells, for defense against pathogens entering the body through the skin and mucous membranes.

The involvement of the immune system in controlling tumor development and progression has been well documented. It was demonstrated in immunodeficient mouse models lacking T, B and NK T cells, a grater numbers of tumors than in immunocompetent mice (Shankaran et al., 2001). The concept of immuno-editing, also called “3E” theory, for elimination, equilibrium and escape, implies the activation of the adaptive immune system and its ability to recognize and eliminate transformed cells (Dunn et al., 2004). The first step, elimination, consists of establishing effective anti-tumor immunity for the eradication of tumor cells. With equilibrium, genetic variants of tumor cells emerge and malignant cells survive and counteract the pressure induced by the immune system. Thus, immunity at this stage is still able to control tumor cells, thereby leading to a dynamic balance between tumor and immune cells. Finally, with escape, malignant cells escape from the immune system, for tumor progression and metastasis. The importance of immunity in the control of tumor progression is illustrated by the fact that in many solid tumors, a high density of intratumoral immune cells is associated with good overall survival of patients (Fridman et al., 2012; Pagès et al., 2010), which confirms the concept of immunosurveillance (Hanahan and Weinberg, 2011).

Despite this anti-tumoral role of the immune response, chronic inflammation can feature tumor-infiltrating immune cells secreting inflammatory cytokines and chemokines that can promote tumor progression (Fridman et al., 2012). Indeed, in 2011, new markers were added to the hallmarks of cancer – “avoiding immune destruction” and “tumor-promoting inflammation” (Hanahan and Weinberg, 2011) – in addition to those established in 2000 (Hanahan and Weinberg, 2000).

In many cancers, chronic inflammation, mainly caused by chemicals and physical agents and/or by some immune cells (Balkwill and Mantovani, 2001), is considered a cofactor of carcinogenesis and/or favoring tumor progression and metastasis. Further evidence of the link between inflammation and tumor development is illustrated by the reduced cancer rates in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs and increased rates in obese patients with high inflammation in adipose tissue (Trinchieri, 2012). With chronic inflammation, some signaling pathways, such as NF- κ B or mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, are constitutively activated, with many studies demonstrating that their activation has a pro-tumoral effect (Balkwill and Coussens, 2004). In hepatocellular carcinoma (HCC) (Pikarsky et al., 2004) and colitis-associated cancer (Greten et al., 2004), the activation of NF- κ B prevented tumor cell death and stimulated the production of pro-inflammatory cytokines in the tumor microenvironment, thereby enhancing tumor progression. Likewise, NF- κ B activation is involved in both tumor initiation and progression in liver cancer (Pikarsky et al., 2004). Therefore, the inflammatory response can lead to carcinogenesis after NF- κ B activation, by the induction of anti-apoptotic molecules (Coussens and Werb, 2002; Karin, 2006). TLR stimulation leads to NF- κ B activation and subsequent production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, growth factors and anti-apoptotic proteins involved in tumor progression and chemoresistance. Repeated TLR stimulation may result in strong inflammation, because it contributes to the recruitment of inflammatory cells in the tumor microenvironment (Chen et al., 2007).

Thus, TLR stimulation in cancers may be a double-edged sword having an anti- or pro-tumoral effect in the tumor microenvironment (Dajon et al., 2015; Dranoff, 2003). In this review we discuss the contrasting roles of TLRs in different tumor types.

2. Toll-like receptors

The Toll gene was initially discovered in 1979 and was implicated in the establishment of the dorsoventral axis in *Drosophila* (Lohs-Schardin et al., 1979). In 1996, the team of J. Hoffmann demonstrated that the Toll gene is also involved in immunity in adult *Drosophila* (Lemaitre et al., 1996), and in 1997, the team described TLR mammal proteins with high homology to *Drosophila* Toll (Medzhitov et al., 1997). Ten TLRs (and three pseudogenes, TLR11, TLR12 and TLR13) have been described in humans and mice. TLRs are type I transmembrane glycoproteins with (1) an ectodomain containing leucine-rich repeats to enable the recognition of the ligands (Rock et al., 1998), (2) a transmembrane domain and (3) an intracellular Toll-interleukin 1 (IL-1) receptor domain (TIR) required to induce signal transduction (Kawai and Akira,

2010; Martin and Wesche, 2002), and subsequent gene transcription of inflammatory molecules (Medzhitov et al., 1997).

PAMPs that bind to TLRs include lipids, lipoproteins, proteins, nucleic acids, derivative of microbes, viruses, bacteria, parasites and fungi. Studies of mice with knockout of different TLRs demonstrated that each TLR has a distinct function in recognizing PAMPs and immune responses. TLRs also recognize the endogenous ligands DAMPs. Many endogenous molecules can stimulate TLRs, especially those associated with tissue damage. Among these are heat shock proteins (HSPs) released by necrotic cells, degraded components of extracellular matrix (Beg, 2002; Bianchi, 2007); high-mobility group box-1 protein (HMGB1) (Piccinini and Midwood, 2010) and heme (Figueiredo et al., 2007), which are ligands for TLR2 and TLR4, RNA sequences and protein-nucleic acid complexes that are ligands for TLR3 (Karikó et al., 2004); single-stranded RNA ligand for TLR7 and TLR8 (Vollmer et al., 2005), and hypomethylated DNA and IgG-chromatin complexes that are ligands for TLR9 (Piccinini and Midwood, 2010).

2.1. TLR signaling

Upon binding of a ligand to a TLR, the signal transduction starts with the dimerization of two receptor chains to enable the association of the TIR domains and the formation of a platform allowing the recruitment of adaptor proteins. This process leads to the formation of a post-receptor signaling complex, activation of transcription factors and production of pro-inflammatory cytokines. The five adaptor molecules that associate with TIR to induce signaling pathways are myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), TIR domain-containing adapter protein [TIRAP], also called Mal, TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF), TRIF-related adaptor molecule and a sterile alpha- and armadillo-motif containing protein (SARM) (Basith et al., 2011). All TLRs except TLR3 activate the classical inflammatory signaling pathway through Myd88, which activates NF- κ B, MAPK (Medzhitov et al., 1998) and IFN regulatory factors (IRFs). Activation of IRFs by its phosphorylation leads to nuclear translocation and induction of type I IFN (Pandey and Agrawal, 2006). The activation of TLR3 and TLR4 induces signaling through TRIF (bypassing MyD88), which leads to the activation of IRF and production of type I IFN (Basith et al., 2011).

2.2. TLR expression profile

TLRs are expressed by various immune cells, essentially antigen-presenting cells such as macrophages, DCs and B cells (Beg, 2002). TLRs are expressed to a lesser extent by other immune cells such as mast cells, NK cells, regulatory T cells (Tregs), monocytes, neutrophils and basophils (Hopkins and Sriskandan, 2005) (Table 1). In the myeloid lineage, plasmacytoid DCs (pDCs) predominantly express TLR1, TLR6, TLR7 and TLR9; conventional DCs (cDCs) mainly express TLR1, TLR6 and TLR8; and monocytes strongly express TLR2, intermediate levels of TLR1 and TLR4 and moderate levels of TLR5, TLR6 and TLR8. Neutrophils express all TLRs except TLR3. Among lymphocytes, B cells express TLR1, TLR2, TLR6, TLR7, TLR9 and TLR10, whereas T cells have a relatively low level of TLR expression, mainly TLR5 (Adams, 2009; Hornung et al., 2002). Finally, NK cells strongly express TLR1 but only moderately TLR2, TLR3, TLR5 and TLR6.

TLRs are also expressed by cell types other than immune cells, including endothelial and epithelial cells, so mucosal tissues can sense PAMPs as a first line of defense (Hopkins and Sriskandan, 2005; Medzhitov et al., 1997) (Table 1). Bronchial epithelial cells express a wide range of TLRs (even without stimulation) for the respiratory tract to sense pathogens (Muir et al., 2004). Similarly, tracheobronchial epithelial cells express TLR2 (Hertz et al., 2003),

and epithelial cells in the intestine express TLR4 (Hornef et al., 2003).

Finally, TLRs are also often expressed by tumor cells (Table 1), conferring a role for TLR in tumor pathophysiology, as described in this review.

3. Involvement of TLRs in cancers

3.1. Anti- and pro-tumoral effects of TLR stimulation (Table 2)

Modulation of TLR signaling can have anti- or pro-tumoral effects on carcinogenesis or tumor progression depending on the TLR, the cancer subtype and the immune cells infiltrating the tumor. Controversial roles were highlighted for some TLRs depending on the tumor model used in experiments. TLR stimulation can have anti-tumor effects by acting on immune cells or directly on tumor cells, thereby improving the anti-tumoral immune response and/or leading to tumor cell apoptosis. This phenomenon has been described for different TLRs and various cancers. In contrast, TLR stimulation can have pro-tumoral effects. For most studies investigating this pro-tumoral effect, the effect is essentially driven by TLR expression by tumor cells. However, several studies also showed the pro-tumoral effect attributed to TLR expression by immune cells.

3.2. TLR1/2

3.2.1. Anti-tumoral effect

In a mouse model of grafting with syngeneic Lewis lung carcinoma (LLC) cells, injection of glucagon-like peptide, a synthetic bacterial lipoprotein ligand for TLR1/2, sharply decreased tumor progression and improved mice survival. These effects were mediated by the reduced immunosuppressive abilities of Tregs and increased cytotoxic activity of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) (Zhang et al., 2011).

In a colitis-induced colon cancer model, the number of tumors was greater in mice deficient in TLR2 than wild-type mice. TLR2 knockout (TLR2-KO) mice showed increased tumor cell proliferation and decreased tumor cell apoptosis as well as increased production of IL-17A and reduced production of IFN- γ by colon homogenates. The authors considered that the pro-tumoral effect in TLR2-KO mice resulted from a switch from a T helper 1 (Th1) to Th17 response (Lowe et al., 2010).

In murine models of HCC, TLR2-KO mouse livers showed increased tumor number and volume associated with reduced mice survival (Lin et al., 2013). In addition, TLR2 stimulation in wild-type mice inhibited IL-18 production by hepatocytes, decreased the recruitment of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and increased the cytotoxicity of CD8⁺ T lymphocytes (Li et al., 2015a).

3.2.2. Pro-tumoral effect

HCC and head and neck carcinoma mouse models, with tumor cells expressing TLR2, showed increased tumor progression abolished with TLR2 knockdown or incubation with blocking antibodies to TLR2 (Farnebo et al., 2015; Huang et al., 2007; Shi et al., 2014). The supposed involved mechanism in head and neck carcinoma was the increased expression of pro-inflammatory and pro-angiogenic factors in tumor cells with TLR2 stimulation (Farnebo et al., 2015).

The pro-tumoral effects of TLR2 are also driven by its stimulation on host non-tumoral cells. In a mouse gastric tumor model, TLR2 stimulation enhanced tumor progression in wild-type but not TLR2-KO mice, which demonstrates the involvement of TLR2 expression by host cells (Tye et al., 2012). In mouse models of intestinal and breast cancers, TLR2 deletion in the epithelium reduced spontaneous tumor development (Scheeren et al., 2014). In a lymphoma mouse model, with EG7 cell lines subcutaneously

implanted into C57BL/6 mice, TLR2 stimulation increased the frequency of MDSCs in the spleen, for a pro-tumoral effect. This effect was not observed in TLR2-KO mice (Maruyama et al., 2015).

3.2.3. Controversies

The hepatocellular model implicated TLR2 in both pro- and anti-tumoral effects (Huang et al., 2007; Li et al., 2015b; Lin et al., 2013;

Table 1
Toll-like receptor (TLR) expression profile.

TLR	Innate Immune cells	Adaptive immune cells	Tumor cells	References
TLR1	cDCs, eosinophils, monocytes, neutrophils, NK cells, pDCs	B cells	Myeloma cells	Adams (2009), Basith et al. (2012), Hausmann et al. (2002), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Nagase et al. (2003)
TLR2	cDCs, monocytes, neutrophils, NK cells	T cells, B cells	Breast cancer, gastric carcinoma, Hepatocellular carcinoma, intestinal carcinoma, Laryngeal carcinoma, myelogenous leukemia, oral squamous cell carcinoma	Adams (2009), Basith et al., (2012), Castaño-Rodríguez et al. (2014), Hausmann et al. (2002), He et al. (2007), Hornung et al. (2002), Huang et al. (2007), Huen and Rook (2014), Nagase et al. (2003), Szczepański et al. (2007), Theodoropoulos et al. (2012), Tye et al. (2012), Wang et al. (2010b), Xie et al., (2009)
TLR3	cDCs, NK cells		Breast cancer, cervical carcinoma, colorectal carcinoma, esophageal squamous cell carcinoma, gastric carcinoma, head and neck cancer, hepatocellular carcinoma, laryngeal carcinoma, lung carcinoma, melanoma, myelogenous leukemia, neuroblastoma cells, ovarian carcinoma, pharyngeal carcinoma (cell lines), prostate carcinoma	Adams (2009), Basith et al. (2012), Castaño-Rodríguez et al. (2014), Fernández-García et al. (2014), González-Reyes et al. (2011), He et al. (2007), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Jiang et al. (2008), Matijevic et al. (2009), Muccioli and Benencia (2014), Nomi et al. (2010), Paone et al. (2008), Salaun et al. (2007), Yoneda et al. (2008)
TLR4	cDCs, eosinophils, monocytes, neutrophils		Adrenocortical carcinoma, breast cancer, cervical cancer, colorectal carcinoma, epithelial ovarian cancer, esophageal squamous cell carcinoma, gastric carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, intestinal carcinoma, laryngeal carcinoma, liver cancer, lung carcinoma, melanoma cell lines, myelogenous leukemia, neuroblastoma, ovarian carcinoma, pancreatic cancer, prostate cancer, skin cancer	Adams (2009), Basith et al. (2012), Cammarota et al. (2010), Castaño-Rodríguez et al. (2014), Fukata et al. (2007), González-Reyes et al. (2011), Hausmann et al. (2002), He et al. (2007), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Kelly et al. (2006), Mai et al. (2013), Molteni et al., (2006), Muccioli and Benencia (2014), Nagase et al. (2003), Pimentel-Nunes et al. (2011), Rhee et al. (2008), Schmausser et al. (2005), Theodoropoulos et al. (2012), Wang et al. (2010b), Yesudhas et al. (2014)
TLR5	cDCs, monocytes, neutrophils, NK cells	T cells	Breast cancer cells, cervical squamous cell carcinoma, colon carcinoma, gastric carcinoma, intestinal carcinoma, ovarian carcinoma	Adams (2009), Basith et al. (2012), Castaño-Rodríguez et al. (2014), Hausmann et al. (2002), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Hussein-zadeh and Davenport (2014), Nagase et al. (2003), Schmausser et al. (2005)
TLR6	cDCs, monocytes, neutrophils, NK cells	B cells		Adams (2009), Hornung et al. (2002), Huen and Rook, (2014), Nagase et al. (2003)
TLR7	Eosinophils, monocytes, neutrophils, pDCs	B cells	Colorectal cancer, esophageal squamous carcinoma, lung carcinoma, myeloma cells, pancreatic ductal adenocarcinoma	Adams (2009), Basith et al. (2012), Cherfils-Vicini et al. (2010), Grimm et al. (2010), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Jago et al. (2006), Nagase et al. (2003), Ochi et al. (2012)
TLR8	cDCs, monocytes, neutrophils	T cells, Tregs	Colorectal cancer, lung carcinoma	Adams (2009), Basith et al. (2012), Grimm et al. (2010), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Nagase et al. (2003)

Table 1 (Continued)

TLR	Innate Immune cells	Adaptive immune cells	Tumor cells	References
TLR9	Eosinophils, monocytes, neutrophils, pDCs	B cells	Breast cancer, cervical squamous cell carcinoma, colorectal cancer, esophageal squamous carcinoma, gastric cancer, lung carcinoma, myeloma cells, myelogenous leukemia, ovarian cancer (cell lines), prostate carcinoma, renal cell carcinoma	Adams (2009), Basith et al. (2012), Berger et al. (2010), Castaño-Rodríguez et al. (2014), Droemann et al. (2005), Fernandez-Garcia et al. (2014), González-Reyes et al. (2011), Grimm et al. (2010), He et al. (2007), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Husseinzadeh and Davenport (2014), Muccioli and Benencia (2014), Nagase et al. (2003), Pimentel-Nunes et al. (2011)
TLR10	Eosinophils, monocytes, neutrophils, pDCs	B cells, T cells, Tregs	Colorectal cancer	Adams (2009), Grimm et al. (2010), Hasan et al. (2005), Hornung et al. (2002), Huen and Rook (2014), Nagase et al. (2003), Oosting et al. (2014)

pDC, plasmacytoid dendritic cells; cDC, conventional dendritic cells; NK, natural killer; Tregs, T regulatory cells.

Shi et al., 2014). However, these studies were not based on the same tumor models. The anti-tumoral effects were demonstrated in genotoxic carcinogen-inducible HCC: TLR2-KO mice showed defects in immune networks, for increased tumorigenesis (Li et al., 2015b; Lin et al., 2013). The pro-tumoral effect was observed when HCC cell lines expressing TLR2 were grafted into mice injected with *Listeria monocytogenes*. The mechanism was activation of MAPK and NF- κ B pathways in tumor cells, which increased tumor cell proliferation (Huang et al., 2007; Shi et al., 2014).

Two studies of intestinal carcinoma reported that TLR2 had pro- or anti-tumoral effects. The first, favoring an anti-tumoral role of TLR2, demonstrated increased tumor progression and increased pro-inflammatory cytokines in a TLR2-KO mouse model of carcinogenesis created by dextran sulfate sodium-induced colitis (Lowe et al., 2010). The second study demonstrated that the TLR2 pathway played an important role in the formation of pre-cancerous polyps/adenoma in the (*Apc*^{min/+}) mouse model, because TLR2-deficient *Apc*^{min/+} mice showed reduced mortality and polyp formation. This pro-tumoral effect of TLR2 was also confirmed in human colon cancer, in which TLR2 overexpression conferred a poor clinical outcome (Scheeren et al., 2014).

3.3. TLR3

3.3.1. Anti-tumoral effect

The anti-tumor effects mediated by TLR3 are mainly due to direct stimulation of tumor cells leading to cell death. Indeed, poly I:C, a specific agonist of TLR3, was used in vitro to stimulate human head and neck squamous-cell carcinoma cells (Nomi et al., 2010), pharyngeal carcinoma cell lines (Matijevic et al., 2009), human melanoma cell lines (Salaun et al., 2007), human hepatocellular carcinoma (HCC) cells (Yoneda et al., 2008) and colon carcinoma cells (Takemura et al., 2015). Such stimulation led to tumor cell apoptosis by decreased expression of survivin (an inhibitor of apoptosis) as well as downregulation of anti-apoptotic XIAP, FLIP and Bcl-xL (Nomi et al., 2010; Yoneda et al., 2008). In the same way, injection of the TLR3 agonist BM-06 decreased tumor cell proliferation and increased apoptosis in a 2-acetylaminofluorene-induced HCC rat model. This result was associated with increased number of cells positive for pro-apoptotic caspase-8 and caspase-3 and decreased expression of anti-apoptotic survivin and Bcl-2 (Xu et al., 2013a). Similarly, TLR3 is expressed in human prostate cancer cells and its stimulation in a mouse model had anti-tumoral effects (Gambara et al., 2015; Paone et al., 2008) because of activation of the IRF3-dependent apoptotic pathway, including caspases 3, 8 and 9 (Paone et al., 2008).

In addition to having direct anti-tumoral effects on tumor cell death, the TLR3 effect could be mediated by immune cells (Chew et al., 2012; Ho et al., 2015; Xu et al., 2013b). In colon carcinoma and HCC mouse models, poly I:C injection produced an anti-tumoral effect via the recruitment of NK and CD8⁺ T cells (Chew et al., 2012; Takemura et al., 2015) and activated CD4⁺ T cells (Ho et al., 2015). In a murine model of lung cancer, TLR3 stimulation by poly I:C decreased tumor progression by a mechanism implying the conversion of pro-tumoral myeloid cells into M1 macrophages with tumoricidal properties (Shime et al., 2012).

In line with the anti-tumoral impact of TLR3, a study of HCC patients demonstrated that TLR3 overexpression by tumor cells conferred good clinical outcome (Chew et al., 2012).

3.3.2. Pro-tumoral effect

We have few data concerning the pro-tumoral effect of TLR3. One study reported TLR3 overexpression by tumor cells in prostate carcinoma associated with poor clinical outcome (González-Reyes et al., 2011).

3.3.3. Controversies

Three studies demonstrated that TLR3 stimulation of prostate carcinoma cell lines had anti-tumoral effects by inducing apoptosis of tumor cells in vitro and in vivo in a xenograft model (Gambara et al., 2015; Paone et al., 2008). Moreover, the use of TLR3 agonists has been successful in prostate immune-based therapies in mice (Chin et al., 2010). However, one study suggested poor clinical outcome with TLR3 expression by tumor cells in prostate cancer patients (González-Reyes et al., 2011). We have no explanation for these controversial findings, which need to be confirmed in additional experimental models or additional cohorts of patients.

3.4. TLR4

3.4.1. Anti-tumoral effect

Numerous studies have demonstrated that TLR4 is involved in anti-tumor responses. TLR4-deficient mice showed increased number of tumors in inducible models of cancer of the lung (Bauer et al., 2005), skin (Yusuf et al., 2008) and mammary gland (Naseemuddin et al., 2012). In the skin cancer model, tumor cell lines from TLR4-deficient mice showed an increase in proliferative capacities, and TLR4-deficient mice expressed increased levels of IL-17, IL-23, vascular endothelial growth factor (VEGF), MIP-2 and IL-8 and reduced levels of IFN- γ (Yusuf et al., 2008). In the mammary tumor model, TLR4-deficient mice showed an increased number of

Table 2
Pro- and anti-tumoral effects of TLR expression and/or stimulation.

Effects	TLR	Tumor type	Mechanisms	References
Anti-tumoral	TLR1/2	Colon cancer	↗ Tumor cell apoptosis ↘ Tumor cell proliferation	Lowe et al. (2010)
		Hepatocellular carcinoma, lung cancer	↗ Cytotoxic immune cells (CTL) ↘ Immunosuppressive immune cells (MDSC, Treg)	Li et al. (2015b), Lin et al. (2013), Zhang et al. (2011)
	TLR3	Head and neck cancer, pharyngeal carcinoma, melanoma, HCC, colon carcinoma	↗ Tumor cell apoptosis + Pro-apoptotic proteins ↘ Survivin + anti-apoptotic proteins	Gambara et al. (2015), Matijevic et al. (2009), Nomi et al. (2010), Paone et al. (2008), Salaun et al. (2007), Takemura et al. (2015), Xu et al. (2013a), Yoneda et al. (2008)
		HCC, colon cancer, lung cancer	↗ Cytotoxic immune cells (NK cells, M1, CD8+ T cells) ↘ Immunosuppressive immune cells	Chew et al. (2012), Ho et al. (2015), Shime et al. (2012), Takemura et al. (2015), Xu et al. (2013b), Yoneda et al. (2008)
	TLR4	Skin cancer, mammary cancer, HCC, lung cancer	↗ IFN- γ ↘ Immunosuppressive immune cells (Treg) + tumor cell proliferation + angiogenic factors	Bauer et al. (2005), Naseemuddin et al. (2012), Okamoto et al. (2003), Wang et al. (2013), Yusuf et al. (2008)
		Breast cancer, melanoma	↗ Cytotoxic immune cells (CTL, NK cells)	Ahmed et al. (2013), D'Agostini et al. (2005)
	TLR5	Breast cancer, colorectal cancer, lung cancer	↗ Necrosis areas + neutrophil infiltration	Burdelya et al. (2012), Cai et al. (2011), Rhee et al. (2008), Zhou et al. (2012)
		Melanoma	↗ Cytotoxic immune cells (CTL)	Geng et al. (2015)
	TLR7	Pancreatic cancer, T-cell lymphoma, HCC Breast cancer, melanoma	↗ Cytotoxic immune cells (CTL, NK cells, γ/δ T cells)	Shojaei et al. (2009), Zhou et al. (2015), Zhu et al. (2015)
			↗ Activation of intratumoral pDC	Aspard et al. (2014), Le Mercier et al. (2013)
TLR9	Neuroblastoma, glioma, B-cell chronic lymphocytic leukemia Ovarian cancer, lung cancer	↗ Tumor cell apoptosis ↘ Tumor cell proliferation	Brignole et al. (2010), El Andaloussi et al. (2006), Jahrsdörfer et al. (2005)	
		↗ Cytotoxic immune cells (NK, CD8+ T cells, M1) + Granulocytes ↘ Immunosuppressive immune cells (Treg, M2)	De Cesare et al. (2008), Sato et al. (2015)	
Effects	TLR	Tumor type	Mechanisms (when known)	References
Pro-tumoral	TLR2	Head and neck carcinoma, lymphoma, HCC, breast cancer, intestinal cancer	↗ Pro-inflammatory factors ↗ Immunosuppressive immune cells (MDSC)	Farnebo et al. (2015), Huang et al. (2007), Maruyama et al. (2015), Shi et al. (2014), Tye et al. (2012)
			↗	Dapito et al. (2012), Gu et al. (2015), He et al. (2007), Hsiao et al. (2015), Jain et al. (2015), Kundu et al. (2008), Szczepanski et al. (2009), Yang et al. (2010, 2014)
	TLR4	Breast cancer, lung cancer, head and neck cancer, prostate cancer, HCC Colon cancer	↗ IL-6 + IL-8 + TGF- β + VEGF + Tumor cell proliferation ↘ Tumor cell apoptosis	Fukata et al. (2007), Huang et al. (2005)
			↗ NO + IL-6 ↗ Amphiregulin by Macrophages ↘ Cytotoxic immune cells (NK + T cells)	
	TLR5	Gastric cancer, salivary gland cancer Sarcoma cancer	↗ IL-8 + Tumor cell proliferation	Park et al. (2011), Song et al. (2011)
			↗ IL-6 + Immunosuppressive immune cells (MDSC)	Rutkowski et al. (2015)
	TLR7	Myeloma, chronic lymphocytic leukemia Pancreatic cancer	↗ IL-6	Jego et al. (2006), Li et al. (2015b)
			↗ Inflammation + Tumor cell proliferation + Pro-tumoral molecules ↘ Anti-tumoral molecules	Grimmig et al. (2015), Ochi et al. (2012)
	TLR9	Lung cancer Esophageal cancer, prostate cancer, myeloma Ovarian cancer, breast cancer	↗ Immunosuppressive immune cells (MDSC) + Anti-apoptotic molecules	Chatterjee et al. (2014), Cherfils-Vicini et al. (2010)
			↗ Pro-inflammatory cytokines + Tumor cell proliferation ↘ Tumor cell apoptosis ↗ Inflammation- and stem-cell-related markers	Jego et al. (2006), Kundu et al. (2008), Zhang et al. (2014) Moreira et al. (2015)

HCC, hepatocellular carcinoma, MDSC, myeloid-derived suppressor cell.

Tregs, increased secretion of VEGF by tumor cells, and decreased production of IFN- γ by T cells (Naseemuddin et al., 2012).

In grafted HCC and breast cancer models, tumor number and metastasis was greater in TLR4-KO than wild-type mice (Ahmed et al., 2013; Wang et al., 2013), with impaired ability of CTLs to kill tumor cells (Ahmed et al., 2013) and increased tumor cell proliferation (Wang et al., 2013).

Other studies demonstrated that injection of TLR4 agonists induced anti-tumoral protection. Indeed, injection of OM-174, an analogue of lipid A from *Escherichia coli* that can stimulate TLR4, had an anti-tumor effect in a melanoma mouse model, driven by increased number and function of NK cells and CTLs (D'Agostini et al., 2005). In addition, the OK-432 molecule picibanil, a lyophilized mixture of group A *Streptococcus pyogenes* with anti-neoplastic activity, had an anti-tumor effect, accompanied by a high production of IFN- γ in C57Bl/6 mice grafted with LLC cells. This anti-tumoral effect was abolished in TLR4-deficient mice (Okamoto et al., 2003). In a glioblastoma model, TLR4 stimulation by lipopolysaccharide (LPS) led to a complete depletion of tumors in wild-type but not TLR4-deficient mice (Chicoine et al., 2007). Finally, release of HMGB1 by dying tumor cells, including breast, colon, osteosarcoma and thymoma cells, and the TLR4–MyD88 signaling pathway were required for the immune response against dying tumor cells and for the efficacy of anti-cancer chemotherapy and radiotherapy in mice (Apetoh et al., 2007).

3.4.2. Pro-tumoral effects of TLR4

The involvement of TLR4 in tumor progression has largely been described in several tumor models. Many studies focused on the pro-tumoral role of TLR4 expressed by tumor cells. In breast cancer, LPS stimulation of TLR4 promoted tumorigenesis by increasing IL-8 and IL-6 secretion by tumor cells (Yang et al., 2010, 2014). In lung, head and neck, prostate and hepatocellular cancer models, TLR4 stimulation increased tumor cell proliferation and/or resistance to apoptosis (Gu et al., 2015; Hsiao et al., 2015; Jain et al., 2015; Kundu et al., 2008) and increased production of transforming growth factor β (TGF- β), VEGF, IL-6, IL8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumor cells (He et al., 2007; Szczepanski et al., 2009). In a colon cancer model, TLR4 stimulation induced nitric oxide and IL-6 production by tumor cells, along with reduced proliferation of T cells and reduced cytotoxic function of NK cells. Moreover, this stimulation induced the resistance of tumor cells to CTLs by downregulating Fas and upregulating B7-H1, B7-H2 and CD40 co-stimulatory molecules by tumor cells (Huang et al., 2005).

The pro-tumoral effects of TLR4 can also be mediated by direct TLR4 stimulation of host cells. In a model of colitis-associated colorectal tumors, TLR4 was required for tumor development by the production of amphiregulin, an epidermal growth factor receptor ligand involved in the production of prostaglandin E2 and cyclooxygenase 2 by macrophages of the lamina propria (Fukata et al., 2007). In a model of diethylnitrosamine-induced HCC in wild-type and TLR4-deficient mice, TLR4 stimulation of resident liver cells by intestinal microbiota was required for promoting HCC (Dapito et al., 2012). Finally, several studies demonstrated TLR4 overexpression by tumor cells associated with poor clinical outcome in breast cancer (Chen et al., 2015; Ma et al., 2014), colorectal cancer (Cammarota et al., 2010) and pancreatic ductal adenocarcinoma (Zhang et al., 2010).

3.4.3. Controversies

Three studies demonstrated TLR4 overexpression associated with poor clinical outcome in colorectal cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma and breast cancer (Cammarota et al., 2010; Chen et al., 2015; Zhang et al., 2010), but no study demonstrated TLR4 overexpression associated with good clinical outcome. In several

types of cancers, including breast cancer and HCC, TLR4 had pro- or anti-tumoral effects (Ahmed et al., 2013; Bauer et al., 2005; Dapito et al., 2012; Gu et al., 2015; He et al., 2007; Hsiao et al., 2015; Okamoto et al., 2003; Wang et al., 2013; Yang et al., 2014). In breast cancer, two studies reported an anti-tumoral role of TLR4. These two studies involved murine models, the first with grafted 4T1 cell lines and the second with carcinogen-induced mammary tumors, both in immunocompetent wild-type and TLR4-deficient mice. In both models, TLR4-KO mice showed increased tumor volume and metastasis, so TLR4 plays a role in the prevention of breast cancer (Ahmed et al., 2013; Naseemuddin et al., 2012). However, a third study, of in vitro and Nude mice grafted with human tumor cell lines, showed a pro-tumoral effect of TLR4. Indeed, in the absence of immune cells, TLR4 stimulation led to a pro- rather than anti-tumoral effect (Yang et al., 2014).

In HCC, the role of TLR4 is controversial. In an in vitro and in vivo model of diethylnitrosamine (DEN)-induced HCC in wild-type and TLR4-mutant mice, TLR4 mediated a pro-tumoral effect (Dapito et al., 2012; Gu et al., 2015). However, in the same model, TLR4-deficient mice showed increased susceptibility to DEN-induced HCC carcinogenesis and progression (Wang et al., 2013). The different observations may result from differing experimental procedures used by the two groups. In one study, the mice received 100 mg/kg DEN at age 12 weeks plus repeated injections of CCl₄, which induced chronic liver injury, inflammation and fibrogenesis and increased endotoxin levels (Dapito et al., 2012). In the other study, mice received only 25 mg/kg DEN at age 15 days.

3.5. TLR5

3.5.1. Anti-tumoral effect

Several studies demonstrated the anti-tumoral effect of TLR5 stimulation by flagellin. Such stimulation decreased tumor volume in models of breast cancer (Cai et al., 2011), colorectal cancer (Rhee et al., 2008), lung cancer (Burdelya et al., 2012; Zhou et al., 2012), and T- and B-cell lymphoma (Leigh et al., 2014), mainly mediated by increased tumor necrosis and neutrophil infiltration (Cai et al., 2011; Rhee et al., 2008; Zhou et al., 2012). In addition, in a melanoma mouse model, T cells engineered to constitutively produce TLR5 ligand could increase anti-tumor activity by increasing proliferation and cytolytic activity of these T cells against melanoma cells (Geng et al., 2015). Finally, in a cohort of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC), TLR5 overexpression was associated with good prognosis. This effect was probably due to inhibition of tumor cell proliferation mediated by TLR5 stimulation (Zhou et al., 2014).

3.5.2. Pro-tumoral effect

In gastric cancer and salivary gland adenocarcinoma, TLR5 stimulation of tumor cells by flagellin increased IL-8 production, NF- κ B activation, and tumor cell proliferation mediated by extracellular signal-regulated kinase signaling (Park et al., 2011; Song et al., 2011). Similarly, in a sarcoma mouse model, TLR5 had a pro-tumoral effect by increasing IL-6 level and MDSC recruitment (Rutkowski et al., 2015).

3.6. TLR7

3.6.1. Anti-tumoral effect

Several studies showed that TLR7 stimulation led to decreased tumor cell survival by increasing the ability to be recognized by immune cells. Indeed, after TLR7 stimulation by imidazoquinoline, chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells produced high levels of costimulatory molecules and pro-inflammatory cytokines, for increased sensitivity of tumor cells to cytotoxic effector cells (Spaner et al., 2006). However, a phase I/II trial of TLR7 agonist in

Table 3
Prognostic value of TLR expression.

TLR	Tumor type	Prognosis	References
TLR3	Hepatocellular carcinoma	Good	Chew et al. (2012)
TLR4	Breast cancer	Good	Ahmed et al. (2013)
TLR9	Renal cell carcinoma	Good	Ronkainen et al. (2011)
TLR3	Prostate carcinoma	Poor	González-Reyes et al. (2011)
TLR4	Pancreatic ductal adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, breast cancer	Poor	Cammarota et al. (2010), Dapito et al. (2012), Fukata et al. (2007), Ma et al. (2014), Zhang et al. (2010)
TLR7	Non-small cell lung cancer, colorectal cancer	Poor	Chatterjee et al. (2014), Grimm et al., (2010)
TLR9	Breast cancer, ovarian cancer, glioblastoma, prostate carcinoma	Poor	Berger et al. (2010), González-Reyes et al. (2011), Wang et al. (2010a)

CLL cells had only modest results in patients (Spaner et al., 2010). In a pancreatic adenocarcinoma model, stimulation of tumor cells with imiquimod downregulated major histocompatibility class I molecules and, subsequently, reduced interaction with NKG2A receptor, resulting in activation of γ/δ T cells that had cytotoxic effects (Shojaei et al., 2009).

The anti-tumoral effect of TLR7 can also be mediated by direct stimulation of TLR in immune cells, for a more effective immune response. In a breast cancer mouse model and in melanoma, injection of TLR7 agonist activated intratumoral pDCs and reduced tumor size (Aspord et al., 2014; Le Mercier et al., 2013). In T-cell lymphoma, TLR7 stimulation had an anti-tumoral effect probably because of increased cytotoxicity of lymphocytes (Zhu et al., 2015). Finally, the TLR7/8 agonist gardiquimod significantly increased the lysis of HCC cells by enhancing the cytotoxic functions of NK cells. This activation was mediated by type I IFN produced by DCs in response to TLR7/8 agonist (Zhou et al., 2015).

3.6.2. Pro-tumoral effect

TLR7 was found expressed by tumor cells in several studies. In vitro stimulation of the human myeloma cell line by TLR7 ligand induced tumor cell survival mediated by increased IL-6 production by tumor cells (Jego et al., 2006). In CLL, TLR7 stimulation of tumor cells induced their proliferation and the secretion of pro-inflammatory cytokines, which was inhibited by spleen stromal-derived IL-6 (Li et al., 2015b). In pancreatic cancer, a strong TLR7 expression by tumor cells compared to the healthy tissue was described in patients as well as in mice model. Furthermore, TLR7 stimulation accelerated tumor progression with increased fibrosis, inflammation and proliferation; decreased the expression of anti-tumoral molecules such as p16, PTEN, and cyclin D1; and increased that of pro-tumoral molecules such as p53, p21, p27, TGF- β , peroxisome proliferator-activated receptor γ , cyclin B1, c-Myc and Src homology protein tyrosine phosphatase 1 (Grimmig et al., 2015; Ochi et al., 2012).

Similarly, a study showed strong expression of TLR7 by CD133⁺ tumoral stem cells in patients with colorectal cancer, which was associated with poor prognosis as compared with patients with low expression of TLR7 (similar observations were found for TLR8) (Grimmig et al., 2010). Our team demonstrated that tumor cells of NSCLC patients express TLR7. TLR7 stimulation induced tumor cell survival and resistance to chemotherapy. These effects seemed to be related to increased expression of anti-apoptotic molecules by tumor cells because we observed a higher expression of Bcl-2 in TLR7-stimulated cell lines and TLR7-expressing tumor cells from patients (Cherfils-Vicini et al., 2010). In addition, in our lung tumor mouse models, injection of TLR7 agonists increased intratumoral infiltration by MDSCs (Chatterjee et al., 2014), which could indirectly contribute to the pro-tumoral effects of TLR7 stimulation of tumor cells. A retrospective study of two independent

cohorts of NSCLC patients revealed strong expression of TLR7 by tumor cells associated with poor prognosis and greater resistance to chemotherapy as compared with patients showing less TLR7 expression (Chatterjee et al., 2014).

3.6.3. Controversies

The controversial roles of TLR7 have been described in CLL and pancreatic carcinoma. TLR7-stimulated CLL cells from patients became sensitive to cytotoxic effector cells in one study (Spaner et al., 2006), whereas they proliferated at high levels in another study (Li et al., 2015b). However, both observations are not necessarily contradictory because the read-out used by the two teams differed. In a mouse model of pancreatic carcinoma and in humans, two studies demonstrated a role for TLR7 expressed by tumor cells in promoting tumor progression (Grimmig et al., 2015; Ochi et al., 2012). However, one study reported a potential anti-tumoral role of TLR7, although this study was performed in vitro with pancreatic cell lines: the authors demonstrated that TLR7 ligation on tumor cells enhanced lysis by γ/δ T cells but did not check for long-term tumor cell proliferation or survival.

3.7. TLR9

3.7.1. Anti-tumoral effect

In several tumor types such as neuroblastoma, glioma, and B-cell CLL, stimulation of tumor cells by CpG decreased their proliferation and increased the proportion of apoptotic cells after activation of intrinsic apoptotic signaling pathways, for reduced tumor cell number (Brignole et al., 2010; El Andaloussi et al., 2006; Jahrsdörfer et al., 2005). In a neuroblastoma and ovarian carcinoma mouse model, TLR9 stimulation by CpG increased mouse survival (Brignole et al., 2010; De Cesare et al., 2008; Gershman et al., 2015). In an orthotopically implanted human ovarian carcinoma model, the anti-tumoral effect was associated with increased infiltration of NK cells and granulocytes in the peritoneal cavity (De Cesare et al., 2008). In a lung carcinoma model, TLR9 stimulation had an anti-tumoral effect associated with increased number of CD8⁺ T cells and M1 macrophages and decreased number of Tregs and M2 macrophages (Sato et al., 2015). Finally, a study of patients with renal cell carcinoma demonstrated reduced TLR9 expression by tumor cells associated with poor clinical outcome (Ronkainen et al., 2011). The authors speculated that this effect was due to lower immunosurveillance and lower recruitment of immune cells, for faster development of tumors (Ronkainen et al., 2011).

3.7.2. Pro-tumoral effect

Several studies showed TLR9 overexpression by tumor cells associated with poor prognosis for patients with glioblastoma (Wang et al., 2010a) or prostate carcinoma (González-Reyes et al., 2011; Luo et al., 2015). Similarly, the expression of TLR9 by tumor

cells was associated with increased tumor grade in both breast and ovarian cancers (Berger et al., 2010), and in breast cancer, the stimulation of this receptor increased the migratory ability of cancer cell lines (Berger et al., 2010). TLR9 stimulation could be induced by hypomethylated DNA, which was found increased in the serum of breast cancer patients (Berger et al., 2010). In esophageal and prostate cancer and in myeloma, TLR9 stimulation increased cell proliferation and cell migration (Kundu et al., 2008; Zhang et al., 2014) as well as resistance to tumor cell apoptosis (Jego et al., 2006). In addition, TLR9 expression by tumor cells in a prostate carcinoma mouse model had a pro-tumoral effect associated with upregulated inflammation- and stem cell-related markers (Moreira et al., 2015). In a spontaneous model of prostate carcinoma, TLR9 stimulation induced proinflammatory signaling in transformed epithelial cells but did not elicit oncogene expression or cancer cell proliferation. In addition, TLR9 had immunosuppressive effects in the tumor microenvironment by inducing Treg recruitment and myeloid-derived suppressor cell proliferation (Zambirinis et al., 2015).

In a spontaneous lung adenocarcinoma mouse model, TLR9-expressing mononuclear cells secreted VEGF, involved in the pro-tumoral effect (Belmont et al., 2014). Finally, in an HCC mouse model, TLR9 stimulation had a pro-tumoral effect due to the formation of a complex between HMGB1 and mitochondrial DNA during hypoxia (Liu et al., 2015).

3.7.3. Controversies

TLR9 has a controversial role in lung carcinoma. One study showed that TLR9 expression by mononuclear cells was associated with poor prognosis in a spontaneous Kras-mutated model of lung cancer and in patients, via increased angiogenesis (Belmont et al., 2014). However, in a model of intratracheal grafted LLC cells, CpG DNA administration resulted in better animal survival by activating immune cells (Sato et al., 2015). These apparently contradictory observations could be explained by the different tumor models used, in which the tumor immune microenvironment is probably not the same.

4. Conclusions

The stimulation of TLRs, mainly expressed by immune cells, is one of the therapeutic approaches used to improve anti-tumor immune responses. Many ligands of TLR are in clinical trials (Vacchelli et al., 2013) or are already approved by the US Food and Drug Administration for some cancers (Pradere et al., 2014). However, tumor cells also express TLRs, and depending on the TLR and tumor type, their stimulation can result in tumor cell death, increased tumor cell survival and proliferation, or resistance to chemotherapy. Table 2 summarizes the studies demonstrating anti- or pro-tumoral effects of TLR stimulation. When using TLR agonists, TLR expression by tumor cells should be taken into account. In addition, TLR overexpression may be associated with poor clinical outcome of patients, as summarized in Table 3, which confirms the double-edged sword effect of TLR – pro- and anti-tumor – in cancer.

Conflict of interest

No potential conflicts of interest were disclosed by the authors.

Acknowledgments

We thank Lubka Roumenina and Priyanka Devi (INSERM U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) for great help with corrections of the manuscript. The team is supported by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,”

the “Fondation ARC pour la recherche sur le cancer,” the “Fondation de France” (00012068), Université Pierre et Marie Curie, Université Paris-Descartes, Institut National du Cancer (2011-1-PLBIO-06-INSERM 6-1, PLBIO09-088-IDF-KROEMER), CARPEM (Cancer Research for Personalized Medicine), and Labex Immunology.

References

- Adams, S., 2009. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* 1, 949–964.
- Ahmed, A., Wang, J.H., Redmond, H.P., 2013. Silencing of TLR4 increases tumor progression and lung metastasis in a murine model of breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 20 (Suppl. 3), S389–S396.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., et al., 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* 13, 1050–1059.
- Aspord, C., Tramcourt, L., Leloup, C., Molens, J.-P., Leccia, M.-T., Charles, J., Plumas, J., 2014. Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC cytotoxic functions and impeding tumor vascularization. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2551–2561.
- Balkwill, F., Coussens, L.M., 2004. Cancer: an inflammatory link. *Nature* 431, 405–406.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond. Engl.* 357, 539–545.
- Basith, S., Manavalan, B., Lee, G., Kim, S.G., Choi, S., 2011. Toll-like receptor modulators: a patent review (2006–2010). *Expert Opin. Ther. Pat.* 21, 927–944.
- Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T.H., Kim, S.G., Choi, S., 2012. Roles of Toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch. Pharm. Res.* 35, 1297–1316.
- Bauer, A.K., Dixon, D., DeGraff, L.M., Cho, H.-Y., Walker, C.R., Malkinson, A.M., Kleeberger, S.R., 2005. Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1778–1781.
- Beg, A.A., 2002. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol.* 23, 509–512.
- Belmont, L., Rabbe, N., Antoine, M., Cathelin, D., Guignabert, C., Kurie, J., Cadranet, J., Wislez, M., 2014. Expression of TLR9 in tumor-infiltrating mononuclear cells enhances angiogenesis and is associated with a worse survival in lung cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 134, 765–777.
- Berger, R., Fiegl, H., Goebel, G., Obexer, P., Ausserlechner, M., Doppler, W., Hauser-Kronberger, C., Reitsamer, R., Egle, D., Reimer, D., et al., 2010. Toll-like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. *Cancer Sci.* 101, 1059–1066.
- Bianchi, M.E., 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1–5.
- Brignole, C., Marimpietri, D., Di Paolo, D., Perri, P., Morandi, F., Pastorino, F., Zorzoli, A., Pagnan, G., Loi, M., Caffa, I., et al., 2010. Therapeutic targeting of TLR9 inhibits cell growth and induces apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res.* 70, 9816–9826.
- Burdelya, L.G., Gleiberman, A.S., Toshkov, I., Aygun-Sunar, S., Bapardekar, M., Manderscheid-Kern, P., Bellnier, D., Krivokrysenko, V.I., Feinstein, E., Gudkov, A.V., 2012. Toll-like receptor 5 agonist protects mice from dermatitis and oral mucositis caused by local radiation: implications for head-and-neck cancer radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 83, 228–234.
- Cai, Z., Sanchez, A., Shi, Z., Zhang, T., Liu, M., Zhang, D., 2011. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Res.* 71, 2466–2475.
- Cammarota, R., Bertolini, V., Pennesi, G., Bucci, E.O., Gottardi, O., Garlanda, C., Laghi, L., Barberis, M.C., Sessa, F., Noonan, D.M., et al., 2010. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J. Transl. Med.* 8, 112.
- Castano-Rodríguez, N., Kaakoush, N.O., Mitchell, H.M., 2014. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front. Immunol.* 5, 336.
- Chatterjee, S., Crozet, L., Damotte, D., Iribarren, K., Schramm, C., Alifano, M., Lupo, A., Cherfils-Vicini, J., Goc, J., Katsahian, S., et al., 2014. TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 74, 5008–5018.
- Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.-A., Mor, G., 2007. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the Toll-like receptor signaling pathway. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y.* 198 (57), 93–107.
- Chen, X., Zhao, F., Zhang, H., Zhu, Y., Wu, K., Tan, G., 2015. Significance of TLR4/MyD88 expression in breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 7034–7039.
- Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliendo, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M.-C., Fridman, W.-H., et al., 2010. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J. Clin. Invest.* 120, 1285–1297.
- Chew, V., Tow, C., Huang, C., Bard-Chapeau, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Weber, A., Lim, K.H., Toh, H.C., Heikenwalder, M., et al., 2012. Toll-like receptor 3

- expressing tumor parenchyma and infiltrating natural killer cells in hepatocellular carcinoma patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1796–1807.
- Chicoine, M.R., Zahner, M., Won, E.K., Kalra, R.R., Kitamura, T., Perry, A., Higashikubo, R., 2007. The *in vivo* antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by Toll-like receptor 4. *Neurosurgery* 60, 372–380 (discussion 381).
- Chin, A.I., Miyahira, A.K., Covarrubias, A., Teague, J., Guo, B., Dempsey, P.W., Cheng, G., 2010. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Res.* 70, 2595–2603.
- Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- D'Agostini, C., Pica, F., Febbraro, G., Grelli, S., Chiavaroli, C., Garaci, E., 2005. Antitumour effect of OM-174 and cyclophosphamide on murine B16 melanoma in different experimental conditions. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1205–1212.
- Dajon, M., Iribarren, K., Cremer, I., 2015. Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment. *Oncimmunology* 4, e991615.
- Dapito, D.H., Mencin, A., Gwak, G.-Y., Pradere, J.-P., Jang, M.-K., Mederacke, I., Cavaglia, J.M., Khiabanian, H., Adayemi, A., Bataller, R., et al., 2012. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 21, 504–516.
- De Cesare, M., Calcaterra, C., Pratesi, G., Gatti, L., Zunino, F., Mênard, S., Balsari, A., 2008. Eradication of ovarian tumor xenografts by locoregional administration of targeted immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 14, 5512–5518.
- Dranoff, G., 2003. Coordinated tumor immunity. *J. Clin. Invest.* 111, 1116–1118.
- Droemmann, D., Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A.J., Branscheid, D., Vollmer, E., Dalhoff, K., Zabel, P., Goldmann, T., 2005. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir. Res.* 6, 1.
- Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. The three Es of cancer immunoeediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360.
- El Andaloussi, A., Sonabend, A.M., Han, Y., Lesniak, M.S., 2006. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 54, 526–535.
- Farnebo, L., Shahangian, A., Lee, Y., Shin, J.H., Scheeren, F.A., Sunwoo, J.B., 2015. Targeting Toll-like receptor 2 inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 6, 9897–9907.
- Fernandez-García, B., Eiró, N., González-Reyes, S., González, L., Aguirre, A., González, L.O., Del Casar, J.M., García-Muñoz, J.L., Vizoso, F.J., 2014. Clinical significance of Toll-like receptor 3, 4, and 9 in gastric cancer. *J. Immunother. Hagerstown Md.* 1997 (37), 77–83.
- Figueiredo, R.T., Fernandez, P.L., Mourao-Sa, D.S., Porto, B.N., Dutra, F.F., Alves, L.S., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L., Graça-Souza, A.V., Bozza, M.T., 2007. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 282, 20221–20229.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., Galon, J., 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A.S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A.J., et al., 2007. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 133, 1869–1881.
- Gambara, G., Desideri, M., Stoppacciaro, A., Padula, F., De Cesaris, P., Starace, D., Tubaro, A., Del Bufalo, D., Filippini, A., Ziparo, E., et al., 2015. TLR3 engagement induces IRF-3-dependent apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumour growth *in vivo*. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 327–339.
- Geng, D., Kaczanowska, S., Tsai, A., Younger, K., Ochoa, A., Rapoport, A.P., Ostrand-Rosenberg, S., Davila, E., 2015. TLR5 ligand-secreting t cells reshape the tumor microenvironment and enhance antitumor activity. *Cancer Res.* 75, 1959–1971.
- Gershon, J.A., Barr, K.M., Weber, J.J., Jing, W., Johnson, B.D., 2015. Immune modulating effects of cyclophosphamide and treatment with tumor lysate/CpG synergize to eliminate murine neuroblastoma. *J. Immunother. Cancer* 3, 24.
- González-Reyes, S., Fernández, J.M., González, L.O., Aguirre, A., Suárez, A., González, J.M., Escaff, S., Vizoso, F.J., 2011. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 60, 217–226.
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.-W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., Karin, M., 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285–296.
- Grimm, M., Kim, M., Rosenwald, A., Heemann, U., Germer, C.-T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., 2010. Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumourigenesis and tumour progression. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 (46), 2849–2857.
- Grimmig, T., Matthes, N., Hoeland, K., Tripathi, S., Chandraker, A., Grimm, M., Moench, R., Moll, E.-M., Friess, H., Tsaur, I., et al., 2015. TLR7 and TLR8 expression increases tumor cell proliferation and promotes chemoresistance in human pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* 47, 857–866.
- Gu, J., Sun, R., Shen, S., Yu, Z., 2015. The influence of TLR4 agonist lipopolysaccharides on hepatocellular carcinoma cells and the feasibility of its application in treating liver cancer. *OncoTargets Ther.* 8, 2215–2225.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., et al., 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 (174), 2942–2950.
- Hausman, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., et al., 2002. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122, 1987–2000.
- He, W., Liu, Q., Wang, L., Chen, W., Li, N., Cao, X., 2007. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol. Immunol.* 44, 2850–2859.
- Hertz, C.J., Wu, Q., Porter, E.M., Zhang, Y.J., Weismüller, K.-H., Godowski, P.J., Ganz, T., Randell, S.H., Modlin, R.L., 2003. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 (171), 6820–6826.
- Ho, V., Lim, T.S., Lee, J., Steinberg, J., Szmyd, R., Tham, M., Yaligar, J., Kaldis, P., Abastado, J.-P., Chew, V., 2015. TLR3 agonist and Sorafenib combinatorial therapy promotes immune activation and controls hepatocellular carcinoma progression. *Oncotarget*.
- Hopkins, P.A., Sriskandan, S., 2005. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 395–407.
- Hornef, M.W., Normark, B.H., Vandewalle, A., Normark, S., 2003. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 198, 1225–1235.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G., 2002. Quantitative expression of Toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 (168), 4531–4537.
- Hsiao, C.-C., Chen, P.-H., Cheng, C.-I., Tsai, M.-S., Chang, C.-Y., Lu, S.-C., Hsieh, M.-C., Lin, Y.-C., Lee, P.-H., Kao, Y.-H., 2015. Toll-like receptor-4 is a target for suppression of proliferation and chemoresistance in HepG2 hepatoblastoma cells. *Cancer Lett.* 368, 144–152.
- Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K.-L., Chen, Y., Chen, S.-H., Mayer, L., Unkeless, J.C., Xiong, H., 2005. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 65, 5009–5014.
- Huang, B., Zhao, J., Shen, S., Li, H., He, K.-L., Shen, G.-X., Mayer, L., Unkeless, J., Li, D., Yuan, Y., et al., 2007. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell Toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res.* 67, 4346–4352.
- Huen, A.O., Rook, A.H., 2014. Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* 26, 237–244.
- Husseinzadeh, N., Davenport, S.M., 2014. Role of Toll-like receptors in cervical, endometrial and ovarian cancers: a review. *Gynecol. Oncol.* 135, 359–363.
- Jahrsdörfer, B., Wooldridge, J.E., Blackwell, S.E., Taylor, C.M., Griffith, T.S., Link, B.K., Weiner, G.J., 2005. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Leukoc. Biol.* 77, 378–387.
- Jain, S., Suklabaidya, S., Das, B., Raghav, S.K., Batra, S.K., Senapati, S., 2015. TLR4 activation by lipopolysaccharide confers survival advantage to growth factor deprived prostate cancer cells. *The Prostate* 75, 1020–1033.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.
- Jego, G., Bataille, R., Geffroy-Luseau, A., Descamps, G., Pellat-Deceunynck, C., 2006. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 20, 1130–1137.
- Jiang, Q., Wei, H., Tian, Z., 2008. Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer* 8, 12.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., Weissman, D., 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279, 12542–12550.
- Karin, M., 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431–436.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.
- Kelly, M.G., Alvero, A.B., Chen, R., Silasi, D.-A., Abrahams, V.M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T., Mor, G., 2006. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66, 3859–3868.
- Kundu, S.D., Lee, C., Billips, B.K., Habermacher, G.M., Zhang, Q., Liu, V., Wong, L.Y., Klumpp, D.J., Thumbikat, P., 2008. The Toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *The Prostate* 68, 223–229.
- Le Mercier, I., Poujol, D., Sanlaville, A., Sisirak, V., Gobert, M., Durand, I., Dubois, B., Treilleux, I., Marvel, J., Vlach, J., et al., 2013. Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res.* 73, 4629–4640.
- Leigh, N.D., Bian, G., Ding, X., Liu, H., Aygun-Sunar, S., Burdelya, L.G., Gudkov, A.V., Cao, X., 2014. A flagellin-derived Toll-like receptor 5 agonist stimulates cytotoxic lymphocyte-mediated tumor immunity. *PLoS One* 9, e85587.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.
- Li, S., Sun, R., Chen, Y., Wei, H., Tian, Z., 2015a. TLR2 limits development of hepatocellular carcinoma by reducing IL18-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 75, 986–995.
- Li, Y., Shi, Y., McCaw, L., Li, Y.-J., Zhu, F., Gorkzynski, R., Duncan, G.S., Yang, B., Ben-David, Y., Spaner, D.E., 2015b. Microenvironmental interleukin-6 suppresses Toll-like receptor signaling in human leukemia cells through miR-17/19a. *Blood* 126, 766–778.

- Lin, H., Yan, J., Wang, Z., Hua, F., Yu, J., Sun, W., Li, K., Liu, H., Yang, H., Lv, Q., et al., 2013. Loss of immunity-supported senescence enhances susceptibility to hepatocellular carcinogenesis and progression in Toll-like receptor 2-deficient mice. *Hepatology* 57, 171–182.
- Liu, Y., Yan, W., Tohme, S., Chen, M., Fu, Y., Tian, D., Lotze, M., Tang, D., Tsung, A., 2015. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *J. Hepatol.* 63, 114–121.
- Lohs-Schardin, M., Cremer, C., Nüsslein-Volhard, C., 1979. A fate map for the larval epidermis of *Drosophila melanogaster*: localized cuticle defects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam. *Dev. Biol.* 73, 239–255.
- Lowe, E.L., Crother, T.R., Rabizadeh, S., Hu, B., Wang, H., Chen, S., Shimada, K., Wong, M.H., Michelsen, K.S., Arditi, M., 2010. Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PLoS One* 5, e13027.
- Luo, Y., Jiang, Q.-W., Wu, J.-Y., Qiu, J.-G., Zhang, W.-J., Mei, X.-L., Shi, Z., Di, J.-M., 2015. Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. *Oncotarget* 6, 22564–22574.
- Ma, F.-J., Liu, Z.-B., Hu, X., Ling, H., Li, S., Wu, J., Shao, Z.-M., 2014. Prognostic value of myeloid differentiation primary response 88 and Toll-like receptor 4 in breast cancer patients. *PLoS One* 9, e111639.
- Mai, C.W., Kang, Y.B., Pichika, M.R., 2013. Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. *Oncotargets Ther.* 6, 1573–1587.
- Martin, M.U., Wesche, H., 2002. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 265–280.
- Maruyama, A., Shime, H., Takeda, Y., Azuma, M., Matsumoto, M., Seya, T., 2015. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 445–450.
- Matijevic, T., Marjanovic, M., Pavelic, J., 2009. Functionally active Toll-like receptor 3 on human primary and metastatic cancer cells. *Scand. J. Immunol.* 70, 18–24.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C.A., 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253–258.
- Molteni, M., Marabella, D., Orlandi, C., Rossetti, C., 2006. Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4. *Cancer Lett.* 235, 75–83.
- Moreira, D., Zhang, Q., Hossain, D.M.S., Nechaev, S., Li, H., Kowolik, C.M., D'Apuzzo, M., Forman, S., Jones, J., Pal, S.K., et al., 2015. TLR9 signaling through NF-(B)/RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells. *Oncotarget* 6, 17302–17313.
- Muccioli, M., Benencia, F., 2014. Toll-like receptors in ovarian cancer as targets for immunotherapies. *Front. Immunol.* 5, 341.
- Muir, A., Soong, G., Sokol, S., Reddy, B., Gomez, M.I., Van Heeckeren, A., Prince, A., 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 777–783.
- Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Yamaguchi, M., Tomizawa, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., Hirai, K., 2003. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J. Immunol.* 171, 3977–3982.
- Naseemuddin, M., Iqbal, A., Nasti, T.H., Ghandhi, J.L., Kapadia, A.D., Yusuf, N., 2012. Cell mediated immune responses through TLR4 prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer* 130, 765–774.
- Newton, K., Dixit, V.M., 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Nomi, N., Kodama, S., Suzuki, M., 2010. Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway. *Oncol. Rep.* 24, 225–231.
- Ochi, A., Graffeo, C.S., Zambirinis, C.P., Rehman, A., Hackman, M., Fallon, N., Barilla, R.M., Henning, J.R., Jamal, M., Rao, R., et al., 2012. Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 4118–4129.
- Okamoto, M., Oshikawa, T., Tano, T., Ohe, G., Furuichi, S., Nishikawa, H., Ahmed, S.U., Akashi, S., Miyake, K., Takeuchi, O., et al., 2003. Involvement of Toll-like receptor 4 signaling in interferon-gamma production and antitumor effect by streptococcal agent OK-432. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 316–326.
- Oosting, M., Cheng, S.-C., Bolscher, J.M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T.S., Verschuere, I.C., Arts, P., Garritsen, A., van Eenennaam, H., Sturm, P., et al., 2014. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4478–E4484.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., Fridman, W.-H., 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093–1102.
- Pandey, S., Agrawal, D.K., 2006. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol. Cell Biol.* 84, 333–341.
- Paone, A., Starace, D., Galli, R., Padula, F., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., Riccioli, A., 2008. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 29, 1334–1342.
- Park, J.-H., Yoon, H.-E., Kim, D.-J., Kim, S.-A., Ahn, S.-G., Yoon, J.-H., 2011. Toll-like receptor 5 activation promotes migration and invasion of salivary gland adenocarcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 40, 187–193.
- Piccini, A.M., Midwood, K.S., 2010. DAMPENING inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010.
- Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., Ben-Neriah, Y., 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461–466.
- Pimentel-Nunes, P., Afonso, L., Lopes, P., Roncon-Albuquerque, R., Gonçalves, N., Henrique, R., Moreira-Dias, L., Leite-Moreira, A.F., Dinis-Ribeiro, M., 2011. Increased expression of Toll-like receptors (TLR) 2, 4 and 5 in gastric dysplasia. *Pathol. Oncol. Res. POR* 17, 677–683.
- Pradere, J.-P., Dapito, D.H., Schwabe, R.F., 2014. The yin and yang of toll-like receptors in cancer. *Oncogene* 33, 3485–3495.
- Rhee, S.H., Im, E., Pothoulakis, C., 2008. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* 135, 518–528.
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., Bazan, J.F., 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 588–593.
- Ronkainen, H., Hirivikoski, P., Kauppila, S., Vuopala, K.S., Paavonen, T.K., Selander, K.S., Vaarala, M.H., 2011. Absent toll-like receptor-9 expression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 30, 84.
- Rutkowski, M.R., Stephen, T.L., Svoronos, N., Allegranza, M.J., Tesone, A.J., Perales-Puchalt, A., Brencicova, E., Escovar-Fadul, X., Nguyen, J.M., Cadungog, M.G., et al., 2015. Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell* 27, 27–40.
- Salaun, B., Lebecque, S., Matikainen, S., Rimoldi, D., Romero, P., 2007. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin. Cancer Res.* 13, 4565–4574.
- Sato, T., Shimosato, T., Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Klinman, D.M., 2015. Intratumoral delivery of CpG microparticles eliminates lung tumors. *Mol. Cancer Ther.* 14, 2198–2205.
- Scheeren, F.A., Kuo, A.H., van Weele, L.J., Cai, S., Glykofridis, I., Sikandar, S.S., Zabala, M., Qian, D., Lam, J.S., Johnston, D., et al., 2014. A cell-intrinsic role for TLR2-MYD88 in intestinal and breast epithelia and oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* 16, 1238–1248.
- Schmausser, B., Andrusis, M., Endrich, S., Müller-Hermelink, H.-K., Eck, M., 2005. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* IJMM 295, 179–185.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2001. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Shi, W., Su, L., Li, Q., Sun, L., Lv, J., Li, J., Cheng, B., 2014. Suppression of Toll-like receptor 2 expression inhibits the bioactivity of human hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 35, 9627–9637.
- Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., Tahara, H., Inoue, N., Seya, T., 2012. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2066–2071.
- Shojaei, H., Oberg, H.-H., Juricke, M., Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D., Wesch, D., 2009. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gamma delta T cells. *Cancer Res.* 69, 8710–8717.
- Song, E.-J., Kang, M.-J., Kim, Y.-S., Kim, S.-M., Lee, S.-E., Kim, C.-H., Kim, D.-J., Park, J.-H., 2011. Flagellin promotes the proliferation of gastric cancer cells via the Toll-like receptor 5. *Int. J. Mol. Med.* 28, 115–119.
- Spaner, D.E., Shi, Y., White, D., Mena, J., Hammond, C., Tomic, J., He, L., Tomai, M.A., Miller, R.L., Booth, J., et al., 2006. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 20, 286–295.
- Spaner, D.E., Shi, Y., White, D., Shaha, S., He, L., Masellis, A., Wong, K., Gorczynski, R., 2010. A phase I/II trial of TLR-7 agonist immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 24, 222–226.
- Szczepański, M., Stelmachowska, M., Stryczyński, L., Golusiński, W., Samara, H., Mozer-Lisewska, I., Zeromski, J., 2007. Assessment of expression of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 264, 525–530.
- Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Szajnik, M., Harasymczuk, M., Boyiadzis, M., Kruk-Zagajewska, A., Szyfter, W., Zeromski, J., Whiteside, T.L., 2009. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res.* 69, 3105–3113.
- Takemura, R., Takaki, H., Okada, S., Shime, H., Akazawa, T., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Teshima, T., Seya, T., 2015. Poly(I:C)-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-Mediated tumor elimination in vivo. *Cancer Immunol. Res.* 3, 902–914.
- Theodoropoulos, G.E., Saridakis, V., Karantanos, T., Michalopoulos, N.V., Zagouri, F., Kontogianni, P., Lymperi, M., Gazouli, M., Zografos, G.C., 2012. Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. *Breast Edinb. Scotl.* 21, 534–538.
- Trinchieri, G., 2012. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 677–706.
- Tye, H., Kennedy, C.L., Najdovska, M., McLeod, L., McCormack, W., Hughes, N., Dev, A., Sievert, W., Ooi, C.H., Ishikawa, T., et al., 2012. STAT3-driven upregulation of

- TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell* 22, 466–478.
- Vaccelli, E., Eggermont, A., Sautès-Fridman, C., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L., 2013. Trial watch: toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e25238.
- Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S., et al., 2005. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* 202, 1575–1585.
- Wang, C., Cao, S., Yan, Y., Ying, Q., Jiang, T., Xu, K., Wu, A., 2010a. TLR9 expression in glioma tissues correlated to glioma progression and the prognosis of GBM patients. *BMC Cancer* 10, 415.
- Wang, J.-P., Zhang, Y., Wei, X., Li, J., Nan, X.-P., Yu, H.-T., Li, Y., Wang, P.-Z., Bai, X.-F., 2010b. Circulating toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C: APMS acta pathol. *Microbiol. Immunol. Scand.* 118, 261–270.
- Wang, Z., Yan, J., Lin, H., Hua, F., Wang, X., Liu, H., Lv, X., Yu, J., Mi, S., Wang, J., et al., 2013. Toll-like receptor 4 activity protects against hepatocellular tumorigenesis and progression by regulating expression of DNA repair protein Ku70 in mice. *Hepatology* 57, 1869–1881.
- Xie, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, H., Wang, J., Hu, Z., 2009. Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF- κ B in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 1027–1032.
- Xu, Y.-Y., Chen, L., Zhou, J.-M., Wu, Y.-Y., Zhu, Y.-Y., 2013a. Inhibitory effect of dsRNA TLR3 agonist in a rat hepatocellular carcinoma model. *Mol. Med. Rep.* 8, 1037–1042.
- Xu, Y.-Y., Chen, L., Wang, G.-L., Zhou, J.-M., Zhang, Y.-X., Wei, Y.-Z., Zhu, Y.-Y., Qin, J., 2013b. A synthetic dsRNA, as a TLR3 pathway synergist, combined with sorafenib suppresses HCC in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 13, 527.
- Yang, H., Zhou, H., Feng, P., Zhou, X., Wen, H., Xie, X., Shen, H., Zhu, X., 2010. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 29, 92.
- Yang, H., Wang, B., Wang, T., Xu, L., He, C., Wen, H., Yan, J., Su, H., Zhu, X., 2014. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PLoS One* 9, e109980.
- Yesudhas, D., Gosu, V., Anwar, M.A., Choi, S., 2014. Multiple roles of Toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front. Immunol.* 5, 334.
- Yoneda, K., Sugimoto, K., Shiraki, K., Tanaka, J., Beppu, T., Fuke, H., Yamamoto, N., Masuya, M., Horie, R., Uchida, K., et al., 2008. Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF- κ B activation and apoptosis. *Int. J. Oncol.* 33, 929–936.
- Yusuf, N., Nasti, T.H., Long, J.A., Naseemuddin, M., Lucas, A.P., Xu, H., Elmets, C.A., 2008. Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. *Cancer Res.* 68, 615–622.
- Zambirinis, C.P., Levie, E., Nguy, S., Avanzi, A., Barilla, R., Xu, Y., Seifert, L., Daley, D., Greco, S.H., Deutsch, M., et al., 2015. TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 212, 2077–2094.
- Zhang, J.-J., Wu, H.-S., Wang, L., Tian, Y., Zhang, J.-H., Wu, H.-L., 2010. Expression and significance of TLR4 and HIF-1 α in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* WJG 16, 2881–2888.
- Zhang, Y., Luo, F., Cai, Y., Liu, N., Wang, L., Xu, D., Chu, Y., 2011. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J. Immunol.* 186, 1963–1969.
- Zhang, Y., Wang, Q., Ma, A., Li, Y., Li, R., Wang, Y., 2014. Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. *Oncol. Rep.* 31, 2298–2304.
- Zhou, S.-X., Li, F.-S., Qiao, Y.-L., Zhang, X.-Q., Wang, Z.-D., 2012. Toll-like receptor 5 agonist inhibition of growth of A549 lung cancer cells in vivo in a Myd88 dependent manner. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 13, 2807–2812.
- Zhou, H., Chen, J., Hu, J., Luo, Y., Li, F., Xiao, L., Zhong, M., 2014. High expression of Toll-like receptor 5 correlates with better prognosis in non-small-cell lung cancer: an anti-tumor effect of TLR5 signaling in non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140, 633–643.
- Zhou, Z., Yu, X., Zhang, J., Tian, Z., Zhang, C., 2015. TLR7/8 agonists promote NK-DC cross-talk to enhance NK cell anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 369, 298–306.
- Zhu, J., He, S., Du, J., Wang, Z., Li, W., Chen, X., Jiang, W., Zheng, D., Jin, G., 2015. Local administration of a novel Toll-like receptor 7 agonist in combination with doxorubicin induces durable tumouricidal effects in a murine model of T cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* 8, 21.

Rôle du TLR7 dans la progression tumorale dans le cancer du poumon

Résumé :

De nombreuses études ont impliqué des TLR dans le développement et la progression tumorale. Précédemment, il a été démontré que les cellules tumorales expriment TLR7, un récepteur à ARNs, et qu'une forte expression de TLR7 par les cellules tumorales de patients atteints de cancer du poumon est associée à un mauvais pronostic. Dans un modèle murin de cancer du poumon, cet effet pro-tumoral a été reproduit lors de l'injection d'agoniste de TLR7.

Mes travaux de thèse ont eu pour objectif de déterminer les mécanismes impliqués dans les effets pro-tumoraux de TLR7. La stimulation de ce récepteur au niveau des cellules tumorales induit une production plus importante de CCL2 et GM-CSF, ainsi qu'un fort recrutement de MDSC au site de la tumeur. Ces MDSC, de par leurs propriétés immunosuppressives sont responsables de l'effet pro-tumoral à la suite de la stimulation de TLR7. Nous avons également mis évidence que la stimulation de TLR7 était pro-métastatique dans un modèle murin de cancer du poumon et que les MDSC étaient également impliquées dans cet effet. Ces effets pro-métastatiques associés au TLR7 ont été confirmés chez l'homme, grâce à l'étude de transcrits de molécules associées à l'invasion, l'angiogénèse, la transition épithélio-mésenchymateuse et les métastases.

Enfin nous avons démontré la présence de ligand de TLR7 chez les patients atteints de cancer du poumon et démontré que l'injection intratumorale de virus respiratoires, IAV et RSV, a un effet pro-tumoral dans notre modèle de cancer du poumon. Ces virus respiratoires pourraient donc être à l'origine de la surexpression de TLR7 et du mauvais pronostic associé à ce récepteur chez les patients atteints de cancer du poumon.

Ces recherches ont donc permis de mettre en évidence de nouveaux facteurs aggravants dans le cancer du poumon, dont les virus respiratoires, et de découvrir les mécanismes impliqués.

Mots clefs : Cancer du Poumon, TLR7, MDSC, Virus Respiratoire, IAV, RSV