



HAL
open science

Mécanisme d'action de la stratégie d'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α contre les carcinomes épidermoïdes cutanés

Ophélie Bonin Vermeulen

► To cite this version:

Ophélie Bonin Vermeulen. Mécanisme d'action de la stratégie d'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α contre les carcinomes épidermoïdes cutanés. Immunothérapie. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ6018 . tel-03767537

HAL Id: tel-03767537

<https://theses.hal.science/tel-03767537v1>

Submitted on 2 Sep 2022

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Mécanisme d'action de la stratégie d'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α contre les carcinomes épidermoïdes cutanés

Ophélie VERMEULEN

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
Équipe de Fabienne Anjuère et Véronique Braud

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la
Vie et de la Santé.
Spécialité Immunologie et Microbiologie
de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Fabienne Anjuère

Soutenue le : 17 Septembre 2021

Devant le jury, composé de :

Dr **Fabienne Anjuère**, CR INSERM, HDR,
IPMC, Sophia Antipolis

Dr **Isabelle Dimier-Poisson**, Professeur,
IPVBTA, Tours

Dr **Armelle Prévost-Blondel**, DR INSERM,
Institut Cochin, Paris

Dr **Abdelilah Wakkach**, DR CNRS,
LP2M, Nice

Étude du mécanisme d'action de la stratégie d'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α contre les carcinomes épidermoïdes cutanés

Membres du jury :

Président du jury :

Dr Abdelilah Wakkach, Directeur de Recherche CNRS, Laboratoire de Physiomédecine Moléculaire (LP2M), Université Côte d'Azur

Rapporteurs :

Dr Isabelle Dimier-Poisson, Maître de Conférences, HDR, Laboratoire d'immunologie parasitaire, Université de Tours

Dr Armelle Prévost-Blondel, Directrice de Recherche INSERM, Institut Cochin, Université de Paris

Directrice de thèse :

Dr Fabienne Anjuère, Chargée de Recherche INSERM, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université Côte d'Azur

Résumé

Les carcinomes cutanés représentent 90% des cancers de la peau. Les stratégies actuelles de traitement, la chirurgie et la radiothérapie sont peu efficaces contre les formes invasives. La mise en place d'un traitement impliquant une réponse immunitaire à long terme permettrait de contrôler ces formes invasives et leurs récives. L'équipe a ainsi développé une immunothérapie basée sur l'injection péri-tumorale d'un agoniste de TLR9 (ODN2395) avec un anticorps bloquant la signalisation à travers le récepteur à l'IL-10 (CD210). Cette stratégie thérapeutique induit la régression totale des tumeurs cutanées établies de taille comprise entre 50 et 130 mm³ mais ne permet pas le contrôle de tumeurs plus grosses chez la souris. Parfois, la régression tumorale est partielle et associée à une fibrose, qui semble servir de substrat à la progression tumorale. L'objectif de ma thèse était de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de cette stratégie d'immunothérapie locale afin de l'optimiser.

Dans le modèle murin de carcinomes cutanés TC-1, nous avons d'abord identifié un rôle clé des cellules dendritiques (DC) dans la réponse au traitement. L'analyse de la dynamique des DC par cytométrie de flux, suggère une migration de ces-dernières dans les ganglions drainant la tumeur, associée à l'expression de marqueurs de maturation tels que CD80, CD86, PD-L1 et PD-L2. Par une approche *ex vivo* nous avons mis en évidence les capacités de présentation antigénique accrues des DC, notamment les cDC2, capables d'éduquer les lymphocytes T CD8 effecteurs, producteurs d'INF- γ , de TNF et d'IL-17, protecteurs contre les récives.

Nous avons également identifié un rôle prépondérant des cellules de l'immunité innée dans la régression tumorale associée à une nécrose hémorragique diffuse dans les heures précoces suivant l'injection du traitement. L'analyse des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs par cytométrie de flux, révèle la présence majoritaire de macrophages hétérogènes dans les tumeurs non traitées qui s'activent localement 12 heures après immunothérapie locale.

L'injection de l'immunothérapie induit un remaniement total de l'infiltrat immunitaire dans les 72 premières heures, associé à un recrutement massif de neutrophiles activés (CD62L^{low}ICAM-1^{bright}) et cytotoxiques : producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de myéloperoxydase (MPO) ou encore de Granzyme B. Leur déplétion *in vivo* par l'injection d'anticorps déplétants anti-Ly6G, impacte considérablement la réponse au traitement ce qui démontre leur rôle primordial dans la régression tumorale

L'étude du mécanisme de recrutement des neutrophiles anti-tumoraux sur le site tumoral met en évidence le rôle des chimiokines CXCL1 et CXCL2 produites par les macrophages et l'implication des récepteurs CXCR1 et CXCR2.

L'ensemble de mes travaux de thèse révèle le mécanisme d'action de la stratégie d'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α dans le modèle murin de tumeurs cutanées TC-1 impliquant la mise en place d'une immunité adaptative et innée complémentaires. A terme, le développement d'un traitement immunomodulateur chez l'Homme, basé sur notre formulation, constitue une approche thérapeutique intéressante pour le traitement des carcinomes épidermoïdes cutanés invasifs.

Mots clés : Immunothérapie, Carcinome épidermoïde cutané, Immunité anti-tumorale

Summary

Skin carcinomas represent 90% of skin cancers. Current treatment strategies, surgery and radiotherapy are not very effective against invasive forms. The initiation of treatment involving a long-term immune response would make it possible to control these invasive forms and their recurrence. The team has thus developed an immunotherapy based on the peritumoral injection of a TLR9 agonist (ODN2395) with an antibody blocking signaling through the IL-10 receptor (CD210). This therapeutic strategy induces the total regression of established skin tumors of size between 50 and 130 mm³ but does not allow the control of larger tumors in mice. Sometimes tumor regression is partial and associated with fibrosis, which appears to serve as a substrate for tumor progression. The objective of my thesis was to understand the cellular and molecular mechanisms of this local immunotherapy strategy in order to optimize it.

In the murine model of TC-1 cutaneous carcinoma, we first identified a key role of dendritic cells (DC) in the response to treatment. Analysis of the dynamics of DCs by flow cytometry suggests their migration into tumor-draining lymph nodes, associated with the expression of maturation markers such as CD80, CD86, PD-L1 and PD-L2. Using an *ex vivo* approach, we have demonstrated the increased antigenic presentation capacities of DCs, in particular cDC2, capable of educating effector CD8 T lymphocytes, producers of INF- γ , TNF and IL-17, which are protective against recurrence.

We have also identified a prominent role of innate immunity cells in tumor regression associated with diffuse hemorrhagic necrosis in the early hours after treatment injection. Analysis of immune cells infiltrating tumors by flow cytometry reveals the majority presence of heterogeneous macrophages in untreated tumors which are activated locally 12 hours after local immunotherapy.

The injection of immunotherapy induces a total rearrangement of the immune infiltrate within the first 72 hours, associated with a massive recruitment of activated neutrophils (CD62L^{low}ICAM-1^{bright}) and cytotoxic: producers of reactive oxygen species (ROS), myeloperoxidase (MPO) or even Granzyme B. Their depletion *in vivo* by the injection of depleting anti-Ly6G antibodies considerably impacts the response to treatment, which demonstrates their essential role in tumor regression.

The study of the mechanism of recruitment of anti-tumor neutrophils to the tumor site highlights the role of chemokines CXCL1 and CXCL2 produced by macrophages and the involvement of CXCR1 and CXCR2 receptors.

All of my thesis work reveals the mechanism of action of the TLR9L+aIL-10R α local immunotherapy strategy in the murine model of TC-1 skin tumors involving the establishment of a complementary adaptive and innate immunity. Ultimately, the development of an immunomodulatory treatment in humans, based on our formulation, constitutes an interesting therapeutic approach for the treatment of invasive cutaneous squamous cell carcinomas.

Key words : Immunotherapy, Cutaneous squamous cell carcinoma, anti-tumor immunity

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier les membres du jury, Dr Abdelilah Wakkach (Président), Dr Isabelle Dimier-Poisson (Rapportrice) et Dr Armelle Prévost-Blondel (Rapportrice) de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je vous remercie sincèrement Fabienne, pour ces années passées ensemble. J'ai tout appris à vos côtés et vous avez toujours su me diriger et m'encourager dans mes recherches. Je suis admirative de vos connaissances et de votre persévérance. J'espère que nous serons ammenées à collaborer de nouveau par la suite.

Merci beaucoup Véronique pour votre soutien tout au long de cette thèse. Nos discussions scientifiques et non scientifiques me manqueront.

Je vous remercie sincèrement toutes les deux de m'avoir accueillie dans le labo et de m'avoir fait grandir avec vous tout en faisant grandir ma passion pour l'immunologie et la cancérologie.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Dr Abdelilah Wakkach et Dr Karine Crozat pour leur soutien et leur accompagnement. Nos discussions scientifiques ont été un atout majeur pour l'avancement de ma thèse. J'espère avoir l'occasion d'échanger de nouveau avec vous sur de nouveaux projets.

Je remercie chacun des membres de l'équipe VBFA, passé et présent. Merci à Pierre et Sokchea de m'avoir accueillie au labo à mes débuts. Un énorme merci à Alain pour ton aide dans de nombreuses manips et pour tes péripéties à n'en plus finir. Merci à Sarah et Roxanne pour vos sourires permanents et vos histoires croustillantes de l'hôpital. Merci à Aida pour ton aide au labo. Un grand merci à toi Luciana pour ta bonne humeur au cours de ces 3 années et ta présence en cette fin de thèse =). Et enfin le meilleur pour la fin, merci à mes 2 collègues qui sont devenues bien plus : Estelle et Emie qui ont partagé mes joies et mes peines dans ma vie professionnelle et personnelle. Vous êtes de véritables amies. Sans vous l'aventure de la thèse n'aurait pas eu la même saveur. Vous m'avez toujours soutenue et surtout, vous étiez toujours là pour les parties de rigolade. Merci les copines =).

Merci aux membres des différentes plateformes de l'IPMC et en particulier Julie et Loéva pour cette belle collaboration.

Un grand merci à ma famille, ma belle-famille et mes amis qui ont toujours cru en moi quoi qu'il arrive. Toujours présents pour m'aider à prendre les bonnes décisions. Vous êtes ma force au quotidien et je suis heureuse de partager chaque instant de ma vie avec vous.

Merci à toi, ma moitié, mon binôme, mon amour pour toujours, d'avoir toujours cru en moi et de me donner confiance en moi à chaque instant. Merci de m'avoir écouté pendant toutes ces années de thèse : je sais que les neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques n'ont (presque) plus de secret pour toi.

Table des matières

Liste des illustrations	10
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	14
Introduction	17
Chapitre 1. La peau et les cancers cutanés	18
A. Rôle et structure de la peau.....	18
1. Généralités	18
2. Structure de la peau.....	18
2.1 L'épiderme.....	20
2.1.1 La couche basale.....	20
2.1.2 La couche épineuse.....	23
2.1.3 La couche granuleuse	23
2.1.4 La couche cornée.....	23
2.2 La lame basale	24
2.3 Le derme.....	25
2.4 L'hypoderme.....	28
3. Rôles de la peau.....	29
B. Les cancers de la peau	34
1. Qu'est-ce qu'un cancer	34
2. Les cancers cutanés.....	38
2.1 Les mélanomes	38
2.2 Les cancers cutanés non mélanocytaires.....	41
2.2.1 Les carcinomes basocellulaires	41
2.2.2 Les carcinomes épidermoïdes cutanés	43
2.2.3 Facteurs de risques des carcinomes cutanés	49
Chapitre 2. L'immunité anti-tumorale.....	52
A. L'immuno-editing	52
1. Principe de l'immunoediting	52
2. Classification des tumeurs selon leur infiltration en cellules immunitaires	54
2.1 Les tumeurs « chaudes ».....	54
2.2 Les tumeurs « froides ».....	56
B. Les acteurs de l'immunité anti-tumorale	57
1. Le cycle de l'immunité anti-tumorale	57
1.1 Relargage d'antigènes tumoraux	57
1.2 Reconnaissance et capture des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques.....	59
1.3 Migration et maturation des DC vers les ganglions lymphatiques drainants	61
1.4 Présentation des antigènes tumoraux	61
1.5 Priming et activation des LT	64
1.6 Réponse T CD4 auxiliaire.....	66
1.7 Migration des LT CD8 cytotoxiques sur le site tumoral et destruction de la tumeur	73
1.8 Mécanismes de subversion du système immunitaire par le microenvironnement tumoral.	75
2. Les cellules lymphoïdes innées.....	77
2.1 Les ILC de groupe 1	77

2.1.1 Les cellules NK	77
2.1.2 Les ILC1	83
2.2 Les ILC de groupe 2	83
2.3 Les ILC de groupe 3	83
2.3.1 Les ILC3	85
2.3.2 Les LTI	85
2.4 Plasticité des ILC	85
2.5 Rôle des ILC dans le contexte des CEC.....	87
3. Les cellules dendritiques	89
3.1 Les DC cutanées à l'homéostasie	89
3.2 Les différentes sous-populations de DC dans la peau.....	91
3.3 Les DC de l'épiderme : les cellules de Langerhans	93
3.4 Les cDC1	97
3.5 Les cDC2	100
3.6 Les moDC.....	102
4. Les macrophages	104
4.1 Généralités	104
4.2 Ontogénie	104
4.2.1 Les macrophages dérivés des monocytes	104
4.2.2 Les macrophages d'origine embryonnaire	107
4.3 Fonctions des macrophages à l'homéostasie	109
4.4 Fonctions des macrophages dans le contexte tumoral.....	111
5. Les neutrophiles.....	116
5.1 Généralités	116
5.2 Ontogénie.....	116
5.3 Recrutement.....	118
5.4 Fonctions dans le contexte tumoral.....	120
5.4.1 Rôles pro-tumoraux.....	120
5.4.2 Rôles anti-tumoraux	122
5.4.3 Rôle des neutrophiles dans les CEC.....	123
6. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC).....	125
Chapitre 3. Les immunothérapies	129
A. Les principales immunothérapies utilisées pour traiter les cancers	129
1. Stimulation de la réponse LT CD8 par transfert adoptif de LT	129
2. Stimulation directe de la réponse LT CD8	130
2.1 Les points de contrôle immunitaire	130
2.2 Les thérapies combinées.....	130
2.3 Nouvelles cibles pour les ICI.....	133
3. Stimulation indirecte de la réponse LT CD8	136
3.1 Thérapie vaccinale	136
3.2 Restauration des capacités d'éducation des LT par les DC	138
3.2.1 Administration systémique d'IL-12	138
3.2.2 Administration locale d'IL-12	140
3.2.3 Restauration de la production d'IL-12 par les DC par un agoniste de TLR9.....	142
3.2.4 Inhibition de la voie de signalisation de l'IL-10.....	145
B. Traitement des CEC par immunothérapie	146
Rationnel et objectifs des travaux de thèse	150

Résultats	158
Partie I - Rôle de l'immunité adaptative dans l'efficacité de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α contre les carcinomes épidermoïdes cutanés	158
Partie II – Papier 1 : Rôle de l'immunité innée dans le mécanisme d'action de l'immunothérapie locale ...	184
Partie III - Résumé des résultats obtenus au cours de la thèse	219
Discussion	222
A. Rôle des DC dans la réponse au traitement	223
1. Caractérisation des DC dans les CEC	223
2. Capacités migratoires des DC	223
3. Capacités de présentation antigénique	224
4. Rôle des sous-populations de cDC dans le contrôle de la croissance tumorale.....	225
B. Rôle des LT dans la réponse au traitement	227
1. Rôle des LT CD4.....	227
2. Rôle des LT CD8.....	227
C. Rôle des macrophages dans la réponse au traitement	228
1. Les macrophages « early » et « late » et leur phénotype	228
2. Le processus de cicatrisation mis en place après le traitement	229
3. Rôle des macrophages dans le contrôle de la croissance tumorale après immunothérapie locale	230
D. Rôle des neutrophiles	231
1. Rôle des neutrophiles dans le contrôle de la croissance tumorale en réponse au traitement	231
2. Phénotype et fonctions des neutrophiles	232
3. Recrutement des neutrophiles	233
E. Adaptation chez l'Homme	234
F. Conclusion générale	235
Annexes	236
Bibliographie	248

Liste des illustrations

Figure 1. Structure de la peau	19
Figure 2. Structure de l'épiderme	21
Figure 3. Composants de la matrice extracellulaire dermique	27
Figure 4. Rôles de la peau	30
Figure 5. Fonctions immunologiques des kératinocytes	30
Figure 6. Processus de cicatrisation	33
Figure 7. Développement d'un cancer	35
Figure 8. Taux d'incidence et de mortalité des cancers dans le monde	37
Figure 9. Images macroscopiques de mélanomes et leurs représentations schématisques	39
Figure 10. Coupe histologique de carcinome basocellulaire colorée par un marquage hématoxyline-éosine-safran	42
Figure 11. Rôle de la voie Sonic Hedgehog dans le développement des carcinomes basocellulaires	42
Figure 12. Incidence des CEC dans le monde	44
Figure 13. Classification des CEC à « haut risque » et « bas risque » et leurs traitements	46
Figure 14. Traitements actuellement utilisés pour traiter les CEC	48
Figure 15. Rôle des UV dans le développement des carcinomes cutanés	50
Figure 16. Différentes manifestations de kératose actinique	50
Figure 17. Démonstration du rôle protecteur du système immunitaire contre le développement des tumeurs par Schreiber en 2011	53
Figure 18. Immunoediting et mise en place des CEC	53
Figure 19. Caractéristiques biologiques et immunologiques des tumeurs froides et tumeurs chaudes	55
Figure 20. Cycle de l'immunité anti-tumorale	58
Figure 21. Présentation croisée par les DC	63
Figure 22. Synapse immunologique et activation des LT par les DC	65
Figure 23. Sous-populations de LT CD4 et leur rôle dans l'immunité anti-tumorale	67
Figure 24. Récepteurs et enzymes clés exprimés à la surface des LT régulateurs et leur ciblage par immunothérapie	70
Figure 25. Mécanismes immunosuppressifs pouvant être mis en jeu lors de l'activation des Treg	72

Figure 26. Fonctions cytotoxiques des LT CD8	74
Figure 27. Détournement des fonctions immunitaires par les cellules tumorales	76
Figure 28. Sous-populations de cellules lymphoïdes innées et leurs principales caractéristiques chez l'Homme	78
Figure 29. Induction de la lyse de la cellule cible par les cellules NK lorsque les signaux activateurs dépassent les signaux inhibiteurs	80
Figure 30. Fonctions des cellules NK	81
Figure 31. Rôle des ILC-1-2-3 dans les différents types de cancer	84
Figure 32. Plasticité des ILC	86
Figure 33. Infiltration des ILC dans le contexte des CEC	88
Figure 34. Marqueurs permettant l'identification des principales sous-populations de DC conventionnelles et dérivées des monocytes chez la souris et chez l'Homme	92
Figure 35. Ontogénie des LC	94
Figure 36. Rôle protecteur des LC dans les CEC humains	96
Figure 37. Rôle des cDC1 dans l'immunité anti-tumorale	99
Figure 38. Différenciation d'un monocyte en macrophage ou moDC selon le microenvironnement	103
Figure 39. Marqueurs permettant l'identification des principales sous-populations de monocytes chez la souris et chez l'Homme	106
Figure 40. Ontogénie des macrophages murins d'origine embryonnaire	108
Figure 41. Macrophages M1 et M2 et leur rôle dans le processus de cicatrisation	110
Figure 42. Fonctions des macrophages tumoraux	112
Figure 43. Fonctions des macrophages tumoraux en fonction de leur origine	114
Figure 44. Extravasation et fonctions des neutrophiles sur le site inflammatoire	117
Figure 45. Fonctions pro-tumorales et anti-tumorales des neutrophiles	121
Figures 46. Résumé graphique de l'étude de Khou et al., 2020	124
Figure 47. Fonctions des MDSC dans le contexte tumoral	126
Figure 48. Nouveaux marqueurs utilisés pour distinguer les monocytes, neutrophiles, M-MDSC et PMN-MDSC	127
Figure 49. Transfert adoptif de LT avec ou non manipulation génétique et génération de CAR T Cells	131
Figure 50. Principe des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICI)	132
Figure 51. Différentes voies de signalisation pouvant être ciblées par des ICI	134
Figure 52. Formulation des vaccins anti-cancéreux	137

Figure 53. Élaboration d'un vaccin personnalisé	137
Figure 54. Rôle de l'IL-12 dans l'immunité anti-tumorale	139
Figure 55. Les avantages de l'application locale de l'IL-12 en comparaison à son application systémique	141
Figure 56. Localisation des TLR et voie de signalisation de TLR9	143
Figure 57. Objectifs de la thèse	157
Figure 58. Conclusions : Mécanisme d'action de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α	222

Liste des tableaux

Tableau 1. Les récepteurs de dangers et leurs ligands	60
Tableau 2. Comparaison des monocytes, neutrophiles, M-MDSC et PMN-MDSC	127
Tableau 3. Immunothérapies actuellement en essai clinique dans le traitement des CEC	147
Tableau 4. Résultats des premières études cliniques des anti-PD-1 contre les CEC	149

Liste des abréviations

A

ADCC : Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity

ADN : Acide Désoxyribonucléique

B

BATF3 : Basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3

C

CAR T Cells : Chimeric Antigen Receptor T Cells

CD : Cluster de Différenciation

cDC : Cellule Dendritique Conventionnelle

CBC : Carcinome Basocellulaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CEC : Carcinome Épidermoïde Cutané

CLEC : C-type Lectin domain

CLR : C-type Lectin Receptors

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène

CSF : Colony Stimulating Factor

CSF1R: Colony Stimulating Factor 1 Receptor

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4

CXCR : CXC chemokine Receptor

D

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

DC : Cellule Dendritique

DC-SIGN : Dendritic Cell Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non integrin

DDR2 : Discoid Domain Receptor 2

DHEA: Déhydroépiandrostérone

DHT: Dihydrotestostérone

DMBA : 2,4-Dimethoxybenzaldehyde

DNAM-1: DNAX Accessory Molecule-1

DNGR1 : Dendritic cell NK lectin Group Receptor-1

DT : Diphteria Toxin

DTR : Diphteria Toxin Receptor

E

EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition

F

FAP : Fibroblast Activation Protein

FASL : FAS Ligand

FCGR2B : Fc fragment of IgG Receptor 2B

FDA : Food and Drug Administration

FLT3L : FMS-like Tyrosine kinase 3 Ligand

FOXP3 : Forkhead box P3

FSP-1: Fibroblast Specific Protein-1

G

GATA3 : GATA binding protein 3

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GFP : Green Fluorescent Protein
GITR : Glucocorticoid Induced
Tumor necrosis factor Receptor
GM-CSF : Granulocyte Monocyte
Colony-Stimulating Factor

H

HE : Hématoxyline/Éosine
HES : Hématoxyline/Éosine/Safran
HMGB1 : High-Mobility Group Box
1 protein
HPV : Human PapillomaVirus

I

IC : Immune Checkpoint
ICAM : Intracellular Adhesion
Molecule
ICI : Immune Checkpoint Inhibitor
ICOS : Inducible Costimulator
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL : Interleukine
ILC : Innate Lymphoid Cell
IRF : Interferon Regulator Factor
ITGAM : Integrin Alpha M
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-
based Inhibitory Motif
ITGAX : Integrin Alpha X

K

KIR: Killer cell Immunoglobulin-like
Receptor
KO : Knocked Out

L

LAG-3 : Lymphocyte Activation
Gene 3

LC : Langerhans Cells
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
LTi : Lymphoid Tissue Inducer
LyzM : Lysozyme M

M

MCPI : Monocyte Chemoattractant
Protein 1
MDSC : Myeloid Derived Suppressor
Cell
MERTK : Myeloid-Epithelial-
Reproductive Tyrosine Kinase
MET : Microenvironnement Tumoral
MHC : Major Histocompatibility
Complex
MIP : Macrophage Inflammatory
Protein
moDC : Monocyte-derived Dendritic
Cell
MMP : Matrix Metalloproteinase
MPO : Myeloperoxidase

N

NET : Neutrophil Extracellular Trap
NK : Natural Killer
NLR : Nucleotide-binding
Oligomerization Domain-Like
Receptor
NO : Nitric Oxyde

O

OMS: Organisation Mondiale de la
Santé

P

PAMPs: Pathogen Associated
Molecular Patterns

pDC : Plasmacytoid Dendritic Cell

PD-1 : Programmed cell death
protein-1

PD-L1 : Programmed cell death
ligand protein 1

PMA : Phorbol Myristate Acetate

PMN : Polymorphonuclear
Neutrophil

Pre-DC : Dendritic Cell Precursor

PRR : Pattern Recognition Receptor

R

RIG : Retinoic acid-Inducible Gene

RLR : RIG-1 Like Receptor

RNA : Ribonucleic Acid

ROR γ T : RAR-related Orphan
Receptor gamma T

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SNP : Single Nucleotide

Polymorphism

STAT : Signal Transducer and
Activator of Transcription

STING : Stimulator of Interferon
Genes

T

T reg : (Lymphocyte) T Régulateur

TAM : Tumor-Associated
Macrophages

T-bet : T-box transcription factor

TCR : T Cell Receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor
beta

Th : (Lymphocyte) T Helper

TIGIT : T cell Immunoreceptor with
Ig and ITIM domains

TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor

TIM-3 : T Cell Immunoglobulin 3

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFRSF4 : Tumor Necrosis Factor
Receptor Superfamily member 4

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-
Inducing Ligand

TSLP : Thymic Stromal Lympho
Protein

U

UV : Ultra-Violet

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

VISTA : V domain Immunoglobulin
Suppressor of T cell Activation

X

XCR1 : XC Chemokine Receptor 1

Z

Zbtb46 : Zinc finger and BTB
domain-containing protein 46

INTRODUCTION

Chapitre 1 : La peau et les cancers cutanés

A. Rôle et structure de la peau

1. Généralités

La surface corporelle des animaux terrestres est exposée à l'air et aux agressions extérieures. Au cours de l'évolution, les arthropodes terrestres ont développé un exosquelette qui protège les cellules vivantes de l'épiderme sous-jacent contre la dessiccation et les dommages mécaniques. Les tétrapodes terrestres, y compris les humains, utilisent la peau en guise de barrière. La peau est définie comme l'organe qui enveloppe le corps. Chez l'adulte, sa surface est comprise entre 1,5 et 2 mètres carrés et son poids varie entre 4 et 10 kg (Lai-Cheong & McGrath, 2013). Elle assure un rôle de protection contre les agressions extérieures et forme une barrière physique, chimique et immunologique entre l'intérieur de l'organisme et l'environnement extérieur. Cet organe pluristratifié présente une structure variable selon la région du corps. C'est un tissu tégumentaire qui renferme également de nombreuses terminaisons nerveuses favorisant le sens du toucher.

2. Structure de la peau

La peau se compose de 3 couches successives. De l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve l'épiderme, le derme et enfin, la couche la plus profonde : l'hypoderme (McGrath, 2016) (Figure 1).

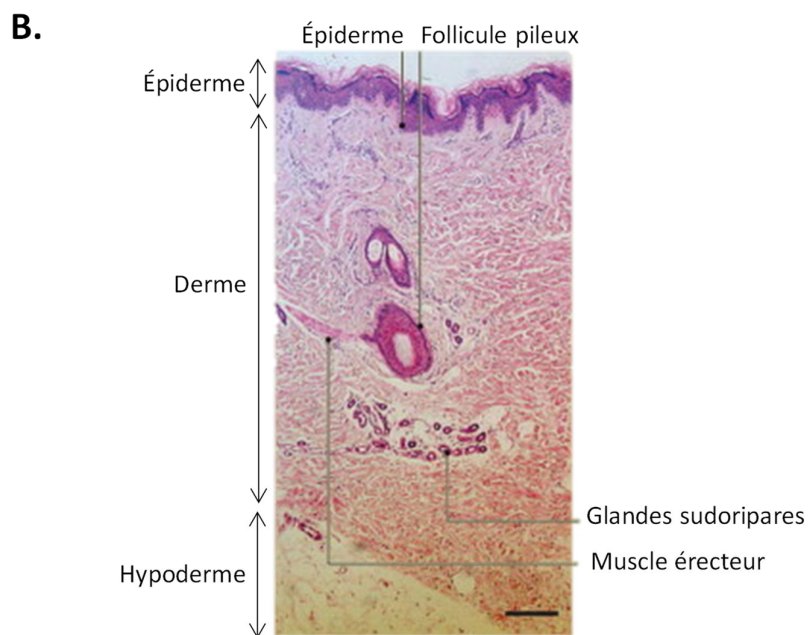
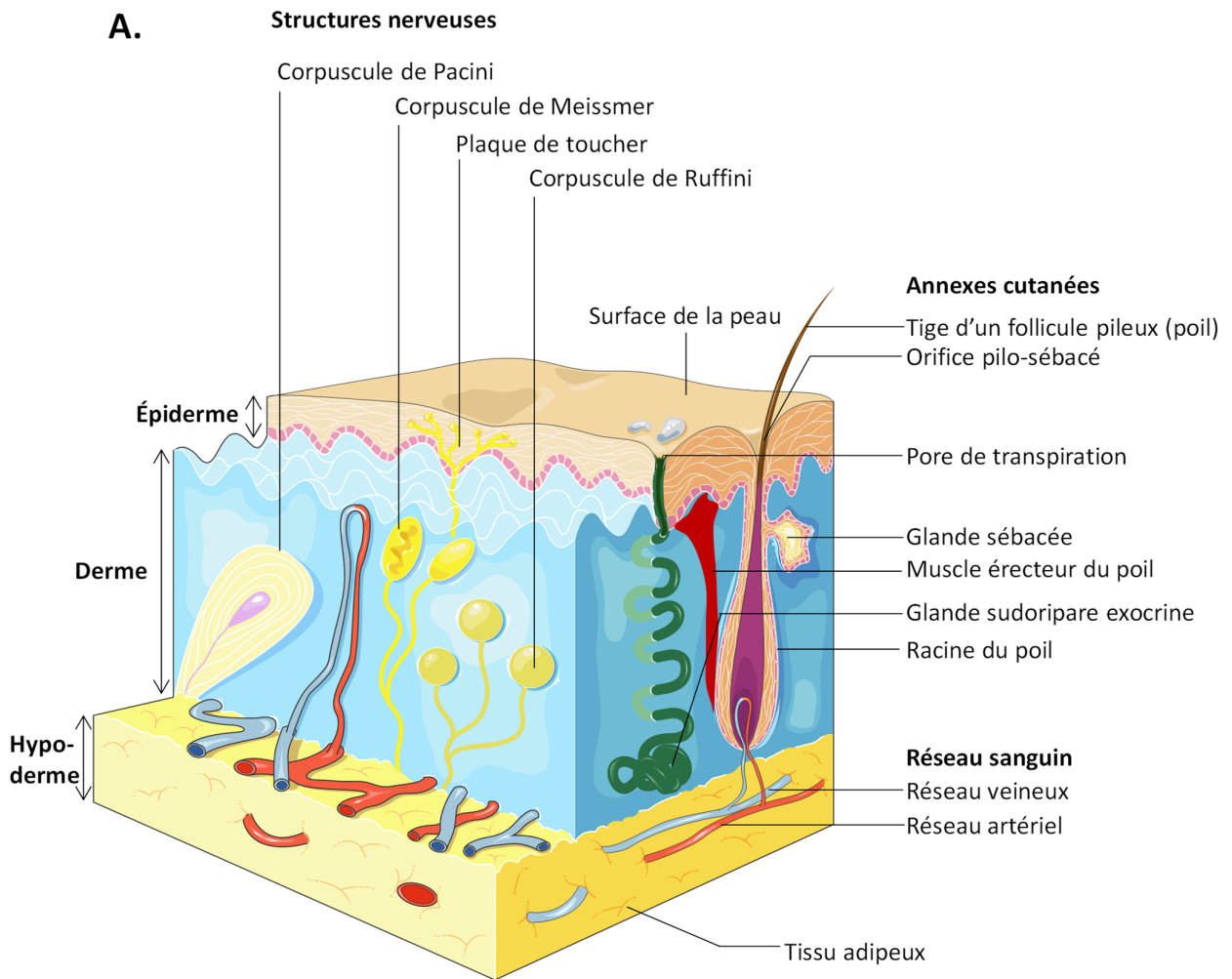


Figure 1. Structure de la peau

A. Représentation schématique des principales structures de la peau

B. Coupe histologique de peau saine (adapté de Lai-Cheong & McGrath 2013)

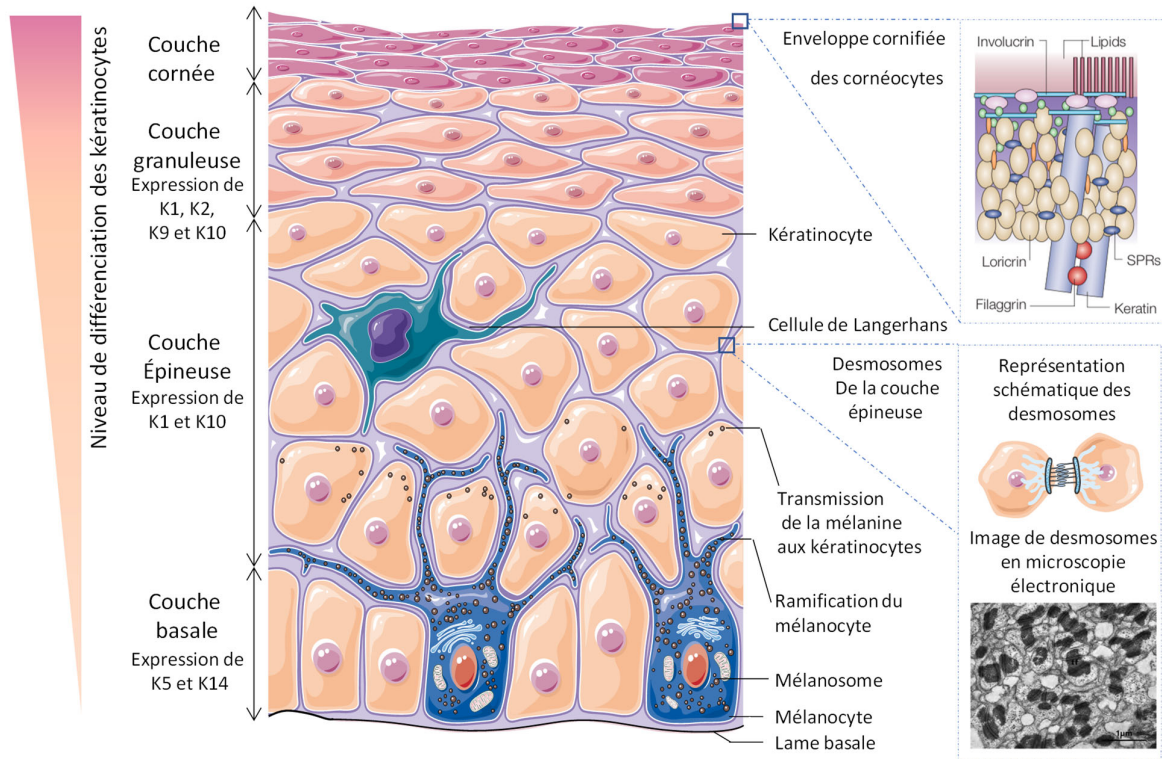
2.1 L'épiderme

L'épiderme humain est un épithélium pluristratifié en renouvellement permanent, d'une épaisseur de 0,05 à 0,1 mm. Les kératinocytes forment le compartiment cellulaire majoritaire dans l'épiderme et représentent 90 à 95% de la population cellulaire (Lai-Cheong & McGrath, 2013). Les kératinocytes de l'épiderme prolifèrent en permanence à partir d'un pool de cellules souches de la lame basale, afin d'assurer leur renouvellement continu. Progressivement, dans leur mouvement de l'intérieur vers l'extérieur, les kératinocytes vont se différencier et se charger en kératine, une protéine fibreuse et hydrophobe qui confère à la peau sa propriété d'imperméabilité. En effet, on attribue 80 à 90% de la masse de l'épiderme à 2 protéines : la kératine et la filagrine. De la même façon, les cellules vont accumuler des quantités variables de grains de mélanine selon la couleur de la peau et de l'exposition solaire. La différenciation finale des kératinocytes se termine par un programme de mort cellulaire appelé cornification, qui aboutit à la formation de corps apoptotiques agglutinés et constitue la couche cornée: c'est le processus de desquamation. Les cellules les plus superficielles vont se détacher lors de frottements. Le cycle de vie des kératinocytes dure 20 à 40 jours environ. Ainsi, l'épiderme se compose de 4 feuillets en contact direct avec l'extérieur qui témoignent de l'état de différenciation des kératinocytes. De l'intérieur vers l'extérieur, on trouve : 1) La couche basale, 2) La couche épineuse, 3) la couche granuleuse, 4) la couche cornée (Figure 2) (McGrath, 2016).

2.1.1 La couche basale

La couche basale est la couche la plus profonde. En contact avec le derme, elle est composée d'une couche unique de kératinocytes en forme de cubes de 10 à 14 μm de côté, qui se divisent rapidement et dont le rôle est de renouveler le contingent de cellules. Ils assurent ainsi le renouvellement de l'épiderme et le maintien de l'homéostasie. Ces kératinocytes peuvent être divisés en 2 sous-types selon leur activité mitotique : les cellules souches de l'épiderme et les cellules amplificatrices transitoires (Rangel-huerta & Maldonado, 2017; Senoo, 2013). Les cellules souches de l'épiderme sont localisées dans des niches au niveau de la lame basale et des follicules pileux. Ce sont des cellules quiescentes qui ne se divisent que très peu. Elles entrent en division lorsque l'épiderme doit être renouvelé rapidement, principalement au cours du processus de cicatrisation. Leur division asymétrique donne naissance à une cellule souche

A.



B.

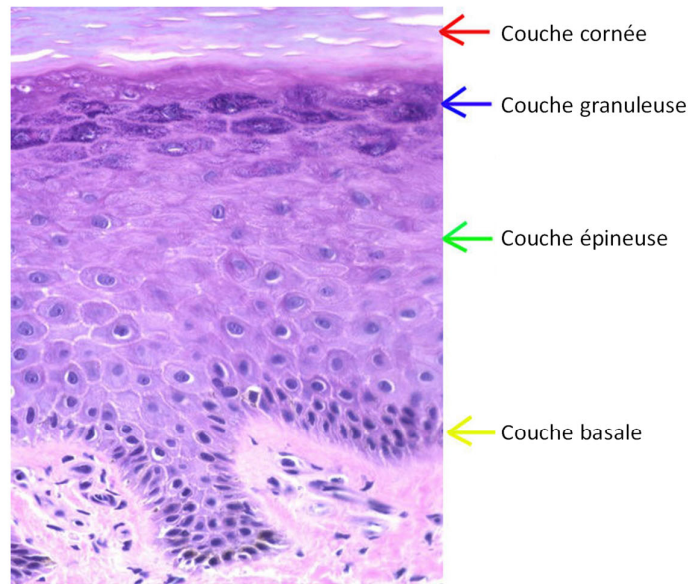


Figure 2. Structure de l'épiderme

- A. Représentation schématique de la structure de l'épiderme (Adapté de Candi et al., 2005 et McGrath, 2016)
- B. Coupe histologique de peau humaine colorée avec un marquage éosine-hématoxyline-safran(apsubiology.org/anatomy/2010)

et une cellule amplificatrice transitoire. Ce sont les cellules amplificatrices transitoires qui ont un très haut potentiel mitotique et qui donneront naissance aux kératinocytes post-mitotiques exprimant les kératines K5 et K14. Dès que les kératinocytes se détachent de la lame basale, ils changent leur profil d'expression génique, notamment sous le contrôle du facteur de transcription p63.

On trouve aussi dans cette couche basale les cellules mélanocytaires, appelées mélanocytes, qui représentent environ 10% de la population cellulaire soit environ 1200 mélanocytes par mm² (Cichorek et al., 2013). Ces cellules fabriquent un pigment spécifique, la mélanine, renfermé dans des organites cytoplasmiques : les mélanosomes. Initialement, les chercheurs pensaient que la mélanine était renfermée dans des mitochondries particulières. En 1960, Seiji et al., démontrent que la mélanine est contenue dans un organite particulier, distinct des mitochondries, et proposent le terme de mélanosome pour ce nouvel organite (Seiji et al., 1960). La Phaelomélanine et l'eumélanine sont les 2 types de mélanine produits dans la peau (Cichorek et al., 2013) et permettent de protéger la peau des rayons ultra-violet (UV) du soleil, on parle de photoprotection. La production de mélanine est spontanée dans le cas des peaux de couleur ou fait suite à une stimulation par les rayons UV du soleil pour les peaux claires (Yi et al., 2018 ; McGrath, 2016). Les mélanocytes sont des cellules ramifiées. Leurs longues ramifications leur permettent d'entrer en contact avec les kératinocytes de la couche épineuse. Les grains de mélanine circulent dans les extensions de la cellule, et jusque dans les cellules épithéliales à leur contact (Bahadoran & Ortonne, 2002). Un mélanocyte permet de fournir suffisamment de mélanine pour 30 à 40 kératinocytes. Plus il y a de grains de mélanine dans les kératinocytes, plus la peau est foncée. Les études visant à caractériser les capacités de renouvellement des mélanocytes n'ont été faites qu'*in vitro*. A l'heure actuelle, on considère que les mélanocytes ne prolifèrent que très rarement dans des conditions physiologiques et que, dès l'âge de 30 ans, 10 à 20% des mélanocytes sont perdus tous les 10 ans (Whiteman et al., 1999).

2.1.2 La couche épineuse

Au-dessus de la couche basale, on trouve la couche épineuse. Autrement appelée corps muqueux de Malpighi, elle doit son nom aux « épines » visibles au microscope qui sont en fait des liaisons entre les kératinocytes appelées desmosomes (Figure 2). En migrant vers la surface de la peau, les kératinocytes deviennent plus gros, ils peuvent encore se diviser, mais sont fixés les uns aux autres par des liaisons qui leur donnent un aspect épineux caractéristique de cette couche. A ce stade, l'expression de K5, K14 et K15 est interrompue et les cellules commencent à exprimer K1 et K10 notamment (Lyle et al., 1998 ; Koster et al., 2007). Cette structure est constituée de la superposition de 4 à 5 épaisseurs de kératinocytes liés entre eux. Les interactions étroites entre kératinocytes permettent de créer une cohésion favorable à la fonction d'imperméabilité de la peau.

2.1.3 La couche granuleuse

La couche granuleuse, sus-jacente à la couche épineuse, est riche en kératinocytes chargés en kératine et dont le noyau dégénère progressivement. Cette couche est le lieu de l'accumulation de la kératine dans les cellules de la peau. La couche granuleuse contient des kératinocytes plus plats, leur grand axe devient parallèle à la surface cutanée et l'on compte dans cette couche granuleuse une à cinq épaisseurs de kératinocytes aplatis. A ce stade, les cellules sont pleines de grains de kératine qui commencent à se coller entre eux à la périphérie du kératinocyte. Plus les cellules vont se rapprocher de la surface de la peau, plus elles vont dégénérer et se déstructurer (McGrath, 2016).

2.1.4 La couche cornée

Enfin, la couche la plus externe de l'épiderme est la couche cornée. Elle contient des kératinocytes au stade ultime de leur maturation. Entièrement différenciés, on les appelle alors, les cornéocytes. Ils sont très plats, translucides, plus ou moins amalgamés entre eux et composés presque exclusivement de filaments de kératine agrégés et alignés. A ce stade, les kératinocytes sont anucléés et ils ont perdu leurs organites cytoplasmiques (McGrath, 2016). Les cornéocytes ont une enveloppe cornifiée hydrophobe de 15 nm d'épaisseur, présente au niveau de la paroi interne de leur membrane plasmique composée de protéines de structures telles que

l'involucrine et la loricrine rattachées entre elles par des transglutaminases (Figure 2) (Steinert & Marekov, 1995 ; McGratt, 2016). Ils constituent un film quasi continu cohésif composé en grande partie de kératine formant ainsi une structure rigide résistante : une véritable barrière contre l'entrée de composés externes et la perte d'eau de l'intérieur vers l'extérieur de l'organisme (Marks et al., 1981 ; Candi et al., 2005). Les cornéocytes sont attachés les uns aux autres par des desmosomes particuliers appelés corneodesmosomes (Serre et al., 1991). Au cours de la phase finale de la différenciation, les corneodesmosomes sont dégradés par des protéases de la famille des kallicréines permettant leur desquamation et leur mort par apoptose. L'équilibre entre l'élimination des cellules par desquamation et leur renouvellement par la couche basale est essentiel pour l'homéostasie de cet organe (Candi et al., 2005 ; Eckhart et al., 2013). Ce programme de mort cellulaire est contrôlé. En effet une mort cellulaire par apoptose ou nécrose non contrôlée aboutirait à la formation de molécules de danger et une inflammation conduisant à une perturbation du programme de différenciation des kératinocytes. Ainsi, de manière paradoxale, les cornéocytes qui entament le processus de desquamation, mettent également en place des mécanismes anti-apoptotiques et anti-nécrotiques.

2.2 La lame basale

La lame basale, d'une épaisseur de 200 nm environ, sépare l'épiderme de la couche sous-jacente : le derme. Elle assure un rôle de barrière mécanique contre l'entrée dans le derme. Elle sert également de complexe d'ancrage entre les deux compartiments et joue un rôle majeur dans le dialogue et la migration des cellules entre ces 2 compartiments. La lame basale est composée d'un mélange complexe de protéines organisées en réseau, comprenant de la laminine, du collagène de type IV, XVII et XVIII notamment, et des peptidoglycane produits à la fois par les kératinocytes de l'épiderme et les fibroblastes du derme (Ghalbzouri et al., 2005 ; Has et al., 2015).

2.3 Le derme

Le derme, quant-à-lui, est composé à 80% d'eau. Son épaisseur est de 0,5 à 5 mm selon la région du corps, soit environ 4 fois plus épais que l'épiderme. Contrairement à l'épiderme dépourvu de vaisseaux sanguins pour éviter un passage direct entre l'extérieur et l'intérieur du corps, le derme est très riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et sert de couche nourricière à l'épiderme apportant ainsi les nutriments, l'oxygène et les cellules de défense (Plager et al., 2014). Le derme comprend également différents éléments annexes de la peau comme les poils, les glandes sudoripares (qui fabriquent la sueur) et les glandes sébacées (qui fabriquent le sébum). Au total dans le derme, ce sont 1,5 à 4 millions de glandes présentes. On y trouve également différents types de terminaisons nerveuses qui permettent de distinguer les stimuli épicrotiques tels que les caresses, ou la reconnaissance des formes lors de la préhension des objets, et les stimuli protopathiques tels que la douleur, les démangeaisons ou encore la température (Figure 1).

Le derme renferme une multitude de types cellulaires comprenant une majorité de fibroblastes, une population cellulaire hétérogène. La vimentine, la protéine « Fibroblast Specific Protein 1 » (FSP-1), également appelée S100A-4, le récepteur au collagène « Discoidin Domain Receptor 2 » (DDR2), CD90 ou encore le marqueur « Fibroblast Activation Protein » (FAP) sont les marqueurs utilisés pour identifier les fibroblastes même s'ils ne sont pas exclusivement exprimés par ces derniers (Driskell & Watt, 2015 ; Kong et al., 2021 ; Chang et al., 2014). Les fibroblastes sont les principaux responsables de la production et de la dégradation des composants constitutifs de la matrice extra-cellulaire (Sorrell & Caplan, 2004).

La matrice extracellulaire contient 2 types de molécules : des molécules de structure (pouvant former ou non des fibres) telles que les collagènes et l'élastine, et des protéines matricielles telles que les glycosaminoglycanes dont le rôle n'est pas structural mais de modifier les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. Les fibres de collagène et d'élastine représentent notamment 70% de la composition de la matrice extracellulaire qui constitue un réseau dense et structuré, servant de soutien à ce tissu (Figure 3) (Kielty et al., 2002). Cela confère à la peau sa solidité, sa souplesse et son élasticité. A l'heure actuelle, 28 types de collagène, différents par leur chaîne alpha (codée par plus de 40 gènes) ont été identifiés (Ricard-blum, 2011). Les collagènes de type I et de type III sont les plus abondants dans le derme. A présent, il est admis que la matrice extracellulaire ne joue pas uniquement un rôle de support mais impacte directement le comportement des cellules qui s'y attachent (Watt & Fujiwara, 2011). Il est également admis que la composition complexe de la matrice extracellulaire est essentielle à l'homéostasie de la peau, en régulant certains aspects comme la prolifération ou migration cellulaire (Tracy et al., 2016).

Le derme se compose de 3 couches successives identifiables par la composition de leur matrice extracellulaire : le derme papillaire, le derme réticulaire et enfin le derme profond. Chacune de ces structures renferme un type particulier de fibroblastes. En réalité, le terme « fibroblastes du derme » est une simplification. En effet, ils représentent des populations diverses et dynamiques.

- Le derme papillaire, d'une épaisseur de 300 à 400 μm , est situé juste sous l'épiderme, au contact de la lame basale. Cette zone est très riche en fibres de collagène de type I et III notamment, et d'élastine, formant une lame quasiment continue, d'épaisseur variable selon les localisations (Lai-Cheong & McGrath, 2013).
- Le derme réticulaire, moins dense en fibres contient la racine des poils ou cheveux ainsi que les principales glandes de la peau. Les fibroblastes présents dans le derme réticulaire jouent un rôle particulier dans les processus de cicatrisation (Janson et al., 2017).
- Enfin, le derme profond correspond, comme son nom l'indique, à la couche la plus profonde du derme. Il fait la transition avec l'hypoderme. Le réseau fibrillaire est plus lâche et on y trouve quelques adipocytes.

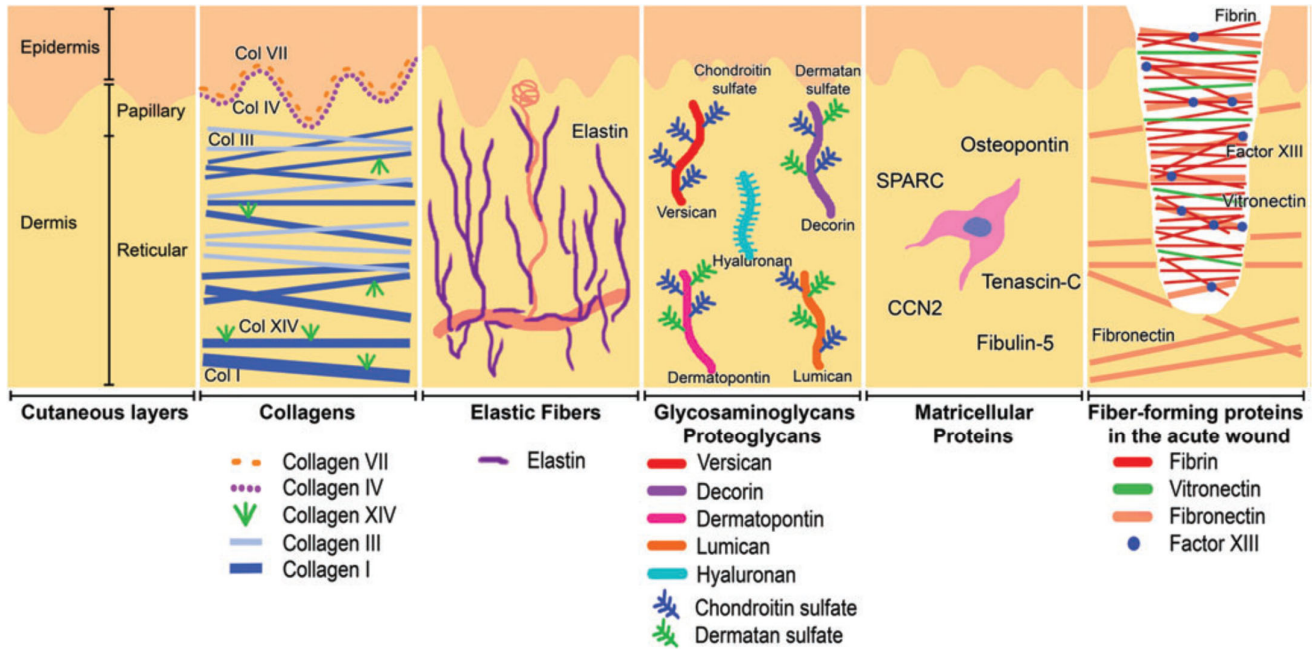


Figure 3. Composants de la matrice extracellulaire dermique (Tracy et al., 2016)

2.4 L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. C'est un tissu de soutien souple et déformable qui fait la liaison entre la peau et les organes qu'elle recouvre. Présent dans toutes les régions du corps à l'exception des oreilles, des paupières et des organes génitaux externes masculins, l'hypoderme est très riche en adipocytes et fibroblastes. Cette structure joue également un rôle de réserve énergétique : les lipides contenus dans les adipocytes peuvent être mobilisés sous forme d'énergie en cas d'effort intense ou prolongé ou de jeûne. Chez les individus non obèses, 80% de la graisse est localisée dans l'hypoderme. L'hypoderme participe également à la régulation thermique, la graisse jouant un rôle d'isolant passif, en réduisant les échanges de température avec l'extérieur. Les adipocytes jouent également un rôle dans la régulation de la croissance des follicules pileux et la cicatrisation (Rivera-gonzalez et al., 2014). Enfin, la graisse joue également un rôle dans la production endocrine d'hormones telles que la leptine, qui contribue à la régulation de la sensation de faim, impactant directement le contrôle métabolique et énergétique. Pendant de nombreuses années, il a été considéré que l'hypoderme ne répondait pas aux radiations UV car elles ne pénètrent pas l'hypoderme : les UVA pénètrent profondément le derme alors que les UVB ne pénètrent que la partie supérieure du derme (Christensen et al., 2017).

3. Rôles de la peau

Barrière mécanique thermique et hydrique : La peau est avant tout une barrière physique à l'interface entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme. La matrice extracellulaire dense et organisée, structure riche en fibres de collagène et d'élastine, confère à la peau sa solidité, son élasticité et ses propriétés de résistance simultanée contre les forces mécaniques externes et internes (Tissot et al., 2016). Les kératinocytes, cellules de Merkel, terminaisons nerveuses et les poils permettent quant à eux de transformer une information mécanique en sensation de toucher et permettent d'alerter en cas de stimulation mécanique ou thermique trop importante (Tissot et al., 2016). La peau permet également de réguler la température du corps par 2 mécanismes : la vasoconstriction et vasodilatation des vaisseaux sanguins qui régulent ainsi les pertes de chaleur et le relargage d'eau par les glandes sudoripares (Kellogg, 2021; Veselá et al., 2019). La peau protège également l'organisme contre les rayonnements UV du soleil grâce au fonctionnement des mélanocytes et leur production de mélanine. Enfin, la couche cornée de l'épiderme forme une véritable barrière empêchant à la fois la pénétration d'agents chimiques, de solvants et la perte hydrique (John et al., 2020). La peau participe donc à l'homéostasie tissulaire en protégeant contre la déshydratation (Figure 4).

Barrière immunologique : La première ligne de défense immunitaire est constituée de cellules non immunitaires : les kératinocytes de l'épiderme, capables de détecter des modifications de l'environnement comme la présence de pathogènes, d'irritants, ou encore les rayonnements UV (Wang & Li, 2020). Les kératinocytes jouent un rôle majeur dans l'immunité antimicrobienne à la surface de la peau. En effet, ce sont les producteurs de peptides anti-microbiens : première ligne de défense contre les micro-organismes. Les kératinocytes expriment différents récepteurs, les « Pathogen Recognition Receptor » (PRR) tels que les « Nuclotide-binding Oligomerization Domain » (NOD-like receptors (NLR)) et aussi principalement des « Toll-Like Receptors » (TLR) capables de reconnaître des signaux de dangers, les « Danger Associated Molecular Pattern » (DAMPs) et des signaux associés à la présence de pathogènes, les « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs) (Figure 5). Chez l'Homme, les kératinocytes expriment TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR3 et TLR9 (Lebre et al., 2007). L'activation des TLR présents à la surface des kératinocytes conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18) (Gröne, 2002 ; Uchi et al., 2000) (Figure 5) qui permet de stimuler localement les cellules immunitaires telles que les cellules de Langerhans (Lebre et al., 2007). L'activation des TLR conduit également à la

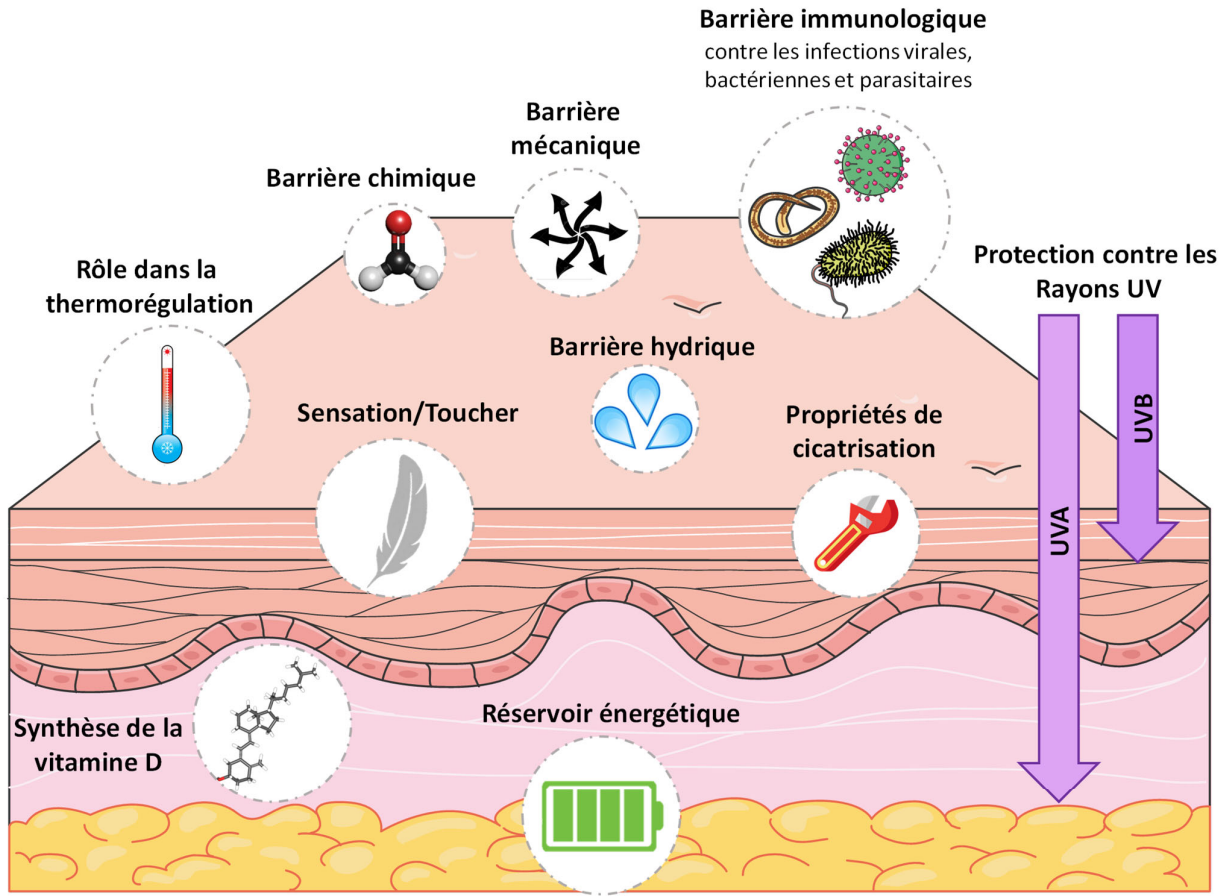


Figure 4. Rôles de la peau

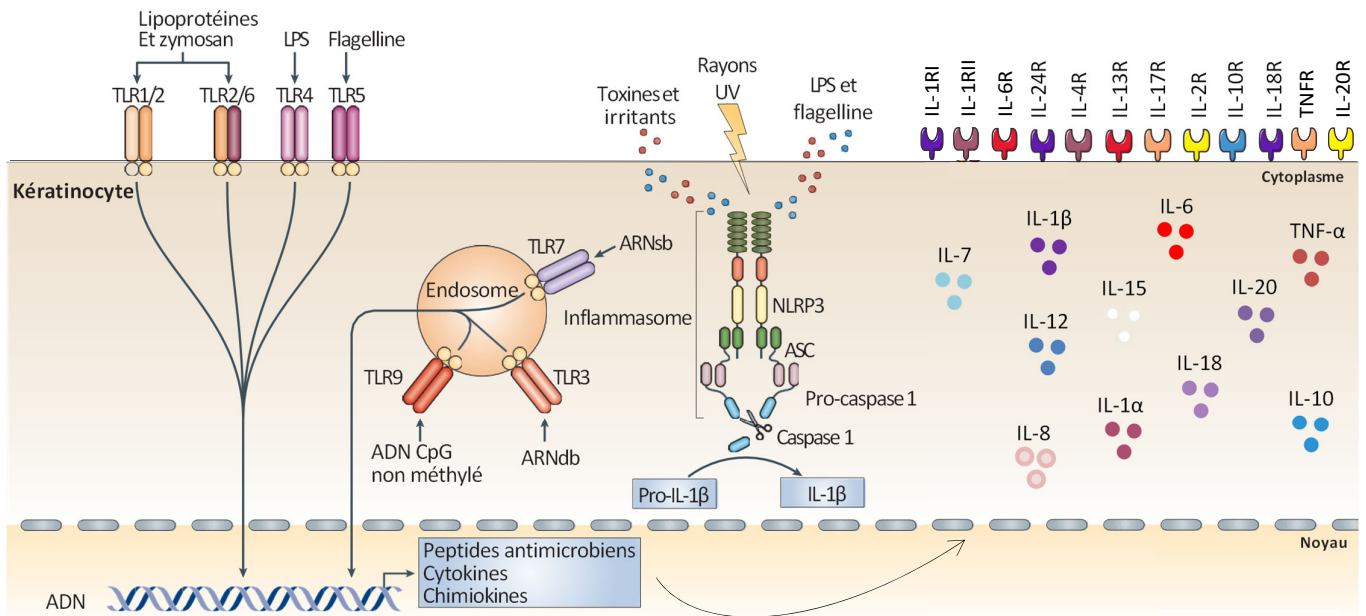


Figure 5. Fonctions immunologiques des kératinocytes.
Adapté de Nestle et al., 2009 et Gröne et al., 2002

production de chimiokines telles que CCL20, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 permettant ainsi le recrutement de lymphocytes T et d'autres cellules effectrices de l'immunité innée comme les monocytes, les cellules dendritiques et les neutrophiles (Nestle et al., 2009).

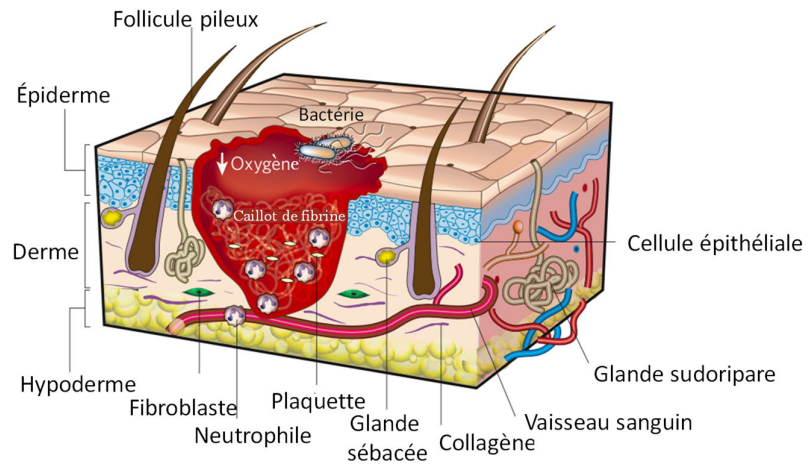
D'autre part, de plus en plus d'études prouvent que les mélanocytes sont des cellules immunocompétentes jouant un rôle important dans l'immunosurveillance de la peau. En effet, les mélanocytes en culture peuvent exprimer différentes molécules telles que le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I et II (CMHI, CMHII), ICAM-1 et CD40 et expriment également différents TLR. Les mélanocytes produisent également des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-12 IL-10 et TNF), des chimiokines (IL-8, CCL2) du TGF- β , catécholamines, eicosanoides, sérotonine, lorsqu'ils sont stimulés (Cichorek et al., 2013 ; Dzierżęga-łęcznar & Stępień, 2019 ; Lu et al., 2002)

On retrouve également différentes sous-populations de cellules immunitaires dans la peau. Nous reviendrons en détail sur les cellules immunitaires de la peau et leurs fonctions, notamment dans le contexte des carcinomes cutanés, dans le Chapitre 2.

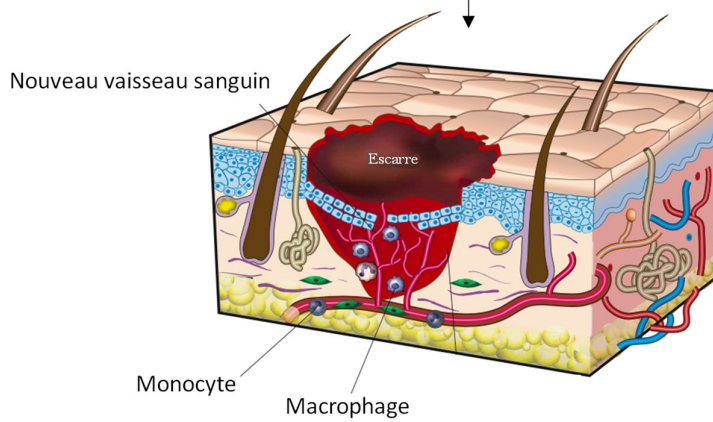
Propriétés endocrines. Bien que la peau ne soit pas la principale source de synthèse des androgènes, les cellules présentes dans les glandes sudoripares, les glandes sébacées et à la base du follicule pileux sont capables de convertir les pro-hormones androgéniques circulantes telles que la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione en testostérone et 5 α -dihydrotestostérone (DHT) (Zouboulis, 2009). Aussi, les fibroblastes du derme et les kératinocytes de la couche granuleuse sont capables de produire des « Insulin-like Growth Factors » (IGF) tels que IGF-1 (Rudman et al., 1997). Après exposition aux rayons UV, les kératinocytes sont responsables de la synthèse et du métabolisme de la vitamine D qui est essentielle pour la régulation de l'absorption du calcium et joue également un rôle dans la régulation des cellules immunitaires (Christensen et al., 2017).

Cicatrisation : Les propriétés auto-réparatrices de la peau permettent la mise en place du processus de cicatrisation lorsque l'intégrité de la barrière cutanée est rompue. La cicatrisation est un phénomène naturel dans lequel de nombreux éléments seront impliqués et influenceront sur la qualité et la rapidité du processus. Trois étapes successives caractérisent le processus de cicatrisation : la première, quelle que soit la plaie, est associée à une inflammation locale précoce. Immédiatement après le traumatisme, la coagulation du sang permettra d'assurer l'étanchéité de la zone lésée. Ensuite, la phase proliférative de la cicatrisation se caractérise par une activation des kératinocytes, fibroblastes, macrophages et cellules endothéliales qui permettra de fermer la plaie, reconstruire la matrice extra cellulaire et induire l'angiogenèse. Enfin, les fibroblastes principalement, s'occuperont du remodelage de la matrice conduisant finalement au retour à l'homéostasie (Wilkinson et al., 2020) (Figure 6).

1. Inflammation



2. Reconstruction



3. Remodelage de la matrice extra-cellulaire

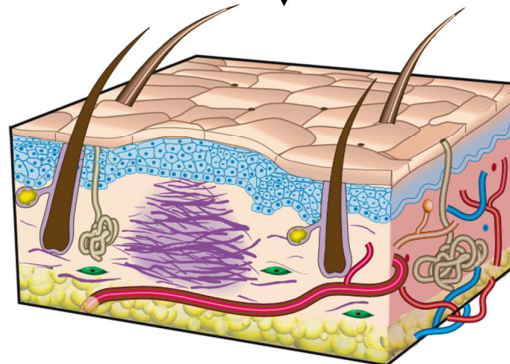


Figure 6. Processus de cicatrisation (Adapté de Gurtner et al., 2008)

B. Les cancers de la peau

1. Qu'est-ce qu'un cancer

De nombreuses erreurs de codage peuvent apparaître dans la séquence d'ADN tout au long de la vie et dans tout organisme. Ces erreurs, appelées mutations, peuvent survenir spontanément ou être induites par des agents mutagènes. Les mutations génétiques peuvent inclure des délétions, insertions ou substitutions de nucléotides, des coupures simple brin ou double brin de l'ADN ou des réarrangements chromosomiques. Au niveau génomique, ces erreurs peuvent conduire à un état aneuploïde, des amplifications géniques, une perte d'hétérozygotie et éventuellement à une perte partielle ou totale de la fonction du gène (Vijg, 2000). Pour pallier à ces effets, la cellule possède différents mécanismes de réparation présentant des voies de signalisation redondantes et chevauchantes. Dans tous les cas, l'accumulation de mutations est le résultat d'un déséquilibre entre les dommages de l'ADN et leur réparation. Lorsqu'un certain niveau de dommage est atteint, les cellules changent de phénotype et peuvent finalement arrêter leur cycle cellulaire, entrer en apoptose ou en sénescence ou se transformer en cellule cancéreuse (Erol, 2011) (Figure 7).

Le vieillissement de la cellule est un facteur de risque important pour le développement de cancers *via* l'accumulation de mutations au cours de la vie. Ainsi, le vieillissement engendre de l'instabilité génétique qui peut aboutir à différentes situations telles que la mort des cellules par apoptose, sénescence ou la prolifération anarchique conduisant au développement des cancers (Aunan et al., 2017 ; Moskalev et al., 2013).

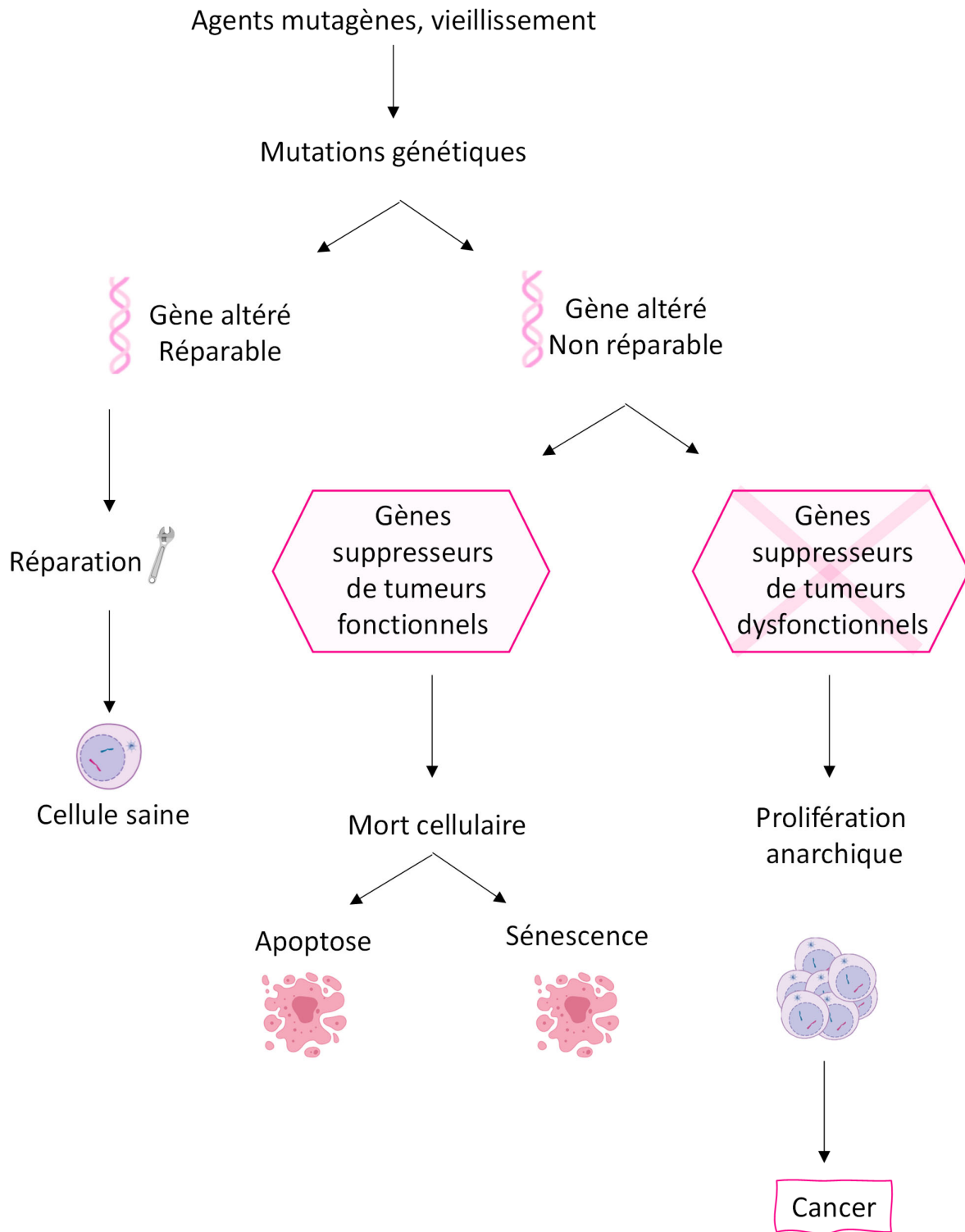
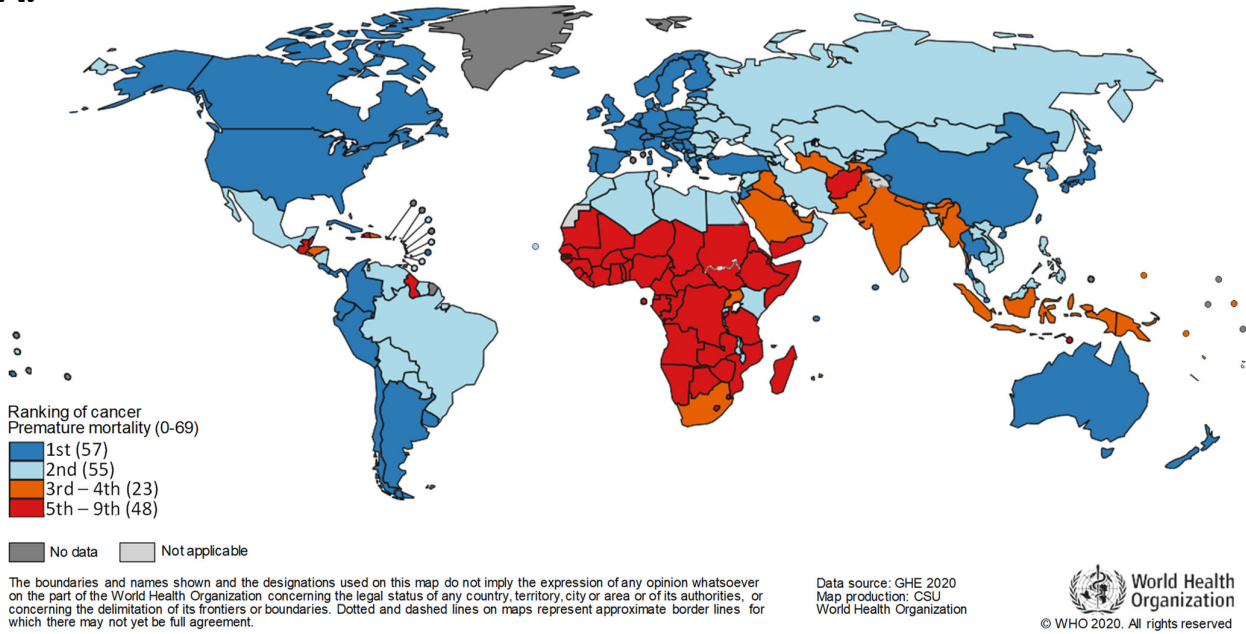


Figure 7. Développement d'un cancer

Les cancers représentent un enjeu mondial. En effet, 19,3 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués et 10 millions de morts ont été liés au cancer dans le monde en 2020 (Sung et al., 2021). De plus, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les cancers ont été la première ou la seconde cause de mortalité avant 70 ans dans 112 pays sur 183 en 2019, et la 3^{ème} cause de mortalité dans 23 autres pays (Figure 8A). L'incidence des cancers est en constante augmentation dans le monde, en raison du vieillissement de la population et des changements de prévalence et distribution des facteurs de risques des cancers dont la plupart sont associés à l'évolution économique et sociale des pays (tabac, régime alimentaire non équilibré, surpoids, sédentarité). Ainsi, une étude récente estime que le nombre de cancers dans le monde va augmenter de 47% en 2040 pour atteindre 28,4 millions de nouveaux cas (Sung et al., 2020). La figure 8B présente la distribution des cancers en terme d'incidence et de mortalité selon la région du monde, tout sexe confondu. On observe que la moitié des cas de cancers et 58,3% des morts surviennent en Asie, lieu de résidence de 59,5% de la population mondiale. D'autre part 22,8% des cas de cancers et 19,6% des morts surviennent en Europe alors que seulement 9,7% de la population mondiale réside dans cette région.

A.



B.

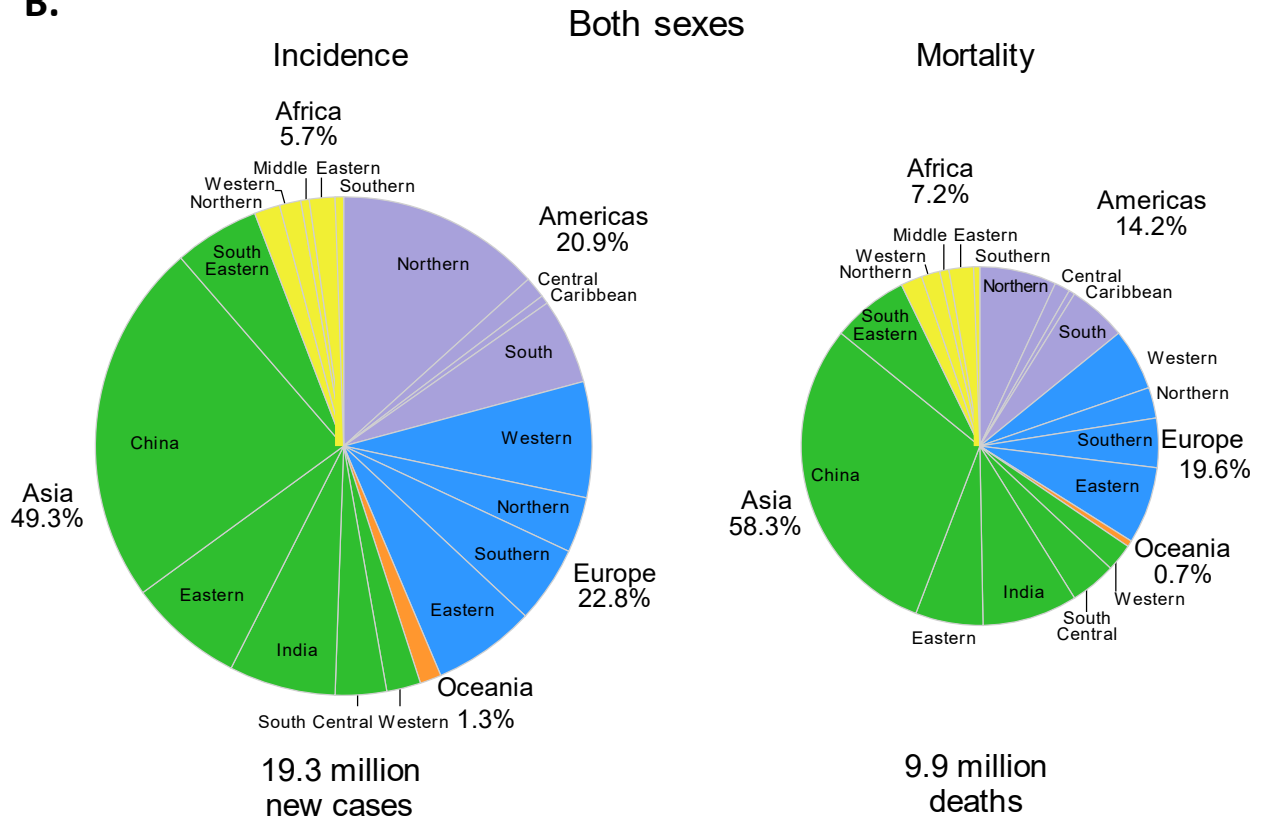


Figure 8. Taux d'incidence et de mortalité des cancers dans le monde (Sung et al., 2021)

2. Les cancers cutanés

Les cancers cutanés sont les tumeurs malignes les plus fréquentes dans la population caucasienne. On distingue 2 grandes familles de cancers cutanés : les mélanomes, qui sont issus de la transformation des mélanocytes en cellules cancéreuses, et les carcinomes qui sont issus de la transformation des kératinocytes en cellules cancéreuses (Apalla, 2017). Il existe 3 autres types de cancers cutanés très rares : le carcinome à cellules de Merkel, le dermatofibrosarcome protubérant et les carcinomes annexiels. Le facteur de risque principal des cancers cutanés est l'exposition aux rayons UV du soleil.

2.1 Les mélanomes

Incidence : Le mélanome est le cancer de la peau le plus mortel bien qu'il ne représente que 4% des cancers de la peau. Sung et al., indiquent dans leur étude que le nombre de cas de mélanomes diagnostiqués dans le monde en 2020 a été supérieur à 320 000 et on a dénombré plus de 57 000 morts de la maladie. L'Australie est la région du monde la plus touchée (Karimkhani et al., 2017 ; International Agency for Research on Cancer 2019). Le taux de mortalité élevé dans les patients atteints de mélanome est dû aux capacités métastatiques des cellules de mélanome. La couleur de la peau représente un facteur de risque important ce qui expliquerait également pourquoi les mélanomes touchent principalement les populations caucasiennes.

Description macroscopique et histologique : A l'échelle macroscopique, les mélanomes se caractérisent par leur Assymétrie, des Bords irréguliers, une Couleur non homogène allant du brun clair au noir foncé et un Diamètre généralement supérieur à 6 mm : c'est la règle ABCD. Son évolution au fil du temps, changement d'aspect, de taille ou de couleur peut indiquer la nature cancéreuse de la lésion (Thompson et al., 2005). Dans les mélanomes à propagation superficielle, on trouve des mélanocytes en grande quantité pouvant former des chaînes le long de la lame basale ou formant de petits amas dans l'épiderme (Figure 9) (Smoller, 2006a).

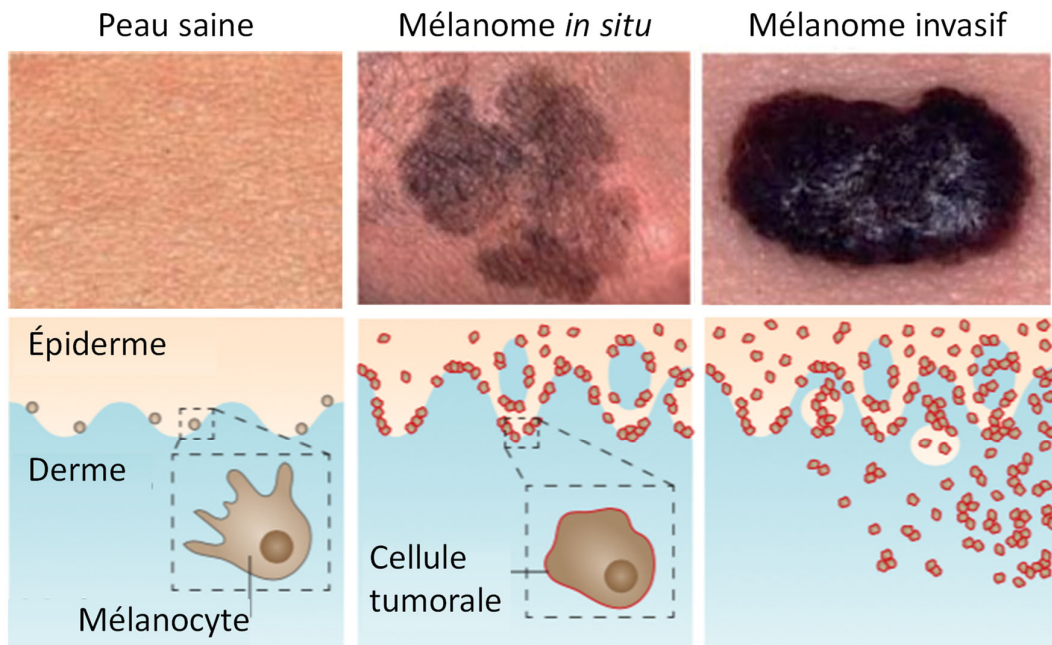


Figure 9. Images macroscopiques de mélanomes et leurs représentations schématiques (Shain & Bastian, 2016)

Carcinogénèse au niveau moléculaire : Environ 50% des mélanomes surviennent à cause d'une mutation du gène codant pour la protéine BRAF, une protéine kinase qui active la voie MAP kinase/ERK qui joue un rôle dans les processus de prolifération et différenciation cellulaire. La mutation V600E représente 90% des mutations retrouvées sur le gène BRAF dans le contexte des mélanomes et conduit à une division cellulaire incontrôlée (Davis et al., 2019). Des mutations sur les gènes CDNK2A, NRAS, PTEN, MYC, MITF et ERB4 ont également été associées au développement du mélanome (Flaherty et al., 2012). De la même façon, une mutation dans le gène MITF constitue une prédisposition au développement d'un mélanome (Dessinioti et al., 2011 ; Leonardi et al., 2018).

Traitements de référence : La résection chirurgicale de la tumeur et des tissus sains environnants représente la première stratégie thérapeutique appliquée au mélanome localisé. La biopsie des ganglions sentinelles est également réalisée chez les patients dont la tumeur mesure plus de 0,8 mm d'épaisseur ou présentant des ulcères. Si la biopsie des ganglions sentinelles révèle la présence de cellules tumorales, les ganglions lymphatiques restants dans la région sont parfois retirés également. Les mélanomes métastatiques peuvent également être retirés chirurgicalement mais la chirurgie seule ne représente pas un traitement curatif pour ces mélanomes (Davis et al., 2019). Depuis 1972, la seconde ligne de traitement est l'utilisation de chimiothérapies telle que la dacarbazine (Yang & Chapman, 2009) mais les nouvelles stratégies thérapeutiques telles que les thérapies ciblées ou les immunothérapies remplacent peu à peu leur utilisation. Les inhibiteurs de BRAF, le vémurafénib et le dabrafénib, approuvés pour le traitement des mélanomes métastatiques, non opérables mutés par BRAF en 2011 et 2013 respectivement sont hautement efficaces pour environ la moitié des patients mais une majorité de patients développe une résistance secondaire dans un laps de temps relativement court. A l'heure actuelle, le traitement le plus efficace pour traiter les mélanomes métastatiques est l'utilisation des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires. Trois inhibiteurs de points de contrôles immunitaires ont reçu une autorisation d'utilisation en clinique : l'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA4 (en 2011) et deux anticorps anti PD-1 : le nivolumab et pembrolizumab et améliorent considérablement le pronostic des patients (Davis et al., 2019).

2.2 Les cancers cutanés non mélanocytaires

Les cancers cutanés non mélanocytaires, ou carcinomes, se différencient à partir des kératinocytes. Leur incidence est 18 à 20 fois supérieure à celle des mélanomes. On distingue 2 grandes familles de cancers cutanés non mélanocytaires : les carcinomes basocellulaires (CBC) et les carcinomes spinocellulaires, autrement appelés carcinomes épidermoïdes cutanés (CEC). Les CBC et CEC ont des taux d'incidence, de récurrence et de métastase et un facteur pronostic différents. L'incidence des carcinomes cutanés est environ 2 fois supérieure chez les hommes que chez les femmes

2.2.1 Les CBC

Incidence : Les carcinomes basocellulaires sont les plus fréquents et représentent 80% des carcinomes cutanés. Leur taux d'incidence est le plus élevé en Australie (> 1000/100 000 habitants par an) et le plus faible en Afrique (<1/100 000 habitants par an) (Lomas et al., 2012). Ils surviennent généralement dans les zones cutanées photo-exposées : la tête et le cou et se développent à partir des kératinocytes de la lame basale ou des follicules pileux (Wang et al., 2012 ; Youssef et al., 2010). Ce sont des tumeurs à croissance lente, rarement invasives ou métastatiques (von Domarus & Stevens 1984 ; Wysong, 2013).

Description macroscopique et histologique : Les CBC sont généralement de petites lésions translucides ou nacrés avec des bords surélevés. Il est parfois difficile de distinguer un CBC du psoriasis, de l'eczéma discoïde ou de la maladie de Bowen (Madan et al., 2010). D'un point de vue histologique, les CBC sont caractérisés par l'épaississement de l'épiderme sans effraction de lame basale conduisant à la formation de nodules, et d'ulcères. On note aussi la présence de kératinocytes agrégés qui restent en contact avec l'épiderme de manière caractéristique (Gellatly et al., 2020 ; McDaniel 2020 ; Stanoszek et al., 2017) (Figure 10).

Carcinogénèse au niveau moléculaire : Certaines mutations sont fréquemment retrouvées dans les CBC (Epstein, 2015 ; Jayaraman et al., 2014 ; Maturo et al., 2020) telles que les protéines de la voie de signalisation Sonic Hedgehog : PTCH1 (dans environ 60% des CBC) et SMO (dans environ 10% des CBC) (Figure 11). On retrouve également la mutation de TP53 dans environ 30% des CBC.

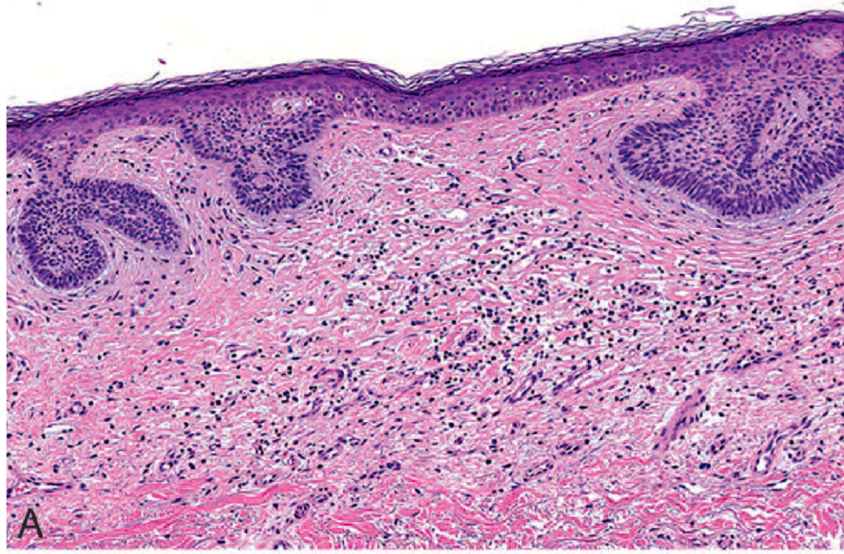


Figure 10. Coupe histologique de Carcinome Basocellulaire (CBC) colorée par un marquage hématoxyline-éosine-safran (Stanoszek et al., 2017)

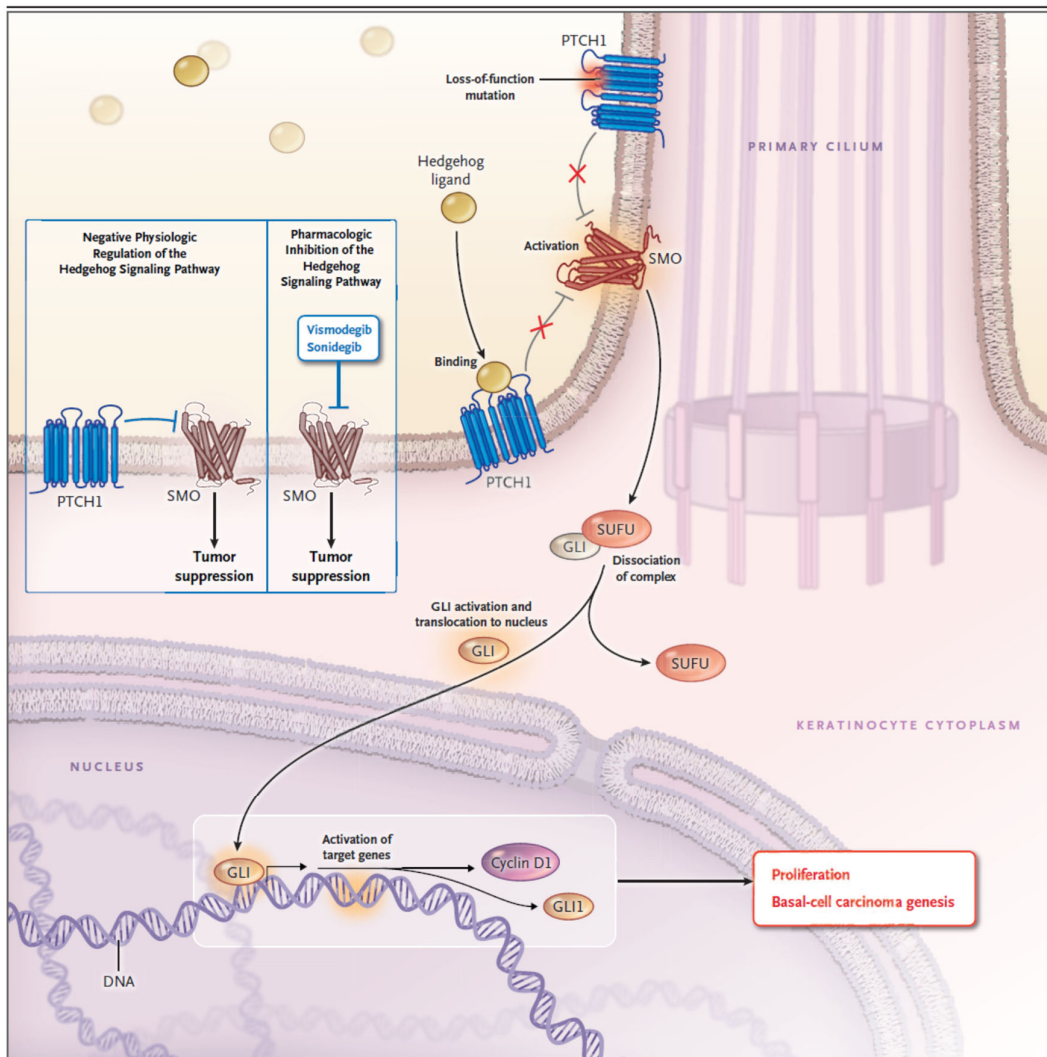


Figure 11. Rôle de la voie Sonic Hedgehog dans le développement des CBC (Kishwer & Bichakjian 2018).

Traitements de référence : Du point de vue clinique, le traitement de référence est la chirurgie mais d'autres stratégies telles que la radiation ou l'utilisation d'immunothérapie peuvent être envisagées en fonction de l'étendue et de la nature des lésions (McDaniel et al., 2020). En effet, l'Aldara®, une immunothérapie à base d'imiquimod qui agit en stimulant les TLR7/8, exprimés à la surface des cellules dendritiques et monocytes, conduit à une production accrue de cytokines et de chimiokines telles que l'IFN- α , favorisant à la fois les réponses immunitaires innées et adaptatives. L'application locale de cette crème est une nouvelle stratégie thérapeutique non invasive utilisée pour traiter les CBC avec un taux de réponse compris entre 69 et 100% chez les patients (Geisse et al., 2004).

2.2.2 Les CEC

Incidence : Les CEC représentent 20% des carcinomes cutanés (Alam, 2001). En Europe, leur incidence est en augmentation ces dernières années avec environ 50 cas pour 100 000 habitants actuellement. C'est en Australie que le taux d'incidence des CEC est le plus élevé avec plus de 270 cas pour 100 000 habitants en 2020 (Figure 12).

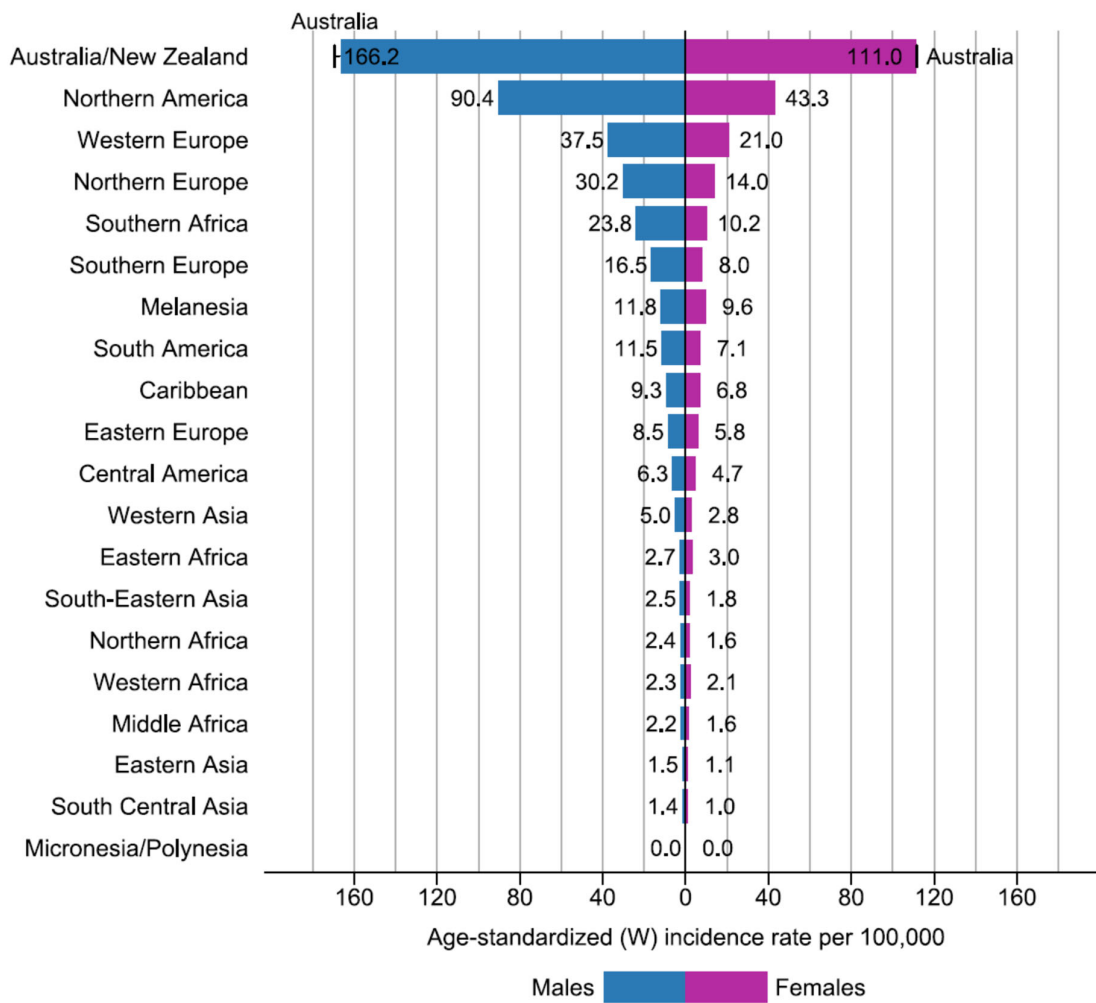


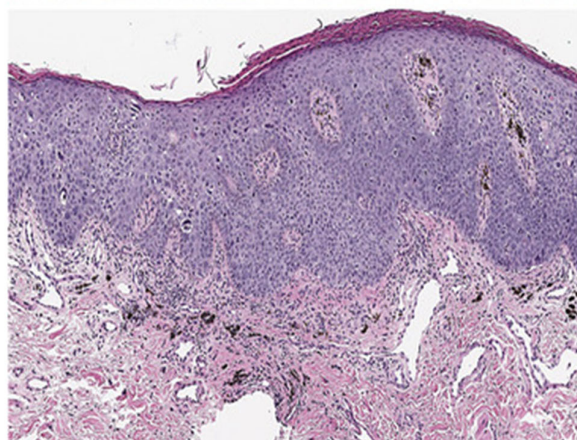
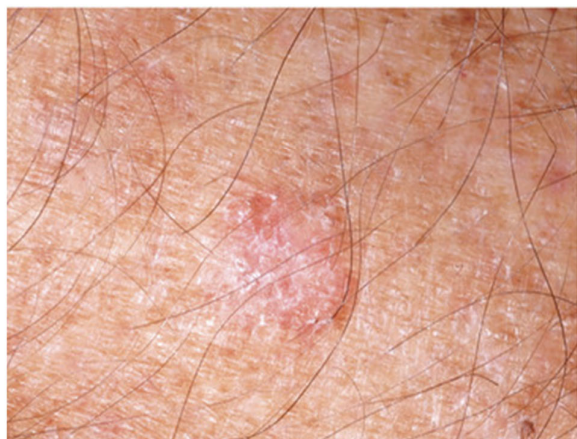
Figure 12 : Incidence des carcinomes épidermoïdes cutanés dans le monde (Sung et al., 2020)

Description macroscopique et histologique : Les CEC sont des tumeurs croûteuses, qui peuvent présenter des fissures et des ulcérations. D'un point de vue histologique, les CEC invasifs comportent des kératinocytes atypiques avec un noyau élargi et un cytoplasme clair en coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) (Figure 13). Selon leur état de différenciation, les kératinocytes transformés ont gardé tout ou partie des desmosomes et produisent de grandes quantités de kératine entraînant la formation de perles de kératine. Dans les formes avancées de CEC invasifs, les cellules tumorales s'organisent en îlots dans le derme (Yanofsky et al., 2011). Il existe 11 sous-types histologiques de CEC invasifs répertoriés selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) associés à des degrés de différenciation des kératinocytes variables (Yanofsky et al., 2011).

Carcinogénèse moléculaire : Les CEC sont des tumeurs à développement lent dans lesquelles le nombre de mutations est très important, principalement en raison de l'exposition aux rayons UV. La mutation la plus répandue (90% des CEC) touche le gène TP53 (Zieglerl & Haven, 1994). Dans la majorité des cas, une substitution de nucléotide C>T entraîne l'inactivation de la protéine. A l'homéostasie, p53 est un facteur de transcription jouant un rôle dual dans la régulation du cycle cellulaire : il permet à la fois l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'activation des systèmes de réparation de l'ADN. Si la molécule d'ADN est trop endommagée, p53 induit l'initiation du programme apoptotique (Zieglerl & Haven, 1994). Ainsi, la suppression des fonctions protectrices de p53 conduit à une accumulation de mutations génétiques conduisant à l'inactivation d'autres gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogènes (Berman & Cockerell 2012).

D'autres anomalies peuvent être retrouvées comme l'inactivation des gènes NOTCH1, NOTCH2, TGFBR1 et TGFBR2, l'inactivation de PIK3CA et HRAS et l'amplification de EGFR. Les gènes CDKN2A, RAS, KMT2C peuvent également présenter des mutations (Pickering et al., 2014).

CEC à bas risque



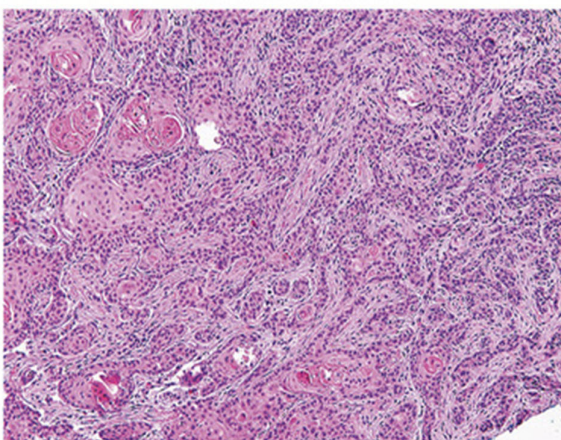
Critères :

- Taille < 2cm si localisé sur le tronc ou les membres
- Taille < 1 cm si localisé sur la joue, le front, le cuir chevelu, le cou
- Frontières bien définies
- Tumeur primaire
- Statut immunocompétent
- Pas de radiothérapie antérieure
- Modérément ou bien différencié
- Pas d'invasion périneurale lymphatique ou vasculaire
- Pas de croissance rapide
- Aucun symptôme neurologique
- Profondeur < 6mm et aucune invasion au-delà de la graisse sous-cutanée

Stratégies thérapeutiques :

- Exérèse chirurgicale
- Électrodésiccation et curetage

CEC à haut risque



Critères :

- Taille > 2cm si localisé sur le tronc ou les membres
- Taille > 1 cm si localisé sur la joue, le front, le cuir chevelu, le cou, le nez et les paupières
- Frontières mal définies
- Tumeur récurrente
- Statut immunodéprimé
- Radiothérapie antérieure
- Mal différencié
- Atteinte périneurale lymphatique ou vasculaire
- Symptômes neurologiques
- Profondeur > 6mm ou invasion au-delà de la graisse sous-cutanée

Stratégies thérapeutiques :

- Exérèse chirurgicale avec larges marges
- Évaluation périphérique

Stratégies thérapeutiques pour les CEC non opérables ou récidivants :

- Thérapies ciblées : Inhibiteurs EGFR
- Immunothérapies : Anti-PD-1

Figure 13. Classification des CEC à « haut risque » et « bas risque » et leurs traitements (Adapté de Kishwer et al., 2018)

Traitements de référence (Figure 14) : De manière générale, les CEC sont des tumeurs de bon pronostic dont le traitement de référence est la chirurgie d'exérèse (Stratigos et al., 2020; Alam et al., 2018). Pour les formes localisées, le taux de survie spécifique à 5 ans est supérieur à 96%, le taux de récurrence locale est de 4,6% et enfin, le taux de récurrence ganglionnaire après chirurgie est de 3,7% (Schmullts et al., 2013). Cependant, certains CEC de forme localisée, situés notamment au niveau de la face et du cou sont dits à « haut risque » et présentent un taux de récurrence local et ganglionnaire supérieur à 20% dans les 2 premières années suivant la chirurgie (Figures 13) (Ruiz et al., 2019). D'autre part, certains CEC ne peuvent être opérés. C'est le cas notamment lorsque le patient présente des comorbidités, lorsque l'extension de la tumeur est trop importante, ou que le patient présente des métastases à distance. Dans ces cas-là, la survie globale des patients à 5 ans peut chuter à 6% (Chapalain et al., 2020). Dans le cas des CEC inopérables, récidivants ou métastatiques, le patient pourra être traité par radiothérapie, chimiothérapie ou immunothérapie.

Parmi les thérapies ciblées, l'inhibition de la voie de signalisation de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) a été l'une des premières thérapies systématiques testées pour traiter les CEC. L'inhibition de cette voie de signalisation inhibe la transduction des signaux PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF et ERK (Wheeler et al., 2010). Il existe deux classes d'inhibiteurs de l'EGFR : les anticorps monoclonaux qui bloquent le domaine extracellulaire du récepteur tels que le cétuximab, panitumumab, nimotuzumab ou zalutumumab et les inhibiteurs de la tyrosine kinase (TKI) tels que géfitinib, erlotinib, afatinib, lapatinib, nératinib et dacomitinib. Les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs TKI ont été évalués dans des essais cliniques pour les CEC de mauvais pronostics mais n'ont actuellement pas reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des CEC (Corchado-Cobos et al., 2020).

Enfin, les immunothérapies représentent une stratégie de choix pour traiter les CEC non opérables, récidivants ou métastatiques. Deux études de phase 2, publiées en 2018 et 2020 respectivement révèlent des taux de réponse objective (OR) de 47% et 44% respectivement à l'application de cemiplimab, un anticorps anti PD-1, chez des patients atteints de CEC localement avancés ou métastatiques (Migden et al., 2018 ; Migden et al., 2020). Ainsi, l'utilisation des immunothérapies pour les CEC est une stratégie thérapeutique encourageante mais à ce jour, aucune immunothérapie ne présente une efficacité suffisante. L'utilisation des immunothérapies dans le contexte des CEC sera traitée plus en détail dans le Chapitre 3.

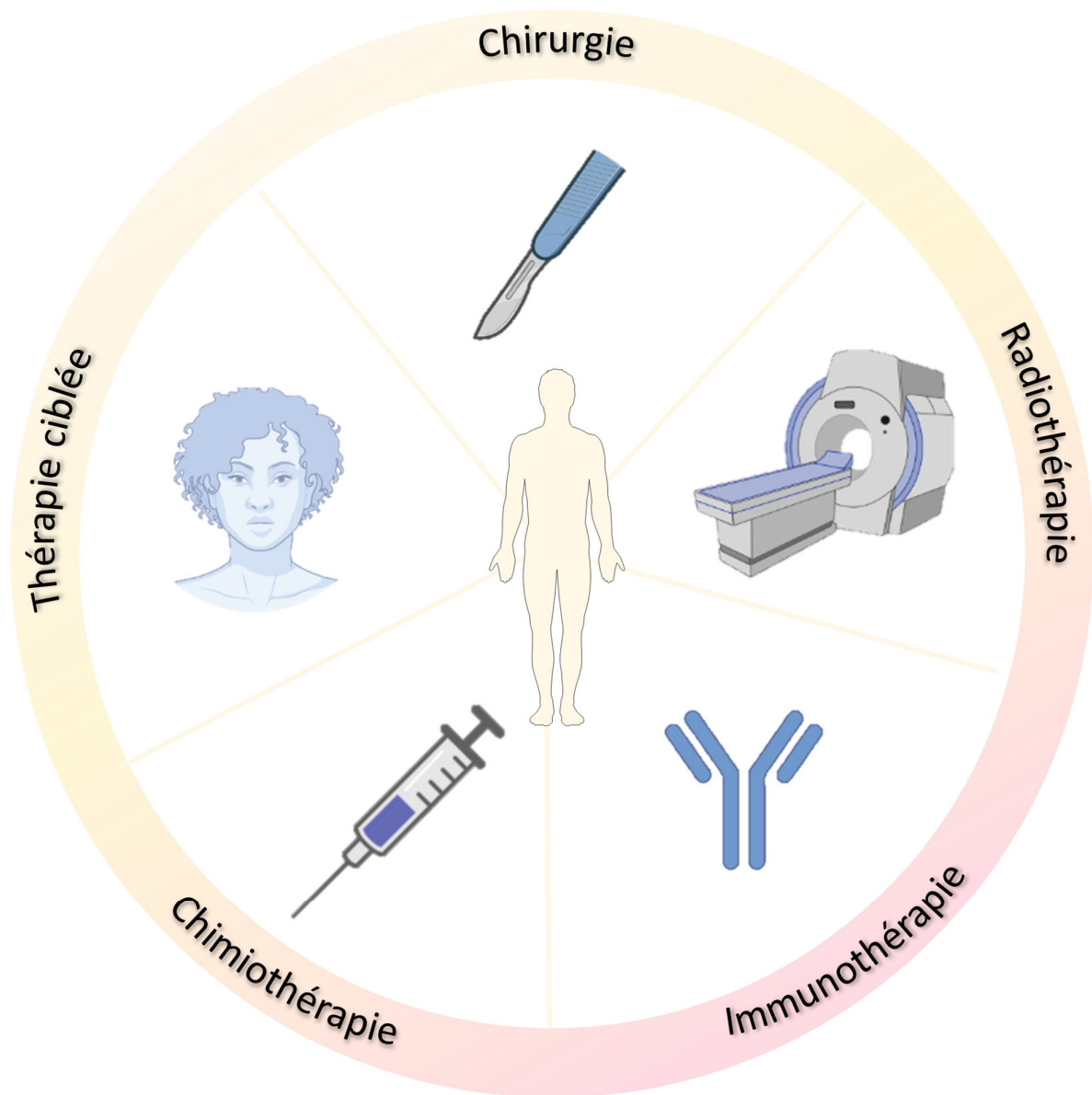


Figure 14. Traitements actuellement utilisés pour traiter les CEC

2.2.3 Facteurs de risques des carcinomes cutanés (CBC et CEC)

Les facteurs de risques associés au développement des carcinomes cutanés sont multiples et associent des facteurs exogènes et endogènes. Ces tumeurs surviennent généralement dans les zones photo-exposées, principalement au niveau de la face et du cou (Alam, 2001).

Le principal facteur de risque pour les carcinomes cutanés est l'exposition aux rayons UV du soleil. En effet, les UVB pénètrent les couches superficielles de l'épiderme et les UVA pénètrent jusque dans le derme. Ces rayonnements UV peuvent induire des mutations génétiques. Ainsi une exposition trop importante aux rayons du soleil représente un facteur de risque majeur au développement des carcinomes cutanés (Figure 15). Le phototype (notamment la peau claire), représente un facteur de risque. En effet, le risque de cancer de la peau dans les peaux claires est 30 à 40 fois supérieure que sur les peaux mates (Hearing, 2011)

Des lésions pré-cancéreuses appelées kératose actinique ont été identifiées dans les CEC. La kératose actinique se caractérise par un épaissement de la couche cornée de l'épiderme survenant en raison d'une exposition importante aux rayons UV. Elle se manifeste sous forme de plaques rugueuses, squameuses, érythémateuses bien délimitées et souvent en forme d'écailles (Figure 16). Elle est définie au niveau histologique par une dysplasie, une prolifération anarchique des kératinocytes au sein de l'épiderme. On distingue également une augmentation atypique du volume des noyaux. L'incidence des kératoses actiniques est difficile à établir car les lésions ne sont pas toujours diagnostiquées (Smoller, 2006b). Ces lésions peuvent évoluer vers une rémission spontanée, un état d'équilibre sans prolifération ou vers la transformation en CEC invasif (Glogau & Francisco, 2000). On estime que le taux d'évolution des kératoses actiniques en CEC est comprise entre 0,025% et 16% (Glogau & Francisco, 2000 ; Affairs et al., 2009 ; Smoller et al., 2006b) D'autre part, une étude rapporte que 60 à 65% environ des CEC primaires proviennent de lésions actiniques diagnostiquées préalablement (Affairs et al., 2009). Ainsi, bien que peu de lésions de kératose actinique se transforment vers un CEC, la majorité des CEC dérive d'une kératose actinique. Il est donc largement admis que la kératose actinique est une prédisposition répandue dans le développement des CEC.

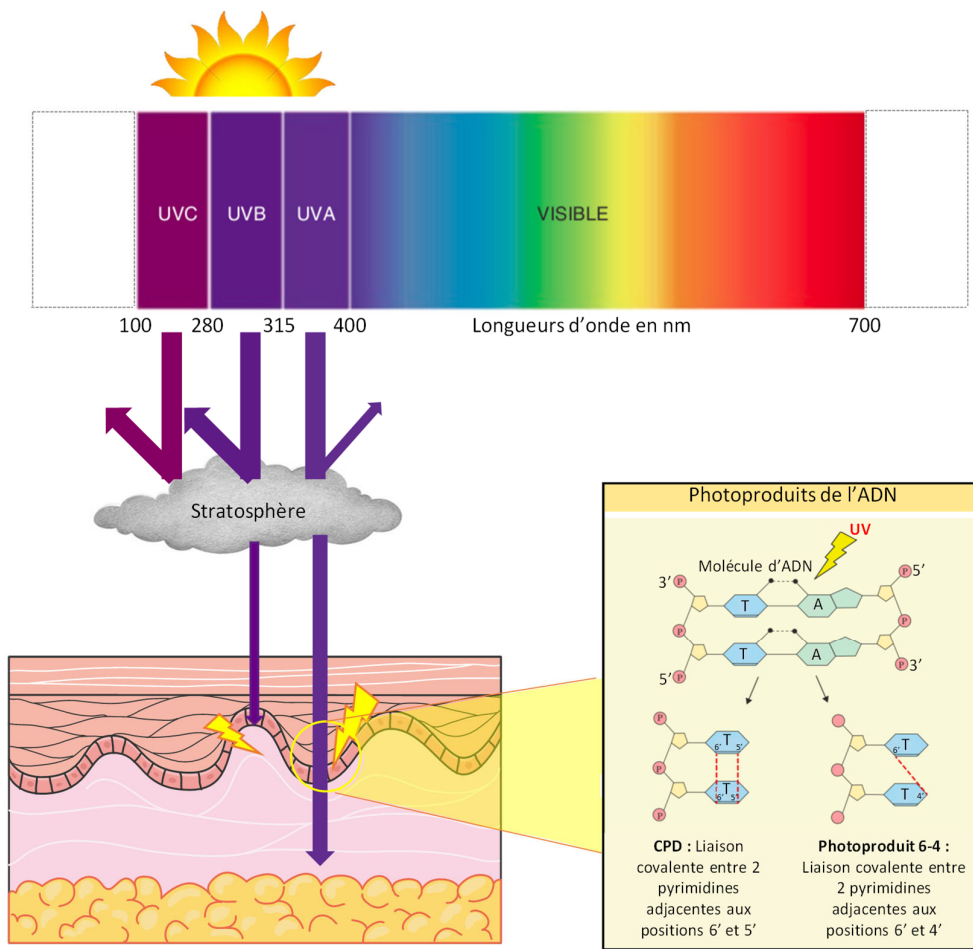


Figure 15 : Rôle des UV dans le développement des carcinomes cutanés. Les rayons UV induisent des mutations de l'ADN de type dimère de cyclobutane pyrimidine (CDP) et des photoproduits (6-4)

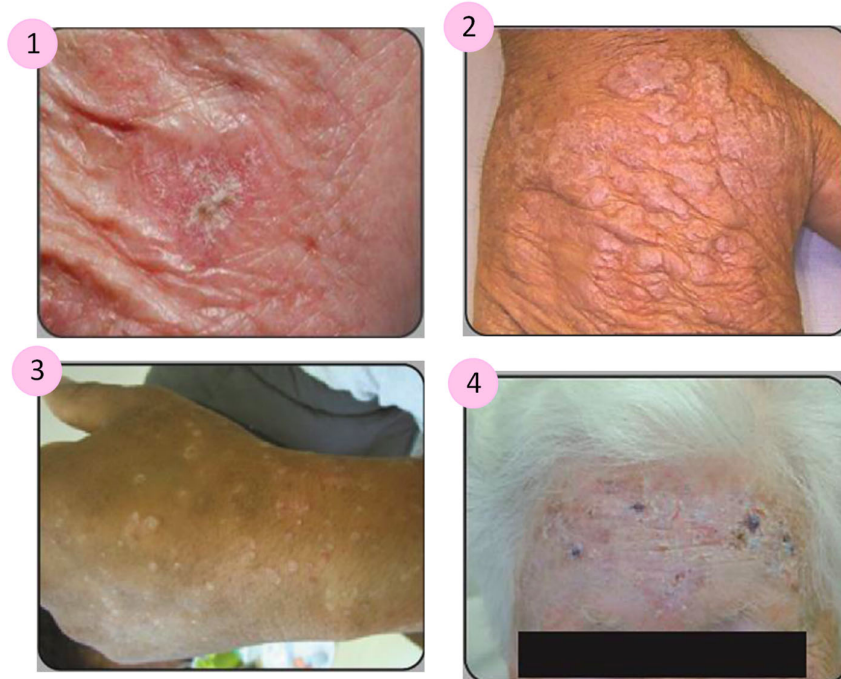


Figure 16 : Différentes manifestations de kératose actinique. (Adapté de Apalla et al., 2017).

Certaines pathologies génétiques représentent également un facteur de risque à part entière. C'est le cas notamment de Xeroderma pigmentosum, une maladie génétique autosomique rare, caractérisée par une extrême sensibilité aux rayonnements UV. Cette hypersensibilité est due à des mutations dans les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN suite à une exposition à des radiations UV. Les patients atteints de Xeroderma pigmentosum ont donc une sensibilité accrue au développement de carcinomes cutanés. En effet, le risque de développer un cancer cutané non mélanocytaire est 10 000 fois supérieur chez les patients atteints de cette maladie génétique (Bradford et al., 2011).

Un autre facteur de risque notable est l'infection aux virus de type Human Papillomavirus (HPV). Les virus HPV appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. Ils forment un groupe de virus non enveloppés à ADN double brin strictement épithéliotropes, c'est-à-dire qu'ils ne se développent que dans les épithéliums. Plus de 170 types d'HPV ont été identifiés et sont classés dans 5 genres (alpha, beta, gamma, mu et nu) (Villiers, 2013). Des études récentes suggèrent un rôle des HPV de type beta dans l'initiation des carcinomes cutanés (Tampa et al., 2020 ; Tommasino, 2019).

L'âge est également un facteur de risque : 95% des cas de carcinomes cutanés non mélanocytaires ont été enregistrés chez des patients de plus de 50 ans entre 2014 et 2018 (International Agency for Research on Cancer 2019)

D'autre part, les patients immunodéprimés ont un risque 100 fois plus important de développer un CEC (Kishwer & Bichakjian 2018). En ce qui concerne les patients immunodéprimés suite à une greffe d'organe, une étude récente a mis en évidence que le taux d'incidence de CEC après la greffe varie selon l'organe transplanté (Puza et al., 2020).

Chapitre 2 : L'immunité anti-tumorale

A. L'immuno-editing

1. Principe de l'immunoediting

De nombreux travaux se sont attachés à caractériser les interactions entre le système immunitaire et les tumeurs (Chow et al., 2012). Comme le suggère le concept d'immunosurveillance établi par Ehrlich en 1909, ensuite redéfini par Burnet en 1970, le système immunitaire exerce en permanence une surveillance qui permet d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses. Cependant, le fait que des tumeurs se développent chez des individus dont le système immunitaire est pleinement fonctionnel a conduit Dunn et Schreiber à développer la théorie de « l'immunoediting » (Desai et al., 2021; Schreiber et al., 2011) (Figure 17). L'immunoediting décrit le processus par lequel l'élimination des cellules tumorales conduit à une sélection positive des cellules tumorales les plus résistantes. Il s'agit de celles qui ont perdu l'expression des antigènes immunogènes spécifiques aux tumeurs, qui prolifèrent, et développent un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. L'immunoediting a été décrit selon trois étapes clés consécutives (Figure 18) :

- Étape 1 : L'élimination, équivalente au concept original d'immunosurveillance. Les cellules tumorales sont reconnues et éliminées efficacement par le système immunitaire (Figure 17).
- Étape 2 : La phase d'équilibre, dans laquelle la réponse immunitaire permet le contrôle des cellules malignes qui se sont adaptées, mais pas leur élimination totale. Les cellules malignes sporadiques qui échappent à la destruction conduiront à la dernière étape.
- Étape 3 : L'échappement. Au cours de cette phase, les cellules tumorales restantes ont été sélectionnées pour leur capacité à survivre aux attaques du système immunitaire. Elles sont alors capables de se développer dans un hôte immunologiquement intact, par une combinaison de processus d'échappement du système immunitaire et de suppression des fonctions du système immunitaire et/ou de résistance à l'apoptose et deviennent majoritaires.

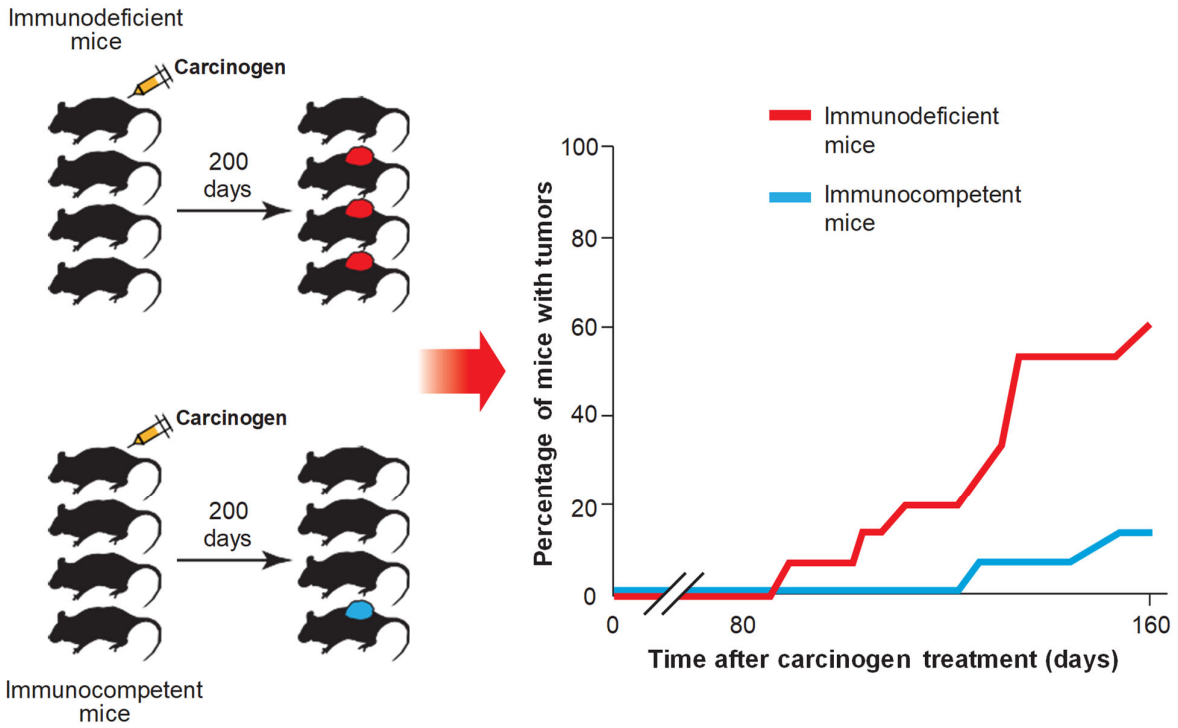


Figure 17. Démonstration du rôle protecteur du système immunitaire contre le développement des tumeurs par Schreiber en 2011 (Schreiber et al., 2011)

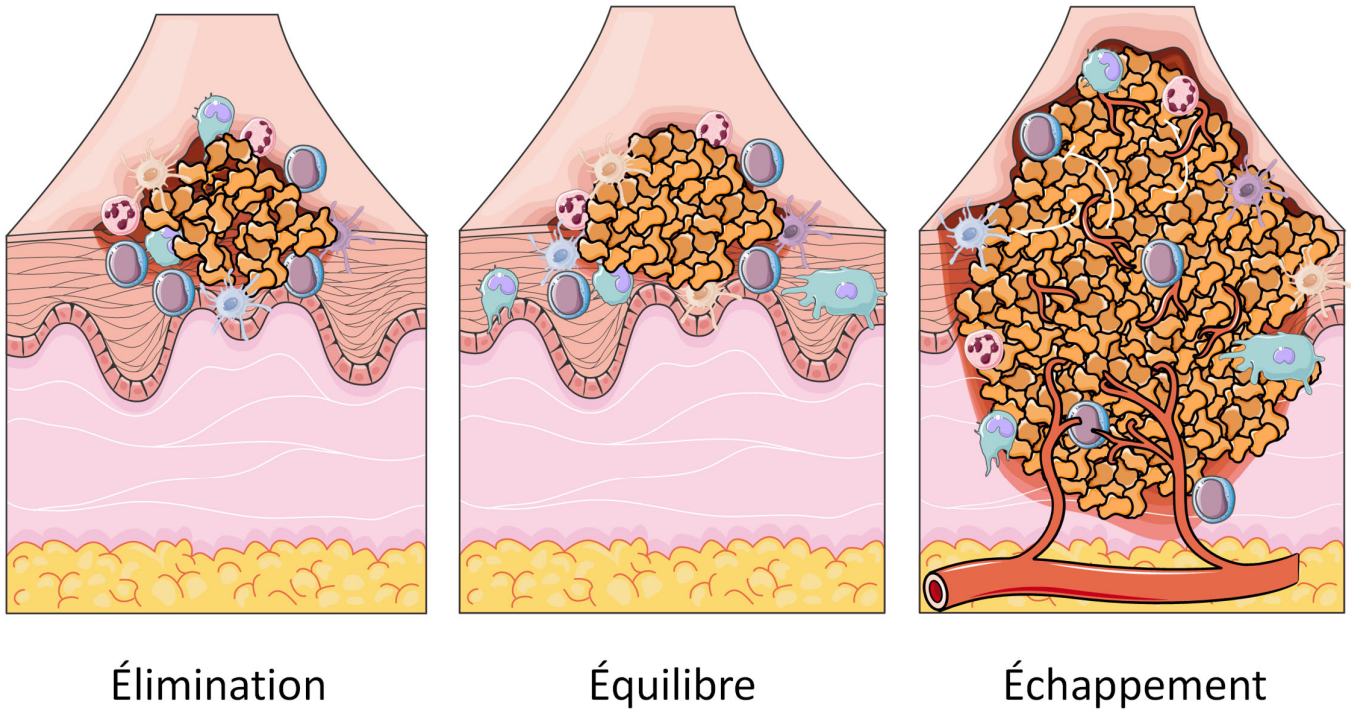


Figure 18. Immunoediting et mise en place des carcinomes épidermoïdes cutanés

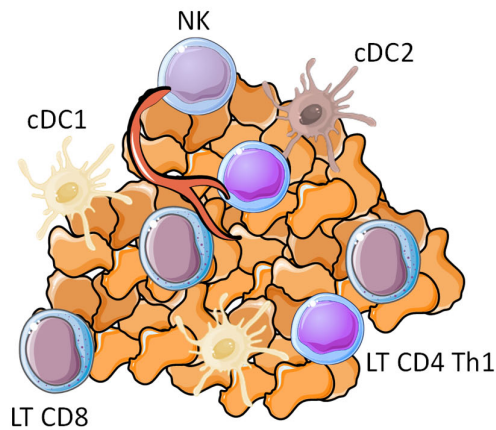
2. Classification des tumeurs selon leur infiltration en cellules immunitaires

La réponse immunitaire anti-tumorale est sculptée par le microenvironnement tumoral. Les types cellulaires présents ainsi que leur état de maturation et d'activation impactent la réponse. En effet, les tumeurs échappent aux défenses immunitaires de l'hôte non seulement en diminuant leur immunogénicité intrinsèque, mais également en façonnant un environnement immunosuppresseur spécifique favorable à la croissance tumorale (Schreiber et al., 2011). Des facteurs exogènes tels que le microbiote et ses métabolites modulent également le microenvironnement tumoral et donc les réponses immunitaires anti-tumorales (Wong-Rolle et al., 2021). Enfin, la matrice extra cellulaire, réseau dense et organisé jouant un rôle de soutien et d'adhésion, module, amplement l'efficacité des réponses immunitaires anti-tumorales (Henke et al., 2020). Selon le degré d'infiltration par les cellules immunitaires et la capacité de ces dernières à activer les réponses immunitaires anti-tumorales, les tumeurs ont été classées comme immunologiquement « chaudes » ou « froides ». Cette classification est hautement prédictive de la réponse aux immunothérapies (Duan et al., 2020) (Figure 19).

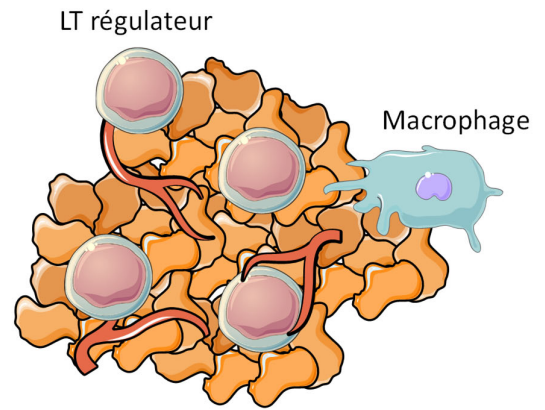
2.1 Les tumeurs « chaudes »

Les tumeurs « chaudes » sont immunogènes et infiltrées par des lymphocytes T (LT) CD8. L'infiltration de LT CD8 dans les tumeurs représente un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de cancer (Gentles et al., 2015). Ces cellules effectrices éliminent les cellules tumorales de manière spécifique par leur activité cytolytique ainsi que par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les tumeurs chaudes sont également caractérisées par la présence de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IFN de type I et de type II et de molécules de recrutement, dites chimiokines, telles que CXCL9, CXCL10 et CCL5, capables d'attirer spécifiquement les lymphocytes T (Spranger & Gajewski, 2013). Elles sont efficacement rejetées par le système immunitaire et répondent plus favorablement aux immunothérapies.

Tumeur chaude



Tumeur froide



Caractéristiques biologiques

Cellules épithéliales
Complètement différenciées

Cellules moins différenciées
Transition épithéliale à mésenchymale

Caractéristiques immunologiques

Enrichissement en chimiokines Th1
Présence de nombreuses cellules effectrices :
LT CD8, cellules NK, LT CD4 Th1
Nombreuses DC fonctionnelles

Cytokines immunosuppressives
Nombreux LT régulateurs
Peu de LT CD4 Th1, cellules NK ou LT CD8
Peu de DC fonctionnelles
Augmentation de la matrice extracellulaire
Augmentation de la production de facteurs angiogéniques

Figure 19. Caractéristiques biologiques et immunologiques des tumeurs froides et tumeurs chaudes

2.2 Les tumeurs « froides »

Au contraire, les tumeurs froides sont caractérisées par une mauvaise infiltration de lymphocytes T dans les tumeurs ce qui est corrélé à une absence de signature IFN de type I et à une mauvaise production de chimiokines (Spranger & Gajewski, 2013). Ces tumeurs sont caractérisées par une augmentation de la matrice extra cellulaire et de facteurs angiogéniques (Gajewski et al., 2013 ; Spranger & Gajewski 2016). Elles sont fortement infiltrées par des cellules myéloïdes affichant un phénotype protumoral appelées MDSC (myeloid-derived suppressor cells), des macrophages pro-tumoraux et des LT régulateurs. Ignorées par le système immunitaire en raison de leur faible immunogénicité, ces tumeurs sont très peu sensibles aux immunothérapies.

B. Les acteurs de l'immunité anti-tumorale

1. Le cycle de l'immunité anti-tumorale

Il est à présent admis que la mise en place de l'immunité anti-tumorale est un processus séquentiel, appelé « cycle de l'immunité anti-tumoral » (Figure 20).

1.1 Relargage d'antigènes tumoraux

Les cellules ayant subi une transformation maligne, accumulent des mutations génétiques. Celles-ci conduiront à l'expression d'antigènes tumoraux spécifiques, relâchés dans le microenvironnement tumoral. Différents types d'antigènes tumoraux ont été identifiés :

- Les antigènes tumoraux spécifiques et les néo-antigènes, qui sont présents uniquement au niveau du tissu tumoral en raison de mutations génétiques ou translocations chromosomiques telles que les protéines de fusion BCR-ABL dans les leucémies ou TP53, NOTCH1/2, HRAS ou PTEN muté dans le CEC (Pickering et al., 2014).
- Les antigènes tumoraux surexprimés par les cellules malignes en comparaison aux cellules saines tels que CCND1 dans le CEC (Pickering et al., 2014).
- Les antigènes tumoraux dits « oncofoetaux » : ce sont des antigènes exprimés uniquement au cours du développement embryonnaire et sont de nouveau exprimés dans le contexte tumoral en raison de dérégulations épigénétiques tels que Erbb-2 par exemple (Ting et al., 1972 ; Tan et al., 2018)

Les tumeurs avec une charge mutationnelle élevée, telles que les CEC produisent plus de néo-antigènes et ont une meilleure réponse aux immunothérapies dans divers types de cancers (Bonaventura et al., 2019).

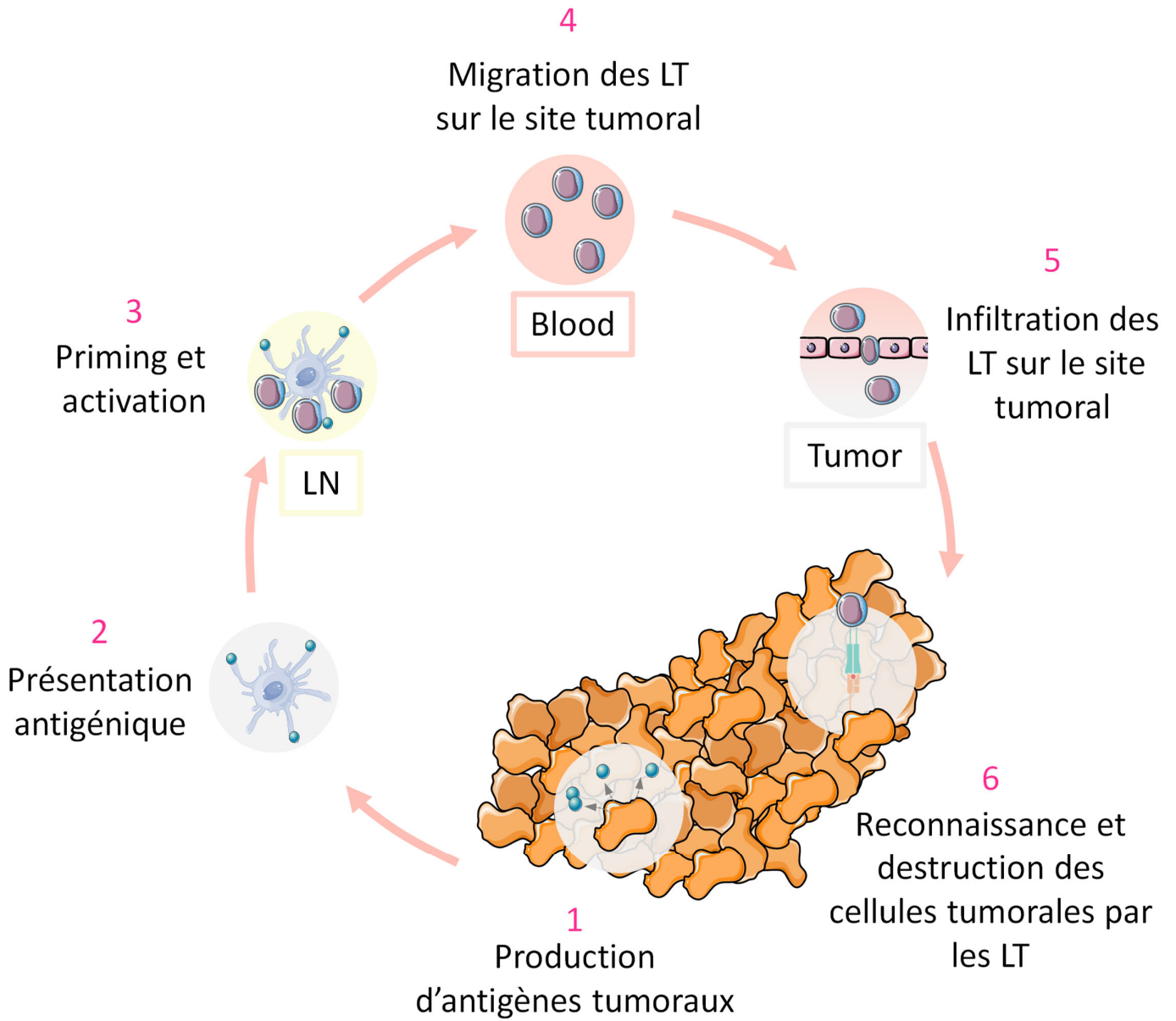


Figure 20. Cycle de l'immunité anti-tumorale (adapté de Chow et al., 2012)

1.2 Reconnaissance et capture des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles, capables de reconnaître la présence de molécules de danger : des « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) dans le cas d'infection, ou des « damage-associated molecular patterns » (DAMPs) dans un contexte inflammatoire stérile tel que le contexte tumoral. Afin de percevoir ces signaux, les DC expriment de nombreux récepteurs de danger que l'on appelle des « Pattern Recognition Receptors » : PRR. Ces récepteurs reconnaissent différentes structures moléculaires telles que des acides nucléiques, des protéines, lipoprotéines ou encore des carbohydrates (Takeuchi & Akira, 2010). Les PRR peuvent être classés en 4 familles principales : les Toll Like Receptor (TLR), les NOD Like Receptors (NLR), les RIG-1 Like Receptors (RLR) et enfin les C-type Lectin Receptors (CLR) (Takeuchi & Akira, 2010) (Tableau 1).

Parmi ces 4 familles de PRR, les récepteurs les plus étudiés appartiennent à celle des TLR. Ils sont impliqués dans la reconnaissance de multiples composés très différents comme des dérivés bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires. Ils peuvent également reconnaître des composés endogènes comme des protéines de choc thermique ou des composés synthétiques (Poly I:C ; imidazoquinolines) (Asami & Shimizu, 2021; Franz & Kagan, 2017; Iwasaki & Medzhitov, 2004). Les TLR extracellulaires 1,2,4,5, 6 et 11 reconnaissent principalement des composés d'origine bactérienne. Les TLR intracellulaires 3,7,8 et 9 sont spécialisés dans la reconnaissance d'acides nucléiques. Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I, qui sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires dont les DC, macrophages les cellules Natural Killer (NK), les neutrophiles mais aussi par des cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales, les kératinocytes ou les fibroblastes. A ce jour, 10 TLR ont été caractérisés chez l'Homme. L'expression des TLR est conservée entre l'homme et la souris sauf quelques exceptions. En effet, les TLR8 et 10 chez la souris et TLR11 chez l'Homme sont des pseudogènes. De plus, chez l'Homme, les gènes codant pour TLR12 et TLR13 n'existent pas. Enfin, l'expression de TLR9 est restreinte aux DC plasmacytoïdes chez l'humain, alors que, chez la souris, différentes populations myéloïdes l'expriment. L'ensemble de ces récepteurs permettent aux cellules dendritiques de reconnaître et capturer une multitude d'antigènes parmi lesquels, les antigènes tumoraux.

Les PRR et leurs ligands			
PRRs	Localisation	Ligand	Origine du ligand
TLR			
TLR1	Membrane plasmique	Lipoprotéine triacylé	Bactéries
TLR2	Membrane plasmique	Lipoprotéine	Bactéries, virus, parasites, soi
TLR3	Endolysosome	ARN db	Virus
TLR4	Membrane plasmique	LPS	Bactéries, virus, soi
TLR5	Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries
TLR6	Membrane plasmique	Lipoprotéine diacylé	Bactéries, virus
TLR7 (humain TLR8)	Endolysosome	ARN sb	Virus, bactéries, soi
TLR9	Endolysosome	ADN CpG	Virus, bactéries, protozoaires, soi
TLR10	Endolysosome	Inconnu	Inconnu
TLR11	Membrane plasmique	Molécules de type profiline	Protozoaires
RLR			
RIG-I	Cytoplasme	Petits ARN db, 5 ^o triphosphate ARN db	Virus à ADN et à ARN
MDA5	Cytoplasme	Longs ARN db	Virus à ARN (Picornaviridae)
LGP2	Cytoplasme	Inconnu	Virus à ARN
NLR			
NOD1	Cytoplasme	iE-DAP	Bactéries
NOD2	Cytoplasme	MDP	Bactéries
CLR			
Dectin-1	Membrane plasmique	β -Glucane	Mycètes
Dectin-2	Membrane plasmique	β -Glucane	Mycètes
MINCLE	Membrane plasmique	SAP130	Soi, mycètes
Autres			
cGAS-STING	Membrane plasmique	ADN	Virus

Tableau 1. Les récepteurs de danger et leurs ligands (Adapté de Takeuchi & Akira., 2010)

1.3 Migration et maturation des DC vers les ganglions lymphatiques drainants

Après reconnaissance et capture de l'antigène, les DC vont s'activer et progressivement acquérir un phénotype dit « mature ». Les DC en cours de maturation perdent leur capacité de capture et d'internalisation des antigènes et acquièrent un fort potentiel de présentation des antigènes aux LT (Reis E Sousa, 2006). La maturation des DC intervient au cours de la migration vers les ganglions drainants, lieu d'éducation des LT. En plus de l'activation des PRR, d'autres molécules telles que le TNF, CD40L, IL-1, IL-6, GM-CSF, IL-4, IL-13 participent à la maturation des DC. La maturation des DC s'accompagne de l'expression restreinte de certains récepteurs de chimiokines guidant leur migration. Les DC immatures expriment notamment CCR2 et CCR6 dont les ligands, CCL2 et CCL20 peuvent être exprimés au niveau de la peau. Après capture de l'antigène, les DC perdent l'expression de ces récepteurs et acquièrent celle de CCR7, qui leur permet de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21 (Villablanca et al., 2008). La maturation des DC est associée à une surexpression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et costimulatrices telles que CD40, CD80 et CD86.

1.4 Présentation des antigènes tumoraux

La reconnaissance des antigènes par les LT requiert leur apprêtement et présentation par les DC, cellules présentatrices de l'antigène professionnelles. Cette présentation de l'antigène est ainsi au cœur de l'initiation et de la régulation des réponses immunitaires (Banchereau & Steinman, 1998). Ce processus peut avoir lieu au sein même du tissu endommagé ou dans les ganglions drainants. Ceci détermine la nature initiale et la force de la réponse immunitaire, entraînant une réponse inflammatoire qui facilite l'élimination de la tumeur, ou une réponse tolérogénique qui peut favoriser la croissance tumorale par atténuation de la réponse (appelée anergie) ou d'une apoptose des lymphocytes T (De Vito et al., 2019). Après reconnaissance et capture des antigènes tumoraux, les DC en cours de maturation vont dégrader et cliver ces antigènes en petits peptides qui seront chargés sur les molécules du CMHI ou CMHII afin d'être présentés aux lymphocytes T. Il a longtemps été admis que les antigènes exogènes étaient exclusivement présentés aux LT CD4 dans le contexte du CMHII tandis que les antigènes endogènes étaient présentés aux LT CD8 par le CMHI. Ce dogme a été remis en cause suite à

l'observation du phénomène de présentation-croisée : présentation d'antigènes exogènes par le CMHI et présentation d'antigènes endogènes par le CMHII (Joffre et al., 2012) (Figure 21). C'est en 1976 que Bevan et al., démontrent que l'activation des LT CD8 cytotoxiques *in vivo* se produit après présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMHI (Bevan 1976). La nécessité du processus de présentation croisée dans l'éducation des LT CD8 tumoraux a été décrite pour la première fois en 1994 (Huang et al., 1994). Les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène professionnelle qui excellent dans cette fonction et sont notamment capables de présenter des antigènes tumoraux par présentation croisée (Nouri-Shirazi et al., 2000 ; Canton et al., 2021). Parmi les DC, les cellules les plus efficaces pour réaliser la présentation croisée sont les DC CD8 α^+ (Den Haan et al., 2000; Den Haan & Bevan, 2002; van Mierlo et al., 2004) et les cellules migratoires CD103 $^+$ de la peau (Bedoui et al., 2009; Henri et al., 2010). A noter que Crozat et al., démontrent en 2011 que les DC CD8 α^+ et CD103 $^+$ appartiennent à une même sous-population de DC identifiée par l'expression de XCR1 et que ce marqueur est conservé à travers les espèces (Crozat et al., 2010 et 2011).

L'autophagie a récemment été proposée comme un autre mécanisme possible pour la présentation croisée d'antigènes exogènes médiée par le CMHI. C'est en 2008 que Li et al., apportent la preuve expérimentale d'un rôle de l'autophagie sur les capacités de présentation croisée d'antigènes tumoraux par les DC (Li et al., 2008). En utilisant des cellules HEK293T exprimant l'ovalbumine et des cellules de mélanome humain, les auteurs ont démontré que la macro-autophagie initiée dans les cellules tumorales est essentielle au phénomène de présentation croisée par les DC *in vitro* et *in vivo*.

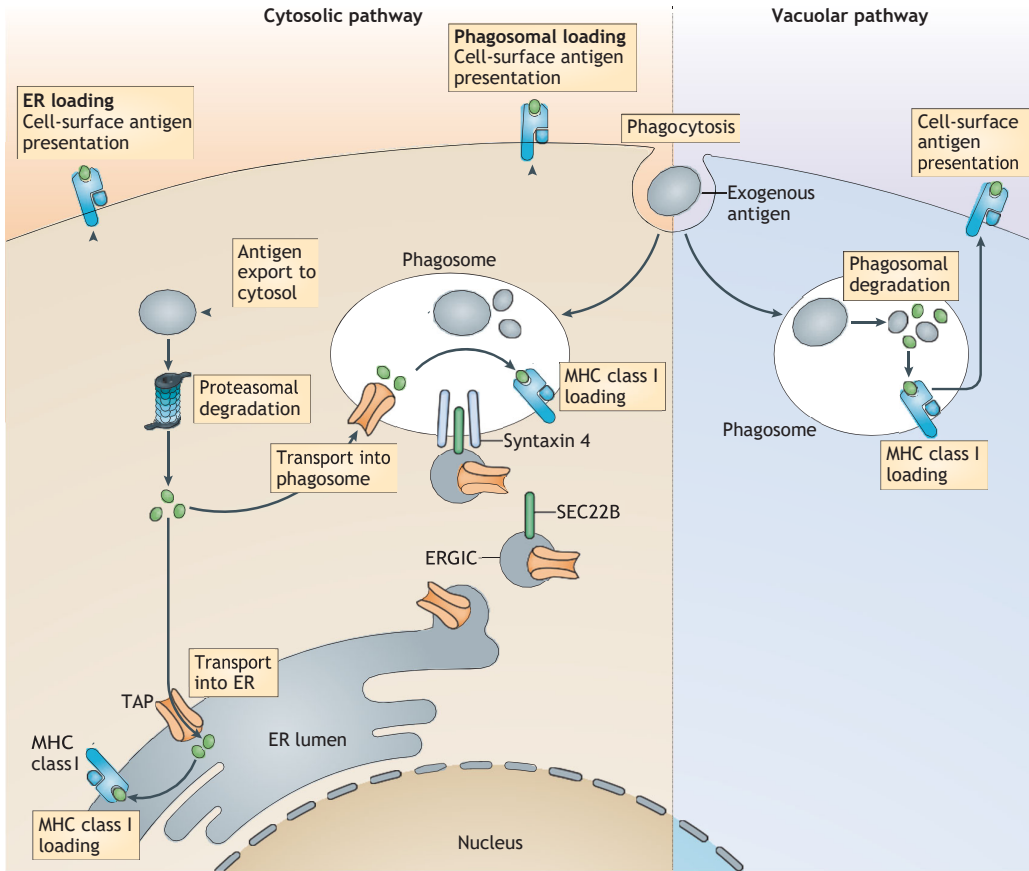


Figure 21. Présentation croisée par les cellules dendritiques (Joffre et al., 2012)

1.5 Priming et activation des LT

Le priming et l'activation des LT nécessite une maturation et une migration des DC vers les ganglions drainants et une présentation antigénique *via* les molécules de CMHI et CMHII aux lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement, formant ainsi une synapse immunologique. Cette éducation des LT par les DC permettra la mise en place d'une réponse adaptative spécifique au danger reconnu. Trois signaux doivent transiter entre les DC et les LT pour obtenir une activation optimale de la réponse adaptative (Figure 22) :

- Signal 1 : Présentation antigénique sur le CMH qui sera reconnue par le « T Cell Receptor » (TCR) (Langenkamp et al., 2002) . Le TCR est composé de deux sous-unités, les chaînes alpha et beta, polymorphiques qui confèrent aux LT un large répertoire de reconnaissance antigénique (Mariuzza et al., 2020). Les TCR possèdent des corécepteurs CD4 et CD8 respectivement, spécifiques des régions invariantes du CMHII et du CMHI (Dustin, 2014).
- Signal 2 : Expression de molécules de costimulation telles que CD80 et CD86 qui interagissent avec des récepteurs de costimulation exprimés à la surface des LT (Ceeraz et al., 2013). Ces molécules amplifient le signal transmis *via* l'activation du TCR (signal 1) et favorisent la production de l'IL-2 (Rulifson et al., 1997) : la cytokine responsable de la prolifération des LT. Ce second signal résulte de l'activation des DC par des PRR spécifiques du danger et du microenvironnement dans lequel les DC ont été activées.
- Signal 3 : Sécrétion de cytokines produites par les DC lors de l'activation des LT telles que l'IL-12 pour permettre une activation optimale. Les différentes combinaisons de cytokines sécrétées dépendent de la stimulation des PRR à la surface des DC. Cela orientera la polarisation des LT CD4 et LT CD8 pour éliminer efficacement la source du danger. (Bhattacharyya & Feng 2020)

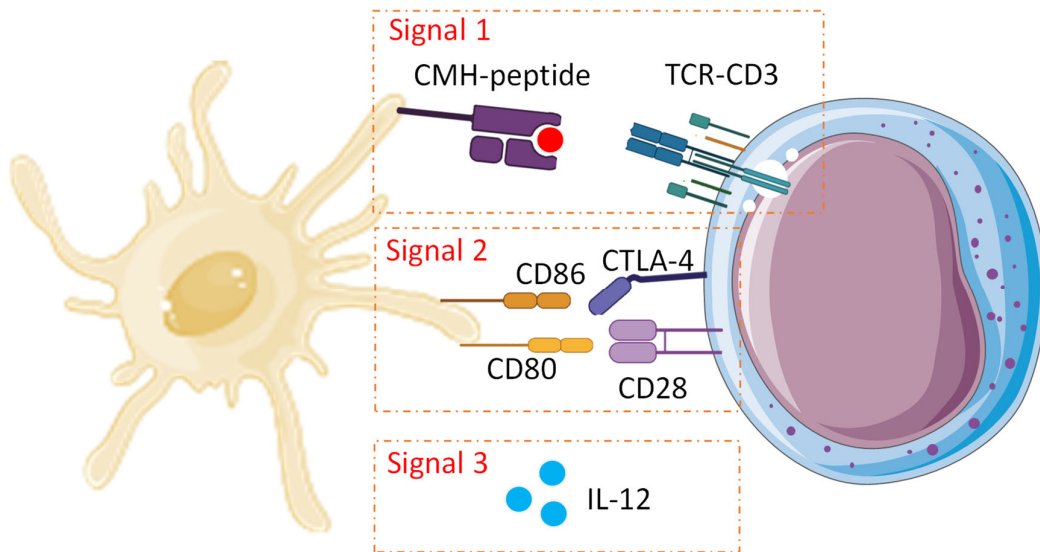


Figure 22. Synapse immunologique et activation des LT par les DC

1.6 Réponse T CD4 auxiliaire

La reconnaissance d'un peptide antigénique dans le contexte de la molécule du CMHII permet à un LT CD4 de s'activer, de proliférer et après différenciation, d'acquérir ses fonctions effectrices. Il peut se différencier en 4 types de LT auxiliaires aux profils cytokiniques différents : Th1 , Th2, Th17, Th9 (Dong, 2021 ; Mosmann & Coffman, 1989 ; Chraa et al., 2018) (Figure 23).

LT CD4 Th1 : Les lymphocytes Th1 jouent un rôle central dans le développement d'une immunité anti-tumorale efficace *via* différents mécanismes et notamment en stimulant l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8. Les Th1 produisent des cytokines telles que IL-12, IL-2, IFN- γ ou le TNF et se développent en réponse à des pathogènes intracellulaires et extracellulaires ou à la présence de cellules tumorales. L'IL-12 est la cytokine essentielle impliquée dans la différenciation des LT CD4 naïfs en Th1. Elle est typiquement sécrétée par des DC activées via les TLR par des ligands de type LPS ou motifs CpG (Reiner 2007). L'IL-12 permet l'activation des facteurs de transcription « Signal Transducer and Activator of Transcription » STAT1 et STAT4 induisant l'expression du facteur de transcription « T-box transcription factor » (T-bet) et de l'IFN- γ (Murphy et al., 2000). Le rôle de l'IL-12 dans la polarisation et le développement de la réponse Th1 est renforcé par son action répressive sur l'expression du facteur de transcription GATA3, régulateur clé du développement Th2 (Ouyang et al., 1998). L'IL-27, de la même famille que l'IL-12 est aussi impliquée dans la différenciation des LT en Th1 car elle induit l'expression de STAT1 et T-bet (Kamiya et al., 2004). Les lymphocytes Th1 expriment notamment les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR3 à leur surface, leur permettant ainsi de migrer vers le site de l'inflammation. Les lymphocytes Th1 sont associés à un bon pronostic dans de nombreux cancers (Chraa et al., 2018). En effet, il a été prouvé que les Th1 sont responsables du recrutement et de l'activation des LT CD8 cytotoxiques sur le site tumoral.

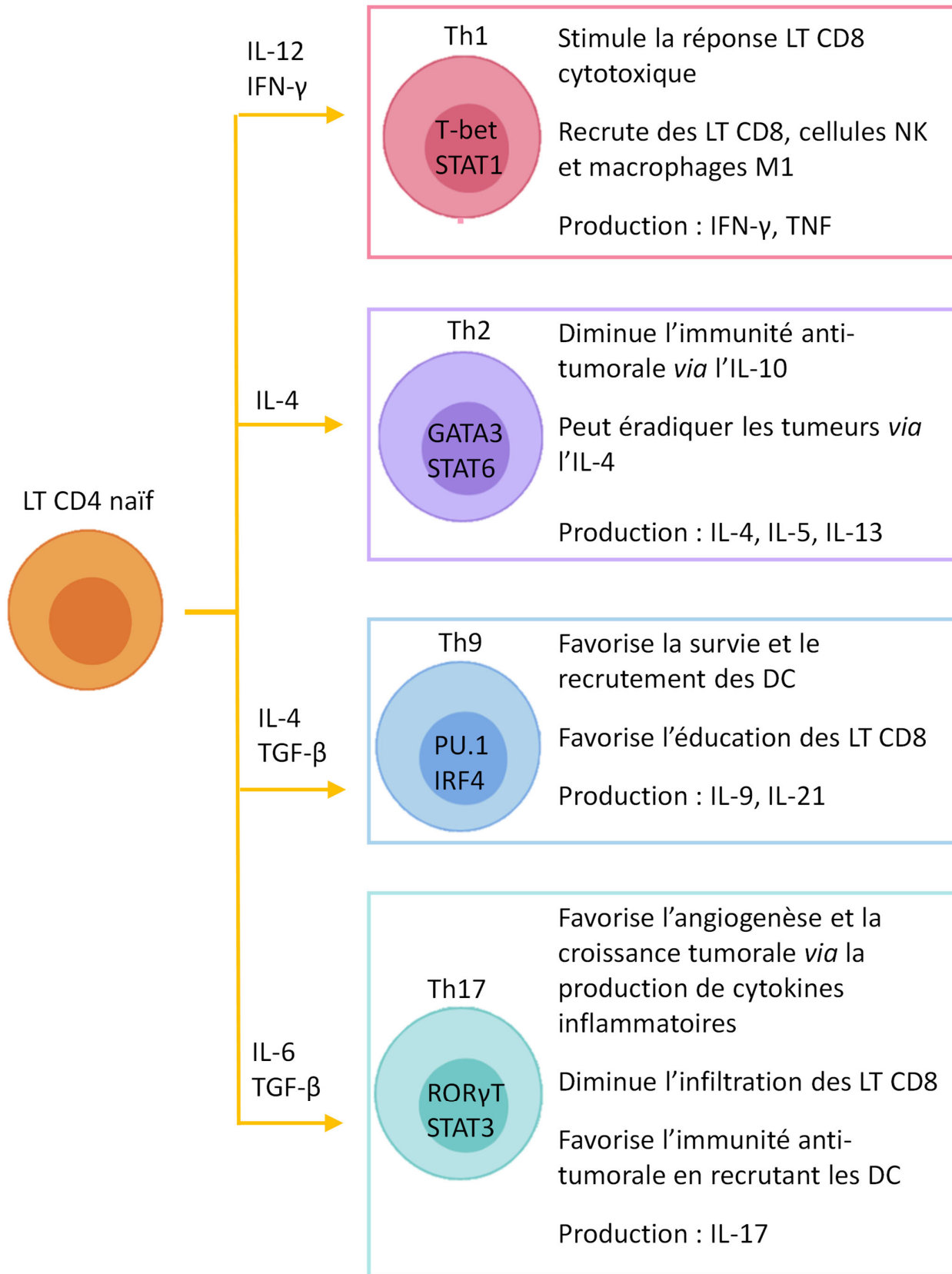


Figure 23. Sous-populations de lymphocytes T CD4 et leur rôle dans l'immunité anti-tumorale

LT CD4 Th2 : Les lymphocytes Th2 sécrètent des cytokines telles que l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. L'IL-4 est la cytokine essentielle à l'orientation vers un lignage Th2. Elle conduit à l'activation de STAT-6 qui induit l'expression du facteur de transcription GATA3 (Zheng & Flavell 1997). Les Th2 expriment les récepteurs aux chimiokines CCR3 et CCR4 (Sallusto et al., 1997 ; Imai et al., 1999). Les Th2 sont notamment connus pour leur rôle majeur dans l'induction de l'inflammation allergique. Ils sécrètent des quantités importantes d'IL-5 en réponse à un allergène et induisent une production d'anticorps de type IgE responsables des réponses allergiques. Dans le contexte tumoral, la réponse humorale associée à la production d'anticorps par les lymphocytes B peut induire la lyse des cellules tumorales *via* l'activation du complément ou du phénomène de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) notamment, ou au contraire, jouer un rôle pro-tumoral en activant les MDSC et en facilitant l'angiogenèse (Largeot et al., 2019). Il a été suggéré que les Th2 sécrètent des cytokines associées à l'immunosuppression dans les tumeurs, comme par exemple la sécrétion d'IL-10 qui inhibe directement les capacités de présentation antigénique des DC et active l'immunosuppression médiée par les LT régulateurs (Chraa et al., 2018). Cependant, il a également été démontré que les Th2 peuvent conduire à la régression tumorale chez la souris. Par exemple, une étude datant de 1992 montre que l'IL-4 produite par les Th2 était associée à une infiltration d'éosinophiles et de macrophages permettant l'élimination de la tumeur. Dans ce cas, la neutralisation de l'IL-4 supprimait l'immunité anti-tumorale (Tepper et al., 1992).

LT CD4 Th17 : Les Th17 représentent un lignage identifié initialement dans des contextes auto-immuns, caractérisé par l'expression du facteur de transcription ROR γ T, inductible par l'IL-6 et le TGF- β et dont l'expansion et le maintien dépendent de l'IL-23 (Ivanov et al., 2006; Mangan et al., 2006). Ce sont des LT producteurs d'IL-17 et IL-22 qui représentent un lignage à part entière et non un variant Th1 ou Th2 comme pensé initialement (Leung-Theng-Long & Guerber 2008). Les Th17 ont des rôles à la fois pro et anti-tumoraux selon le type de cancer (Chraa et al., 2018).

LT CD4 Th9 : Les études portant sur les cellules Th9 mettent en évidence des rôles activateurs et inhibiteurs de la réponse inflammatoire et un rôle central dans l'immunité anti-tumorale. Dans un modèle de mélanome pulmonaire, Lu et al., ont rapporté un rôle notable dans l'immunité anti-tumorale *in vivo*. Dans leur modèle, la neutralisation de l'IL-9 affaiblit la réponse anti-tumorale chez la souris, alors que le transfert de cellules Th9 augmente la protection contre le développement des tumeurs. Le rôle protecteur des cellules Th9 semble être dû au recrutement de DC sur le site de la tumeur et à l'amélioration de la différenciation des LT CD8 cytotoxiques spécifiques de la tumeur (Lu et al., 2012). Park et al., ont également suggéré que les cellules Th9 favorisaient la survie des DC grâce à la sécrétion d'IL-3 mais pas à celle d'IL-9 (Park et al., 2014). D'autre part, lorsqu'elles sont activées *via* le récepteur dectine-1, les DC sont capables d'induire une puissante immunité anti-tumorale médiée par les Th9 (Chen et al., 2016 ; Zhao et al., 2016). L'importance du facteur de transcription IRF1 dans la fonction cellulaire des Th9 a été soulignée par Végran et al. Il a été démontré que l'IRF1 induit les fonctions effectrices de ces cellules et favorise les activités anticancéreuses médiées par l'intermédiaire de l'IL-21 (Végran et al., 2014).

LT CD4 régulateur (T reg): Les T reg sont caractérisés par l'expression de CD25, chaîne alpha de IL-2R et par l'expression du facteur de transcription FOXP3. Il existe deux types de T reg : les T reg dits « naturels » qui sont générés dans le thymus à partir d'un précurseur FOXP3⁺. Ils émigrent dans la périphérie pour protéger l'organisme des réactions inflammatoires indésirées. Chappert et al., ont montré en 2010 que les T reg jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'auto-immunité. En effet, en bloquant spécifiquement l'expansion des LT CD8 auto-réactifs, les T reg permettent de bloquer les réponses auto-immunes (Chappert et al., 2010). Le second type, les T reg dits « inductibles », sont quant à eux générés en périphérie suite à un contact avec l'antigène à partir de précurseurs de LT CD4 naïfs qui augmentent l'expression de FOXP3 (Fontenot et al., 2003 ; Li & Rudensky 2016). La différenciation des T reg induits, est dépendante de l'IL-10 et de TGF- β chez l'Homme et chez la souris (Dees et al., 2021 ; Hsu et al., 2015 ; Jarnicki et al., 2006). Les T reg expriment des récepteurs capables d'inhiber la réponse immunitaire, tels que PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3 ou encore TIGIT (Figure 24).

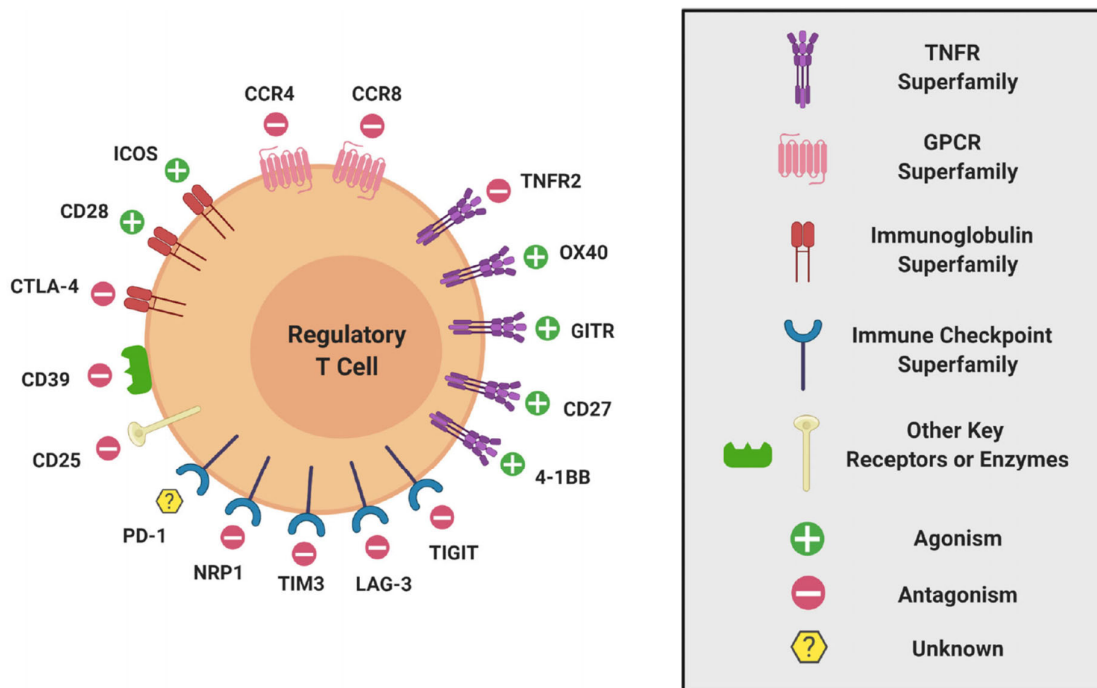


Figure 24. Récepteurs et enzymes clés exprimés à la surface des LT régulateurs et leur ciblage par immunothérapie (Dees et al., 2021)

Dans le contexte tumoral, l'infiltration en T reg est souvent associée à un mauvais pronostic chez les patients (Chraa et al., 2018). Les T reg sur le site tumoral peuvent jouer un rôle immunosuppresseur *via* leur interaction directe avec d'autres cellules immunitaires environnantes ou *via* leur production de facteurs solubles (Figure 25). Ils peuvent, par exemple, entrer en compétition avec les LT effecteurs pour la disponibilité de l'IL-2 ce qui conduit à une réduction des fonctions des LT effecteurs ou leur entrée en apoptose (Höfer et al., 2012 ; Śledzińska et al., 2020). Les T reg tumoraux peuvent également supprimer les fonctions des DC *via* l'expression de différents points de contrôle immunitaires tels que CTLA-4 (Von Boehmer & Daniel, 2013; Zou, 2006) (Figure 24) ou encore sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β , l'IL-10 , l'IL-35, qui suppriment la prolifération et les fonctions des LT effecteurs (Vignali et al., 2008). Aussi, il a été reporté chez la souris que les T reg ROR γ T⁺ Foxp3⁺ produisent de l'IL-10 et de l'IL-17 dans le microenvironnement tumoral ce qui favorise la polarisation tolérogénique des DC et autres cellules immunitaires (Fallarino et al., 2013). On trouve généralement plus de T reg au sein du tissu tumoral que dans les tissus sains adjacents (Chraa et al., 2018). Il a également été démontré par Clarck et al., en 2005 que les CEC humains échappent au contrôle du système immunitaire notamment *via* le recrutement de T reg (Clarck et al., 2005).

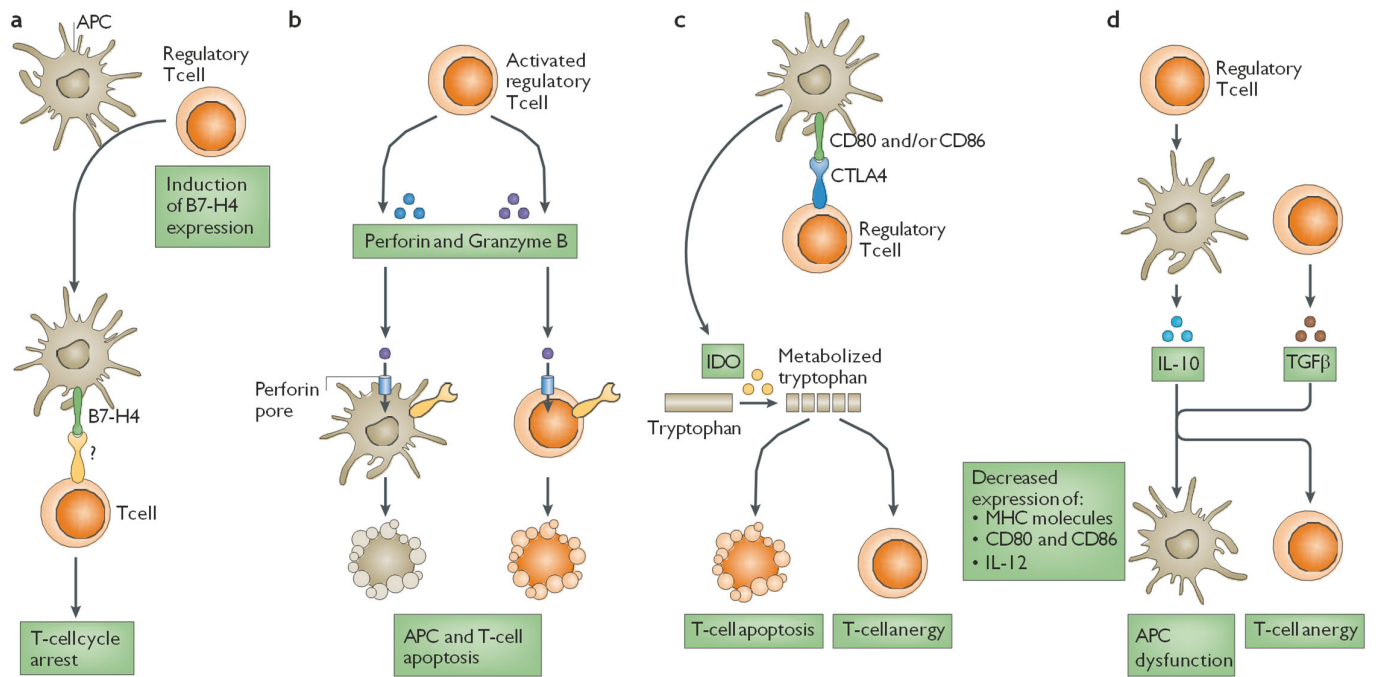


Figure 25. Mécanismes immunosuppresseurs pouvant être mis en jeu lors de l'activité des LT régulateurs (Zou et al., 2006)

1.7 Migration des LT CD8 cytotoxiques sur le site tumoral et destruction de la tumeur

Les LT CD8 effecteurs sont éduqués spécifiquement par les DC pour éradiquer les cellules tumorales. Après leur différenciation, prolifération et activation, les LT CD8 cytotoxiques doivent rejoindre le site tumoral. Les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 produites par les monocytes, DC, macrophages tumoraux, cellules endothéliales et fibroblastes permettent de les recruter *via* le récepteur CXCR3 (House et al., 2020; Spranger & Gajewski, 2016 ; Tokunaga et al., 2018). A noter que CXCL9 et CXCL10 sont des molécules inductibles par l'IFN- γ et sont donc surexprimées par les LT CD8 producteurs d'IFN- γ . Cela produit une boucle d'amplification de recrutement des LT activés (Slaney et al., 2014). Les LT cytotoxiques arrivés sur le site tumoral ont été éduqués par les DC à reconnaître spécifiquement des peptides présentés par le CMHI des cellules tumorales. Cette reconnaissance permettra la destruction spécifique de la cellule tumorale par les LT CD8 cytotoxiques. Les LT CD8 ont des propriétés cytotoxiques notamment liées à leur capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF ou l'IFN- γ qui vont induire une cytotoxicité directe sur les cellules à proximité. Les LT CD8 cytotoxiques pourront également exercer leurs capacités cytotoxiques par une reconnaissance spécifique induisant l'élimination de la cellule cible *via* la lyse de la cellule par les voies (Perforine/Granzyme ou Fas/FasLigand) (Figure 26). L'infiltration de LT CD8 cytotoxiques dans les tumeurs est généralement associée à un bon pronostic (Gentles et al., 2015).

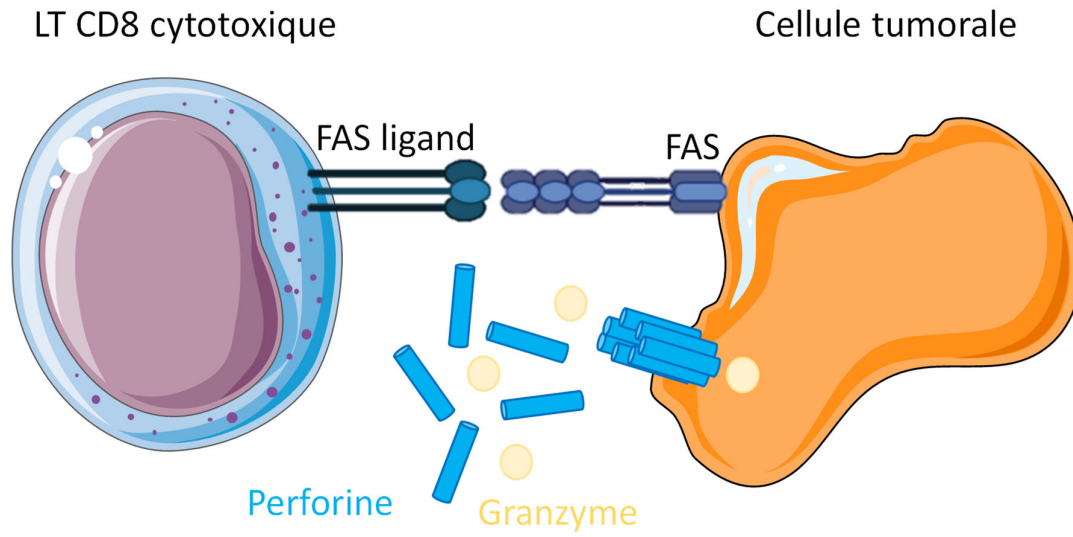


Figure 26. Fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8

1.8 Mécanismes de subversion du système immunitaire par le microenvironnement tumoral.

Bien qu'une armée de cellules immunitaires soit recrutée, les cellules tumorales se développent et prolifèrent de façon incontrôlée. Les cellules tumorales développent différents mécanismes afin d'échapper au contrôle du système immunitaire (Figure 27). Tout d'abord, Les antigènes tumoraux sont généralement moins immunogéniques que les antigènes étrangers. Ainsi, les LT CD8 anti-tumoraux sont généralement moins fortement activés que les LT CD8 anti microbiens (Engels et al., 2013) et peuvent nécessiter un signal cytokinique plus important pour être totalement efficaces (Grange et al., 2012). Certaines cellules tumorales vont limiter l'infiltration des LT, notamment en diminuant l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales telles que ICAM-1, ICAM-2 et CD34 (Harjunpää et al., 2019). Le microenvironnement tumoral présente également une matrice extracellulaire modifiée pouvant séquestrer les LT CD8 dans le stroma, les empêchant ainsi de pénétrer au cœur de la tumeur (Salmon et al., 2012). Un autre mécanisme est de sous-exprimer les molécules du CMH et ainsi réduire leur reconnaissance par les LT CD8 cytotoxiques (Reeves & James 2016). Les tumeurs peuvent également favoriser le recrutement de cellules immunosuppressives telles que les LT régulateurs notamment par la production de CCL22, CCL17 et CCL28 (Chaudhary & Elkord 2016). Les cellules tumorales peuvent également exprimer des molécules de co-inhibition telles que PD-L1 et ainsi stopper l'activation et la maturation des LT cytotoxiques (Wu et al., 2019).

Bien que le cycle de l'immunité anti-tumorale rassemble des étapes clés, il ne traduit pas complètement la complexité de la réponse dans laquelle d'autres types cellulaires jouent un rôle majeur. Les cellules lymphoïdes innées, mais également les cellules myéloïdes, les lymphocytes B ou encore les éosinophiles jouent un rôle prépondérant dans la progression des cancers. Dans la suite de ce manuscrit nous nous focaliserons sur le rôle clé des cellules lymphoïdes innées et cellules myéloïdes, et plus particulièrement le rôle des cellules dendritiques, macrophages et neutrophiles dans la réponse anti-tumorale.

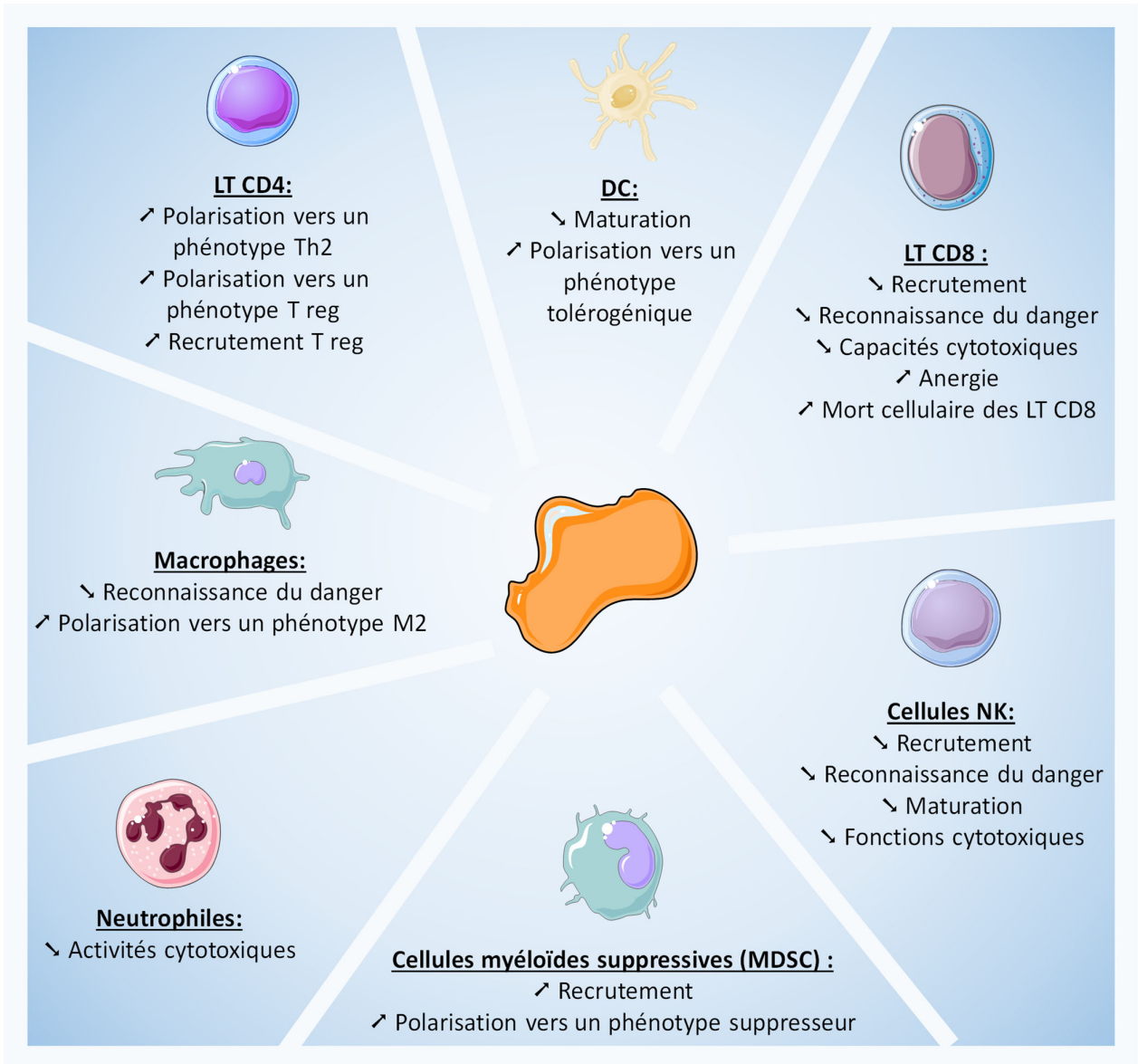


Figure 27. Détournement des fonctions immunitaires par les cellules tumorales

2. Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont définies par leur morphologie lymphoïde, l'absence d'expression de récepteurs spécifiques d'un antigène, et enfin, par l'absence d'expression des marqueurs phénotypiques de cellules myéloïdes et dendritiques (Spits et al., 2012). Elles sont majoritairement résidentes des tissus et sont classées en 3 sous-groupes selon leur phénotype et leurs caractéristiques fonctionnelles (Vivier et al., 2019) (Figure 28). Les ILC de groupe 1 ont majoritairement des fonctions anti-tumorales alors que les ILC de groupe 2 et 3 sont généralement associées à la progression du cancer.

2.1 Les ILC de groupe 1

Les ILC de groupe 1 comprennent les cellules Natural Killer (NK) et les ILC1. Ces cellules expriment le facteur de transcription T-bet, et produisent de l'IFN- γ et du TNF (Figure 28).

2.1.1 Les cellules NK

Découverte des NK. Les cellules NK, ont été découvertes et décrites par Rolf Kiessling et Ronald Herberman dans les années 1970 (Kiessling et al., 1975 ; Herberman et al., 1975). A cette époque, les efforts de recherche étaient concentrés sur l'étude de la réactivité immunitaire des LT aux antigènes tumoraux et sur l'identification d'une méthode efficace pour évaluer cette réactivité. Les premières tentatives de standardisation du test de libération du Chrome-51 pour mesurer la réactivité des LT contre la leucémie dans un modèle murin ont échoué en raison d'une « lyse basale » (Kiessling et al., 1975). Les chercheurs ont rapidement compris qu'il ne s'agissait pas d'un bruit de fond mais de l'effet d'une population différente des LT : les cellules NK. Chez l'Homme et la souris, les cellules NK expriment le marqueur Nkp46.

Famille des cellules innées lymphoïdes

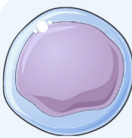

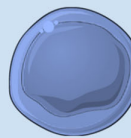


ILC de Groupe 1	ILC de Groupe 2	ILC de Groupe 3
T-bet	GATA3	ROR γ T
IFN- γ ; TNF	IL-4 ; IL-5 ; IL-13	IL-4 et/ou IL-22
 <p><u>NK</u> : Nkp46 ; Nk1.1</p>	 <p><u>ILC2</u> : CRTH2 ; CD161</p>	 <p><u>ILC3</u> : Nkp46 ; CD56 NCR^{+/-}</p>
 <p><u>ILC1</u> : Nkp46 ; Nk1.1 CD49a</p>		 <p><u>LTi</u> : Nkp46⁻</p>

Figure 28. Sous-populations de cellules lymphoïdes innées et leurs principales caractéristiques chez l'Homme.

Activation des cellules NK. Ces cellules effectrices de l'immunité innée, ont la capacité intrinsèque de reconnaître et détruire les cellules infectées par un virus, stressées ou cancéreuses, sans éducation préalable. Les cellules NK sont capables de distinguer les cellules malignes des cellules du « soi » grâce à l'équilibre entre la signalisation des récepteurs activateurs tels que NKG2D ou, DNAM-1, et les récepteurs inhibiteurs tels que KIR ou NKG2A. Les cellules tumorales peuvent sur-exprimer les ligands des récepteurs activateurs des cellules NK ou au contraire, manquer de molécules capables de se lier aux récepteurs inhibiteurs des cellules NK, conduisant à leur reconnaissance et destruction (Shaver et al., 2021) (Figure 29).

Cytotoxicité médiée par les cellules NK. La réponse cytotoxique des cellules NK est déclenchée lorsque les signaux activateurs dépassent les signaux inhibiteurs (Bryceson et al., 2011). Elle est médiée par la libération de granules cytoplasmiques contenant de la perforine et des granzymes, l'expression de FASL et/ou TRAIL (Screpanti et al., 2005 ; Zamaï et al., 1998) et la libération de vésicules extracellulaires possédant une activité cytotoxique (Lugini et al., 2012). Les cellules NK expriment également le récepteur CD16 (FcγRIII), qui reconnaît les anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux spécifiques. Cette reconnaissance déclenche le phénomène d'ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Capuano et al., 2021 ; Trotta et al., 1998). En plus de la destruction directe des cellules tumorales, les NK sécrètent des chimiokines et des cytokines permettant de recruter et coordonner les réponses des autres cellules immunitaires telles que les LT (Roda et al., 2006) et les DC (Böttcher et al., 2018) (Figure 30).

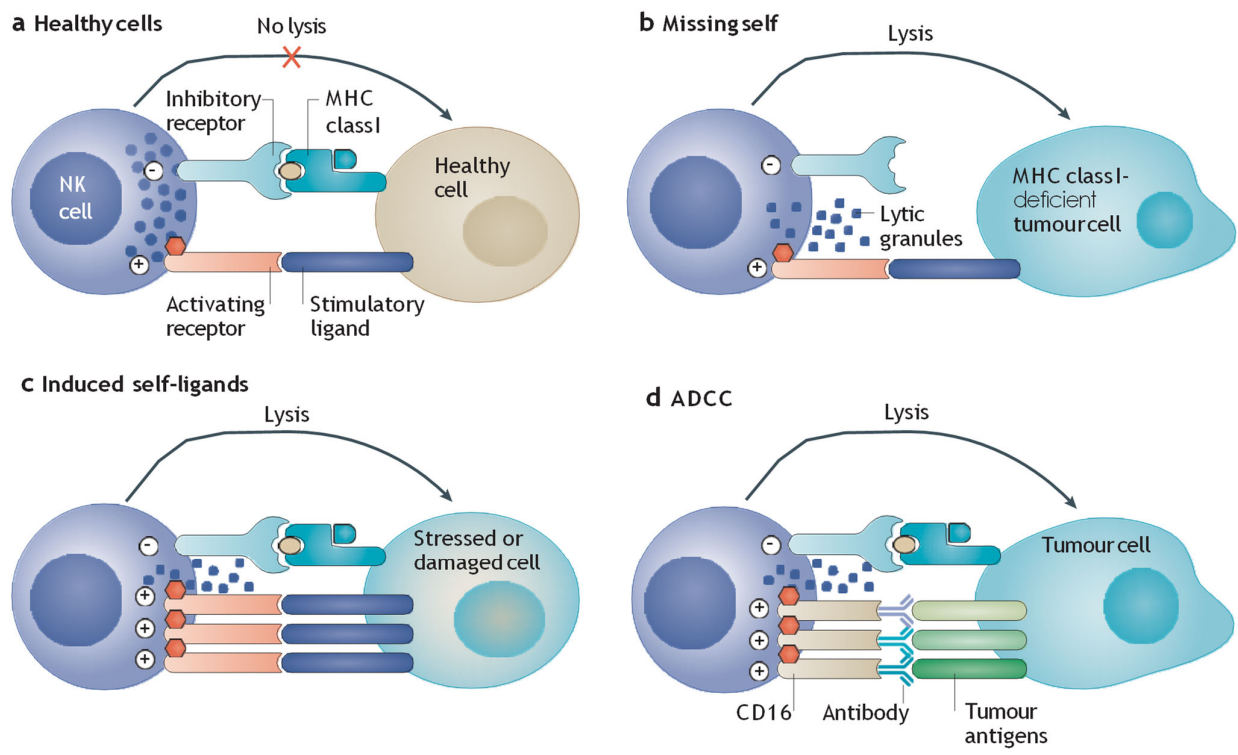


Figure 29. Induction de la lyse de la cellule cible par les cellules NK lorsque les signaux activateurs dépassent les signaux inhibiteurs (Morvan et al., 2016)

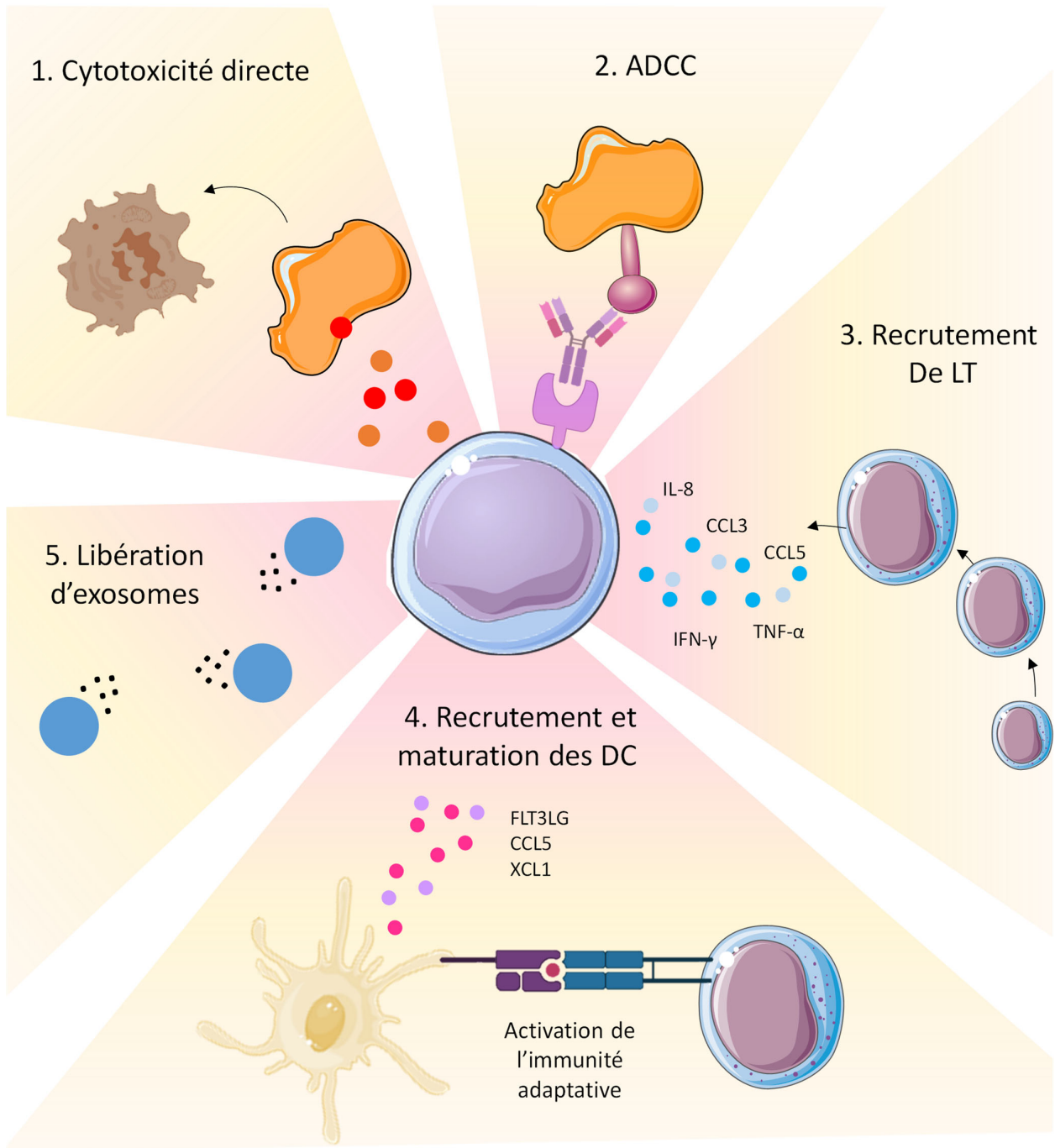


Figure 30. Fonctions des cellules NK

Rôle des cellules NK dans le micro-environnement tumoral. Les cellules NK jouent donc un rôle primordial dans l'immunosurveillance et l'immunité antitumorale. Ainsi, Imai et al., ont démontré dans une étude prospective de 11 ans que les individus sains ayant une faible activité cytotoxique des lymphocytes du sang périphérique présentaient un risque significativement plus élevé de développer un cancer par rapport aux individus ayant une activité lymphocytaire cytotoxique moyenne ou élevée (Imai et al., 2000). Aussi, les tumeurs hautement infiltrées en cellules NK sont associées à un bon pronostic (Imai et al., 2000, Ishigami et al., 2000 ; Villegas et al., 2002 ; Gentles et al., 2015). Cependant, le microenvironnement tumoral modifie largement la réponse immunitaire. Par exemple, il a été démontré que les cellules NK associées aux tumeurs présentent un répertoire de récepteurs activateurs altéré et une capacité cytotoxique diminuée par rapport aux cellules NK de donneurs sains (Easom et al., 2018 ; Mamessier et al., 2011 ; Platonova et al., 2011). Notamment la signalisation TGF- β réduit directement l'expression des marqueurs d'activation par les cellules NK dans un éventail de cancers (Mamessier et al., 2011 ; Otegbeye et al., 2018).

2.1.2 Les ILC1

Les ILC1 ressemblent aux Th1. Comme les Th1, les ILC1 sont régulées par le facteur de transcription T-bet et peuvent produire de l'IFN- γ , GM-CSF (Bernink et al., 2013), granzyme et perforine en réponse à des cytokines telles que l'IL-12 ou l'IL-15 (Fuchs et al., 2013), l'IL-18, le TGF- β (Gao et al., 2017), des virus (Weizman et al., 2017) ou des bactéries intracellulaires (Klose et al., 2013). Elles se caractérisent par l'expression des marqueurs Nkp46⁺CD127⁺CD49a⁺ chez l'Homme (Figure 28). Elles présentent des caractéristiques de cellules NK et peuvent exercer des fonctions anti-tumorales (Figure 31). Cependant, en réponse au TGF- β ou à l'IL-2, il a été démontré que les ILC1 exercent des fonctions pro-tumorales, favorisant la croissance des tumeurs (Gao et al., 2017).

2.2 Les ILC de groupe 2

Les ILC2 sont les seules membres du groupe 2 des ILC. Elles ressemblent aux Th2 : comme les Th2, les ILC2 sont régulées par le facteur de transcription GATA3 et peuvent produire de l'IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 en réponse à des cytokines telles que l'IL-25, IL-33 et TSLP (Thymic Stromal Lympho Protein) (Bruchard et al., 2019). Chez l'Homme, les ILC2 expriment les marqueurs CRTH1 et CD161 (Figure 28). Ces cellules jouent un rôle ambivalent dans la progression du cancer qui dépend de l'environnement cytokinique (Figure 31). Par exemple, il a été démontré que la production d'IL-13 par les ILC2 est associée à une progression tumorale dans le cancer de la vessie chez l'Homme (Chevalier et al., 2017). Il a également été démontré chez la souris que les ILC2 peuvent produire de l'IL-5 qui entraîne l'activation des éosinophiles et une réponse anti-tumorale accrue dans le cancer du poumon (Ikutani et al., 2012).

2.3 Les ILC de groupe 3

Les ILC de groupe 3 concernent les ILC3 et les « Lymphoid Tissue Inducer (LTi) caractérisés par leur production d'IL-22 et/ou IL-17 et l'expression de ROR γ T (Figure 28).

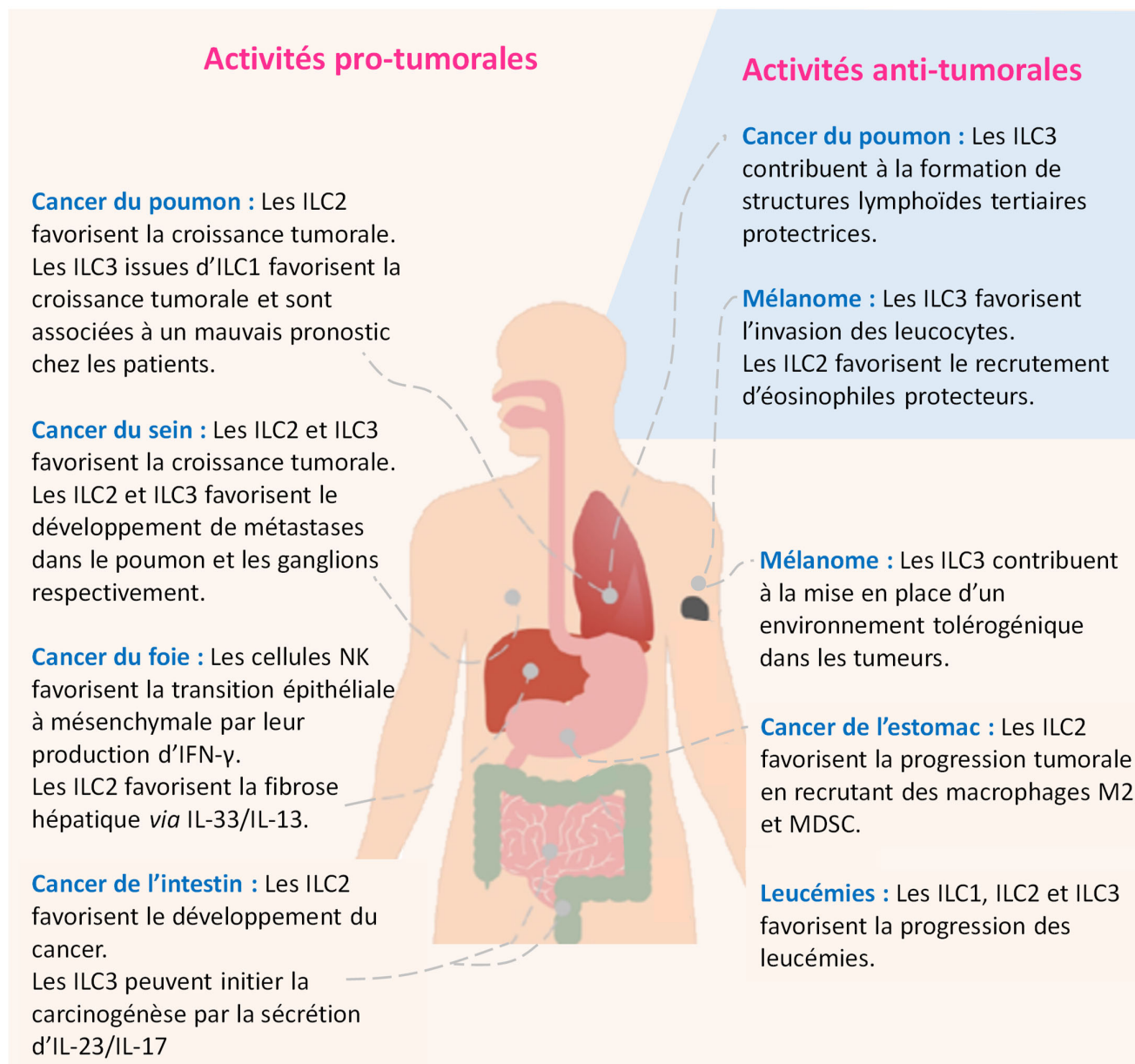


Figure 31. Rôle des ILC1-2-3 dans les différents types de cancer (Adapté de Wang et al., 2020)

2.3.1 Les ILC3

Les ILC3 expriment, comme les Th17, ROR γ T, IL-17, IL-22, GM-CSF et TNF en réponse à des cytokines telles que l'IL-23 ou IL-1 β . Elles sont caractérisées chez l'Homme par l'expression des marqueurs Nkp46⁺CD56⁺NCR^{+/-} (Figure 28). Il a été démontré que l'IL-22 pourrait favoriser la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer du côlon (Kirchberger et al., 2013). En revanche, les ILC3 reconnaissent les cellules tumorales et facilitent l'entrée des leucocytes dans les tumeurs, améliorant ainsi l'immunité anti-tumorale (Bruchard et al., 2019) (Figure 31). Dans certains contextes, les ILC3 ont été retrouvées en bordure des structures lymphoïdes tertiaires associées à un bon pronostic (Carrega et al., 2015).

2.3.2 Les LTI

Le rôle des LTI dans les cancers a été étudié notamment dans le mélanome. Eisenring et al., montrent en 2010 que lorsque les LTI Nkp46⁺ dépendant du facteur de transcription ROR γ T sont activés par l'IL-12, ils permettent de recruter des leucocytes et ainsi contrôler la croissance tumorale (Eisenring et al., 2010). A l'inverse, dans certains cas, il a été rapporté que le recrutement de LTI dans le mélanome est corrélé à l'expression de CCL21 dans la tumeur qui favoriserait la transition des tumeurs immunogéniques vers un phénotype tolérogénique, favorisant ainsi la croissance tumorale (Shields et al., 2010)

2.4 Plasticité des ILC

Le concept de plasticité cellulaire a été introduit initialement en 1985 par Helen Blau, et définit la capacité d'une cellule à changer d'identité (Blau et al., 1985). Les ILC sont des cellules plastiques. De façon comparable aux LT, les ILC adaptent leur phénotype en fonction des signaux qu'elles reçoivent. Ainsi, il a été démontré que les ILC3 peuvent se convertir en ILC1 que les ILC2 peuvent également se convertir en ILC1 productrices d'IFN- γ (Bal et al., 2020). et enfin que des cellules NK peuvent devenir des ILC1 intermédiaires (CD49a⁺CD49b⁺) lorsqu'elles sont stimulées par le TGF- β (Gao et al., 2017) (Figure 32).

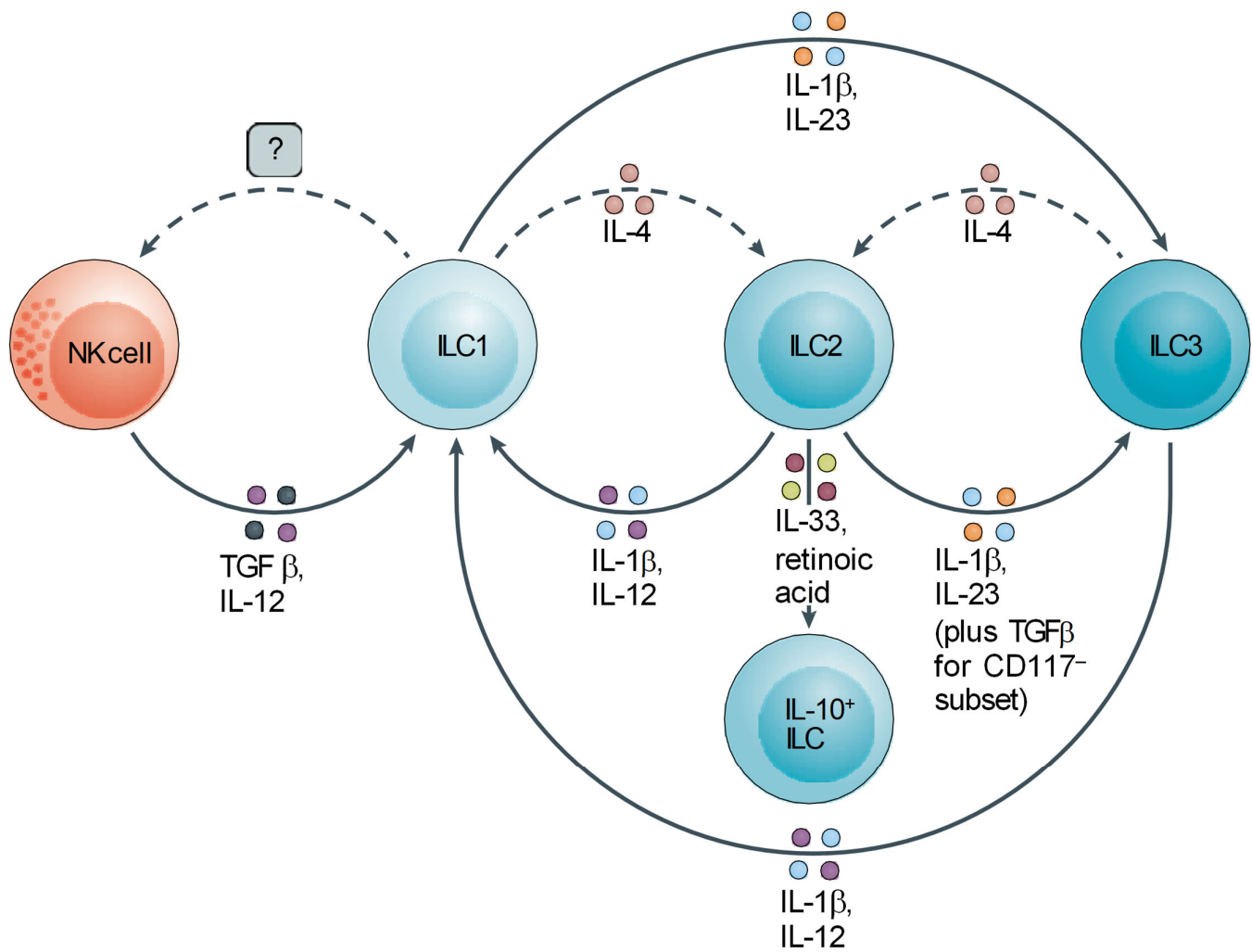


Figure 32. Plasticité des ILC (Bal et al., 2020).

Les flèches pleines représentent les signalisations pour lesquelles nous disposons de preuves scientifiques solides. Les flèches en pointillé représentent les signalisations pour lesquelles des études complémentaires sont nécessaires.

2.5 Rôle des ILC dans le contexte des CEC

Peu d'études ont été menées pour déterminer le rôle des cellules de la famille des ILC dans le contexte du CEC. Notre équipe a récemment publié un article dans lequel je suis co-auteur, qui met en évidence le rôle primordial des cellules NK dans le contrôle précoce de la progression tumorale dans un modèle de tumeur chimio-induit DMBA-PMA chez la souris (Annexe) (Figure 33). Nous avons également démontré que les ILC infiltrant les CEC sont hétérogènes et que l'on trouve principalement des ILC1 dans les lésions précancéreuses : les papillomes, et principalement des cellules NK dans le stade tumoral. Les cellules NK et ILC1 de ces tumeurs sont dysfonctionnelles chez la souris et expriment des récepteurs inhibiteurs. Enfin, comme chez la souris, les ILC infiltrant les CEC humains sont hétérogènes, composées principalement de cellules NK, ILC1 et quelques ILC3. Ces dernières expriment également des récepteurs inhibiteurs tels que TIGIT.

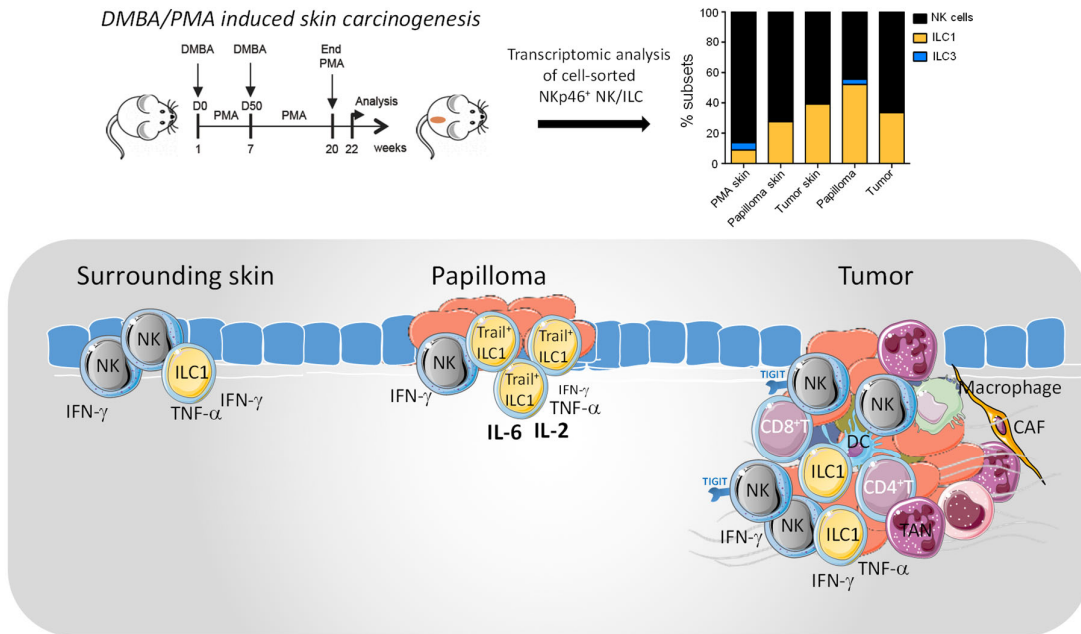


Figure 33. Infiltration des ILC dans le contexte des CEC.
Résumé graphique de l'article (Luci et al., 2021) (Voir Annexe).

3. Les cellules dendritiques

3.1 Les DC cutanées à l'homéostasie

Les DC cutanées sont une population de cellules hétérogènes, tant chez l'homme que chez la souris (Angel et al., 2007 ; Bursch et al., 2007 ; Ginhoux et al., 2007 ; Poulin et al., 2007). Leur distribution dans le derme n'est pas aléatoire. Les DC du derme se trouvent sous forme de cellules uniques ou au sein de « clusters » de 20 à 40 cellules (Roediger et al., 2008). Roediger et al., ont démontré en 2008 que les DC cutanées sont constitutivement mobiles et utilisent un mécanisme de migration amiboïde. Les études portant sur la maturation des DC ont donné naissance à 2 paradigmes majeurs. Premièrement, on suppose que toutes les DC des tissus périphériques, y compris celles de la peau, sont « immatures » à l'état d'équilibre (Romani et al., 1989). Deuxièmement, on pense que les DC « immatures » sont tolérogènes, tandis que les DC « matures » sont pro-inflammatoires. En ce qui concerne les DC cutanées, ces paradigmes présentent un paradoxe, car la migration et la maturation des DC étaient traditionnellement liées (de Vries et al., 2003 ; Weinlich et al., 1998), or de nombreuses preuves expérimentales montrent que les DC de l'épiderme et du derme migrent en continu de la peau vers les ganglions lymphatiques drainant la peau *via* le système lymphatique. Elles remplissent ainsi leur rôle de cellules patrouilleuses, véritables capteurs pour le système immunitaire adaptatif (Hemmi et al., 2001) y compris dans des conditions non inflammatoires, (Kamath et al., 2002 ; Liu et al., 2007 ; Merad et al., 2002), dans cet organe protecteur contre les rayons UV (Box 1).

Box 1 : Réaction des DC aux UV.

Les rayonnements ultra-violet (UV), l'un des principaux facteurs de risque des CEC (Chapitre 1), induisent une réduction fonctionnelle et quantitative des réponses immunitaires systémiques. Les rayonnements UV induisent à la fois l'apoptose des DC et leur migration dans les ganglions lymphatiques, conduisant à une déplétion cutanée (Furio et al., 2005 ; Lee et al., 2013 ; Pradhan et al., 2008). De plus, la migration dans les ganglions drainants ainsi que les capacités de présentation antigénique des DC sont altérées par les rayonnements UV, ce qui conduit à une réduction de l'inflammation induite par les DC et à la promotion des réponses Th2 et T reg (Furio et al., 2005 ; Hamakawa et al., 2006 ; Nakagawa et al., 1999 ; Schade et al., 2005). Des études d'association à grande échelle, à l'échelle du génome et à l'échelle du transcriptome ont identifié certaines mutations génétiques (Single Nucleotid polymorphism : SNP) du CMHII qui peuvent être associées à un risque accru de CEC chez l'Homme (Wang et al., 2018). Les effets de ceux-ci n'ont pas été élucidés mécaniquement mais pourraient se rapporter à une présentation altérée par les DC aux cellules effectrices.

3.2 Les différentes sous-populations de DC dans la peau

Les différentes sous-populations de DC ont été définies en fonction de leur ontogénie, de leur phénotype, de leur localisation anatomique et de leurs capacités uniques à présenter l'antigène à des lymphocytes T naïfs (Collin et al., 2013 ; Mildner & Jung, 2014). Les progrès des technologies à haut débit ont amélioré la classification des DC en identifiant des signatures moléculaires et des marqueurs spécifiques de chaque sous-population (Guilliams et al., 2010 ; Harman et al., 2013 ; Villani et al., 2017). La conservation de la classification des DC chez l'Homme et chez la souris dans plusieurs études (Dutertre et al., 2019 ; Zilionis et al., 2019) soutient l'hypothèse que les DC peuvent être classées et comparées de manière cohérente entre les espèces.

Chez l'Homme et chez la souris, les DC conventionnelles (cDC) présentes dans le derme, sont généralement catégorisées en utilisant l'expression de CD11b (également connu sous le nom d'ITGAM). Les cDC1 sont caractérisées par leur expression de XCR1 et sont CD11b⁻. Chez la souris, elles incluent les cellules CD103⁺ et CD103⁻ (Bursch et al., 2007). Il s'agit de la lignée de cDC dépendante de BATF3 (Croizat et al., 2011 ; Hildner et al., 2008). Les cDC2 quant à elles sont caractérisées par l'expression de CD11b et Sirp α (chez la souris) et CD1c (chez l'Homme). Les LC se caractérisent par l'expression de CD207 et enfin, les DC dérivées des monocytes (moDC) expriment différents récepteurs mentionnés dans la Figure 34. Chacune de ces sous-populations présente une identité transcriptionnelle spécifique. Aussi, de nouvelles populations ont récemment été décrites chez l'Homme grâce aux technologies d'analyse intégrative telle que le Single Cell RNAseq (Villani et al., 2017 ; Bourdely et al., 2020).


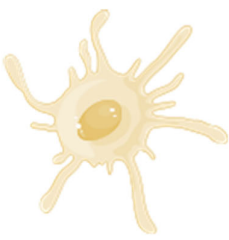
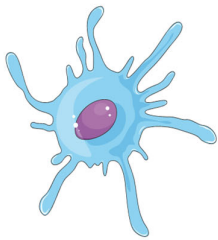
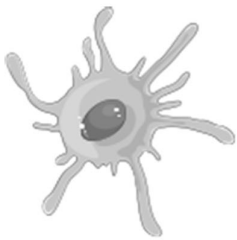


	LC	cDC1	cDC2	moDC
				
	CD11b EPCAM CD207	XCR1 CD24 CD103 CD8 α CLEC9A	Sirp α CD209 DC-SIGN CD172a CD11b	Ly6C CD64 ^{low} CD11b CSF1R CD206
	BDCA1 CD207 CD1a	XCR1 BDCA3 CD141 CLEC9A	BDCA1 CD1c CD11b	CD64 CD14 CD1a CD1c CD206

Figure 34. Marqueurs permettant l'identification des principales sous-populations de cellules dendritiques conventionnelles et dérivées des monocytes chez la souris et chez l'Homme.

3.3 Les Cellules dendritiques de l'épiderme : les Cellules de Langerhans

Généralités. Les cellules de Langerhans (LC) constituent le premier sous-type de DC identifié et sont peut-être les mieux caractérisées. Les LC présentent une morphologie stellaire (Kissenpfennig et al., 2005 ; Lai et al., 2008 ; Nishibu et al., 2006). Présentes dans l'épiderme, les LC murines ont un renouvellement lent à l'état d'équilibre (Kamath et al., 2002 ; Merad et al., 2002) et sont largement radio-résistantes (Merad et al., 2002) : une propriété majeure qui nous permet de distinguer les LC des cDC du derme. Au cours de leur maturation, les LC diminuent l'expression de la E-cadhérine. Par conséquent, elles se détachent des kératinocytes et deviennent mobile. Les LC atteignent les ganglions lymphatiques drainants après 3 à 4 jours (Kissenpfennig et al., 2005).

Ontogénie. Chez la souris, les LC proviennent de précurseurs myéloïdes dérivés du sac vitellin qui sont incrustés dans l'épiderme vers le 18^{ème} jour embryonnaire (Chorro et al., 2009) et de monocytes fœtaux dérivées du foie (Hoeffel et al., 2012) plutôt que d'un précurseur pré-DC (Figure 35). Ces précurseurs de LC épidermiques acquièrent une morphologie de type DC immédiatement après la naissance et commencent à exprimer les molécules CD207 et CD11c (ITGAX). Ils entrent ensuite dans un processus de prolifération importante entre les jours 2 et 7 (postnatal) (Chorro et al., 2009). Ensuite, les LC entièrement différenciées ont un faible taux de prolifération *in situ* qui suffit à maintenir leur nombre à l'âge adulte sans autre apport de la moelle osseuse (Poulin et al., 2007 ; Chorro et al., 2009 ; Vishwanath et al., 2006). Ce mode de renouvellement ressemble à celui de la microglie (cellules phagocytaires présentes dans le cerveau) et contraste avec celui des cDC dermiques, qui nécessite un apport continu de précurseurs dérivés du sang issus de la moelle osseuse. Comme la microglie, le maintien des LC nécessite l'IL-34, qui est constitutivement produite par les kératinocytes et les neurones (Wang et al., 2012 ; Gautier et al., 2012). Le mode de régénération des LC, indépendant des précurseurs véhiculés par le sang, constitue peut-être une adaptation à l'épiderme, qui manque de vaisseaux sanguins et dont les plus proches vaisseaux, situés dans le derme, sont de l'autre côté de la membrane basale.

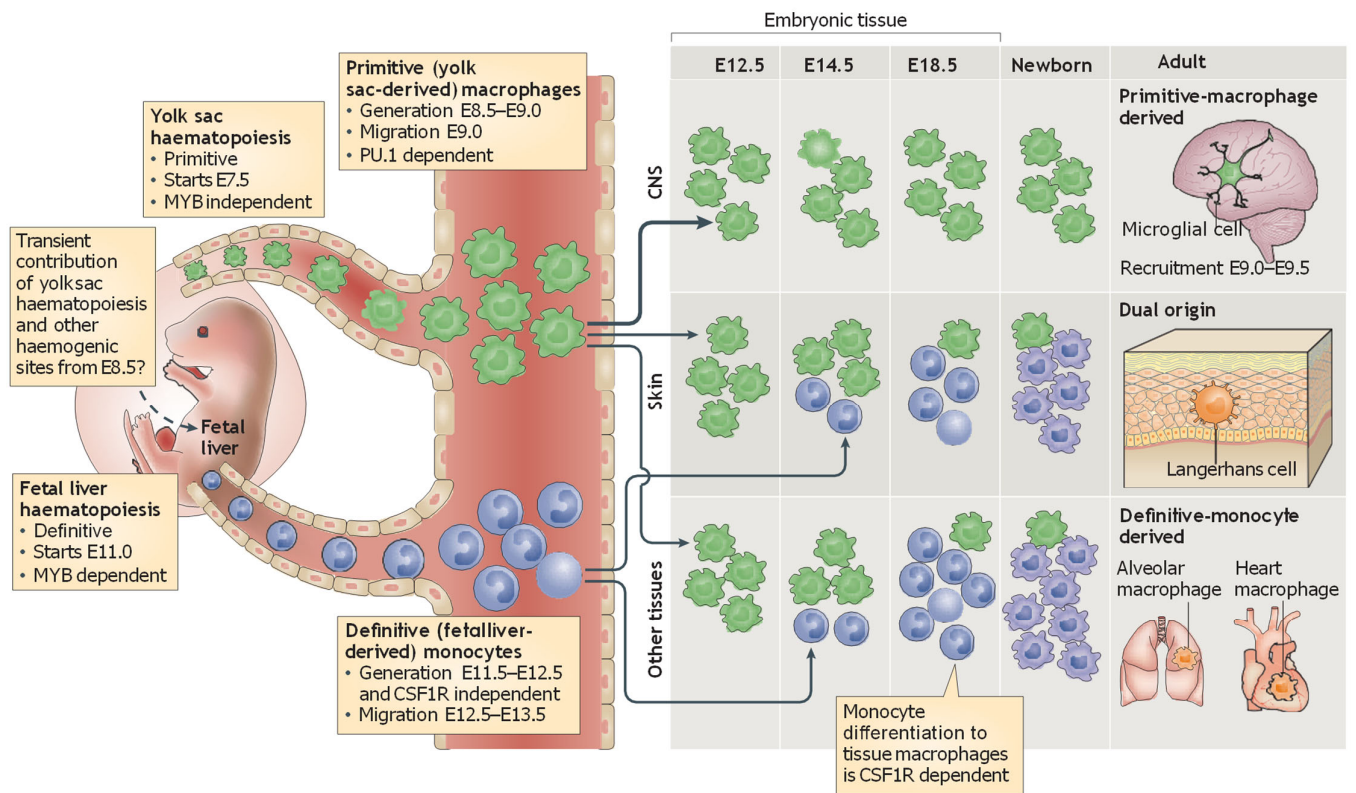


Figure 35. Ontogénie des cellules de Langerhans (Ginhoux & Jung 2014).

Rôle anti-tumoral des LC dans les CEC : Fujita et al., démontrent en 2012 que les LC infiltrant les CEC humains présentent un phénotype plus mature et sont capables d'induire une réponse immunitaire de type Th1 et de stimuler la prolifération des LT CD4 et CD8 de façon plus efficace que les LC infiltrant la peau périlésionnelle. Les LT éduqués par les LC tumorales produisent de l'IFN- γ , une cytokine jouant un rôle clé dans l'immunité anti-tumorale (Fujita et al., 2012) (Figure 36). D'autre part, les cytokines jouant un rôle dans la prolifération et migration des LC hors du derme, telles que le facteur TSLP jouent un rôle protecteur dans le développement des cancers de la peau (Demehri et al., 2012 ; Di Piazza et al., 2012). Cependant, cette activation des LC dans le contexte des CEC ne permet pas d'éradiquer la tumeur. Cette défaillance peut s'expliquer par la diminution du nombre de LC présentes dans le microenvironnement des CEC (Pogorzelska-Dyrbus & Szepietowski, 2020), par une reconnaissance, internalisation ou apprêtement défaillant des antigènes tumoraux ou encore par une migration non optimale des LC. Un contact physique des LC avec des T reg ou des cellules immunosuppressives doit également être pris en considération.

Rôle pro-tumoral des LC dans les CEC : Au contraire, il a été démontré que les LC jouent un rôle pro-tumoral dans le modèle de carcinogénèse chimio-induite DMBA/PMA. En effet, dans ce modèle, les LC favorisent les mutations de l'ADN induites par le DMBA. Les souris génétiquement modifiées constitutivement dépourvues de LC (langerine-DTA) développent moins de tumeurs que leurs contrôles (Modi et al., 2012 ; Raaby et al., 2017). Enfin, au cours de la transformation des cellules en tumeur maligne, les cellules épithéliales peuvent perdre leur polarité et leurs propriétés adhésives les rendant plus invasives. Les LC peuvent également jouer un rôle dans le processus de transition épithéliale à mésenchymale (EMT) dans les cancers cutanés car de nombreuses molécules impliquées dans la migration des LC hors de l'épiderme, telles que le TGF- β , participent à la transition EMT (Hieronymus et al., 2015).

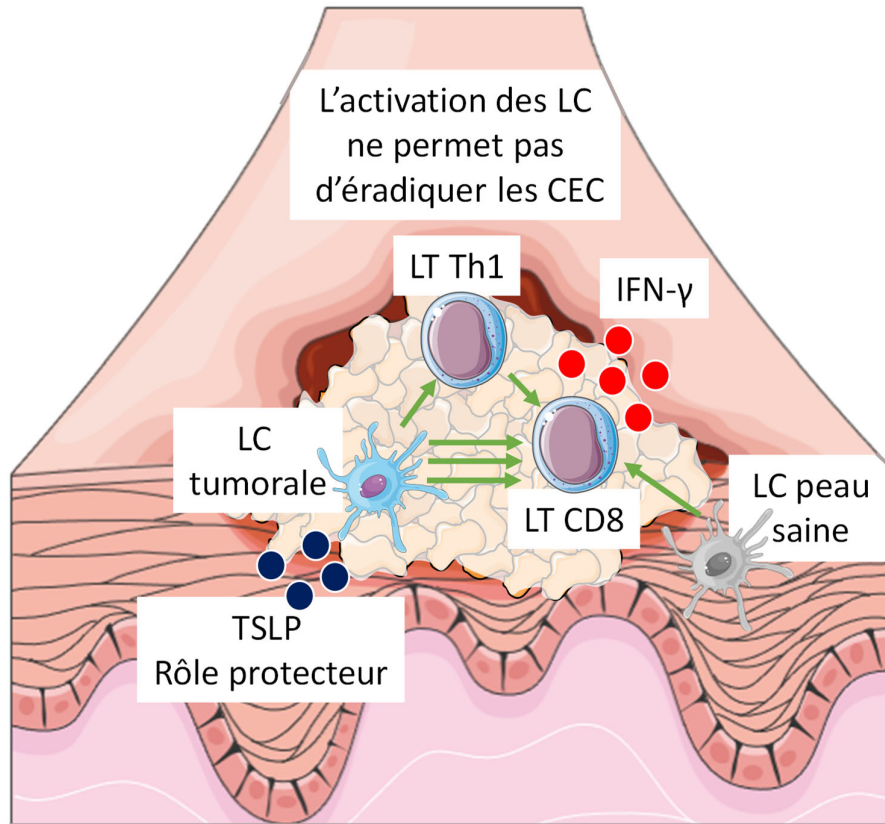


Figure 36. Rôle protecteur des LC dans les CEC humains

3.4 Les cellules dendritiques conventionnelles de type 1

Généralités. Chez la souris, les cDC1 englobent à la fois les cDC CD8 α ⁺ résidentes des ganglions lymphatiques et les cDC CD103⁺CD11b⁻ résidentes des tissus tels que la peau (Crozat et al., 2011 ; Hildner et al., 2008 ; Burcsh et al., 2007 ; Ginhoux et al., 2007 ; Poulin et al., 2007). Chez l'Homme, les cDC1 correspondent aux cellules CD141⁺BDCA3^{high}CD11b^{-/low} (Bachem et al., 2010). Les cDC1 murines et humaines expriment spécifiquement le récepteur de chimiokine XCR1 et sélectivement le récepteur endocytaire de lectine de type C CLEC9A (également appelé DNGR1) (Bachem et al., 2010 ; Bachem et al., 2012 ; Crozat et al., 2011 ; Vu Manh et al., 2015). Les cDC1 humaines expriment les TLR3 et 8 (O'Keefe et al., 2015) et les cDC1 murines expriment, en plus TLR4 et TLR9 notamment. Les cDC1 présentes dans le derme ont une morphologie amiboïde, caractéristique d'une cellule migratoire. L'activation des cDC1 induit leur maturation et migration vers les ganglions lymphatiques drainants. Chez l'Homme et la souris, les cDC1 sont connues pour leurs capacités exceptionnelles de présentation croisée d'antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8, ce qui est probablement dû à leur expression sélective de la lectine de type C, CLEC9A un récepteur pour les cellules endommagées (Ahrens et al., 2012)

Ontogénie. Les cellules cDC1 sont issues de précurseurs présents dans la moelle osseuse et peuvent entrer directement dans les tissus à partir du sang ou se différencier localement d'un progéniteur dédié, le pré-cDC1 qui a été caractérisé chez l'Homme et chez la souris (Schlitzer et al., 2015 ; See et al., 2017). Les cDC1 sont dépendantes de FLT3L *in vivo* et *in vitro* (Poulin et al., 2010 ; Proietto et al., 2012) et de BATF3 *in vitro* (Poulin et al., 2012). Le facteur de transcription IRF8 est également fortement exprimé par les cDC1 humaines mais les patients présentant des mutations dans le gène IRF8 n'ont pas de défaut des cDC1 (Guilliams et al., 2016 ; Hambleton et al., 2011). Elles ont un temps de demi-vie court et sont continuellement remplacées à partir de précurseurs de cDC provenant de la moelle osseuse (Schlitzer et al., 2015). Chez la souris, elles sont remplacées tous les 10 à 15 jours (Liu et al., 2007).

Fonctions des cDC1 dans le contexte tumoral. Peu de données sont répertoriées sur le rôle des cDC1 dans les CEC mais leurs fonctions ont été largement caractérisées dans d'autres types de cancer. En effet, il est à présent admis que les cDC1 sont essentielles pour l'immunité anti-tumorale dirigée par les lymphocytes T (Hildner et al., 2008) (Figure 37). En plus de leur rôle critique d'amorçage de la réponse T dans les ganglions lymphatiques drainants (Martín-Fontecha et al., 2003), des études récentes ont démontré que les cDC1 peuvent être trouvées au sein même des tumeurs, où elles recrutent des LT (de Mingo Pulido et al., 2018). Le rôle des cDC1 CD103⁺ dans les tumeurs est controversé. Bien que des études aient identifié cette population comme importante lors de la réponse immunitaire anti-tumorale, Garris et al., n'ont pas d'expression d'IL-12p40 par ces DC tumorales qui semblent dysfonctionnelles (Broz et al., 2014 ; Garris et al., 2018 ; Ruffell et al., 2014 ; Salmon et al., 2016). L'utilisation de souris chimériques Zbtb46-DTR, initialement décrites par Meredith et al., en 2012, a permis de mettre en évidence que les DC CD103⁺ infiltrant les tumeurs favorisent l'immunité anti-tumorale T-dépendante et les réponses aux immunothérapies (Broz et al., 2014). Aussi, il a été proposé que les cDC1 représentent la principale population de cellules présentatrices de l'antigène capable de stimuler les réponses anti-tumorales dans les modèles de tumeurs murines de manière dépendante de l'interféron de type I (Fuertes et al., 2011; Salmon et al., 2016). Les cDC1 jouent donc un rôle clé dans l'immunité anti-tumorale mais peuvent être dysfonctionnelles en raison du microenvironnement tumoral. De nombreuses stratégies d'immunothérapies visent à reprogrammer les cDC1 et restaurer leurs propriétés anti-tumorales et seront décrites dans le Chapitre 3.

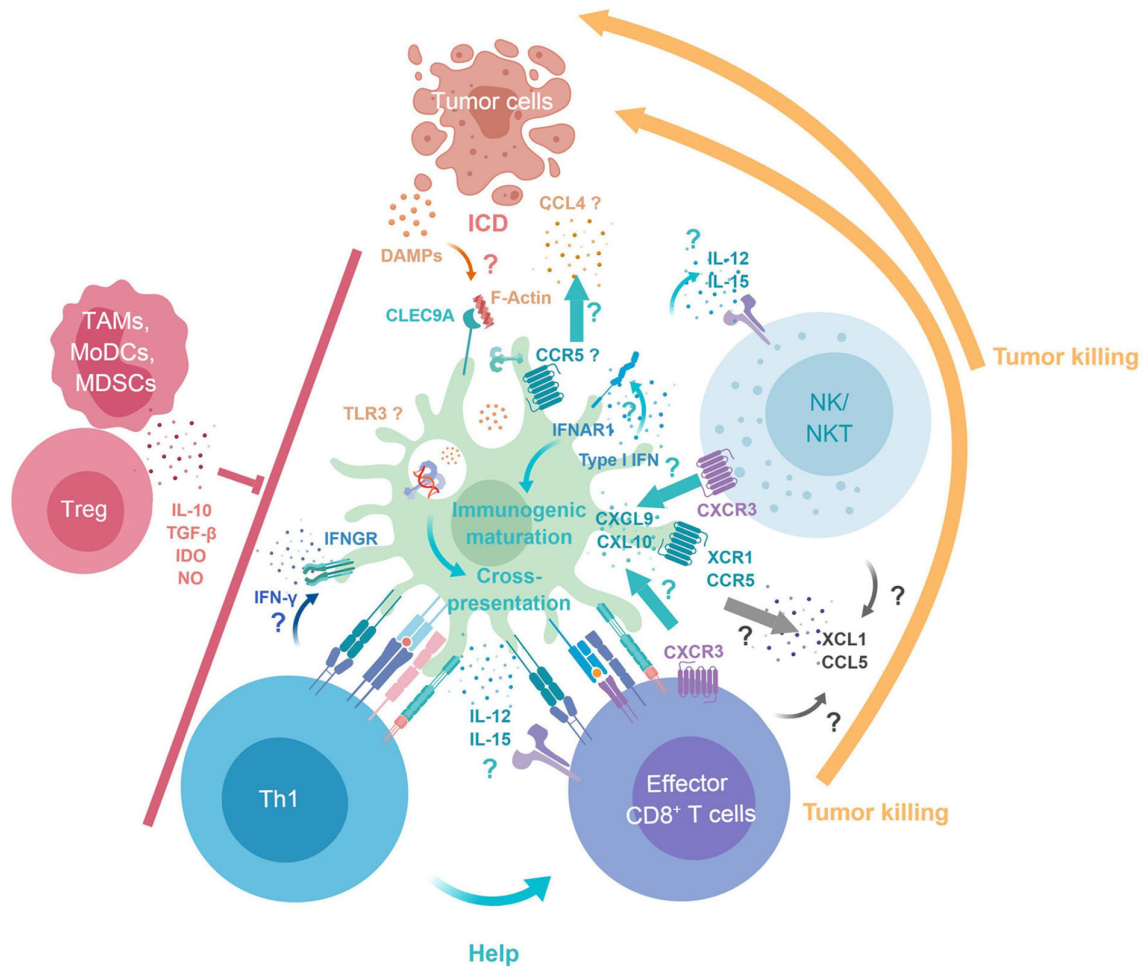


Figure 37. Rôle des cDC1 dans l'immunité anti-tumorale (Cancel et al., 2019)

3.5 Les cellules dendritiques conventionnelles de type 2

Généralités. Comme les cDC1, les cDC2 présentes dans le derme ont une morphologie amiboïde, caractéristique d'une cellule migratoire. Chez la souris les cDC2 correspondent aux cellules CD11b⁺. Chez l'Homme, les cDC2 expriment CD11b^{+high} et CD1c (également appelé BDCA1) (Collin et al., 2013). Les similitudes phénotypiques entre les cDC2 et les DC dérivées des monocytes ainsi que l'expression de CD1c par les lymphocytes B et d'autres sous-populations de DC a rendu difficile l'identification des cDC2 pour lesquelles nous ne disposons pas, à ce jour, de marqueur spécifique pour les caractériser. Bien que des études antérieures aient utilisé CD64 pour différencier les moDC des cDC2 dans le sang, il a récemment été découvert que les cDC2 expriment de faibles niveaux de ce marqueur chez l'Homme (Guilliams et al., 2016). Plus récemment, des analyses en Single Cell RNAseq ont mis en évidence une hétérogénéité des cDC2 et identifié de nouveaux marqueurs tels que CLEC10A, FCGR2B, FCER1A pour distinguer les différentes cellules assimilées aux cDC2 humaines (Villani et al., 2017). CLEC10A a été proposé comme nouveau marqueur spécifique des cDC2 chez l'Homme mais il existe chez la souris différentes isoformes de CLEC10A (Heger et al., 2018). Les marqueurs CD5, CD32B, CD163 et CD36 ont récemment été utilisés pour identifier différents groupes de cDC2, plus ou moins liés aux monocytes (Villani et al., 2018 ; Yin et al., 2017). Concernant l'expression de PRR, les cDC2 expriment fortement TLR2 mais expriment également d'autres PRR tels que RIG-I par exemple (Luber et al., 2010, Worah et al., 2016). Les différentes sous-populations de cDC2 semblent exprimer différents PRR. Par exemple, les cDC2 CD5^{high} expriment des niveaux élevés de TLR7 et 8 et les cDC2 CD5^{low} et CD32B⁺ expriment des niveaux plus élevés de STING que les cDC2 CD163⁺CD36⁺ (Villani et al., 2017 ; Yin et al., 2017).

Les cDC2 remplissent un large éventail de fonctions, comprenant principalement la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4 et l'amorçage des réponses Th2 et Th17. Elles peuvent également produire des niveaux élevés d'IL-12p70 induisant potentiellement la différenciation Th1 (Schlitzer et al., 2013). Les cDC2 humaines sont également capables de présenter un antigène soluble aux LT CD8 naïfs de façon comparable aux cDC1 (Chiang et al., 2016), cependant, contrairement aux cDC1, les cDC2 ne peuvent pas faire de présentation croisée d'antigènes issus de cellules en processus de mort cellulaire.

Ontogénie. Comme les cDC1, les cDC2 sont issues de précurseurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse. Leur développement est dépendent du facteurs FLT3L (comme les cDC1) mais dépendent également des facteurs de transcription IRF4 et IRF8 (Hambleton et al., 2011 ; Schlitzer et al., 2013). Les cDC2 transitent par le sang pour rejoindre le tissu.

Fonction des cDC2 dans le contexte tumoral. Binnewises et al., ont démontré en 2019 que les cDC2 présentes dans le microenvironnement tumoral sont capables d'induire l'activation des LT CD4 mais ne parviennent pas à induire leur différenciation *in situ*. Les auteurs ont également démontré que la déplétion des T reg dans leur modèle lève cette inhibition et restaure les fonctions d'éducation des LT CD4 par les cDC2 (Binnewises et al., 2019). Aussi, l'équivalent des cDC2 murines a été retrouvé chez l'Homme et les auteurs démontrent que la balance entre les cDC2 et les T reg chez les patients atteints de mélanome est un marqueur pronostic. Cette capacité des cDC2 à éduquer les LT CD4 dans le contexte tumoral a également été démontré dans un modèle de carcinome pulmonaire (Laoui et al., 2016). Dans ce modèle, les auteurs démontrent que les cDC2 dérivées des tumeurs et des ganglions drainants stimulent plus efficacement les LT CD4 *ex vivo* que les cDC1. De plus la vaccination avec des cDC2 activées réduit la croissance tumorale de façon comparable à celle observée avec les cDC1. Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, nous ne disposons pas de marqueur clair pour identifier les cDC2. De plus, le rôle de ces cellules n'a pas été défini dans le contexte des CEC. Ainsi le rôle des cDC2 dans le contexte tumoral doit être caractérisé plus finement, en utilisant notamment les nouveaux marqueurs identifiés et plus particulièrement dans les CEC.

3.6 Les DC dérivées des monocytes

Généralités. Les DC dérivées des monocytes (moDC) ont d'abord été découvertes dans des systèmes de culture tissulaire *in vitro* dans les années 1990. Ces systèmes de culture permettent d'induire l'acquisition d'une capacité de présentation antigénique dans des cellules souches et précurseurs sanguins CD34⁺ lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* avec des combinaisons variables de cytokines incluant le GM-CSF (Reid et al., 1992) et l'IL-4 (Sallusto et al., 1994). Les moDC, également appelées DC inflammatoires proviennent des monocytes (Segura et al., 2013), et sont détectées à la suite d'une inflammation, d'un cancer ou d'une infection et sont largement absentes à l'état d'équilibre. Chez la souris, les moDC expriment notamment CD11b, CD64, CD206, CD209 et CCR2. Chez l'Homme, elles expriment notamment CD1c, CD11b, CD64, CD206, CD209 et CCR2 (Wculek et al., 2020). Les DC dérivées des monocytes sont des DC inflammatoires dont les fonctions dépendent du signal inflammatoire initial. Chez la souris, elles peuvent ainsi exercer des fonctions antimicrobiennes, induire des réponses Th1, Th2 ou Th17 (Segura et al., 2013).

Ontogénie. Les moDC sont issues de la différenciation d'un monocyte en DC *in situ*. Les monocytes sont des cellules plastiques très hétérogènes qui patrouillent dans les vaisseaux sanguins. Ils se différencient, principalement pendant l'inflammation, en cellules dérivées de monocytes pouvant acquérir des caractéristiques de macrophages et de cellules dendritiques (Malissen et al., 2014 ; Segura et al., 2013). La différenciation d'un monocyte en moDC ou en macrophage dépend du microenvironnement (Figure 38) (Goudot et al., 2017).

Rôle des moDC dans le contexte tumoral. Il a été démontré que les moDC sont impliquées dans l'immunosuppression des tumeurs *via* la production d'IL-10 chez la souris (Augier et al., 2010). Segura et al., identifient et caractérisent en 2013 une population de moDC chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire ou du sein. Ces moDC stimulent plus efficacement les Th17 que les macrophages (Segura et al., 2013b). Il a été également montré dans un modèle de mélanome que les moDC jouent un rôle primordial dans la réponse au traitement par des agents immunostimulants (Kuhn et al., 2015). Aussi, les cellules CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high}, qui présentent donc certaines caractéristiques des moDC jouent un rôle dans la chimiothérapie anticancéreuse (Kuhn et al., 2013). Ces DC sont capables de capturer et présenter un antigène tumoral et lors d'un transfert adoptif dans une souris naïve, elles protègent la souris receveuse de la croissance tumorale (Ma et al., 2013).

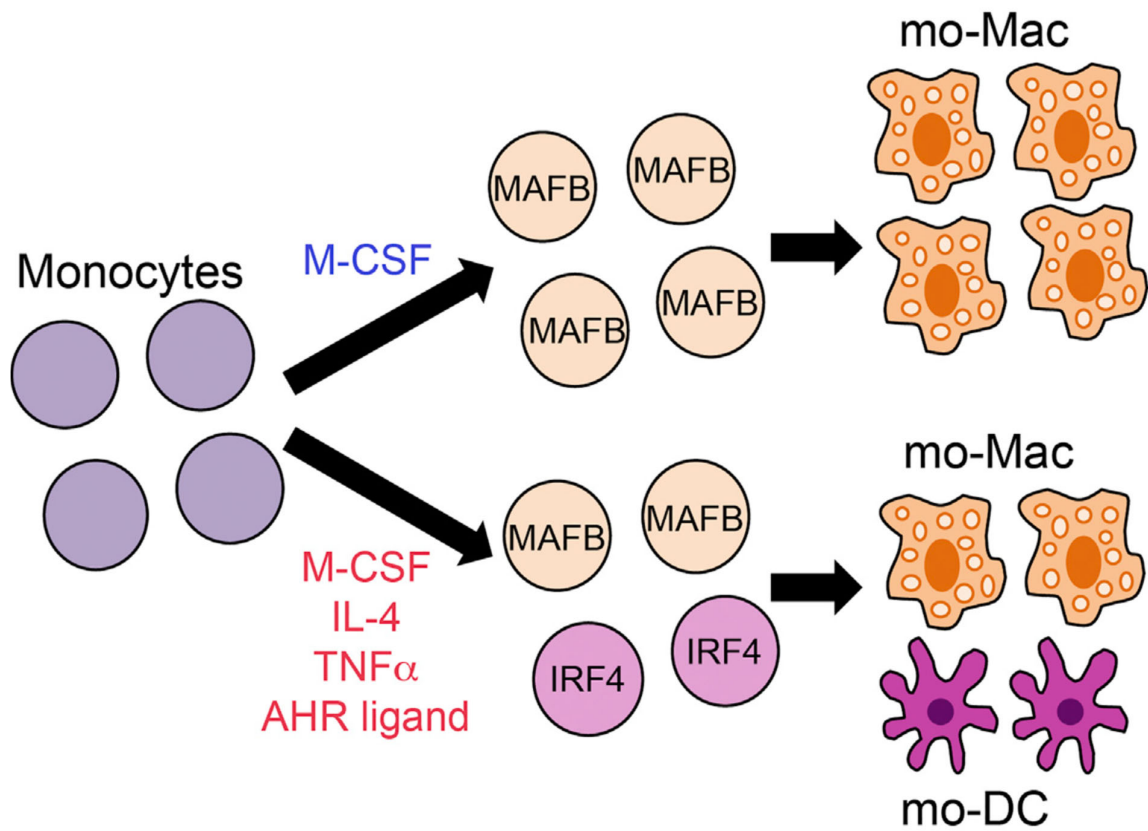


Figure 38. Différenciation d'un monocyte en macrophage ou moDC selon le microenvironnement (Goudot et al., 2017)

4. Les macrophages

4.1 Généralités

Les macrophages contribuent à l'homéostasie tissulaire et à la réparation des plaies en raison de leur capacité à phagocyter les débris, les organismes pathogènes et les cellules apoptotiques. Contrairement aux DC, les macrophages tissulaires sont incapables de migrer vers les ganglions lymphatiques après leur activation *in situ* (Tamoutounour et al., 2013). Les macrophages sont hétérogènes. Chez la souris, ils sont caractérisés par l'expression de F4/80 bien que ce marqueur soit également exprimé par certaines sous-populations de DC comme les cDC2 et les LC (Guilliams et al., 2016). CD64 et MERTK sont des nouveaux marqueurs identifiés en 2012 mais ces marqueurs ne sont pas suffisants pour apprécier l'hétérogénéité des macrophages (Gautier et al., 2012). Chez l'humain, les macrophages sont principalement caractérisés par l'expression de CD14, bien que ce marqueur soit également exprimé par les monocytes inflammatoires notamment (Haniffa et al., 2009). Les macrophages expriment des PRR comme les TLR, NLR ou récepteurs « scavengers » ou éboueurs en français, qui leurs permettent de reconnaître des pathogènes et lésions tissulaires (Canton et al., 2013). Leur rôle dans l'inflammation est notamment médié par leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-6 et TNF et de chimiokines comme CCL2 et IL-8 (Arango Duque & Descotaux 2014).

4.2 Ontogénie

Les macrophages consistent en un pool de cellules établies avant la naissance et un pool qui se développe après la naissance à partir de monocytes sanguins qui expriment des niveaux élevés de CCR2 et Ly6C.

4.2.1 Les macrophages dérivés des monocytes

Les monocytes sont des cellules du système phagocytaire mononuclée capables de générer d'autres cellules telles que les macrophages *in vitro* (de Bruijn et al., 1994) et *in vivo* (Kennedy & Abkowitz, 1998). Il est maintenant admis que les monocytes se déclinent en 2 sous-populations, redéfinies au début des années 2000 avec l'expression différentielle de différents

marqueurs de surface en utilisant une souris CX3CR1⁺/GFP. On distingue les monocytes classiques qui sont Ly6C^{high}CX3CR1^{low}CCR2⁺CD62L⁺ et les monocytes non classiques, aussi appelés patrouilleurs, dont le phénotype est Ly6C^{low}CX3CR1^{high}CCR2⁻CD62L⁻ (Geissmann et al., 2003) (Figure 39). L'équivalent chez l'Homme des monocytes classiques sont les monocytes CD14⁺CD16⁻ et les monocytes intermédiaires CD14⁺CD16⁺ (Passlick et al., 1989). La population CD14⁻CD16⁺ quant à elle correspond aux monocytes non classiques. De plus en plus d'évidences supportent l'hypothèse que les monocytes Ly6C^{low} dits patrouilleurs proviennent des monocytes classiques (Sunderkötter et al., 2004 ; Yona et al., 2013). A noter que la signalisation *via* les TLR semble impacter le comportement des monocytes patrouilleurs. En effet l'application de ligands de TLR2,5,7/8 augmente le recrutement des monocytes Ly6C^{low} (Imhof et al., 2017). Ainsi, les monocytes classiques sont considérés comme les cellules qui entrent dans le site inflammatoire et vont se différencier en macrophages ou moDC pour résoudre l'inflammation.

Lors de la différenciation en macrophages dermiques, les monocytes Ly6C^{high} perdent l'expression de CCR2, ce qui indique que la signalisation CCR2 n'est pas nécessaire à leur maintien dans le derme. Les macrophages du derme dérivés des monocytes chez la souris diffèrent des moDC par leur activité phagocytaire élevée, l'expression faible de CCR2 et l'expression élevée de CD64 et MERTK (Gautier et al., 2012 ; Tamoutounour et al., 2013).

Les monocytes dérivés de la moelle osseuse donnent naissance à des macrophages dans différents organes y compris la rate, le poumon, le foie mais pas le cerveau (Kennedy & Abkowitz 1998). L'absence de colonisation de ces cellules dérivées de la moelle osseuse dans le cerveau suggère une origine différente des macrophages du cerveau, appelés microglie. Au début des années 2000, plusieurs groupes posent le concept de macrophages d'origine embryonnaire capables d'auto-renouvellement dans la peau et le cerveau (Geissman et al., 2010 ; Ginhoux et al., 2010 ; Merad et al., 2002).

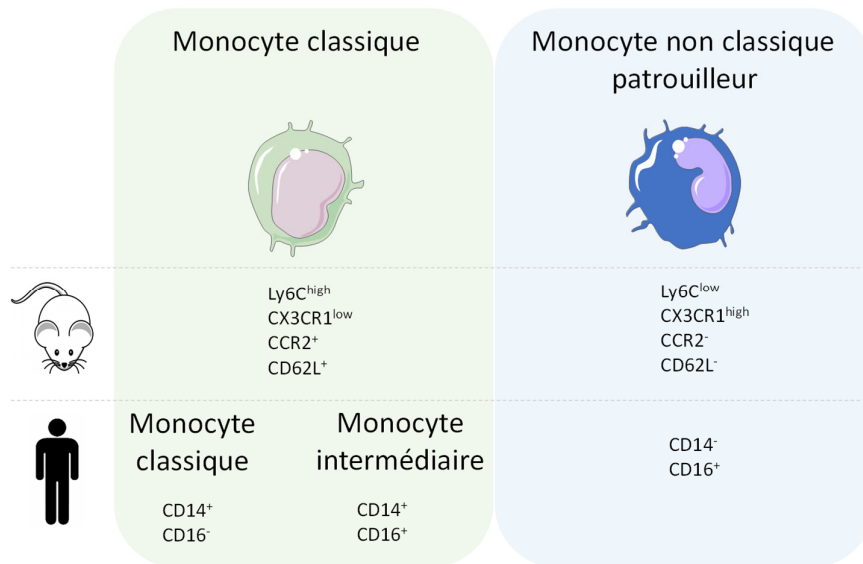


Figure 39. Marqueurs permettant l'identification des principales sous-populations de monocytes chez la souris et chez l'Homme.

4.2.2 Les macrophages d'origine embryonnaire

Le développement des LC dans l'épiderme (Merad et al., 2002), la microglie dans le cerveau (Ajami et al., 2007), une population de macrophages spléniques, les macrophages alvéolaires dans les poumons (Hashimoto et al., 2013) et les cellules de Kupffer dans le foie (Yona et al., 2013) sont complètement indépendants des monocytes circulant en conditions physiologiques. Ces macrophages d'origine embryonnaire se différencient à partir de trois vagues successives d'hématopoïèse (Figure 40). La première vague, dite « primitive » apparaît dans le sac vitellin entre E7.0 et E9.0. Ensuite, se produit l'hématopoïèse définitive au niveau de l'aorte, les gonades et le rein embryonnaire. Vers E10.5, les progéniteurs hématopoïétiques commencent à coloniser le foie fœtal, qui deviendra l'organe hématopoïétique majeur vers E11.5. Finalement, les cellules souches hématopoïétiques colonisent la rate et la moelle osseuse afin de former le stock de cellules hématopoïétiques chez l'adulte (Orkin & Zon 2008). En conditions physiologiques, les macrophages résidents du tissu indépendants des monocytes prolifèrent localement dans le tissu (Merad et al., 2002). En conditions inflammatoires au contraire, ces populations sont renouvelées à partir de monocytes dérivés de la moelle osseuse (Merad et al., 2002).

Les macrophages tissulaires ont donc plusieurs ontogénies. Certains macrophages sont différenciés avant la naissance et sont indépendants des monocytes en conditions physiologiques et d'autres sont dérivés des monocytes après la naissance. Dans la peau, on retrouve les macrophages dérivés des monocytes et les macrophages embryonnaires, appelés également macrophages résidents.

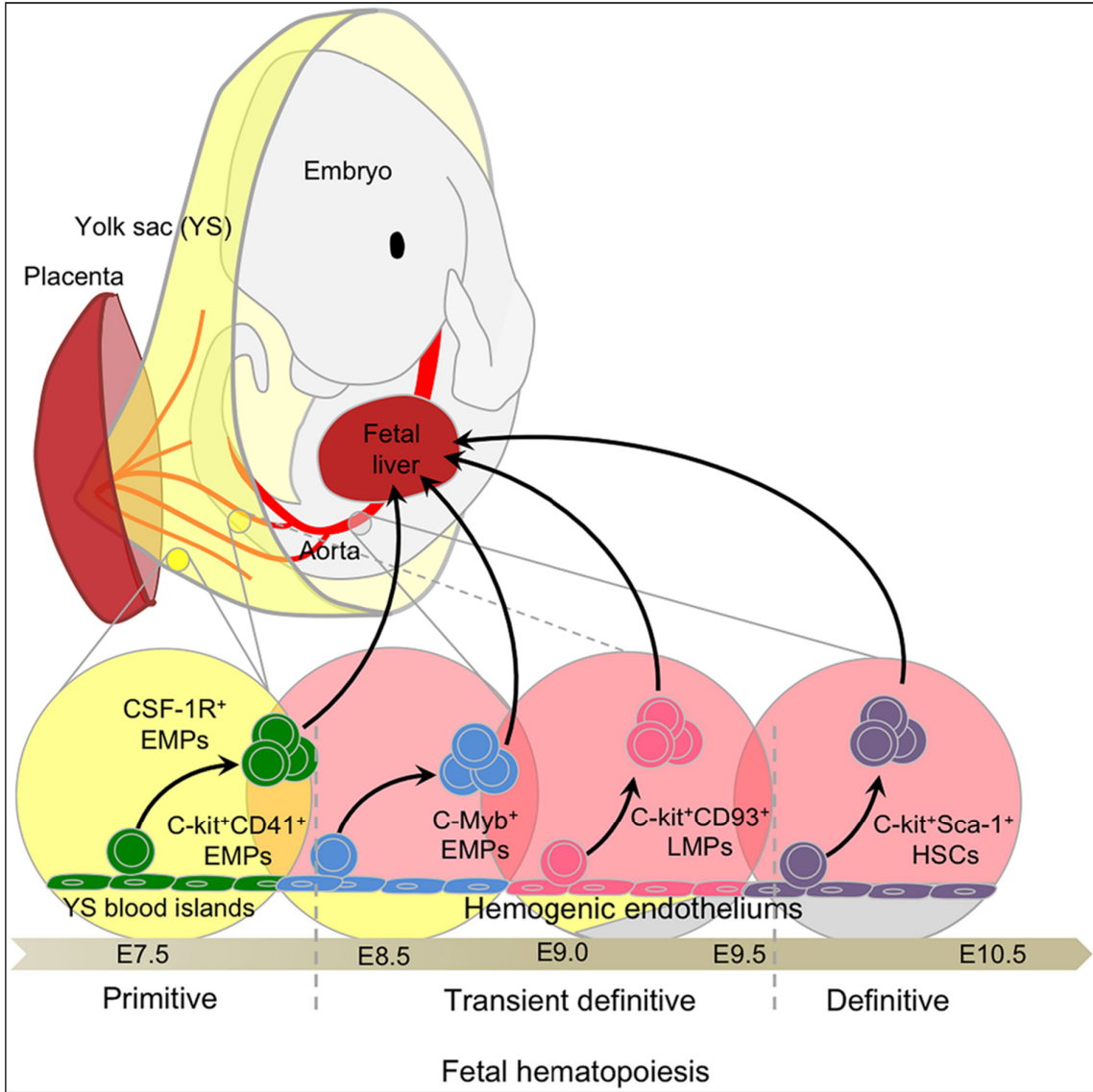
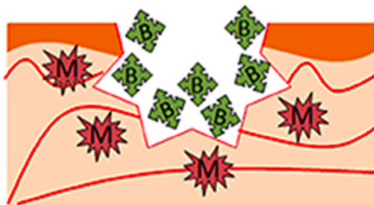


Figure 40. Ontogénie des macrophages murins d'origine embryonnaire (Hoeffel & Ginhoux 2015).

4.3 Fonctions des macrophages à l'homéostasie

Les macrophages cutanés jouent un rôle clé dans le processus physiologique de cicatrisation (Figure 41). On distingue les macrophages dits M2, qui présentent un phénotype anti-inflammatoire, et les macrophages dits M1, qui au contraire, jouent un rôle primordial dans l'inflammation. En conditions physiologiques les macrophages résidents sont majoritairement de type M2. Ils ont des spécialisations tissulaires et ils ont comme fonctions principales le maintien de l'homéostasie et la réparation tissulaire. Durant une blessure, les macrophages M1, participent à l'inflammation aiguë. Ils vont ensuite se polariser en macrophages dits M2, anti-inflammatoires, sous l'effet de médiateurs de l'environnement comme l'IL-4, IL-10 et TGF- β . Durant cette phase de cicatrisation, les macrophages M2 phagocytent les débris cellulaires et contribuent à toutes les étapes du remodelage tissulaire (Lucas et al., 2010). En particulier les macrophages M2 sont les principales cellules sécrétant du VEGF permettant la revascularisation lors de la cicatrisation (Willenborg et al., 2012). De plus la déplétion des macrophages et neutrophiles dans des souris CD11b-DTR et LysM-Cre-DTR, durant la phase de cicatrisation empêche la fermeture de la blessure et une reformation correcte de l'épiderme (Rodero & Khosrotehrani 2010). Ainsi, les macrophages peuvent adopter un phénotype pro-inflammatoire dit M1 ou anti-inflammatoire, dit M2 qui jouent des rôles clés et physiologiques dans le processus de cicatrisation. Aussi, les macrophages dermiques participent, à l'homéostasie, au bon développement des follicules pileux et au maintien de l'équilibre salin cutané et de la pression artérielle mais ces fonctions ne seront pas décrites dans ce manuscrit (Yanez et al., 2017).

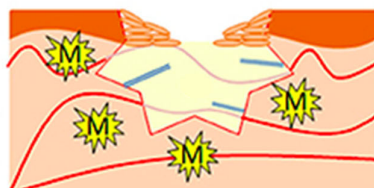
Inflammation



Macrophage M1 Pro-inflammatoire

Phagocytose des bactéries entrantes et cellules mortes
Recrutement de cellules immunitaires

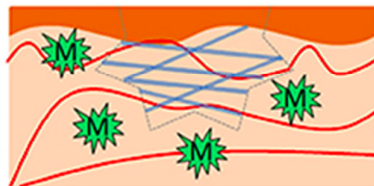
Prolifération



Macrophage M2 Pro-cicatrisation

Favorise la formation de la Matrice extra cellulaire
Favorise l'angiogénèse, re-épithélialisation et
Fermeture de la plaie
Supprime l'inflammation *via* la production d'IL-10

Remodelage



Macrophage M2 Pro-résolution

Sécrète des protéines MMP pour remodeler la
Matrice extra cellulaire
Sécrète du VEGF pour la revascularisation de la peau



Bactérie



Collagène



Vaisseau sanguin



Kératinocyte

Figure 41. Macrophages M1 et M2 et leur rôle dans le processus de cicatrisation
(Adapté de Krzyszczyk et al., 2018)

4.4 Fonctions des macrophages dans le contexte tumoral

Les macrophages tumoraux (TAM) sont abondants dans le stroma à tous les stades de la progression tumorale. *In vitro*, et dans des modèles animaux, il a été démontré que les macrophages éradiquent diverses lignées cellulaires tumorales (non CEC) (Baron-Bodo et al., 2005 ; Boyer et al., 1999 ; Fidler, 1974). Cependant, des études cliniques et des expériences sur des modèles murins indiquent que les TAM sont généralement polarisés par le milieu tumoral et adoptent un phénotype pro-tumoral, généralement de type M2, qui détourne leurs fonctions anti-tumorales et favorise l'invasion et la mobilité des cellules tumorales (Biswas et al., 2013 ; Pollard 2015), contrairement aux macrophages de type M1 qui sont décrits pour avoir des fonctions anti-tumorales (Figure 42).

Les TAM contribuent également aux métastases en initiant le développement de sites pré-métastatiques et en permettant l'extravasation, la survie et la croissance persistante des cellules tumorales (Qian et al., 2011) et en augmentant la vascularisation (Lin & Pollard 2007). De plus, la libération de cytokines telles que l'IL-1 α , IL-8, TNF, TGF- β et IL-10 par les TAM génère un environnement inflammatoire chronique propice à l'initiation et à la croissance des tumeurs (Coussens & Werb 2002 ; Pollard 2015). Il a également été démontré que les TAM expriment les ligands de PD-1 : PD-L1 et PD-L2, des molécules de co-inhibition des lymphocytes T (Lau et al., 2017 ; Rozali et al., 2012).

L'étude de Curiel et al., montre que les TAM peuvent également recruter les T reg (Curiel et al., 2004). Cette étude montre que chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, la production de CCL22 par les cellules tumorales et les TAM, mais pas de CCL17, conduit au recrutement de T reg.

Les TAM peuvent également séquestrer les LT CD8 effecteurs en périphérie de la tumeur, empêchant ainsi leur infiltration au cœur de la tumeur (Peranzoni et al., 2018). Il n'est donc pas surprenant que l'infiltration de TAM soit positivement corrélée à la présence de métastases et à un mauvais pronostic clinique dans une variété de cancers humains (Pollard et al., 2015). Chez les patients atteints d'adénocarcinomes de poumon, Zilionis et al., ont mis en évidence l'hétérogénéité des TAM et ont identifié 9 sous-populations de macrophages dont la signature génique est toujours associée à un mauvais pronostic (Zilionis et al., 2019).

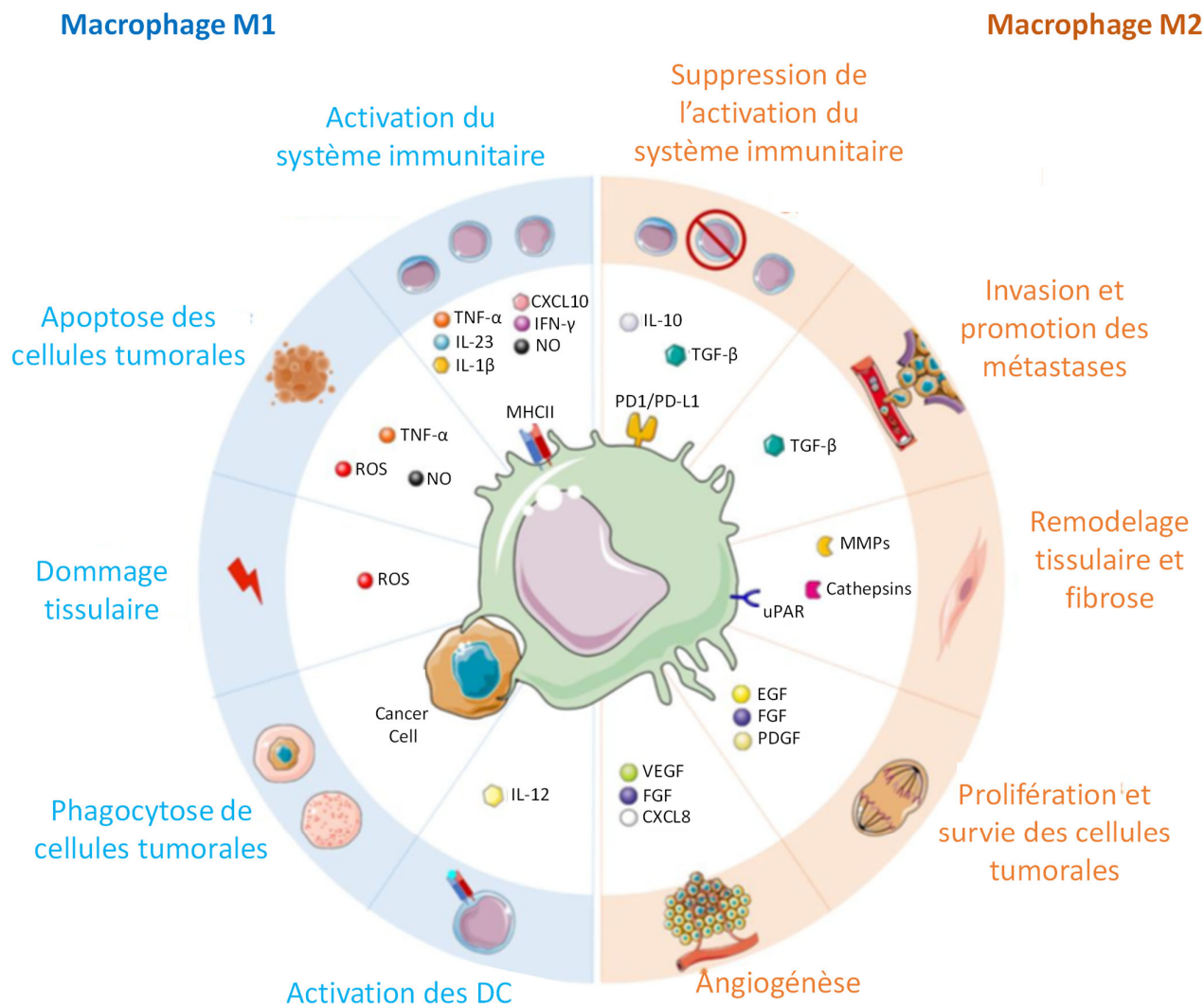


Figure 42. Fonctions des macrophages tumoraux (Adapté de Belgiovine et al., 2020)

Cependant, la compréhension du rôle joué par ces cellules dans le microenvironnement tumoral est complexe en raison de l'hétérogénéité de cette population dans les tumeurs mise en évidence récemment (Zilionis et al., 2019). Etzerodt et al., démontrent en 2019 que dans leur modèle de mélanome présentant une résistance aux anti-PD-1, le rôle anti-tumoral médié par les TAM est attribué à une sous-population de TAM exprimant spécifiquement CD163. Dans cette étude, la déplétion spécifique des macrophages CD163⁺ induite par l'injection de la toxine diphtérique dans des souris Cd163-iCre:Csf1r-LSL-DTR, entraîne une infiltration massive de LT cytotoxiques et la régression des tumeurs. Aussi, la déplétion des macrophages CD163⁺ était associée à un recrutement de monocytes inflammatoires participant à la régression des tumeurs. Cette étude met en évidence l'importance cruciale du ciblage de populations spécifiques et non d'une suppression globale des TAM pour rétablir l'immunité anti-tumorale (Etzerodt et al., 2019).

De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment, les macrophages ont deux origines ontogéniques : ils peuvent être dérivés des monocytes ou être résidents du tissu. Jusqu'à récemment, les TAM étaient presque exclusivement considérés comme des macrophages dérivés des monocytes. Il a été démontré que cette population de TAM dérivés des monocytes est hétérogène dans un modèle d'adénocarcinome mammaire (Movahedi et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs démontrent que les monocytes Ly6C⁺CMHII⁻ se différencient en macrophages F4/80⁺CMHII^{high} et F4/80⁺CMHII^{low}. De plus, ces TAM CMHII^{high} et CMHII^{low} présentaient des signatures génétiques distinctes correspondant respectivement à des macrophages de phénotype M1 et M2.

Cependant, des études récentes utilisant des modèles dits de « fate mapping » qui permettent de suivre le « destin » d'une cellule, c'est-à-dire les étapes clés de sa différenciation au cours du temps, ont permis d'identifier les macrophages résidents comme source potentielle de TAM. Ainsi Zhu et al., ont identifié dans leur modèle d'adénocarcinome pancréatique, des macrophages d'origine embryonnaire et des macrophages dérivés des monocytes avec des fonctions distinctes dans la progression de la pathologie (Zhu et al., 2017) (Figure 43). En effet les auteurs démontrent que les macrophages dérivés des monocytes façonnent la réponse immunitaire et jouent un rôle notamment dans la présentation antigénique. Au contraire, les macrophages résidents prolifèrent *in situ* et favorisent la progression tumorale ainsi que le phénomène de fibrose.

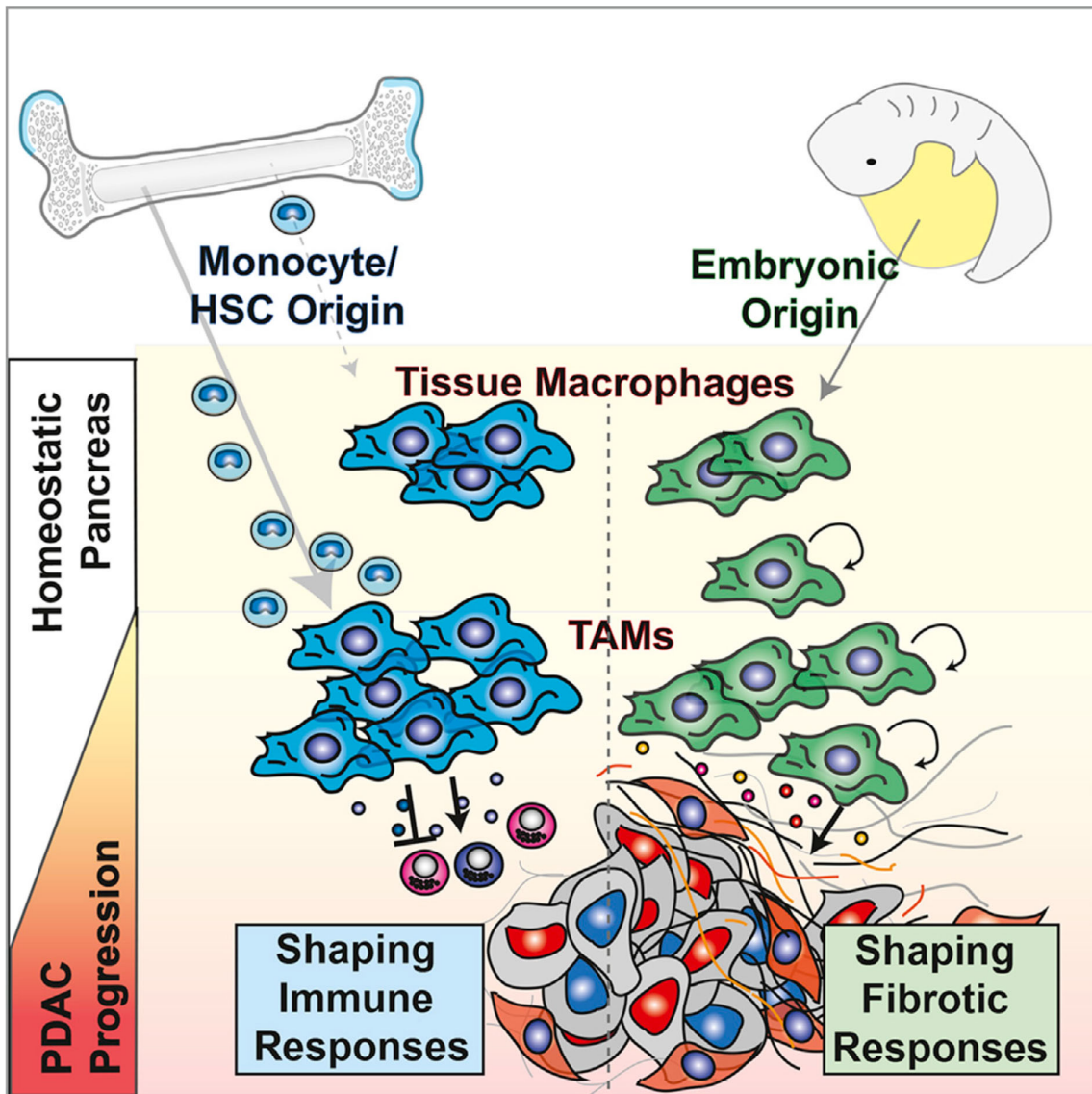


Figure 43. Fonctions des TAM en fonction de leur origine (Zhu et al., 2017)

De la même manière, Loyher et al., démontrent que les tumeurs pulmonaires induites par la lignée tumorale TC-1 sont infiltrées par des macrophages résidents et dérivés des monocytes dans le poumon. L'analyse transcriptomique de ces 2 populations révèle une différence d'expression de plus de 600 gènes entre les macrophages résidents et dérivés des monocytes dans ces tumeurs. Cette étude démontre que l'origine différentielle des macrophages impacte directement les fonctions des macrophages dans le microenvironnement tumoral.

Dans le contexte des CEC, il a été démontré que le dialogue entre les kératinocytes endommagés et les macrophages résidents peut représenter l'événement déclencheur du recrutement de leucocytes circulants conduisant au développement d'une inflammation chronique qui joue un rôle clé dans le développement du CEC (Cela et al., 2015). Les TAM infiltrant la tumeur, au cours de la carcinogenèse des CEC, sont probablement influencés par la signalisation paracrine, y compris TGF- β , et des concentrations relativement faibles d'IFN- γ et de TNF qui favorisent une réponse humorale Th2-M2 (par opposition à une réponse cytotoxique Th1-M1). Cette polarisation Th2-M2 conduit à une phagocytose inefficace et la présentation d'antigène avec acquisition d'un phénotype immunorégulateur (Antsiferova et al., 2017 ; Nissinen et al., 2016). Des macrophages ont été identifiés autour et dans le CEC excisé en plus grand nombre que dans la peau normale avec des preuves phénotypiques d'une polarisation M1 et M2 (Moussai et al., 2011). Il a également été démontré que les TAM infiltrant les CEC peuvent directement favoriser la croissance tumorale par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, ou encore en dégradant la matrice extra cellulaire *via* la production de MMP (Moussai et al., 2011). La repolarisation de la réponse anti-tumorale médiée par les TAM fait également l'objet de nombreuses stratégies d'immunothérapies. En effet, l'objectif est de reprogrammer la réponse vers une polarisation Th1-M1 et l'induction de cellules cytotoxiques anti-cancéreuses.

5. Les neutrophiles

5.1 Généralités

Les neutrophiles appartiennent à la famille des granulocytes, tout comme les basophiles, éosinophiles et mastocytes. Les marqueurs CD11b et Ly6G sont communément utilisés pour caractériser les neutrophiles chez la souris. Chez l'Homme, ce sont les marqueurs CD11b et CD66b notamment qui sont utilisés. Les neutrophiles sont les cellules immunitaires innées les plus abondantes. Ce sont parmi les premières cellules recrutées sur le site de l'inflammation et elles contribuent de manière significative à l'inflammation aiguë. Un défaut quantitatif ou qualitatif de l'activation des neutrophiles contribue à plusieurs types d'agranulocytose, entraînant par conséquent un risque élevé d'infection systémique. En revanche, une infiltration et une activation excessives des neutrophiles au site de l'inflammation peuvent endommager les tissus, entraînant une inflammation locale et systémique (Beyrau et al., 2012). Les neutrophiles peuvent initier et amplifier des réponses immunitaires par la libération de cytokines, de chimiokines et d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que les alarmines (Mantovani et al., 2011). Les neutrophiles ont également des fonctions cytotoxiques *via* leurs processus de dégranulation, production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de nétose (Figure 44). Les neutrophiles peuvent également favoriser le recrutement et l'activation de neutrophiles supplémentaires ainsi que de cellules immunitaires adaptatives, y compris les lymphocytes B et lymphocytes T.

5.2 Ontogénie

Le développement des neutrophiles se déroule dans la moelle osseuse et implique différentes étapes définies dont notamment le stade préneutrophile prolifératif CXCR4⁺CXCR2⁻ (promyélocytes), le stade neutrophile immature non prolifératif CXCR4⁺CXCR2^{low} (myélocytes, métamyélocytes, et bandneutrophiles). Enfin, ils se développent en neutrophiles segmentés CXCR2^{high} (Borregaard et al., 2010 ; Coffelt et al., 2016). Compte tenu de leur courte durée de vie et de leur nature post-mitotique, les neutrophiles matures sont constamment générés à partir de progéniteurs dans la moelle osseuse et relâchés dans la circulation avant d'infiltrer les tissus inflammés (Figure 44) (Silvestre-Roig et al., 2016).

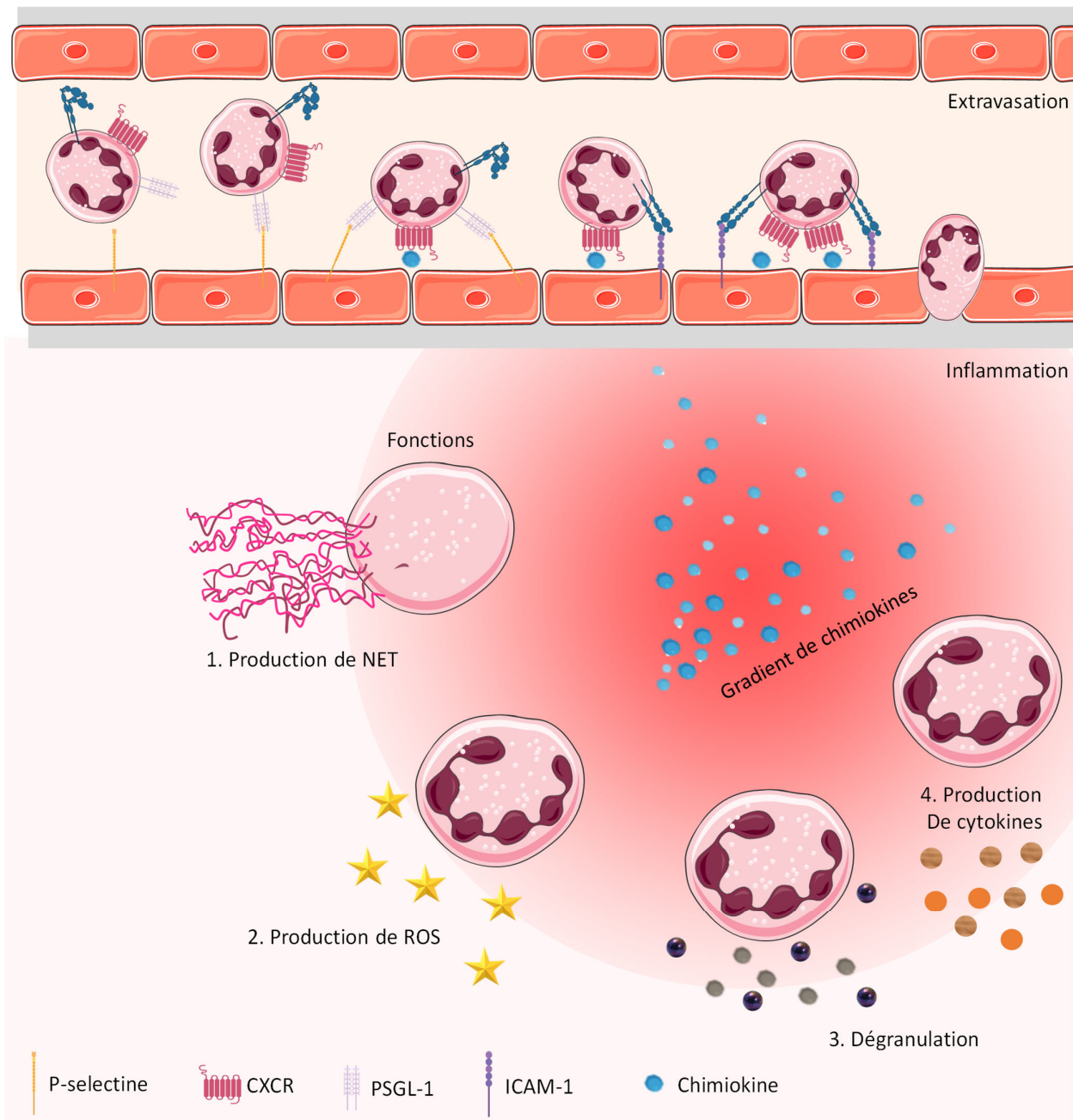


Figure 44. Extravasation et fonctions des neutrophiles sur le site inflammatoire

5.3 Recrutement

Les neutrophiles sont parmi les premières cellules recrutées sur le site de l'inflammation. Après génération dans la moelle osseuse et une brève période de circulation dans le sang périphérique, les neutrophiles migrent vers les tissus. Au cours de leur recrutement dans les organes, les neutrophiles adhèrent initialement à la paroi vasculaire puis transmigrent à travers l'endothélium vers le site cible (Ley et al., 2007). Ces événements ont été largement étudiés et ont révélé une cascade d'interactions moléculaires entre les neutrophiles et les cellules endothéliales (Ley et al., 2007). Cette migration est régulée par les chimiokines libérées par des cellules endothéliales activées, des fibroblastes, des macrophages et divers produits de micro-organismes en cas d'infection (Kobayashi & DeLeo, 2012). Les récepteurs liés peuvent être internalisés, le ligand digéré et le récepteur retourné à la surface cellulaire. Cependant, les neutrophiles peuvent modifier leur profil d'expression en cas de manipulation, pouvant ainsi générer des artefacts (Box 2).

La rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse dépend largement du récepteur de chimiokine CXCR4. La délétion de CXCR4 conduit au relargage des neutrophiles de la moelle osseuse dans la circulation sanguine (Eash et al., 2010). En revanche, le marqueur CD62L et le récepteur de chimiokine CXCR2 (qui fonctionne à travers ses ligands CXCL1/CXCL2), favorisent la libération de neutrophiles de la moelle osseuse (Eash et al., 2010). CXCR2 est un récepteur couplé aux protéines G dont les ligands sont les chimiokines CXC humaines à savoir CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8. Le récepteur CXCR2 murin possède un répertoire plus limité de ligands car la souris n'exprime pas CXCL6 et CXCL8. La fonction immunitaire principale de CXCR2 est la régulation de la migration des neutrophiles, car elle contrôle la sortie de ces cellules de la moelle osseuse et leur recrutement vers les sites inflammatoires (Cacalano et al., 1994 ; Eash et al., 2010). D'autres molécules ont été reconnues pour moduler le recrutement des neutrophiles : IL-22, IL-23 α , IL-19, IL-17, IL-1 α . La signalisation VEGF-VEGFR régule également l'infiltration de neutrophiles chez l'Homme et chez la souris dans les tissus pendant l'infection (Janela et al., 2019 ; Massena et al., 2015).

Box 2 : La difficulté de travailler avec les neutrophiles – Les artefacts

Dès qu'une aiguille est insérée dans une veine, le comportement des neutrophiles est modifié. Les artefacts *in vitro* ne peuvent être évités, mais, si possible, ils doivent être reconnus et minimisés. Les neutrophiles circulants sont des cellules exprimant un faible nombre de récepteurs au repos. En dehors de la circulation, le nombre et l'affinité des récepteurs peuvent être augmentés par simple incubation dans des milieux artificiels ou par des changements de température (Andersson et al., 1987 ; Fearon & Collins, 1983 ; Tennenberg et al., 1988). La contamination des globules rouges peut être éliminée par lyse hypotonique, mais cela introduit immédiatement plus d'artefacts. Des conditions hypotoniques, même pendant aussi peu de temps que 20 secondes, influencent la membrane des neutrophiles, et si le chlorure d'ammonium est utilisé, les gradients de pH dans les compartiments subcellulaires et l'homéostasie du calcium sont perturbés (Styrt & Klempner 1988). Pour la plupart des tests, les cellules sont ensuite suspendues dans un tampon contenant des cations divalents et 0,1% d'albumine, pour maintenir l'intégrité de la membrane cellulaire. Les techniques les plus récentes, telle que le Single Cell RNAseq doivent également être mises au point lorsqu'il s'agit d'étudier les neutrophiles. En effet, le nombre de transcrits dans les neutrophiles étant très faible, le seuil minimum de transcrit détecté doit être ajusté car ces cellules pourraient être exclues par inadvertance lors de l'utilisation des filtres de données couramment utilisés (Zilionis et al., 2019)

5.4 Fonctions dans le contexte tumoral

Leur courte durée de vie a fait que l'on n'a pas tenu compte du rôle des neutrophiles dans les tumeurs pendant très longtemps. Les neutrophiles sont traditionnellement considérés comme une population homogène de cellules. Cependant, des découvertes récentes ont élargi nos connaissances sur les rôles des neutrophiles car ces cellules présentent une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle dans divers troubles immunitaires et cancers et ces cellules ont la capacité de modifier leur programme de transcription en route vers le site inflammatoire (Beyrau et al., 2012 ; Evrard et al., 2018 ; Kolaczkowska & Kubes, 2013). Par homologie aux phénotypes M1 et M2 attribués aux macrophages pro-inflammatoires et anti-inflammatoires respectivement, une appellation N1, N2 a été donnée aux neutrophiles. Les neutrophiles tumoraux peuvent jouer des rôles pro ou anti-tumoraux (Figure 45).

5.4.1 Rôles pro-tumoraux.

Plusieurs études chez l'Homme et chez la souris révèlent que l'abondance des neutrophiles dans le microenvironnement tumoral est associée à la progression des tumeurs et à un mauvais pronostic (Evrard et al., 2018 ; Gentles et al., 2015 ; Rao et al., 2012). Chez les patients atteints d'adénocarcinomes de poumon, Zilionis et al., ont identifié 5 sous-populations de neutrophiles. Parmi ces différents clusters, la majeure partie des signatures géniques associée à l'infiltration de neutrophiles est de mauvais pronostic (Zilionis et al., 2019). Un nouveau ratio semble également être indicateur de la progression des cancers : le ratio Neutrophiles/Lymphocytes T. Dans les carcinomes hépatocellulaires, il a été montré que le ratio Neutrophiles/Lymphocytes T était supérieur en péri-tumoral et que ceci est corrélé négativement avec le pronostic (He et al., 2015). Il a également été démontré que les neutrophiles favorisent la progression tumorale en augmentant l'invasion et les métastases, en libérant des protéases (Ardi et al., 2007 ; Deryugina et al., 2020), en augmentant l'angiogenèse (Tazzyman et al., 2009) et en favorisant directement la croissance tumorale (Hattar et al., 2014 ; Queen et al., 2005 ; Wislez et al., 2003). De plus, il a été démontré que les neutrophiles limitent les réponses immunitaires anti-tumorales en supprimant l'activité des lymphocytes T CD8 (Kalyan & Kabelitz, 2014 ; Leliefeld et al., 2015 ; Pillay et al., 2013) et cellules NK (Spiegel et al., 2016). Il est intéressant de noter que la NETose a été détectée pour la première fois, il y a quelques années chez des individus atteints de cancer (Berger-Achituv et al., 2013 ; Demers et al., 2012). La NETose est généralement associée à une stimulation de la progression tumorale.

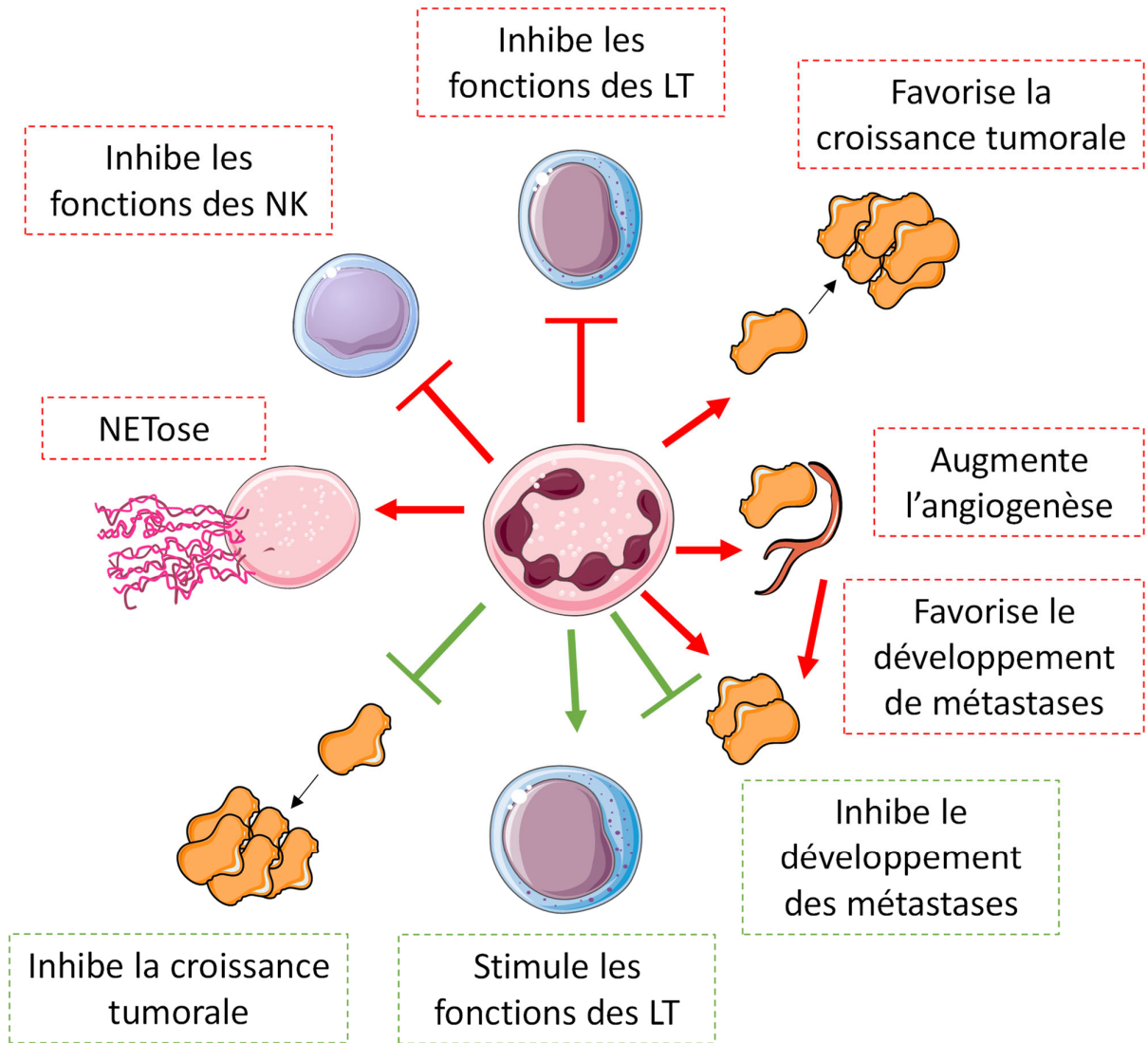


Figure 45. Fonctions pro-tumorales (en rouge) et anti-tumorales (en vert) des neutrophiles

5.4.2 Rôles anti-tumoraux

Cytotoxicité directe. Les neutrophiles sont également capables d'induire l'apoptose des cellules tumorales *via* la production de molécules cytotoxiques telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez l'Homme et chez la souris (Dallegrì et al., 1991 ; Takeshima et al., 2016). Une étude *réalisée in vitro* a notamment démontré que les neutrophiles producteurs de ROS détruisent plusieurs lignées tumorales et que cette fonction cytotoxique est spécifique des cellules tumorales car aucune cytotoxicité n'est observée contre des cellules primaires ou lignées immortalisées non transformées. Cela suggère que les cellules tumorales expriment des facteurs reconnus par les neutrophiles qui s'activent et deviennent cytotoxiques (Yan et al., 2014). Il a également été rapporté que les neutrophiles peuvent induire une cytotoxicité directe sur les cellules tumorales *via* la production d'espèces réactives de l'azote (NO) (Finisguerra et al., 2015), ou du ligand inducteur de mort cellulaire sTRAIL (Tecchio et al., 2004).

Inhibition de la croissance tumorale primaire et de la formation des métastases. L'étude de Blaisdell et al., met en évidence le rôle d'immunosurveillance des neutrophiles dans le développement des tumeurs précoces. En effet, les souris déficientes en neutrophiles (G-CSF-R KO) ont une croissance tumorale plus importante que les souris contrôles dans un modèle de tumeur utérine. Aussi, les auteurs démontrent que les neutrophiles producteurs de ROS et MMP-9 permettent de détacher les cellules nouvellement transformées de la lame basale et ainsi éviter leur expansion dans le tissu (Blaisdell et al., 2015). Aussi, des preuves récentes suggèrent que les granulocytes ont la capacité d'inhiber la formation de métastases pulmonaires dans un modèle expérimental de cancer du poumon (Granot et al., 2011).

Stimulation de l'immunité adaptative. Il a été démontré chez l'Homme que les neutrophiles tumoraux ont un phénotype plus activé que les neutrophiles sanguins chez les patients atteints de cancer du poumon. Ces derniers expriment fortement ICAM-1 ainsi que des récepteurs de chimiokines tels que CCR5, CCR7, CXCR2 ou CXCR4 et produisent des facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1, IL-9, MIP-1 α , et IL-6. Dans cette étude les neutrophiles tumoraux stimulent la prolifération des LT et leur production d'IFN- γ de façon comparable aux neutrophiles du sang (Eruslanov et al., 2014).

5.4.3 Rôle des neutrophiles dans les CEC

Peu de données ont été répertoriées sur le rôle des neutrophiles dans les CEC. Notre équipe a démontré en 2020 que la fréquence de neutrophiles augmente dans les lésions au fur et à mesure de la croissance tumorale dans un modèle de CEC induit par le carcinogène DMBA associé à l'agent inflammatoire PMA. Des analyses comparatives approfondies de l'expression génique ont identifié une signature d'expression génique différente entre les neutrophiles tumoraux et infiltrant la peau saine environnante. Les neutrophiles tumoraux présentent une signature génique associée à un phénotype pro-tumoral. De plus, dans un modèle de greffe intradermique de CEC, la déplétion *in vivo* des neutrophiles retarde la croissance tumorale et augmente de manière significative la prolifération des LT CD8 et leur production d'IFN- γ . Les fonctions pro-tumorales des neutrophiles sont assurées par une activité élevée de l'arginase, la production de ROS et de NO. Aussi, la taille des tumeurs est corrélée à l'expression de PD-L1 par les neutrophiles tumoraux (Khou et al., 2020) (Figure 46).

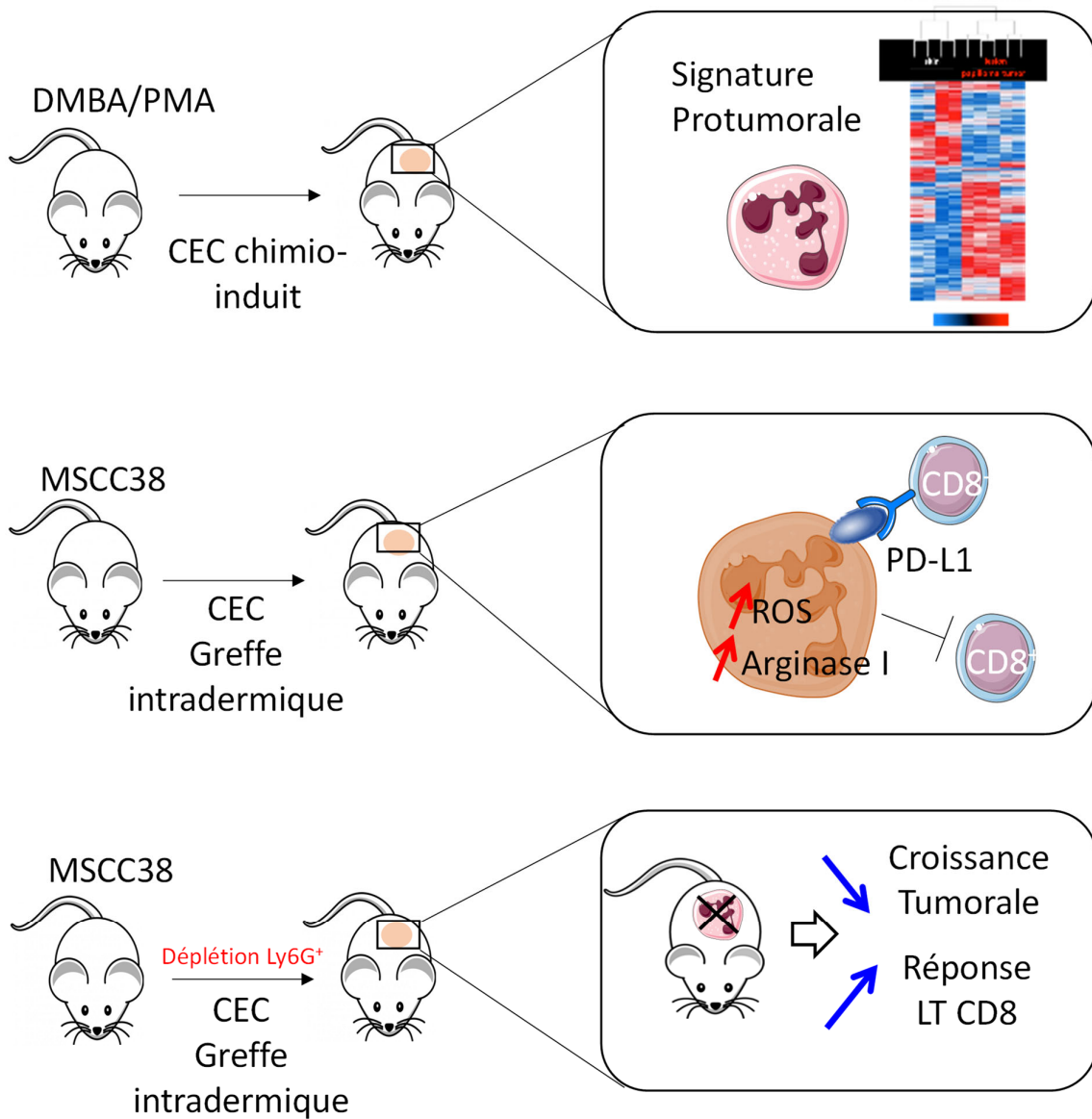


Figure 46. Résumé graphique de l'étude de Khou et al., 2020.

6. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)

Dans des conditions physiologiques, les précurseurs des cellules myéloïdes qui dérivent des cellules souches hématopoïétiques, se développent en cellules myéloïdes immatures qui se différencient ensuite en macrophages matures, cellules dendritiques ou granulocytes. En revanche, dans des conditions pathologiques, telles qu'un contexte inflammatoire, tumoral, infectieux ou auto-immun, une expansion des cellules myéloïdes immatures est observée. Ces dernières, ont un phénotype immature et une activité immunosuppressive et se différencient en cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) (Veglia et al., 2021).

Ces cellules inhibent fortement la réponse immunitaire (Figure 47). Ainsi, il a été démontré que lors de la transformation maligne suivant une inflammation chronique, les MDSC diminuent la réponse anti-tumorale en diminuant la production de cytokines par les macrophages, et en favorisant leur expression de facteurs immunosuppresseurs tels que l'arginase 1 et NO (Veglia et al., 2021). Ces composés inhibent directement la réponse anti-tumorale en supprimant l'activation des LT cytotoxiques et en diminuant l'expression de CMHII sur les cellules présentatrices de l'antigène (Melero-Jerez et al., 2016). Il a également été reporté que les MDSC contribuent à la dissémination des cellules tumorales en favorisant la transition épithéliale à mésenchymale (Toh et al., 2011). Les MDSC peuvent également induire l'apoptose des LT *via* l'interaction Galectine-9 (exprimé par les MDSC) et TIM3 (exprimé par les LT) (Gabrilovich & Nagaraj 2009). Hoechst et al., ont également révélé que les MDSC favorisent le développement et l'induction des T reg renforçant ainsi l'immunosuppression (Hoechst et al., 2011).

Nous ne disposons pas de marqueur clair pour identifier les MDSC. On distingue 2 familles de MDSC : les MDSC dérivées des monocytes (M-MDSC) et les MDSC dérivées des neutrophiles, ou « polymorphonuclear neutrophils » (PMN-MDSC) (Tableau 2). Les M-MDSC, dérivés des monocytes sont caractérisés par l'expression de CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} chez la souris et CD11b⁺CD14⁺HLADR^{-/lo}CD15⁻ chez l'Homme (Gabrilovich 2017 ; Sawanobori et al., 2008). Les PMN-MDSC, sont identifiés par les marqueurs CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} chez la souris et CD11b⁺CD14⁻CD15⁺ ou CD11b⁺CD14⁻CD66b⁺ chez l'Homme (Gabrilovich 2017 ; Sawanobori et al., 2008). Veglia et al., résumant dans une revue les nouveaux marqueurs et caractéristiques biochimiques des MDSC (Figure 48).

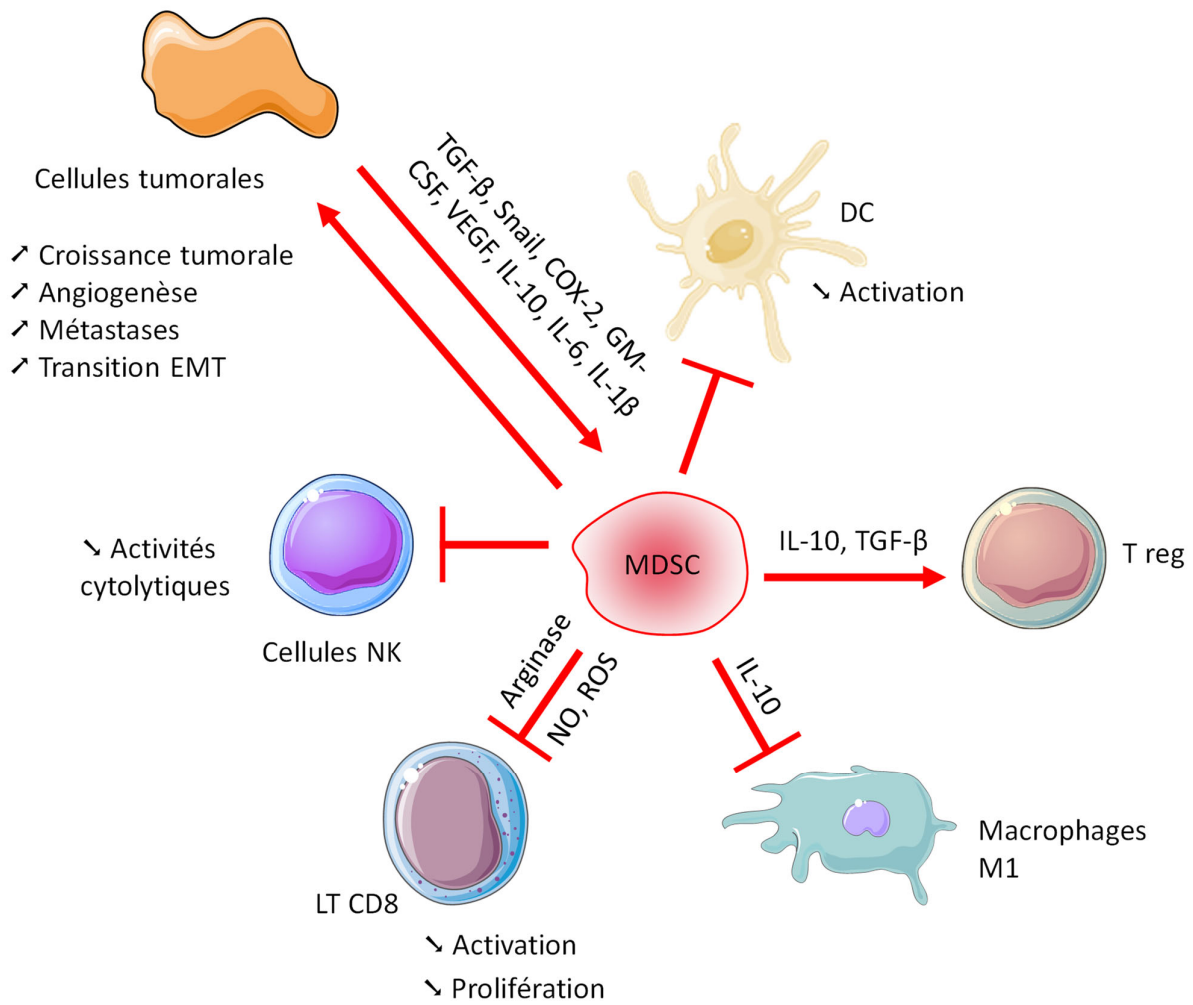


Figure 47. Fonctions des MDSC dans le contexte tumoral.
 Les signaux inhibiteurs sont représentés par un T alors que les signaux activateurs sont représentés par une flèche.

Table 1 | Comparison of basic characteristics of mDSCs and classical neutrophils and monocytes

Characteristic	Myeloid cell population			
	Neutrophils	Monocytes	PMN-MDSCs	M-MDSCs
Origin	CMP and granulocytic precursors	CMP and monocytic precursors	CMP, granulocytic precursors, monocytic-like precursors	CMP and monocytic precursors
Activation stimuli	Primarily bacterial and viral pathogens; TLR ligands, PAMPs and DAMPs; relatively short duration of activation		Prolonged exposure to cytokines released during chronic infection, inflammation, autoimmune diseases and cancer	
Activation process	Classical one-phase activation: rapid mobilization to tissues associated with compensatory myelopoiesis; fast degranulation, cytokine release, activation of phagocytosis and respiratory burst		Pathological two-phased activation: myelopoiesis and conditioning in the bone marrow, conversion to pathologically activated cells in tissues; modest myelopoiesis, altered cell metabolism	
Standard phenotypical markers in mice	CD11b ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ^{lo}	CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ^{hi}	CD11b ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ^{lo}	CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ^{hi}
Standard phenotypical markers in humans	CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ /CD66b ⁺ ; high-density cells	CD14 ⁺ CD15 ⁻ HLA-DR ^{hi}	CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ /CD66b ⁺ ; low-density cells	CD14 ⁺ CD15 ⁻ HLA-DR ^{lo/-}
Novel markers in mice	NA	NA	CD11b ⁺ Ly6G ⁻ CD84 ⁺	CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ^{hi} CD84 ⁺
Novel markers in humans	NA	NA	CD15 ⁺ /CD66b ⁻ CD14 ⁻ LOX1 ⁺ ; CD15 ⁺ /CD66b ⁻ CD14 ⁻ CD84 ⁺	CD14 ⁺ /CD66b ⁻ CD84 ⁺
Maturity and fate	Mostly mature cells; lifespan in steady-state conditions ~ 2–3 days	Differentiation to macrophages in tissues	Mostly immature cells, with variable presence of mature cells depending on type of disease; very short lifespan	Differentiation to macrophages in tissues; in cancer, differentiation to tumour-associated macrophages
Major developmental factors	GM-CSF, G-CSF, SCF	GM-CSF, M-CSF, FLT3L, SCF	High levels of GM-CSF, VEGF, IL-6, IL-1 β , adenosine, HIF1 α	High levels of M-CSF, VEGF, adenosine, HIF1 α
Main regulators of suppressive functions	NA	NA	STAT3, STAT1, STAT6, NF- κ B, ER stress pathways, cAMP, COX2, PTGES, CEBP β , IRF8, Rb1 downregulation, oxidized lipids	

CMP, common myeloid progenitor; DAMP, damage-associated molecular pattern; ER, endoplasmic reticulum; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; HIF1 α , hypoxia inducible factor 1 α ; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; M-MDSC, monocytic MDSC; NA, not applicable; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PMN, polymorphonuclear; PTGES, prostaglandin E synthase; SCF, stem cell factor; TLR, Toll-like receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Tableau 2 : Comparaison des monocytes, neutrophiles, M-MDSC et PMN-MDSC (Veglia et al., 2021)

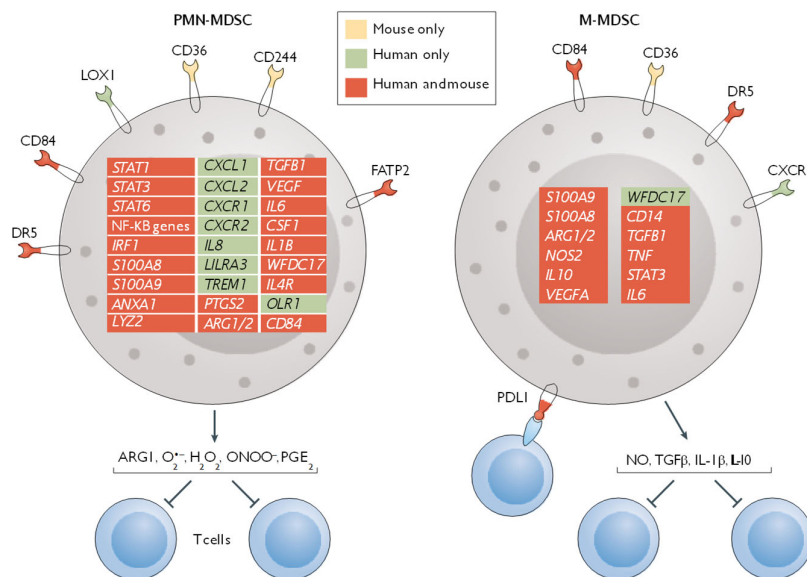


Figure 48. Nouveaux marqueurs utilisés pour distinguer les monocytes, neutrophiles, M-MDSC et PMN-MDSC

Ne disposant pas de marqueur clair pour distinguer les M-MDSC des monocytes et les PMN-MDSC des neutrophiles on peut se demander si une distinction entre ces populations a du sens. Il semblerait en effet que ces cellules représentent des populations distinctes. L'activité immunosuppressive, caractéristique intrinsèque des MDSC ne peut être induite de façon aussi importante dans les monocytes ou neutrophiles *in vitro* en stimulation avec des PAMP, des DAMP ou des cytokines pro-inflammatoires (Gabrilovich 2017). Il a également été démontré que les PMN-MDSC humains ont un profil génomique unique qui les distingue des neutrophiles chez le même patient. Au contraire, les neutrophiles de donneurs sains et de patients cancéreux ont des expressions géniques très similaires (Condamine et al., 2016). La spécificité protéomique (Choksawangkarn et al., 2016 ; Gato et al., 2015) et transcriptomique (Friedlander et al., 2012) des MDSC a également été mise en évidence chez la souris. Il semblerait également que les PMN-MDSC et M-MDSC expriment des niveaux supérieurs d'arginase 1 et de NO que les monocytes et neutrophiles (Gabrilovich 2017). Cependant les études portent généralement sur les MDSC totales, sans distinctions des M-MDSC et des PMN-MDSC. Enfin, la majorité des études ont été menées chez la souris et peu d'évidences démontrent l'existence de ces cellules immatures chez l'Homme.

Chapitre 3 : Les immunothérapies

Dans le Chapitre 2, nous avons mis en évidence le rôle primordial du système immunitaire dans le contrôle de la croissance tumorale. Cependant, les cellules tumorales détournent les fonctions des cellules immunitaires et parviennent à échapper à leur contrôle. Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à reprogrammer les fonctions immunitaires afin de les rendre fonctionnelles et efficaces dans l'élimination des tumeurs. On appelle ces stratégies thérapeutiques des immunothérapies.

A. Les principales immunothérapies utilisées pour traiter les cancers

1. Stimulation de la réponse LT CD8 par transfert adoptif de LT

L'une des stratégies thérapeutiques actuelles vise à rétablir les capacités d'un patient à éliminer les cellules cancéreuses en lui administrant directement des LT cytotoxiques activés. Cette méthode repose sur l'expansion *in vitro* de LT. Appelée « transfert adoptif de cellules », cette stratégie présente de nombreux avantages. Elle permet :

- De développer une réponse spécifique à la tumeur en limitant la cytotoxicité contre les cellules saines.
- Une expansion robuste des LT après activation et leur migration vers le site tumoral, permettant ainsi le traitement des métastases et de la micro-invasion
- Une potentielle immunité mémoire (Perica et al., 2015).

C'est dans les années 1960 que la première étude chez le rat a démontré une efficacité potentielle du transfert adoptif de cellules dans un modèle de sarcome (Delorme, 1964). La première étude clinique ayant évalué l'efficacité du transfert adoptif de LT chez l'Homme a été effectuée sur 20 patients atteints de mélanome métastatique. Dans cette étude, les LT infiltrant la tumeur ont été stimulés *in vitro* avec de l'IL-2 après résection du mélanome. La régression objective a été observée chez 50% des patients environ (Rosenberg et al., 1988). Cependant, les premiers essais n'ont pas permis de démontrer la persistance de ces LT transférés, probablement en raison d'une population de T reg persistante et d'une expansion limitée des cellules transférées chez l'hôte (Antony et al., 2005 ; Gattinoni et al., 2005). Dans certains cas, le transfert se fait dans des patients préalablement lymphodéprimés. Avec cette technique,

l'expansion des LT cytotoxiques a lieu *in vitro*, ce qui permet de manipuler génétiquement les LT avant perfusion (Figure 49). Ainsi certains TCR de haute affinité pour des antigènes clés ont été clonés dans des rétrovirus pour induire des LT hautement spécifiques (Johnson et al., 2006 ; Maude et al., 2014 ; Morgan et al., 2006 ; Perica et al., 2015) générant ainsi des LT avec des récepteurs chimériques : les CAR T cells. Cependant, les coûts importants associés à la technologie requise pour la culture et l'expansion des LT transférés ainsi que l'effet anti-tumoral difficilement prévisible restent des obstacles importants pour la mise en œuvre de cette technique en clinique.

2. Stimulation directe de la réponse LT CD8

2.1 Les points de contrôle immunitaire

Les points de contrôle immunitaire, ou immune checkpoint (IC) sont des protéines dont le rôle est d'inhiber l'activation incontrôlée de l'auto-immunité. Cependant, les tumeurs peuvent détourner ces voies afin de supprimer la réponse immunitaire anti-tumorale adaptative. Bien que des travaux récents aient découvert de nombreuses voies de contrôle, les deux voies moléculaires qui ont conduit à des essais de médicaments réussis impliquent les molécules co-inhibitrices des LT : CTLA-4 et PD-1. C'est en 1995 que Krummel démontre que CTLA-4 est un IC (Krummel & Allison, 1995) et en 1999, Nishimura démontre le rôle inhibiteur de PD-1 chez la souris (Nishimura et al., 1999). A partir de ces observations, différents traitements ont été développés, les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire ou « Immune Checkpoint Inhibitors » (ICI), tels que l'ipilimumab le premier anti CTLA-4 et le nivolumab, le premier anti-PD-1, afin de contrôler l'activation des LT (Figure 50).

2.2 Thérapies combinées

Suite au succès clinique des ICI en monothérapie, les thérapies combinées qui associent des agents avec des mécanismes d'action distincts ont augmenté le succès thérapeutique dans divers cancers. Par exemple, la thérapie combinant ipilimumab et nivolumab a conféré un avantage de survie significatif chez les patients atteints de mélanome métastatique et de carcinome rénal avancé qui leur a valu un accord d'utilisation par la FDA (Food and Drug Administration) (Motzer et al., 2018 ; Wolchok et al., 2013, 2017). La synergie des thérapies anti CTLA-4 et anti-PD-1 n'est pas surprenante. En effet ces 2 IC régulent l'immunité anti-tumorale de manière complémentaire (Fife & Bluestone, 2008). Cependant, la combinaison d'ICI augmente les effets secondaires chez les patients (Wolchok et al., 2017).

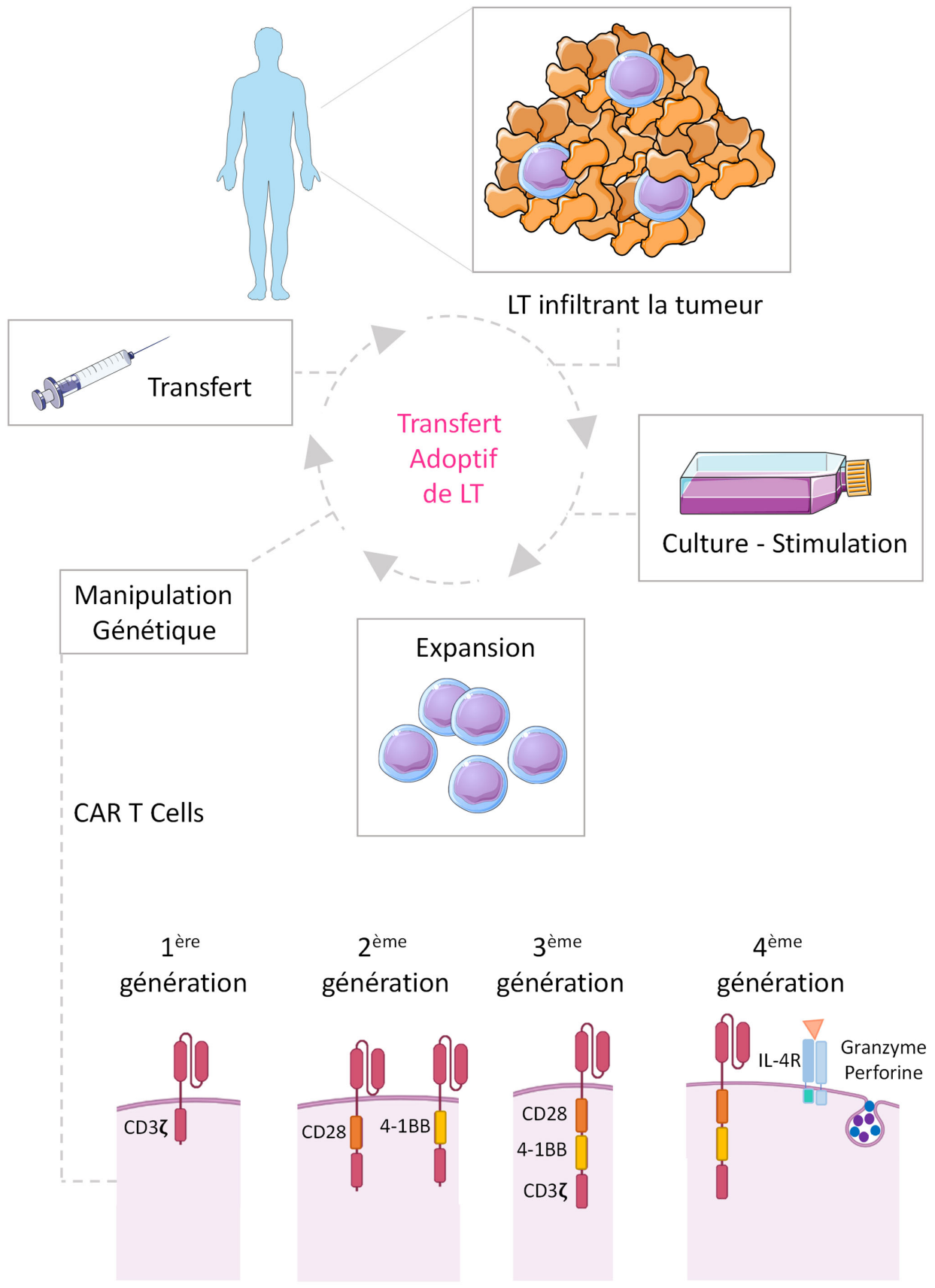


Figure 49. Transfert adoptif de LT avec ou non manipulation génétique et génération de CAR T Cells. L'évolution des CAR T Cells est également présentée.

Régulation de la réponse anti-tumorale médiée par les LT grâce à l'utilisation des Inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI)

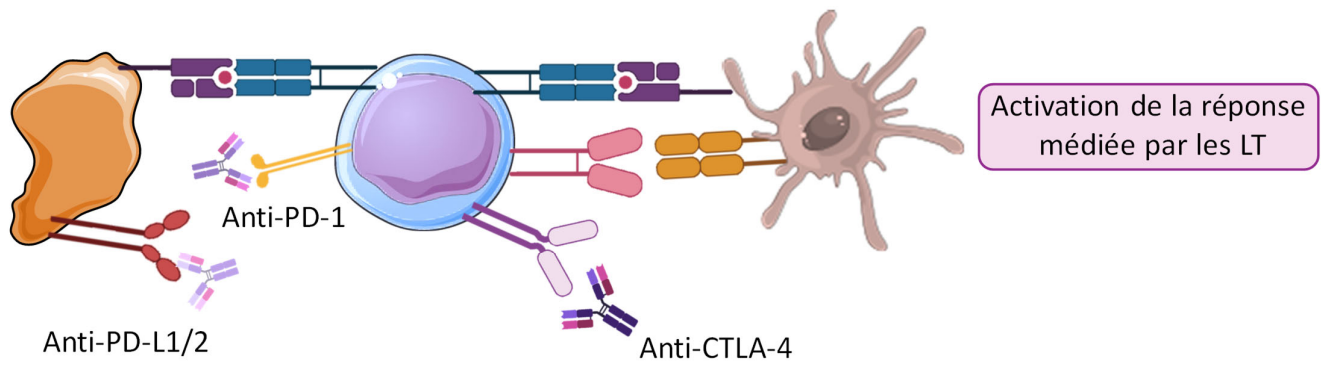
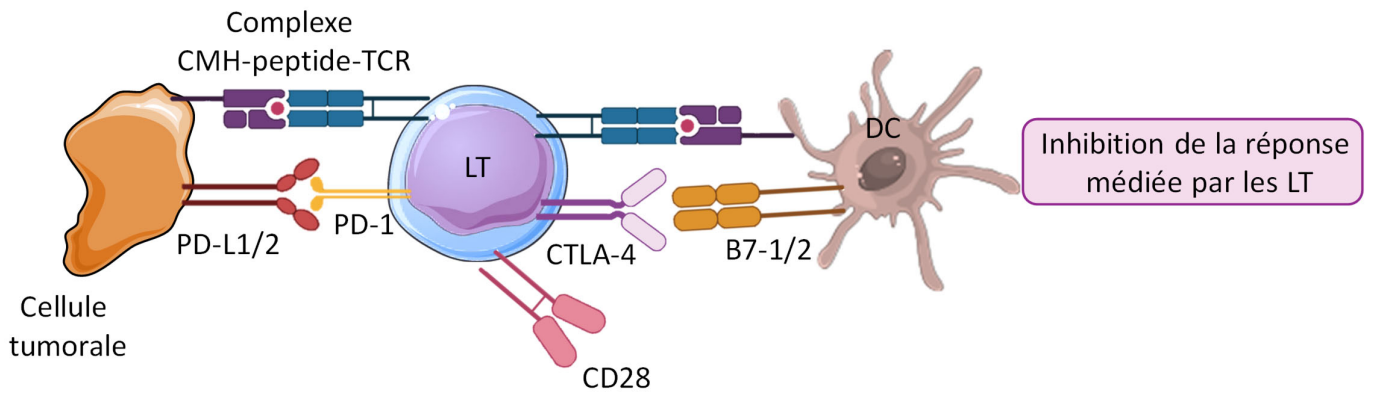


Figure 50. Principe des Inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI)

L'utilisation des ICI en combinaison avec de la radiothérapie est également une stratégie de choix pour le traitement des tumeurs récalcitrantes. La radiothérapie seule, joue un rôle ambivalent dans la réponse immunitaire anti-tumorale. D'une part, elle augmente la diversité des réponses anti-tumorales médiées par les LT en générant des néoantigènes, d'autre part elle atténue la réponse immunitaire, par l'induction de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales (Ngwa et al., 2018). Ainsi, et sur la base de données précliniques, l'association de la radiothérapie avec des bloqueurs de l'axe PD-1 et/ou CTLA-4 représente une combinaison synergique de choix (Twyman-Saint Victor et al., 2015), notamment pour les patients atteints d'une pathologie métastatique (Ngwa et al., 2018 ; Postow et al., 2012).

2.3 Nouvelles cibles pour les ICI

Les recherches actuelles portent sur de nouveaux points de contrôle immunitaires tels que LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3), TIM-3 (T cell Immunoglobulin 3), VISTA (V domain, Immunoglobulin Suppressor of T cell Activation), B7-H3 et TIGIT (T cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif domain (Figure 51) (Friedlaender et al., 2019 ; Marin-Acevedo et al., 2018 ; Tagliamento et al., 2020).

Comme PD-1, **LAG-3** est un marqueur d'épuisement des LT, qui indique un pronostic moins bon pour le patient dont les LT expriment ce marqueur (Deng et al., 2016). De multiples inhibiteurs ont été développés contre LAG-3, notamment une protéine de fusion LAG3:Ig et des anticorps anti-LAG3. Lors d'un essai clinique sur des patients atteints de carcinome rénal et d'adénocarcinome pancréatique, ces médicaments n'ont pas eu l'effet escompté en monothérapie, bien qu'ils permettent d'augmenter la fréquence de LT spécifiques de la tumeur (Desai et al., 2021). Par contre, en combinaison avec une chimiothérapie, le paclitaxel, utilisée pour traiter les patientes atteintes du cancer du sein métastatique, la protéine de fusion LAG3:Ig induit une réponse dans 50% des patientes (Brignone et al., 2010).

B7-H3 est fortement exprimé dans de nombreux types de tumeurs, notamment le mélanome, carcinome pulmonaire, le cancer de la prostate, du pancréas, de l'ovaire ou colorectal (Marin-Acevedo et al., 2018). Un anticorps anti-B7-H3 a été développé et testé dans une étude clinique de phase I pour traiter des patients atteints de mélanome, cancer de la prostate et divers types de tumeurs BH-H3⁺ (Powderly et al., 2015). Dans cette étude, la pathologie s'est stabilisée durant plus de 12 semaines et la taille de la tumeur diminue (2 à 69%) dans divers types de tumeurs.

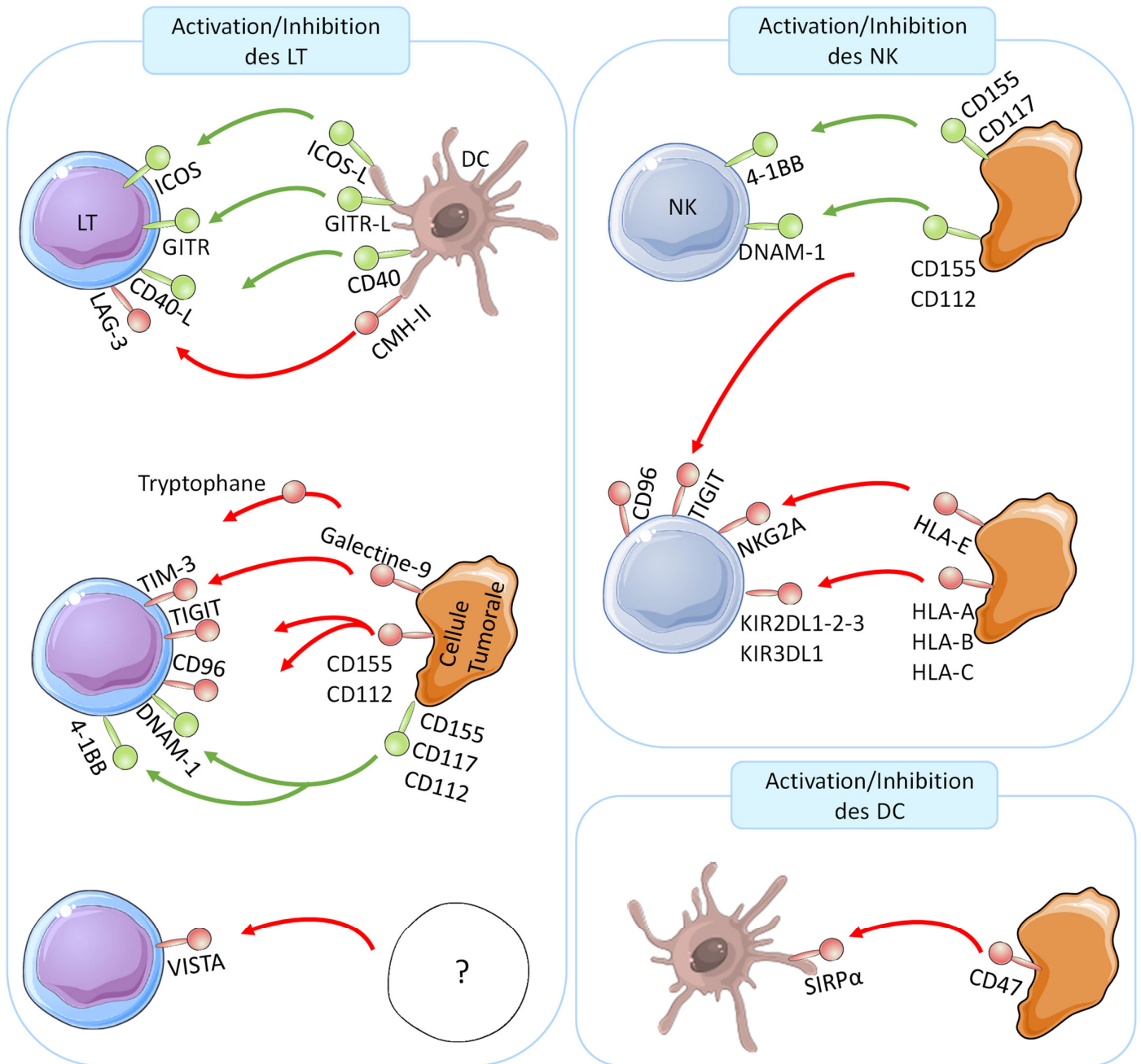


Figure 51. Différentes voies de signalisation pouvant être ciblées par des ICI. Les signaux activateurs sont représentés en vert. Les signaux inhibiteurs sont représentés en rouge.

Enfin, il a été montré que le blocage de **TIGIT** augmente l'effet des ICI préexistants et restaure les fonctions des LT spécifiques dans différents modèles de tumeurs (Anderson et al., 2016; Chauvin et al., 2015).

La stimulation des récepteurs de co-stimulation des LT, y compris ICOS (Inducible Costimulator), TNFRSF4 ou CD134 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 4), TNFRSF9 ou 4-1BB, GITR (Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor), ou encore CD27 peut également amplifier l'effet des immunothérapies. Cela a été démontré dans des études précliniques et dans des études cliniques de stade précoce (Donini et al., 2018 ; Finney et al., 2004 ; Imai et al., 2004 ; Kowolik et al., 2006 ; Maher et al., 2002 ; Marin-Acevedo et al., 2018).

Actuellement, le blocage de ces nouveaux points de contrôle immunitaires, autres que CTLA-4 ou l'axe PD-1, n'a pas encore montré d'avantages cliniques majeurs en monothérapie, mais permettent d'augmenter les effets des traitements préexistants lorsqu'ils sont utilisés en thérapie combinée.

3. Stimulation indirecte de la réponse LT CD8

3.1 Thérapie vaccinale

Bien qu'ils puissent cibler les tumeurs chaudes, les vaccins sont particulièrement prometteurs pour sensibiliser les tumeurs froides dont l'initiation de la réponse adaptative est défailante. Les vaccins thérapeutiques contre les cancers ciblent une ou plusieurs des 3 classes d'antigènes tumoraux : les antigènes tumoraux spécifiques de la tumeur, surexprimés dans la tumeur, ou exprimés de nouveau dans la tumeur (Desai et al., 2021). La vaccination contre les néoantigènes tumoraux se fait généralement *via* l'utilisation de vaccins peptidiques (Figure 52). Ces-derniers permettent la vaccination contre des antigènes spécifiques des cellules tumorales, plutôt que des vaccins à cellules entières. De plus, l'utilisation de plusieurs peptides dans un seul vaccin est possible et montre une meilleure efficacité que les vaccins à peptide unique (Slingluff et al., 2007 ; Walter et al., 2012). Les vaccins à acide nucléique ont également généré un intérêt grandissant et certains essais cliniques incluent à présent des vaccins à ARNm et ADN (Coxon et al., 2020 ; Hu et al., 2018 ; Sahin et al., 2017).

Les vaccins à cellules dendritiques sont générés *ex vivo*. Les DC sont activées, puis chargées en antigènes à présenter aux LT (Hu et al., 2018). Les vaccins DC sont étudiés dans des essais cliniques pour le cancer de la prostate, le mélanome, le carcinome à cellules rénales, le gliome et le cancer du côlon (Hu et al., 2018). Des travaux récents suggèrent de plus en plus que les tumeurs présentent une hétérogénéité génomique significative au sein des différents types de tumeurs et au sein même des tumeurs individuelles et qu'il est crucial d'adapter spécifiquement la thérapie à chaque patient (Ott et al., 2017 ; Sahin et al., 2017). A présent, des algorithmes permettent d'identifier comme cibles vaccinales des néo-antigènes candidats à partir d'un échantillon d'un patient donné afin de fabriquer un vaccin adapté à ce patient (Figure 53) (Waldman et al., 2020). Il a été démontré que ces vaccins personnalisés peuvent générer des réponses LT CD4 et LT CD8 spécifiques de la tumeur chez les patients atteints de mélanome ou glioblastome (Carreno et al., 2015 ; Hilf et al., 2019 ; Johanns et al., 2019 ; Sahin et al., 2017).

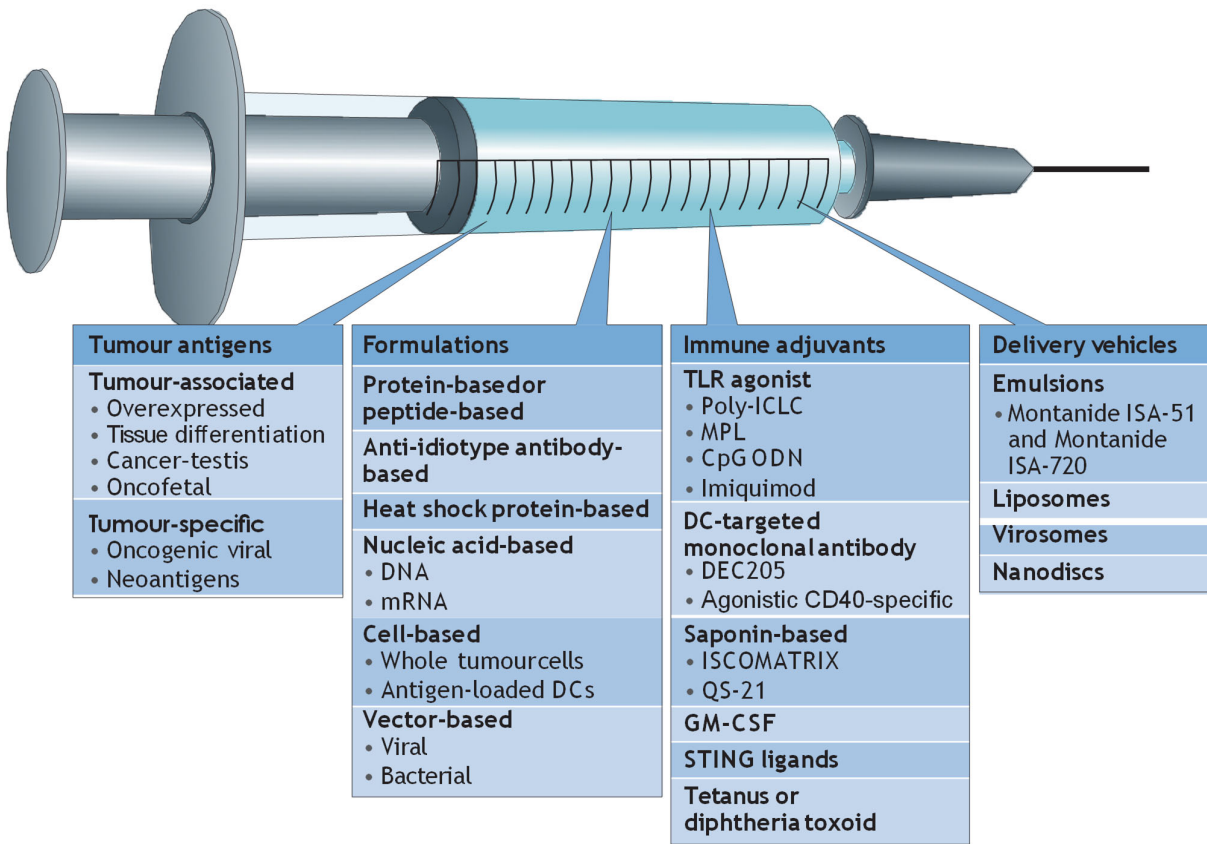


Figure 52. Formulation des vaccins anti-cancéreux (Hu et al., 2018)

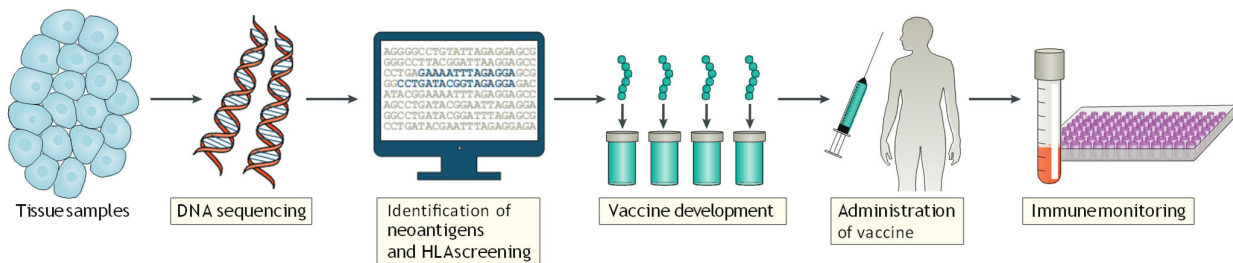


Figure 53. Élaboration d'un vaccin personnalisé (Waldman et al., 2020)

3.2 Restauration des capacités d'éducation des LT par les DC

Les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles qui ont la capacité d'éduquer les lymphocytes T CD8 cytotoxiques, acteurs clés de l'immunité anti-tumorale. Comme mentionné dans le Chapitre 2, le microenvironnement tumoral peut affaiblir les fonctions des DC. Certaines immunothérapies se focalisent sur la restauration des capacités des DC à induire une immunité anti-tumorale adaptative robuste. Différentes stratégies peuvent être mises en œuvre à cet effet, telles que l'administration de facteurs capables de recruter ou activer directement les DC (Wculek et al., 2020). Parmi les molécules capables d'influer directement l'activation des DC, nous nous focaliserons dans la suite de ce manuscrit sur le rôle de l'IL-12 et l'IL-10 dans la génération de DC anti-tumorales fonctionnelles.

3.2.1 Administration systémique d'IL-12

L'une des façons de rétablir les capacités d'éducation des LT par les DC, est l'application d'IL-12, cytokine clé impliquée dans le développement des LT CD4 Th1 et LT CD8 cytotoxiques qui jouent un rôle primordial dans l'immunité anti-tumorale (Figure 54). Depuis la découverte de l'IL-1 en 1953, les scientifiques ont cherché à utiliser les cytokines exogènes pour manipuler le système immunitaire des patients afin de contrôler le développement des tumeurs (Bennett, 1953). Il faut attendre 1986 pour qu'une thérapie cytokinique, à base d'IFN- α , soit acceptée par le FDA pour traiter les patients atteints de cancer (Floros & Tarhini, 2015). Depuis, des centaines d'études ont évalué plus de 40 cytokines sur des modèles précliniques. Actuellement, seulement 2 cytokines sont approuvées en tant qu'immunothérapie en monothérapie pour un nombre limité d'applications. L'IL-12 en tant qu'immunothérapie cytokinique en monothérapie, a été testée dans une dizaine d'études cliniques entre 1997 et 2004 (Atkins et al., 1997 ; Bajetta et al., 1998 ; Lenzi et al., 2002 ; Little et al., 2006 ; Motzer et al., 1998 ; Rook et al., 1999 ; van Herpen et al., 2005). Malheureusement l'efficacité du traitement aux doses tolérées est minime. Bien que l'IL-12 ait démontré une activité anti-tumorale robuste dans des études précliniques et un potentiel immunostimulant puissant chez l'Homme, l'administration systémique de cette cytokine s'est avérée extrêmement toxique chez les patients. Dans un essai clinique de phase II, une dose maximale de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ a entraîné des effets secondaires graves chez 12 des 17 patients et la mort de 2 patients (Leonard et al., 1997). Ainsi, les résultats décevants au cours des essais cliniques ainsi que la cytotoxicité importante de cette stratégie

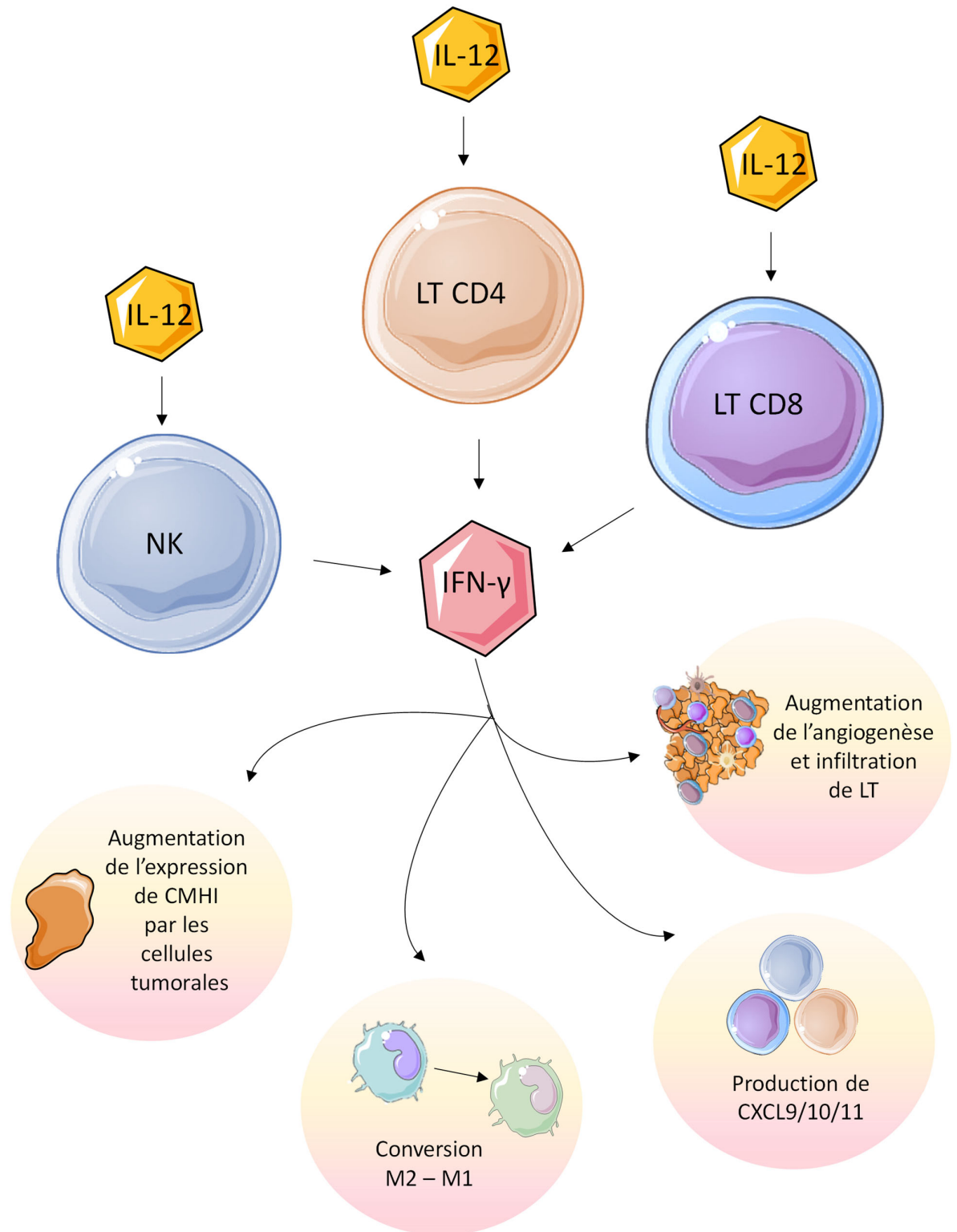


Figure 54. Rôles de l'IL-12 dans l'immunité anti-tumorale

thérapeutique a freiné l'enthousiasme basée sur cette stratégie thérapeutique administrée par voie systémique.

3.2.2 Administration locale de l'IL-12

A présent, les recherches portent sur une administration locale de l'IL-12 afin d'augmenter le taux de réponse chez les patients et diminuer la toxicité. L'administration locale d'IL-12 présente 5 avantages (Figure 55) :

Premièrement, elle améliore la distribution de la cytokine dans le temps et l'espace par rapport à une administration systémique. En effet, l'échec des immunothérapies à base d'IL-12 en étude clinique peut être au moins partiellement attribué à l'incapacité de l'IL-12, dans des doses tolérées par l'Homme en systémique, d'atteindre des concentrations thérapeutiques suffisantes dans les tumeurs humaines. Ainsi, l'application locale d'IL-12 augmenterait considérablement la concentration de la cytokine sur le site tumoral.

Deuxièmement, cela permet d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale systémique à partir d'une réponse immunitaire initiée localement. Des études chez la souris ont démontré que l'administration locale d'IL-12 peut générer une mémoire immunologique systémique et adaptative, capable d'inhiber les métastases et de prévenir les récurrences tumorales (Smith et al., 2015 ; Vo et al., 2014).

Troisièmement, l'IL-12 est une cytokine pléiotrope dont les actions dépendent du contexte. Ainsi, lorsque l'IL-12 est administrée par voie systémique, elle induit une augmentation rapide des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF et l'IL-6. Cette « tempête cytokinique » combinée à une diminution rapide des lymphocytes du sang périphérique, des monocytes et neutrophiles peut être mortelle (Leonard et al., 1997). Au contraire, lorsque l'IL-12 est appliquée localement, les cytokines pléiotropes ont le potentiel d'engager de multiples mécanismes effecteurs anti-tumoraux. Par exemple, l'IL-12 augmente l'activation et les fonction des LT CD8 cytotoxiques et des cellules NK et induit la production des IFN- γ qui à son tour, peut tuer directement les cellules tumorales, inhiber l'angiogenèse et stimuler les cellules NK et les LT CD8 cytotoxiques (Figure 54) (Bromberg et al., 1996 ; Hayakawa et al., 2002 ; Hollenbaugh & Dutton, 2006)

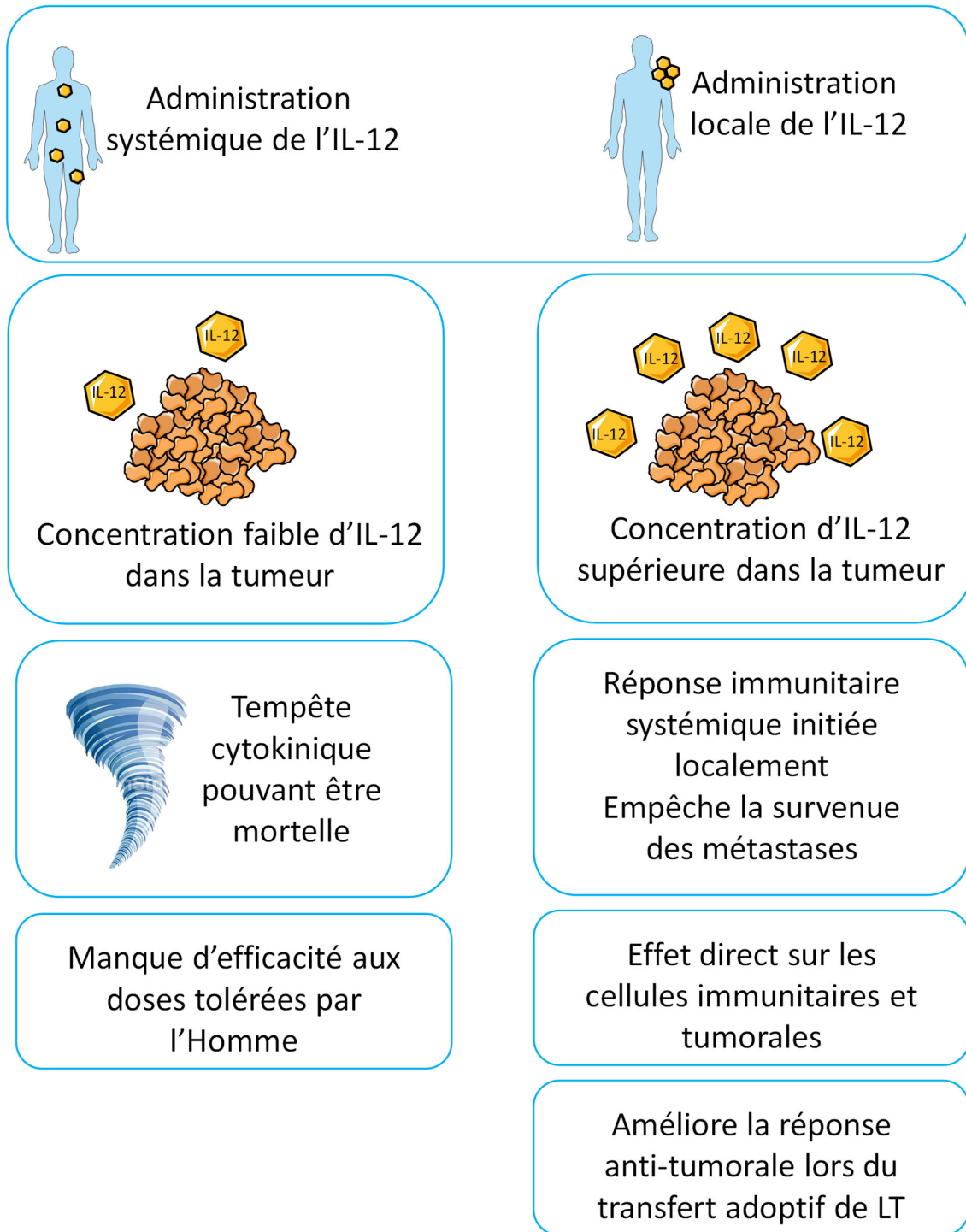


Figure 55. Les avantages de l'application locale de l'IL-12 en comparaison à son application systémique

Ensuite, des taux élevés d'IL-12 administrés localement peuvent inverser l'immunosuppression du microenvironnement tumoral associée notamment à la présence de TGF- β , IL-10, IDO ou L-arginase. En effet, des concentrations intra-tumorales élevées d'IL-12 peuvent provoquer l'apoptose et l'élimination des T reg dans les tumeurs (Kilinc et al., 2006) ou encore convertir les TAM pro-tumoraux en TAM anti-tumoraux (Watkins et al., 2007).

Enfin, l'IL-12 améliore la réponse anti-tumorale lors du transfert adoptif de LT chez la souris (Díaz-Montero et al., 2011 ; Rubinstein et al., 2012). De plus, une persistance accrue des LT perfusés ainsi qu'une expression accrue du récepteur à l'IL-2 (IL-2R α), ICOS, OX40, granzyme B et IFN- γ ont été observées (Lin et al., 2019 ; Rubinstein et al., 2012). Les LT cytotoxiques murins stimulés avec de l'IL-12 avant transfert contrôlent plus efficacement des tumeurs que les LT cytotoxiques stimulés avec l'IFN- α avant transfert (Gerner et al., 2013). Enfin, ces LT stimulés avec l'IL-12 expriment des niveaux inférieurs de PD-1 par rapport aux LT stimulés avec l'IFN- α (Gerner et al., 2013).

Ainsi, diverses stratégies ont été développées afin de permettre une administration locale d'IL-12 (Nguyen et al., 2020). Une autre possibilité est de stimuler les DC afin de les rendre capables de produire de l'IL-12, notamment par des agonistes des TLR. Dans la suite de ce chapitre nous nous focaliserons sur le rôle des agonistes de TLR9 dans l'induction d'une immunité anti-tumorale efficace.

3.2.3 Restauration de la production d'IL-12 par les DC par un agoniste de TLR9

TLR9 est un PRR intracellulaire (Figure 56). L'utilisation systémique et locale des agonistes du TLR9 en monothérapie et en association avec la chimiothérapie, la radiothérapie, la thérapie ciblée et l'immunothérapie a été explorée dans plusieurs modèles précliniques au potentiel thérapeutique prometteur. Dans des modèles syngéniques de tumeur du poumon, du sein ou encore du colon, les agonistes de TLR9 ont inhibé la croissance tumorale en monothérapie, en association avec la chimiothérapie, ou en association avec une thérapie ciblant l'EGFR (Damiano et al., 2006 ; Wang et al., 2006 ; Yuan et al., 2018). Dans ces diverses études, les agonistes du TLR9 ont été administrés par voie topique, sous-cutanée, intra-tumorale ou systémique. Les injections intra-tumorales induisent généralement un rejet de la tumeur et, dans certains cas, de puissants effets sur les tumeurs distantes non traitées (Karapetyan et al., 2020).

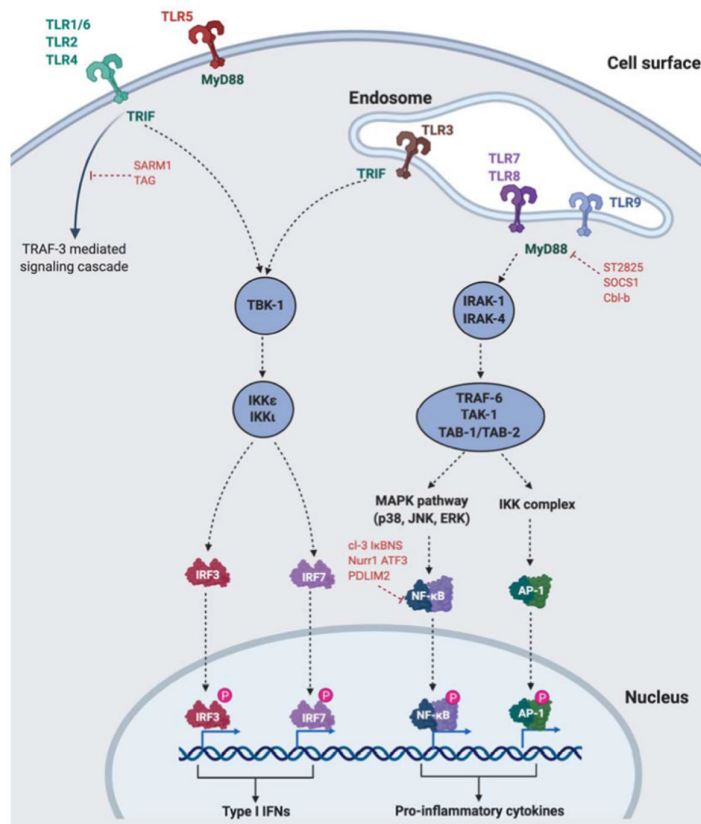


Figure 56. Localisation des TLR et voie de signalisation de TLR9 (Karapetyan et al., 2020)

Des études précliniques ont montré une synergie entre les agonistes de TLR9 et la radiothérapie (Meng et al., 2005 ; Zhang et al., 2012). La vaccination intra-tumorale avec un peptide combiné à des CpG (agoniste de TLR9) entraîne une augmentation des LT CD8 spécifiques de l'antigène tumoral dans différents modèles tumoraux de mélanome, de cancer du poumon, de cancer du sein et de sarcome (Brody et al., 2010 ; Goldinger et al., 2012 ; Karbach et al., 2010 ; Speiser et al., 2005 ; Valmori et al., 2007). Ces LT CD8 spécifiques sont producteurs d'IFN- γ et présentent une activité lytique.

Par ailleurs, l'administration systémique de CpG en association avec la chimiothérapie n'a pas entraîné de réponses cliniques dans le mélanome, le cancer du poumon, ou le cancer colorectal, mais a augmenté la cytotoxicité du traitement (Chan, et al., 2015 ; Belani. et al., 2011 ; Hirsh et al., 2011 ; Manegold et al., 2012 ; Manegold et al., 2008 ; Smith et al., 2014 ; Weber et al., 2009 ; Yamada et al., 2010)

Plusieurs études montrent également que les agonistes de TLR9 en association avec des ICI peuvent améliorer les réponses anti-tumorales des LT et augmenter les avantages cliniques par rapport à l'utilisation d'un agent seul. Cet effet synergique peut s'expliquer par le fait que les agonistes de TLR9 induisent des LT CD8 spécifiques de l'antigène qui augmentent l'expression de PD-1 chez la souris (Wang et al., 2016). Aussi, les agonistes de TLR9 en combinaison avec des anti-PD-1 transforment le microenvironnement tumoral en augmentant la fréquence de LT CD8, cellules NK, DC et lymphocytes B y compris dans les tumeurs réfractaires aux anti-PD-1 (Wang et al., 2016)

Les agonistes de TLR9 ont été testés dans une multitude d'essais cliniques. Cependant, lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie dans les tumeurs solides avancées et les leucémies chroniques, les agonistes du TLR9 n'ont révélé aucun résultat d'efficacité cliniquement significatif (Hofmann et al., 2008 ; Kim et al., 2010 ; Pashenkov, et al., 2006 ; Thompson et al., 2009 ; Weihrauch et al., 2015). Bien que de nombreuses preuves démontrent que l'association des agonistes de TLR9 joue un rôle bénéfique en association avec les ICI, à ce jour, aucune étude clinique n'a démontré un effet significatif chez l'Homme.

3.2.4 Inhibition de la voie de signalisation de l'IL-10

Finalement, une autre option thérapeutique est de limiter les effets immunosuppresseurs des cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral telle que l'IL-10. L'IL-10 a été détectée dans le microenvironnement tumoral de nombreux types de cancer et est corrélée à un mauvais pronostic (Mannino et al., 2015 ; Nemnaitis et al., 2001 ; O'Garra et al., 2008). Cytokine hautement immunosuppressive, notamment par sa capacité à inhiber la production d'IL-12 par les DC et par conséquent la différenciation Th1, l'IL-10 a été considérée comme une cible pour l'immunothérapie anticancéreuse. En effet, cette cytokine diminue l'activation des LT CD8 cytotoxiques en diminuant l'expression du CMH sur les cellules cancéreuses et les DC, empêchant ainsi la reconnaissance spécifique des cellules tumorales par les LT spécifiques de l'antigène (Steinbrink et al., 1999).

Il a notamment été démontré que les souris invalidées pour IL-10 (IL-10 KO) sont résistantes à la cancérogenèse cutanée induite par les UV et ceci est corrélé à une puissante réponse Th1 chez ces souris (Loser et al., 2007). En revanche, dans un modèle de carcinome cutané chimio-induit, une carence en IL-10 entraîne une augmentation significative de la charge tumorale et une accélération de la mortalité (Mumm et al., 2011). Il a également été démontré que les souris déficientes en IL-10 ont des tumeurs chimio-induites et transplantées plus grosses et ont plus de métastases (Kundu et al., 1997 ; Zheng et al., 1996). Ainsi, l'IL-10 est une cytokine pléiotrope dont l'action dépend du contexte. Manipuler la voie de signalisation à l'IL-10 pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers à condition d'être contrôlée.

Une étude préclinique réalisée dans un modèle murin de greffe de la lignée épithéliale TC-1 exprimant la protéine virale E7 de HPV16 a démontré que la vaccination avec un peptide E7 associée avec un anticorps inhibiteur ciblant le récepteur de l'IL-10 (CD210), injectée par voie intra-péritonéale, inhibe la croissance des tumeurs TC-1. Cette formulation induit également une réponse LT CD8 spécifique de l'antigène beaucoup plus forte que la monothérapie sans anti-IL10R (Chen et al., 2014). Plusieurs études montrent que le blocage de la voie de signalisation de l'IL-10 au moment de la vaccination favorise la génération de réponses LT CD8 robustes. (Brooks et al., 2008 ; Ejrnaes et al., 2006). De plus, le blocage de la voie de signalisation *via* le récepteur à l'IL-10 exprimé par les LT CD8 infiltrant la tumeur peut également inhiber la croissance tumorale. Ainsi, la voie de signalisation au travers du récepteur de l'IL-10 joue un rôle complexe dans l'immunité anti-tumorale. La stimulation, comme le

blocage de la voie de signalisation de l' IL-10, peuvent tous 2 empêcher la croissance tumorale. Par conséquent, la formulation de l'immunothérapie doit être définie en fonction de la cellule tumorale cible.

B. Traitement des CEC par immunothérapie

Le traitement de référence pour les CEC est la chirurgie. Cependant, lorsque l'extension de la tumeur est trop importante, ou que le patient présente des métastases à distance, la tumeur est inopérable et d'autres stratégies thérapeutiques, telles que l'administration d'immunothérapie doivent être mises en place.

Les CEC présentent les caractéristiques des tumeurs solides sensibles aux immunothérapies. En effet, le fait que les patients immunodéprimés présentent un plus haut risque de développement de CEC met en évidence le rôle primordial du système immunitaire dans le contrôle de la pathologie. Aussi, les CEC présentent un taux de mutations très importants (Martincorena et al., 2015). Étant donné que la mortalité associée aux CEC provient généralement d'une maladie locale mal contrôlée plutôt que d'une progression métastatique systémique (Eigentler et al., 2017), le traitement par immunothérapie représente une approche bénéfique substantielle pour ces patients.

De nombreuses études cliniques sont actuellement en cours, afin d'évaluer l'efficacité et les risques d'une immunothérapie pour traiter les CEC (Tableau 3). Par exemple, le cemiplimab, un ICI qui bloque la voie de signalisation de PD-1 est disponible en application systémique pour le traitement des CEC métastatiques, localement avancés, ou ne pouvant être traités en chirurgie et radiothérapies. Il s'agit du premier traitement approuvé aux USA et en Europe pour ces patients (Lee et al., 2020). Cependant, le cemiplimab a le potentiel de provoquer des effets indésirables immuno-dépendants pouvant être très graves voire mortels. Ainsi, les patients recevant ce traitement doivent être suivis médicalement, pour détecter les signes et symptômes d'effets indésirables avec une prise en charge médicale rapide lorsqu'ils sont détectés (Kristo et al., 2020). Dans une étude clinique de phase I, le taux de réponse chez les patients atteints de CEC métastatiques ou localement avancés est de 50%. L'analyse de sous-groupe révèle un taux de réponse similaire entre les patients atteints de CEC métastatiques et ceux atteints de CEC localement avancés (Migden et al., 2018). Dans une seconde étude clinique de phase II, le taux de réponse au cemiplimab est de 44% pour des CEC non opérables dont 13% de patients

Drug	Treatment	Conditions	Current State	NCT Code
Cemiplimab	Alone	Advanced and metastatic CSCC	Completed (47%-50% response rate) Recruiting next phase	NCT02383212 NCT02760498
	Alone (before surgery)	Recurrent stage III-IV head and neck CSCC	Recruiting	NCT03565783
	Alone (pre-operative therapy intralesional)	Recurrent CSCC	Recruiting	NCT03889912
	Adjuvant therapy after surgery and radiotherapy	High risk CSCC	Recruiting	NCT03969004
	Alone or combination with RP1	Advanced or metastatic CSCC	Recruiting	NCT04050436
	Alone	Unresectable locally recurrent and/or metastatic CSCC	Recruiting	NCT04242173
	Alone (neoadjuvant therapy)	Stage II to IV CSCC	Recruiting	NCT04154943
Pembrolizumab	Alone	Recurrent/metastatic or locally advanced unresectable CSCC	Active, not recruiting	NCT03284424
	Alone	Locally advanced or metastatic CSCC	Active, not recruiting (preview results presented in ASCO show 42% response rate)	NCT02883556
	Alone	Locally advanced and metastatic CSCC	Active, not recruiting	NCT02964559
	Adjuvant therapy after surgery and radiotherapy	High risk locally advanced CSCC	Recruiting	NCT03833167
	Combination with postoperative radiotherapy	CSCC of head and neck	Recruiting	NCT03057613
	Combination with cetuximab	Recurrent/metastatic CSCC	Recruiting	NCT03082534
	Combination with AST-008	Advanced/metastatic CSCC	Recruiting	NCT03684785
	Combination with abexinostat	Stage III-IV CSCC of head and neck	Recruiting	NCT03590054
	Combination with sonidegib	Stage IV CSCC of head and neck	Not yet recruiting	NCT04007744
	Combination with nivolumab and CIMAvax vaccine	Stage III-IV CSCC of head and neck	Recruiting	NCT02955290
Nivolumab	Combination with SO-C101	Advanced/metastatic CSCC	Recruiting	NCT04234113
	Alone	Locally advanced/metastatic CSCC	Recruiting	NCT04204837
	Alone	Advanced CSCC	Recruiting	NCT03834233
	Alone or combination with ipilimumab	Metastatic CSCC in immunosuppressed patients	Recruiting	NCT03816332
	Combination with pembrolizumab and CIMAvax vaccine	Stage III-IV CSCC of head and neck	Recruiting	NCT02955290

Tableau 3 : Immunothérapies actuellement en essai clinique dans le traitement des CEC (Corchados-Cobos et al., 2020)

présentaient une réponse complète et 31% une réponse partielle (Migden et al., 2020) (Tableau 4). Pour un blocage réussi avec les anti-PD-1, le microenvironnement préexistant doit être immunologiquement chaud. Ainsi, les CEC avec de multiples récurrences locales sont associés à de moins bons résultats (Migden et al., 2020). Des observations cliniques récentes suggèrent que des charges mutationnelles élevées ne définissent pas nécessairement la probabilité de réponse aux anti-PD-1 dans les CEC localement avancés ou non opérables (Migden et al., 2020). Un second anticorps anti-PD-1, le pembrolizumab, est en cours d'essai clinique. Le nivolumab, un autre inhibiteur de PD-1 a été testé sur des patients atteints de CEC en monothérapie ou en combinaison avec le pembrolizumab. Certains cas rapportés démontrent une efficacité clinique et une bonne tolérance du traitement par les patients (Blum et al., 2018). En ce qui concerne les effets des anti-PD-1 dans le contexte de la pandémie de COVID-19, peu de données ont été obtenues en terme de probabilité d'infection et d'évolution de l'infection virale. En effet, les anti-PD-1 pourraient être nocifs *via* l'augmentation de l'inflammation et ainsi favoriser les effets néfastes de la cascade cytokinique et de l'autre, ils pourraient théoriquement améliorer les résultats en améliorant le contrôle immunitaire des infections virales. Ainsi, Saporona et al., démontrent dans leur étude portant sur 54 patients que le traitement anti-PD-1 des patients atteints de CEC doit être continué malgré le contexte épidémique actuel (Saporona et al., 2020).

L'ensemble des données suggère que les immunothérapies reposent principalement sur la restauration de la réponse LT cytotoxique endogène présente mais déficiente. Cela laisse de grandes possibilités pour étudier de nouvelles stratégies thérapeutiques à combiner avec des immunothérapies qui stimuleront la réponse immunitaire innée affaiblie par le microenvironnement tumoral. Dans le contexte des CEC, seuls des anti-PD1 sont actuellement proposés pour traiter les patients dont la tumeur est inopérable. Cependant, la réponse n'est que partielle chez les patients et la rémission rarement complète. C'est pourquoi il est primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de guérir les CEC non opérables.

Outcomes of Clinical Trials of PD-1 Blockade for SCCs					
Primary lesion	Condition	Drug	Phase	OR (%)	ClinicalTrials.gov# (NCT#)
Cutaneous	Locally advanced/metastatic	Cemiplimab	1	50 (30-70)	02383212
Cutaneous	Metastatic	Cemiplimab	2	47 (34-61)	02760498
Cutaneous	Locally advanced	Cemiplimab	2	44 (32-55)	02760498
Cutaneous	Recurrent/metastatic	Pembrolizumab	2	34.3 (25.3-44.2)	03833167

Tableau 4 : Résultats des premières études cliniques des anti-PD-1 contre les CEC (Ishitsuka et al., 2021)

RATIONNEL ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE

Mes travaux ont porté sur les carcinomes épidermoïdes cutanés (CEC), des tumeurs solides qui se développent à partir des kératinocytes de l'épiderme dans les zones photo-exposées. Le facteur de risque principal au développement de ces tumeurs est l'exposition aux rayonnements UV. Leur incidence dans le monde est en constante augmentation (Sung et al., 2020). Ils sont généralement de bon pronostic et rarement métastatiques. Le traitement de référence pour ces cancers est la chirurgie (Alam et al, 2018 ; Stratigos et al., 2020) mais d'autres stratégies telles que la radiothérapie ou l'utilisation d'immunothérapie peuvent être envisagées en fonction de l'étendue et de la nature des lésions (McDaniel et al., 2020). Cependant, certains CEC situés au niveau de la tête et du cou sont dits à « haut risque » et présentent un taux de récurrence local et ganglionnaire supérieur à 20% dans les 2 premières années suivant la chirurgie. De plus, certains CEC non opérables sont également de mauvais pronostic, avec une survie globale à 5 ans de 6% (Chapalain et al., 2020). Pour ces cancers, des immunothérapies locales telles que le cemiplimab, un anti-PD-1 dont les effets prometteurs ne permettent un contrôle de la croissance tumorale que chez 44 à 50% des patients (Migden et al., 2018 ; Migden et al., 2020), sont en cours de développement. Le développement d'immunothérapies locales stimulant l'immunité adaptative pourrait donc améliorer la survie à long terme des patients sans récurrence.

Il est maintenant admis que les cellules immunitaires présentes dans les tissus éliminent les cellules tumorales au cours de la phase d'immunosurveillance mais, au cours de l'immunoediting, les cellules tumorales deviennent résistantes au système immunitaire et échappent à son contrôle (Desai et al., 2021, Schreiber et al., 2011). L'échappement des tumeurs au système immunitaire peut faire intervenir des mécanismes variés tels que la diminution de la détection des cellules tumorales par les cellules immunitaires, la résistance aux attaques des cellules effectrices ou encore le développement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (Desai et al., 2021). L'infiltration de LT CD8 dans les tumeurs représente un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de cancer (Gentles et al., 2015). Ces cellules effectrices éliminent les cellules tumorales de manière spécifique, par leur activité cytolytique ainsi que par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, il a été démontré que les immunothérapies actuelles ciblant les points de contrôle immunitaires à la surface des LT, notamment les anti-PD-1 dans le contexte des CEC, restaurent les capacités cytotoxiques des LT et améliorent le contrôle de la progression tumorale (Migden et al., 2020). Le développement de stratégies thérapeutiques permettant l'expansion *in vivo* des lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux devrait donc favoriser la régression tumorale.

Les cellules dendritiques (DC), cellules présentatrices professionnelles de l'antigène, sont des acteurs essentiels de l'immunité anti-tumorale en charge de l'éducation des LT CD4 et LT CD8. Il a été démontré que les tumeurs sont infiltrées par une population hétérogène de DC, comprenant des DC conventionnelles de type 1, de type 2, et des DC inflammatoires dérivées des monocytes notamment (Zillionis et al., 2019). L'infiltration de DC dans les tumeurs est associée à un bon pronostic dans de nombreux types de cancers (Gentles et al., 2015). Cependant, les facteurs exprimés par l'environnement tumoral, tel que l'IL-10, inhibent leurs fonctions anti-tumorales et favorisent le recrutement ou la formation locale de DC immunosuppressives. Ainsi, le blocage de la signalisation de l'IL-10 dans le cancer du sein s'est avéré suffisant pour la reprogrammation des DC qui en réponse, sécrètent de l'IL-12 et induisent une immunité anti-tumorale en réponse à une chimiothérapie immunogène (Ruffell et al., 2014). Ainsi, la plasticité des DC suggère que la reprogrammation d'un phénotype pro-tumoral à anti-tumoral est possible, faisant ainsi des DC de bonnes cibles thérapeutiques. Les DC des tissus expriment une multitude de récepteurs senseurs de l'environnement pouvant faire l'objet de ciblage thérapeutique parmi lesquels les Toll Like Receptors : TLR. Les TLR sont des récepteurs de dangers (Pattern Recognition Receptor, PRR) permettant aux DC de s'activer suite à la détection d'un danger. Cibler l'un des TLR exprimé par les DC tout en bloquant la signalisation liée à la présence d'IL-10 dans le milieu pourrait conduire à leur activation *in situ*. En reprogrammant *in situ* les DC, on permettrait un recrutement accru de LT cytotoxiques sur le site de la tumeur conduisant ainsi à l'induction d'une immunité anti-tumorale tant innée qu'adaptative.

L'hypothèse des travaux de l'équipe était que reprogrammer l'immunité anti-tumorale dans l'environnement des carcinomes épidermoïdes cutanés en stimulant *in situ* les DC devrait permettre de contrôler à long terme ces tumeurs cutanées. Les travaux antérieurs de mon équipe ont mis en évidence :

- i) Dans un modèle murin de CEC chimio-induit (DMBA/PMA) (Abel et al., 2009), que les DC infiltrant les tumeurs sont dysfonctionnelles et ne permettent pas l'éducation et l'induction d'une immunité anti-tumorale adaptative efficace.
- ii) Dans un modèle de greffe syngénique de tumeur cutanée, qui consiste en l'injection intradermique de la lignée épithéliale pulmonaire TC-1 chez la souris C57BL/6 (Lin et al., 1996), les DC isolées des tumeurs ont un phénotype tolérogénique, producteur d'IL-10 au détriment de la production d'IL-12 *in vitro*.
- iii) La stimulation de DC tumorales purifiées des tumeurs TC-1 intradermiques par différents agonistes de TLR incluant TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR11/12 n'induit pas la production d'IL-12 contrairement à des DC d'environnement sain. Néanmoins, la stimulation de ces DC *in vitro* par un agoniste de TLR9, les rend

sécrétrices d'IL-12. Le blocage simultané de la signalisation à travers le récepteur à l'IL-10 avec un anticorps bloquant la signalisation à travers la chaîne α du récepteur à l'IL-10 (IL-10R α) augmente d'un facteur 10 la capacité des DC isolées de tumeurs à sécréter de l'IL-12. Ceci suggère qu'un traitement combiné TLR9L+aIL-10R α *in vivo* pourrait restaurer l'immunité anti-tumorale et par conséquent contrôler la croissance tumorale.

- iv) L'injection péri-tumorale du traitement combiné TLR9L+aIL10-R α induit la régression de tumeurs cutanées TC-1 de manière plus efficace que l'Aldara®, traitement de référence d'immunothérapie des carcinomes cutanés à base d'imiquimod, un agoniste de TLR7 à application topique ou de son principe actif administré par voie péri-tumorale (Imiquimod) (**Figure 1**).

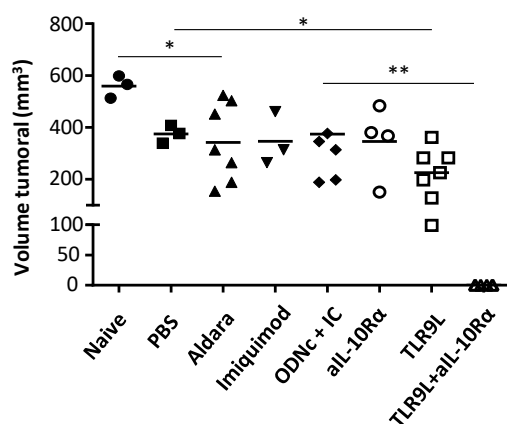


Figure 1 : Un traitement local avec un agoniste de TLR9 combiné avec un anticorps bloquant la signalisation à travers le récepteur à l'IL-10 (TLR9L+aIL-10R α) induit la régression de tumeurs TC-1 cutanées établies.

Comparaison de l'impact sur la régression tumorale d'un traitement local stimulant l'immunité anti-tumorale *via* TLR9 seul (TLR9L) ou en combinaison avec un anticorps bloquant la signalisation IL-10 (TLR9L+aIL-10R α), ou par l'Aldara®, traitement de référence à base d'imiquimod, un agoniste de TLR7 à application topique ou par son principe actif administré par voie péri-tumorale (Imiquimod). Ces traitements ou leurs contrôles (PBS, ODNc/IC, aIL-10R α seul) sont administrés par voie péri-tumorale à l'exception de l'Aldara® dans des tumeurs de 7 jours. Le volume tumoral est mesuré à J21. Les analyses statistiques indiquent une différence entre les groupes : **: $p < 0,01$ et *: $p < 0,05$; test de Mann-Whitney.

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse a été d'élucider le mécanisme d'action de l'immunothérapie locale ciblant le Toll-like récepteur TLR9 tout en bloquant la signalisation au travers du récepteur de l'IL-10 grâce à l'utilisation d'un anticorps bloquant capable de cibler

la chaîne alpha du récepteur à l'IL-10 (TLR9L+aIL-10R α) *in vivo* afin de l'optimiser (Figure 57).

La première partie de mes travaux a consisté à évaluer le rôle de l'immunité adaptative dans l'efficacité de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α contre les CEC. Nous nous sommes demandés si le traitement permettait une stimulation optimale de l'immunité adaptative médiée par les DC. Pour répondre à cette question, je me suis appuyée sur le modèle tumoral TC-1 dans lequel les cellules tumorales expriment la protéine oncogénique E7 que j'ai utilisé comme antigène tumoral. Par une approche de déplétion *in vivo* des lymphocytes T, j'ai caractérisé le rôle de ces cellules dans la régression tumorale. J'ai également identifié par cytométrie de flux le phénotype et les fonctions de ces dernières. Ensuite, j'ai identifié la migration des cellules dendritiques tumorales vers les ganglions lymphatiques drainants. Par une technique de présentation antigénique *ex vivo*, j'ai identifié les sous-populations de DC capables d'éduquer les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'antigène tumoral en réponse à l'immunothérapie locale. Pour cela j'ai utilisé les souris E7TCR- β de fond génétique C57BL/6 qui expriment la chaîne variable β 12 du récepteur T des lymphocytes T. Dans ces souris 1% des LT CD8 possède un récepteur T (TCR) capable de reconnaître le fragment peptidique E7 dans le contexte de la molécule de CMHI-H2-Db (Narayan et al., 2009). Enfin, j'ai caractérisé les fonctions des LT CD8 éduqués par les DC tumorales stimulées par notre traitement par une approche *in vitro* qui consiste à une stimulation secondaire des LT CD8 avec des splénocytes chargés en peptide E7. L'ensemble de ces approches a permis de mettre en évidence le rôle primordial des DC conventionnelles, principalement les cDC2 dans l'éducation des LT CD8 cytotoxiques en réponse à l'immunothérapie locale.

La deuxième partie de mes travaux a consisté à déterminer le rôle des effecteurs de l'immunité innée dans l'efficacité initiale entre J1 et J3 de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α . Pour cela, j'ai utilisé des approches complémentaires *in vivo* et *ex vivo*. J'ai d'abord caractérisé par cytométrie de flux et par des marquages d'immunofluorescence sur coupe l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs à différents temps post-traitement. J'ai ainsi caractérisé le phénotype des macrophages et des neutrophiles en réponse au traitement. J'ai également mis en évidence les fonctions des macrophages et neutrophiles par une approche *ex vivo* qui consiste à l'identification de l'expression de cytokines et molécules effectrices par marquage intracellulaire en cytométrie de flux dans ces cellules. Ensuite, j'ai identifié le rôle primordial des

neutrophiles dans la réponse au traitement par une approche de déplétion *in vivo* via l'utilisation d'anticorps déplétants qui ciblent Ly6G. Puis, j'ai identifié les molécules solubles présentes dans le microenvironnement tumoral et mis en évidence l'abondance de molécules capables de recruter les neutrophiles *in vivo* : CXCL1 et CXCL2. J'ai poursuivi mes recherches, en bloquant la voie de signalisation CXCR1/2 – CXCL1/2 grâce à l'injection *in vivo* de réparixine, un inhibiteur compétitif des récepteurs CXCR1 et CXCR2. Enfin, j'ai identifié les cellules productrices des chimiokines CXCL1 et CXCL2 par une approche *in vitro*. J'ai trié par cytométrie de flux les différentes sous-populations de cellules, et après stimulation *in vitro* avec l'immunothérapie, j'ai quantifié la concentration de CXCL1 et CXCL2 dans les surnageants de culture. L'ensemble de ces approches a permis d'identifier le rôle des macrophages dans le recrutement de neutrophiles anti-tumoraux cytotoxiques en réponse à l'immunothérapie locale.

Mécanisme d'action de l'immunothérapie locale TLR9L+αIL-10Rα dans le modèle murin TC-1

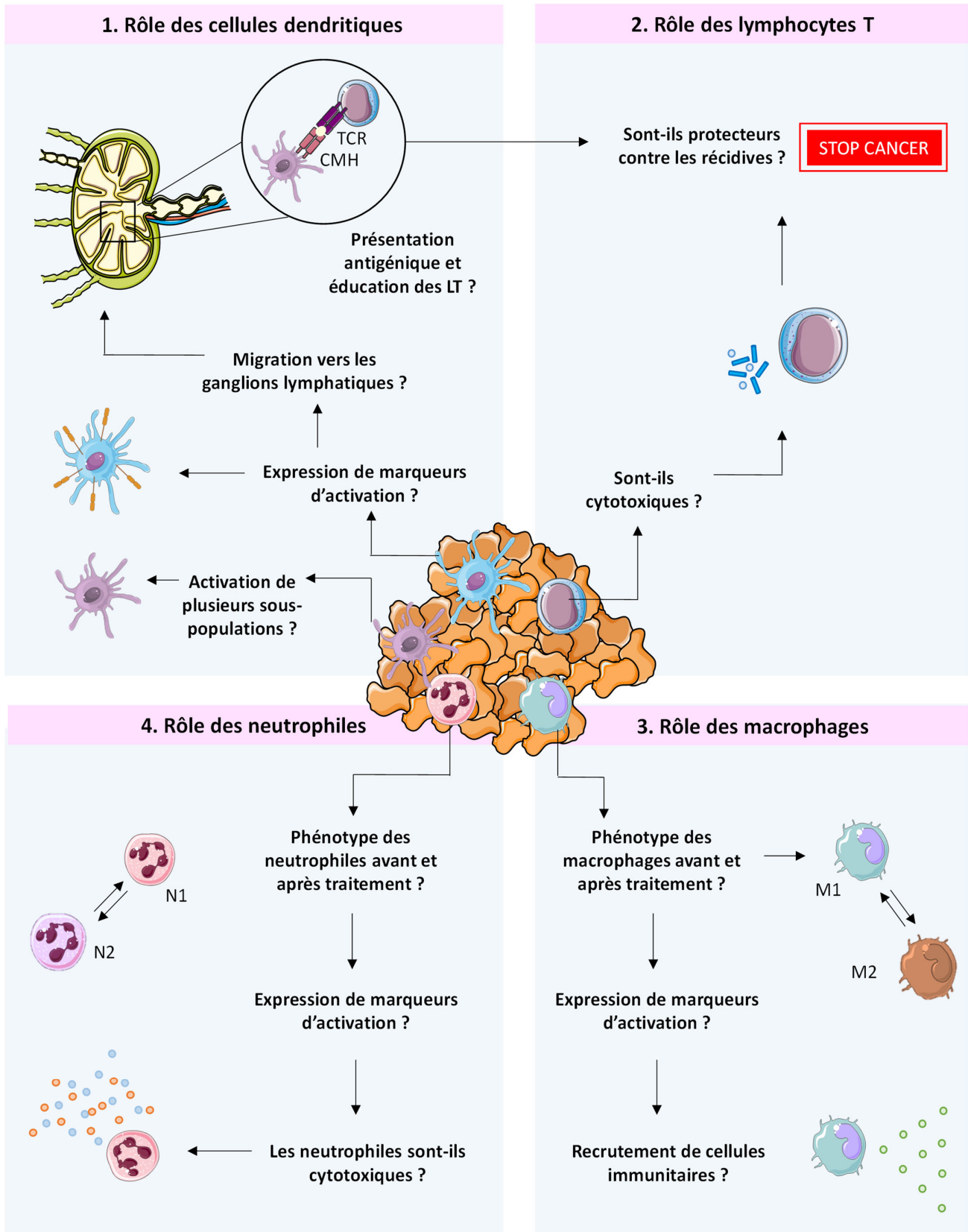


Figure 57. Objectifs de la thèse

RESULTATS

Partie I - Rôle de l'immunité adaptative dans l'efficacité de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α contre les carcinomes épidermoïdes cutanés

Résultats

Les CEC humains et murins sont infiltrés par des LC, cDC1, cDC2 et moDC

Afin de déterminer la pertinence des données générées dans un modèle murin pour le cancer humain, nous avons tout d'abord déterminé la nature des DC infiltrant des biopsies fraîches de carcinomes épidermoïdes humains par cytométrie de flux après marquage multiparamétrique. J'ai utilisé 7 biopsies humaines dont les caractéristiques des patients sont détaillées dans le Tableau 1.

L'analyse de ces biopsies humaines a mis en évidence la présence de DC plasmacytoïdes (pDC), de cellules de Langerhans (LC), de DC conventionnelles (cDC) et dérivées des monocytes (moDC) dans toutes les tumeurs.

Parmi les cellules CD45⁺ vivantes, négatives pour les marqueurs de lignage (CD3, CD19, CD15, CD56), la population de DC dérivées des monocytes est caractérisée par l'expression des marqueurs CD11c⁺CD14⁺CD1c⁺. La fraction cellulaire CD14⁻CD11c^{+/-} comprend les pDC qui expriment le marqueur CD304, les cellules CD11c^{int}CD141^{low} correspondant aux LC, les cellules CD11c^{int}CD141^{bright} qui représentent les DC conventionnelles de classe 1 (cDC1), ainsi que les cellules CD11c⁺CD141⁺CD1c⁺ qui correspondent aux DC conventionnelles de classe 2 (cDC2), également identifiées dans la peau humaine saine par Haniffa et al., 2012 (**Figure 1A**). La fréquence de chaque sous-population de DC parmi les cellules immunitaires CD45⁺ dans les tumeurs humaines est inférieure à 1%, faisant ainsi des DC des cellules très rares dans le microenvironnement tumoral. De manière importante, la population de cDC1, considérée comme un marqueur majeur de la défense anti-tumorale (Broz et al., 2014), est la population la plus rare dans l'ensemble des tumeurs analysées (**Figure 1B**).

Afin de déterminer le mécanisme d'action de notre immunothérapie locale contre les carcinomes épidermoïdes cutanés, nous avons ensuite utilisé le modèle tumoral TC-1. J'ai validé la pertinence de ce modèle murin en caractérisant les différentes sous-populations de DC

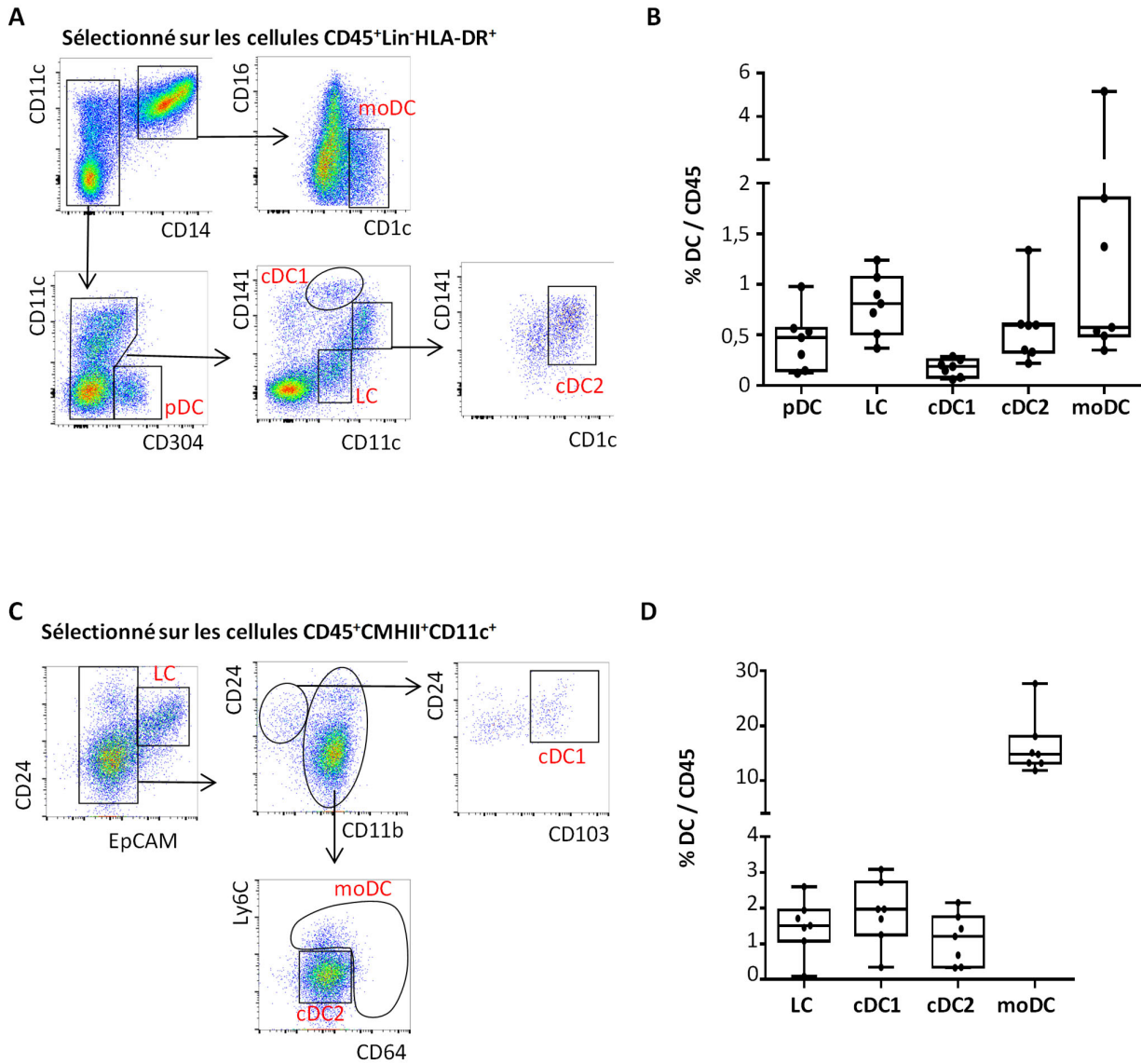


Figure 1. Différentes sous-populations de DC infiltrant les CEC de biopsies de patients et de souris

A.B. Les sous-populations de DC infiltrant les CEC humains ont été identifiées par cytométrie de flux après digestion mécanique et enzymatique et marquage multiparamétrique des biopsies.

A. La stratégie d'analyse permet d'identifier les pDC, LC, cDC1, cDC2 et moDC grâce à l'expression différentielle des marqueurs CD14, CD1c, CD141 et CD11c. La première fenêtre, qui correspond aux cellules vivantes CD45⁺Lin⁺HLA-DR⁺, est effectuée sur la fraction cellulaire dépourvue de débris et de doublets. Le marqueur de viabilité utilisé est le 7-AAD.

B. Fréquence de chaque sous-population de DC parmi les cellules immunitaires CD45⁺ vivantes, identifiées à partir de 7 biopsies de patients. Les données sont représentées sous forme de boîtes incluant les valeurs individuelles et la médiane.

C.D. Des tumeurs TC-1 de 14 jours ont été prélevées et les suspensions cellulaires obtenues par digestion mécanique et enzymatique ont été analysées par cytométrie de flux après marquage multiparamétrique afin d'identifier les sous-populations de DC infiltrant les tumeurs.

C. La stratégie d'analyse permet d'identifier les pDC, LC, cDC1, cDC2 et moDC grâce à l'expression différentielle des marqueurs EpCAM, CD24, CD11b, CD103, CD64 et Ly6C. La première fenêtre, qui correspond aux cellules phagocytaires vivantes CD45⁺CMHII⁺CD11c⁺ est effectuée sur la fraction cellulaire dépourvue de débris et de doublets. Le marqueur de viabilité utilisé est le 7-AAD.

D. Fréquence de chaque sous-population de DC parmi les cellules immunitaires CD45⁺ vivantes. Les données sont représentées sous forme de boîtes incluant les valeurs individuelles et la médiane.

Caractéristiques	Nombre
Genre	
Homme	6 (85,7%)
Femme	1 (14,3%)
Âge	
Moyenne (année ± SEM)	81,40 ± 3,19
Valeurs minimale et maximale	65-92
Historique	
Pas de traitement anti-inflammatoire	7
Non immuno-déprimé	7
Pas de traitement anti-cancéreux	7
Localisation de la tumeur	
Tempe	3
Cuir chevelu	1
Joue	1
Oreille externe	1
Cou	1
Histologie	
CEC non différencié	1
CEC modérément différencié	3
CEC différencié	3
Grade pTNM	
pT1	1
pT3	6

Tableau 1. Données cliniques des patients atteints de CEC analysés dans notre étude

et leurs proportions dans les tumeurs TC-1 par cytométrie en flux. Parmi les cellules CD45⁺ vivantes exprimant CD11c et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII), j'ai identifié les cellules CD24⁺EpCAM⁺ correspondant aux LC. Parmi les cellules EpCAM⁺, les cellules CD24⁺CD11b^{low}CD103⁺ correspondent aux cDC1, décrites comme la principale sous-population de DC capable de faire de la présentation croisée d'antigènes tumoraux (Henri et al., 2010). Les cellules CD11b⁺ comprennent les cellules Ly6C⁻CD64⁻ qui correspondent aux cDC2 et les cellules Ly6C⁺CD64⁺ qui sont les moDC (**Figure 1C**). Nous avons constaté que les CEC murins sont infiltrés par toutes les sous-populations de DC décrites chez l'Homme dans une proportion comparable à l'exception des pDC, connues pour être absentes dans de nombreux modèles murins (**Figure 1D**).

Ces résultats valident donc l'utilisation du modèle murin TC-1 pour l'analyse du rôle des cellules dendritiques dans l'environnement tumoral des CEC.

Identification des cellules cibles du traitement TLR9L+aIL-10R α *in vitro*

La stratégie d'immunothérapie locale composée d'un agoniste de TLR9 (TLR9L) combinée à un anticorps bloquant la voie de signalisation au travers du récepteur de l'IL-10 (aIL-10R α) induit la régression de tumeurs cutanées TC-1 et la combinaison des 2 agents est nécessaire à la régression des tumeurs TC-1 établies.

Nous avons identifié les cellules des tumeurs TC-1 exprimant le récepteur TLR9, cible de l'agoniste de TLR9 utilisé dans le traitement. Pour cela, nous avons déterminé par cytométrie de flux après marquage multiparamétrique le niveau d'expression de TLR9 par les différents types cellulaires présents dans une suspension cellulaire de tumeur TC-1 de 14 jours (**Figure 2A**). Nous avons démontré que le marqueur TLR9 est majoritairement exprimé par les cellules phagocytaires, parmi lesquelles 60% des CD45⁺CD11c⁺CMHII⁺, qui correspondent à des DC conventionnelles, des DC dérivées des monocytes ainsi que des macrophages. Ces cellules expriment les niveaux les plus élevés de TLR9. TLR9 est également exprimé par 56% des macrophages immatures (CD45⁺CMHII⁻CD11b⁺), avec un niveau moyen d'expression de TLR9 plus faible. Par contre, les neutrophiles (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺) et une population hétérogène de lymphocytes de l'immunité innée et adaptative (CD45⁺CMHII⁻CD11b⁻Ly6G⁻)

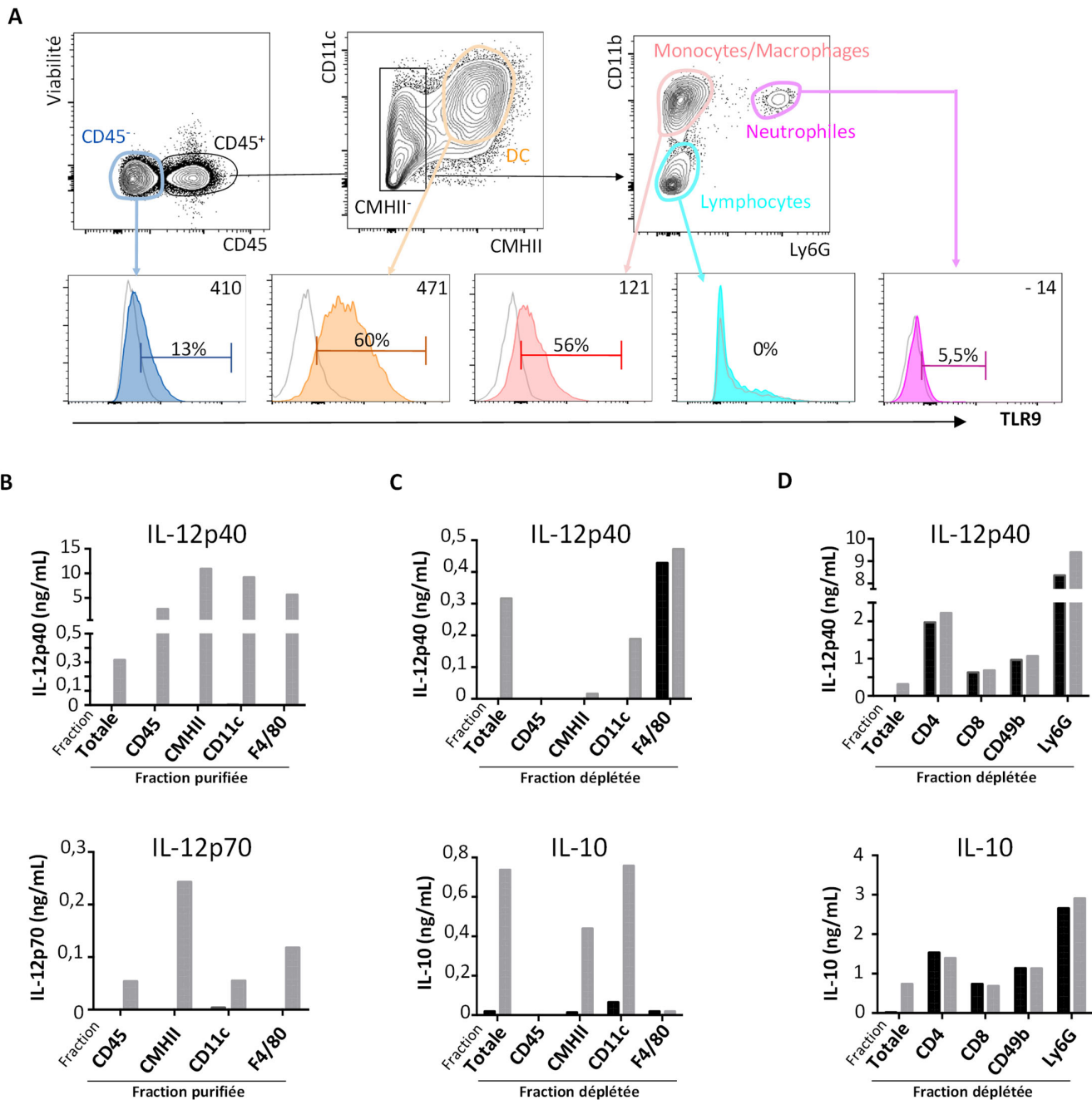


Figure 2 : Identification des différentes populations de cellules ré pondant au traitement TLR9L+aIL-10R α

A. Des tumeurs TC-1 de 14 jours ont été prélevées et les suspensions cellulaires obtenues par digestion mécanique et enzymatique ont été analysées par cytométrie de flux après marquage multiparamétrique afin de déterminer les types cellulaires exprimant le ré cepteur TLR9. La stratégie d'analyse permet d'identifier différentes populations. Les histogrammes colorés pleins montrent la fluorescence spécifique de TLR9 associée au type cellulaire indiqué et les histogrammes vides de contour gris, montrent la fluorescence du même type cellulaire avec l'isotype contrôle. Dans chaque histogramme est indiqué le pourcentage de cellules exprimant TLR9 ainsi que la moyenne de fluorescence.

B-D. Les suspensions tumorales issues de tumeurs TC-1 de 14 jours ont été poolées (n=10) puis séparées en différentes conditions. Dans chaque condition, un anticorps biotinylé différent est utilisé afin d'enrichir ou de dépléter la suspension cellulaire tumorale en une population donnée par incubation avec des billes immunomagnétiques streptavidine et séparation sur colonne magnétique. Chaque suspension cellulaire (500 000 cellules/puits) est ensuite cultivée pendant 24 heures dans du milieu de culture en présence ou non du traitement TLR9L+aIL-10R α). Les cytokines IL-12p40, IL-12p70 et IL-10 produites dans les surnageants de culture des suspensions cellulaires enrichies (**B**) ou déplétées (**C et D**) en un type cellulaire donné sont analysées par technique CBA. Barres noires : condition non stimulée. Barres grises : condition stimulée TLR9L+aIL-10R α). Les résultats correspondent à une expérience.

expriment des niveaux extrêmement faibles voire pas du tout de TLR9. Enfin, nous avons mis en évidence que 13% des cellules tumorales CD45⁻ expriment des niveaux faibles de TLR9 et peuvent ainsi potentiellement répondre à la stimulation par l'agoniste de TLR9.

Ensuite, afin de mettre en évidence les rôles direct et indirect du traitement sur les différents types cellulaires présents dans les tumeurs TC-1, nous avons stimulé *in vitro* avec le traitement TLR9L+aIL-10R α des fractions cellulaires de tumeur enrichies ou déplétées en un ou plusieurs types cellulaires : ces fractions comprennent les cellules immunitaires (CD45⁺), les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) (CMHII⁺), les DC (CD11c⁺), les cellules de Langerhans et/ou macrophages (F4/80⁺), les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, les cellules Natural Killer (NK) (CD49b⁺) et les neutrophiles (Ly6G⁺) obtenues selon une procédure d'enrichissement immunomagnétique décrite dans la section matériel et méthodes. Les cytokines IL-12p40, IL-12p70 et IL-10 produites après 24 heures de culture en l'absence ou présence de stimulation TLR9L+aIL-10R α sont quantifiées par technique CBA (cytokine bead assay).

La stimulation avec TLR9L+aIL-10R α induit une production d'IL-12p40 de 360 pg/mL par la suspension cellulaire totale de tumeur sous stimulation (**Figure 2B**). Les cellules immunitaires CD45⁺ sont les cellules qui produisent l'IL-12 en réponse à la stimulation comme le montre la production massive IL12-p40 et celle d'IL12-p70 par la fraction enrichie en cellules CD45 (**Figure 2B**) et l'absence de ces cytokines dans la fraction déplétée en CD45 (**Figure 2C**). Parmi les leucocytes intra-tumoraux (cellules CD45⁺), les cellules CMHII⁺ et plus particulièrement les DC (cellules CD11c⁺) et les cellules de Langerhans et/ou les macrophages (cellules F4/80⁺) produisent de l'IL-12p40 et de l'IL12-p70 en réponse au traitement, ce qui confirme que les DC mais aussi les cellules de Langerhans et/ou les macrophages sont les principaux producteurs d'IL-12 en réponse à une stimulation *via* TLR9 (**Figure 2B**). De manière complémentaire, la déplétion des cellules F4/80⁺ restaure une production massive d'IL-12p40 avec ou sans stimulation et abolit complètement la production d'IL-10, ce qui démontre que les cellules F4/80⁺ sont les seules cellules productrices d'IL-10 dans l'environnement tumoral et que l'absence de production d'IL-10 est suffisante pour restaurer la capacité des cellules dendritiques de produire de l'IL-12 (**Figure 2C**). Ceci suggère que la population de macrophages joue un rôle régulateur dans l'environnement tumoral, qui peut s'expliquer par le fait qu'ils produisent des facteurs immunosuppresseurs parmi lesquels l'IL-10, ce qui est en accord avec les travaux de Ruffel et al., (2014) dans un modèle murin de tumeur mammaire. Enfin, on observe que la déplétion des lymphocytes T CD4 (CD4⁺), T CD8 (CD8⁺), les cellules

NK (CD49b⁺) ou les neutrophiles (Ly6G⁺) induit une augmentation de la production de l'IL-12p40 et de l'IL-10 en présence et en l'absence de traitement ce qui suggère que ces populations cellulaires régulent la production de ces cytokines par les cellules dendritiques et les macrophages (**Figure 2D**).

Ces données ont permis de mettre en évidence un rôle direct des cellules CMHII⁺F4/80⁻ correspondant aux cellules dendritiques dans la production d'IL-12, cytokine importante dans la génération de l'immunité adaptative anti-tumorale.

L'immunothérapie locale favorise la mise en place d'une réponse T CD8 effectrice et mémoire intra-tumorale

Afin de déterminer la contribution des lymphocytes T CD8 dans la réponse à l'immunothérapie locale, nous avons évalué l'impact d'une déplétion en lymphocytes T CD8 au moment du traitement dans des souris porteuses de tumeurs TC-1 selon le protocole illustré dans la **Figure 3A**.

L'injection de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α dans des tumeurs TC-1 établies induit la régression totale et rapide des tumeurs (**Figure 3B**, courbes rouges) en comparaison au groupe contrôle non traité (**Figure 3B**, courbes noires). L'administration d'un anticorps déplétant anti-CD8 β par voie intra-péritonéale juste avant l'immunothérapie selon le protocole décrit dans la **Figure 3A**, permet de dépléter spécifiquement les LT CD8 dans les tumeurs TC-1 *in vivo* (data non montrées). Dans ces souris (**Figure 3B**, courbes bleues), l'immunothérapie locale induit un contrôle initial de la croissance tumorale suivi d'un échappement rapide et une croissance exponentielle de la tumeur. Ceci démontre que suite à un contrôle initial de la croissance tumorale par l'immunité innée, les LT CD8 jouent un rôle primordial dans le contrôle de la croissance et la régression tumorale.

Nous avons ensuite évalué si la régression tumorale induite par le traitement local TLR9L+aIL-10R α implique une immunité adaptative mémoire capable de contrôler la croissance de tumeurs secondaires. Pour cela, des souris dont la tumeur TC-1 a régressé totalement après l'administration de l'immunothérapie locale ont été suivies durant un mois. Suite à la régression

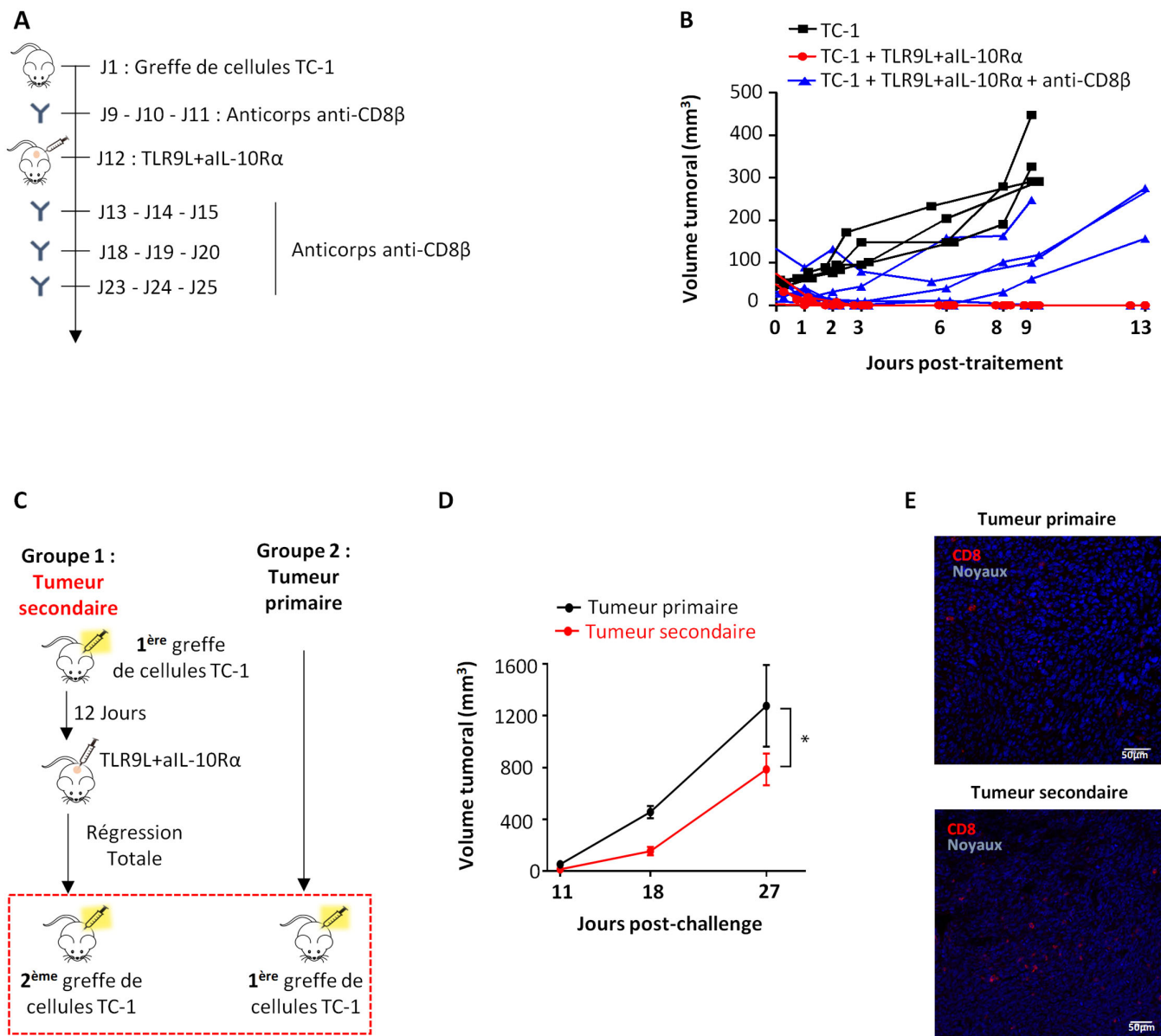


Figure 3. L'immunothérapie locale permet le développement d'une réponse LT CD8 effectrice et mémoire.

A. Trois injections consécutives par semaine de 100 µg d'anticorps anti-CD8β déplétant les LT CD8 ont été administrées par voie intrapéritonéale, à partir de J9 (4 jours avant traitement) et jusqu'à J13 post-traitement (TLR9L+aIL-10Rα) dans des souris porteuses de tumeurs TC-1.

B. Le graphique montre la taille des tumeurs TC-1 portées par des souris contrôles (ligne noire), des souris ayant reçu l'immunothérapie locale (ligne rouge) et des souris ayant reçu l'immunothérapie locale ainsi que les anticorps anti-CD8β (ligne bleue). La taille des tumeurs est représentée pour chaque souris individuelle ($4 \leq n \leq 7$; N=2 expériences indépendantes).

C. Des souris dont la tumeur TC-1 a régressé totalement suite à l'injection locale du traitement TLR9L+aIL-10Rα ont reçu une seconde greffe de tumeurs TC-1 en intradermique (tumeur secondaire), 1 mois après la réjection de la tumeur primaire. Des souris témoins naïves reçoivent également une injection intradermique de 20 000 cellules tumorales TC-1 (tumeur primaire).

D. Le graphique montre la taille des tumeurs TC-1 primaires (groupe 1, ligne noire) et des tumeurs secondaires (groupe 2, ligne rouge). n=4 souris par groupe. ANOVA bidirectionnelle. * indique une différence statistique, $p < 0,05$.

E. Des tumeurs TC-1 de 27 jours provenant de souris challengées (groupe 1) ou contrôles (groupe 2) ont été congelées et coupées. Les images d'immunofluorescence montrent l'infiltration en LT CD8 (rouge) et les noyaux (bleu) au centre des tumeurs. Grossissement X10.

totale et la cicatrisation des tumeurs primaires, nous avons implanté les cellules tumorales TC-1 par injection intradermique dans un site distant du premier, dans la peau du dos des souris afin de générer des tumeurs secondaires (**Figure 3C**). Nous avons ensuite comparé la croissance de ces tumeurs secondaires à celle de tumeurs primaires, injectées dans des souris naïves contrôles. L'immunité induite lors de la régression des tumeurs primaires n'est pas suffisante pour empêcher complètement le développement de tumeurs secondaires mais permet de retarder de manière significative la croissance tumorale par rapport aux souris contrôles (**Figure 3D**). Le retard de croissance est associé à une infiltration des tumeurs TC-1 secondaires par des lymphocytes T CD8 contrairement aux tumeurs primaires comme montré par immunofluorescence (**Figure 3E**). Ceci n'est cependant pas suffisant pour empêcher la croissance des tumeurs TC-1, ce qui peut s'expliquer par la capacité extrêmement rapide des cellules tumorales TC-1 à se développer dans la peau après greffe. Néanmoins, ces données ont démontré qu'une réponse immunitaire de type mémoire était induite par l'immunothérapie locale combinée TLR9L+aIL-10R α .

L'immunothérapie locale induit une immunité effectrice et mémoire qui contribue partiellement à la régression tumorale et au contrôle de tumeurs récidivantes.

L'immunothérapie locale induit l'activation de lymphocytes T CD8 naïfs dans les ganglions drainant la tumeur.

Afin de déterminer si l'immunothérapie induit l'activation des LT CD8 naïfs dans les ganglions drainant la tumeur, nous avons ensuite caractérisé le phénotype des LT CD8 présents dans les ganglions drainant la tumeur 4 jours après injection de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α ainsi que leurs propriétés fonctionnelles.

Nous avons tout d'abord déterminé par cytométrie de flux après marquage multiparamétrique, le nombre de LT CD8 activés par l'expression différentielle des marqueurs CD44, KLRG1 et CD62L, les LT CD8 effecteurs étant CD44⁺KLRG1⁺ et les LT CD8 effecteurs mémoires sont caractérisés par l'expression de CD44 et la perte d'expression de CD62L (**Figure 4A**). Le nombre de LT CD8 effecteurs et LT CD8 effecteurs mémoires augmente de manière significative dans les souris traitées en comparaison aux souris contrôles non traitées. Ces données démontrent que l'immunothérapie augmente l'activation des lymphocytes T CD8 dans

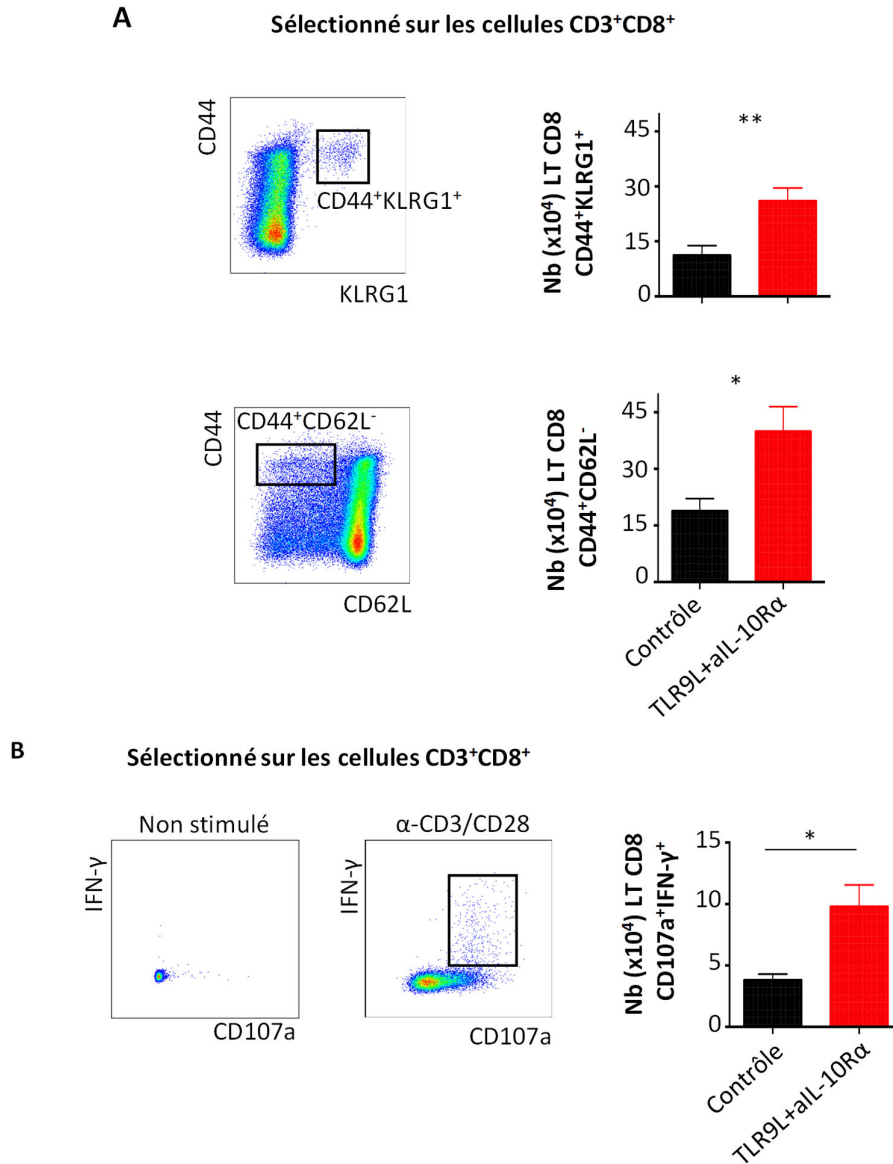


Figure 4. L'immunothérapie induit l'activation de LT CD8 effecteurs dans les ganglions drainants

A. Stratégie d'analyse des LT CD8 effecteurs (partie supérieure) et LT CD8 effecteurs mémoires (partie inférieure) présents dans les ganglions drainant les tumeurs TC-1. Les histogrammes montrent le nombre de chaque sous-population de LT dans les ganglions drainant des tumeurs TC-1 4 jours après immunothérapie locale (barres rouges) ou en l'absence d'immunothérapie locale (barres noires). n=6 souris par groupe ; N=2 expériences indépendantes.

B. Nombre de LT CD8 effecteurs producteurs d'IFN- γ et CD107a avant et après stimulation *in vitro* avec des billes α -CD3/CD28 pendant 15 heures, présents dans les ganglions lymphatiques drainant des tumeurs TC-1 4 jours après immunothérapie locale (barres rouges) ou en l'absence d'immunothérapie locale (barres noires).

A.B. Les analyses statistiques indiquent une différence entre les groupes : **: p<0,01 et *: p<0,05 ; test de Mann-Whitney. n=6 souris par groupe ; N=2 expériences indépendantes.

les ganglions drainant les tumeurs. Nous avons ensuite déterminé l'impact de l'immunothérapie sur les propriétés fonctionnelles des LT CD8 des ganglions drainant la tumeur. Pour cela, des suspensions cellulaires des ganglions drainants de souris ayant reçu l'immunothérapie locale ou des souris contrôles sont stimulées en culture pendant 15 heures avec des billes α -CD3/CD28¹⁶⁸. Puis, l'expression de la cytokine IFN- γ par les LT CD8 et leur capacité de dégranulation mesurée par l'expression en surface membranaire du marqueur CD107a sont déterminées par cytométrie de flux. Ainsi, nous avons identifié un nombre plus important de LT CD8 producteurs d'IFN- γ et de CD107 après stimulation avec des billes α -CD3/CD28 *in vitro* durant 15 heures, dans les souris traitées comparées aux souris contrôles (**Figure 4B**). Enfin, on observe une tendance à l'augmentation de la production du marqueur de surface CD107a, par les LT CD8 des ganglions drainants témoignant d'une activité cytolytique dans les souris traitées en comparaison aux contrôles (**Figure 4B**).

Ces données mettent en évidence que l'immunothérapie locale active des lymphocytes T CD8 effecteurs producteurs d'IFN- γ et dotés de propriétés potentiellement cytotoxiques dans les ganglions drainants.

La proportion des sous-populations de DC infiltrant la tumeur diminue en réponse à l'immunothérapie locale

Afin d'évaluer la contribution des cellules dendritiques dérivées de tumeurs dans l'éducation des LT CD8, nous avons ensuite évalué les propriétés migratoires des DC associées aux tumeurs en réponse à l'immunothérapie locale. Pour cela, les souris porteuses de tumeurs TC-1 de 12 jours sont sacrifiées 0, 3, 6, 12, 24 ou 72 heures après injection péritumorale du traitement TLR9L+aIL-10R α suivant le protocole détaillé dans la **Figure 5A**.

La fréquence et le phénotype de quatre populations de cellules dendritiques sont analysés par cytométrie de flux sur la base de l'expression des marqueurs suivant : les LCs (CD11b⁺CD24⁺), les cDC1 (CD11b⁻CD24⁺CD103⁺), les cDC2 (CD11b⁺, CD24^{low}, CD64⁻) et les moDC (CD11b⁺CD24^{int}CD64⁺) (**Figure 5B**). A l'état basal, les cellules dendritiques infiltrant la tumeur représentent 25,6% \pm 2,3 de l'infiltrat immunitaire de la tumeur. Cette proportion chute avec un minimum à 12 heures de traitement où elles représentent 4,5% \pm 1, (données non montrées). On observe une diminution marquée de la proportion de LC, de cDC1, de cDC2 et

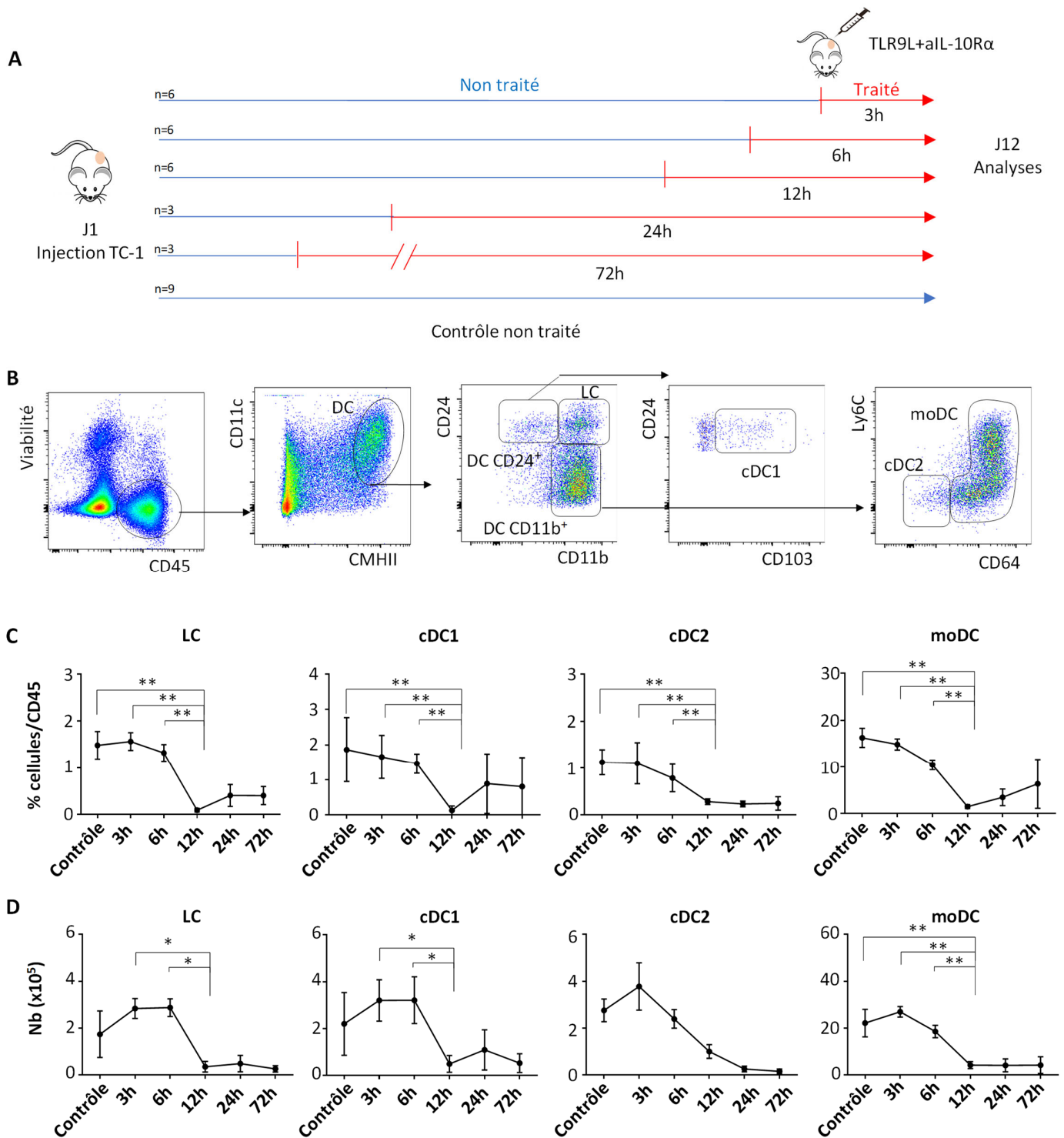


Figure 5 : L'immunothérapie locale module la fréquence et le nombre de DC infiltrant les tumeurs

A. Stratégie expérimentale montrant que des souris sont injectées avec la lignée tumorale TC-1 par voie intradermique à J1 et l'infiltrat immunitaire des tumeurs est analysé à J12. Le traitement TLR9L+aIL-10R α est administré par injection péri-tumorale 0, 3, 6, 12, 24 ou 72 heures avant l'analyse.

B. Stratégie d'analyse de la suspension tumorale en cytométrie de flux. Le marqueur de viabilité utilisé est le NIR Zombie.

C. Fréquence des DC totales et de leurs différentes sous-populations infiltrant la tumeur déterminée par cytométrie de flux après différents temps post-traitement et selon la stratégie d'analyse décrite en B.

D. Nombres absolus des différentes sous-populations de DC par tumeur après différents temps post-traitement calculés en utilisant le nombre de cellules vivantes comptées et leur fréquence relative dans la suspension cellulaire.

C.D. Chaque point de la courbe représente la moyenne des pourcentages (C) et des nombres absolus (D) par condition (\pm S.E.M). Le nombre de points expérimentaux par condition est indiqué en A. Les analyses statistiques indiquent une différence entre les groupes, ** : $p < 0,01$ et * : $p < 0,05$, Test de Kruskal Wallis.

de moDC après 12 heures de traitement (**Figure 5C**). Le nombre absolu des LC, des cDC1 et moDC diminue également significativement dans l'environnement tumoral sous l'effet du traitement (**Figure 5D**). Ces données suggèrent que les DC intra-tumorales ont migré dans les ganglions drainants. Cependant, on ne peut pas exclure qu'elles meurent localement sous l'effet du traitement.

170

L'immunothérapie locale induit la migration et la maturation des cellules dendritiques d'origine cutanée dans les ganglions drainant la tumeur

Afin de déterminer si l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α induit une migration des DC dans les ganglions drainant la tumeur, nous avons analysé leur fréquence, leur nombre absolu et leur phénotype dans les ganglions drainants à différents temps précoces de la réponse au traitement. Pour cela, les suspensions cellulaires de ganglions drainant la tumeur sont enrichies en DC sur gradient de densité et la fréquence et le phénotype des DC résidentes des ganglions (DC résidentes) et des DC d'origine cutanée (MigDC) parmi lesquelles les cDC1 et les cDC2 sont analysées par cytométrie de flux après marquage multiparamétrique. La stratégie d'analyse décrite dans la **Figure 6A** permet de différencier les DC résidentes exprimant des niveaux élevés de CD11c et intermédiaire de CMHII (DC CD11c⁺CMHII^{int}) et des DC migratoires provenant de la peau par la voie lymphatique suite à une activation. Les DC dérivées de la peau (MigDC) expriment des niveaux élevés de CMHII et plus faibles de CD11c (DC CD11c^{int}CMHII⁺).

L'immunothérapie locale induit une augmentation d'un facteur 4 de la proportion de MigDC dans les ganglions drainant la tumeur et d'un facteur 5 de leur nombre absolu à 12 heures de traitement avec un pic entre 12 et 24 heures post-traitement (**Figure 6B**, panel gauche). La fréquence et le nombre de DC résidentes ne sont pas impactés par le traitement entre 12 et 24 heures. Néanmoins, une augmentation d'un facteur 2 environ de leur nombre est observée après 72 heures de traitement (**Figure 6B**, panel droit). Nous avons ensuite déterminé la fréquence et le nombre absolu des sous populations : Mig cDC1 de phénotype CD24⁺CD11b^{low}CD103⁺ et des Mig cDC2 CD24^{low}CD11b⁺ parmi les migDC (**Figure 6A**). La population de LC migratoires est comprise dans la population CD24⁺CD11b^{low}CD103⁻ mais l'absence de marqueur spécifique ne nous permet pas de la quantifier de manière précise dans les ganglions. La fréquence des deux populations de DC migratoires cDC1 et cDC2 est faiblement modulée

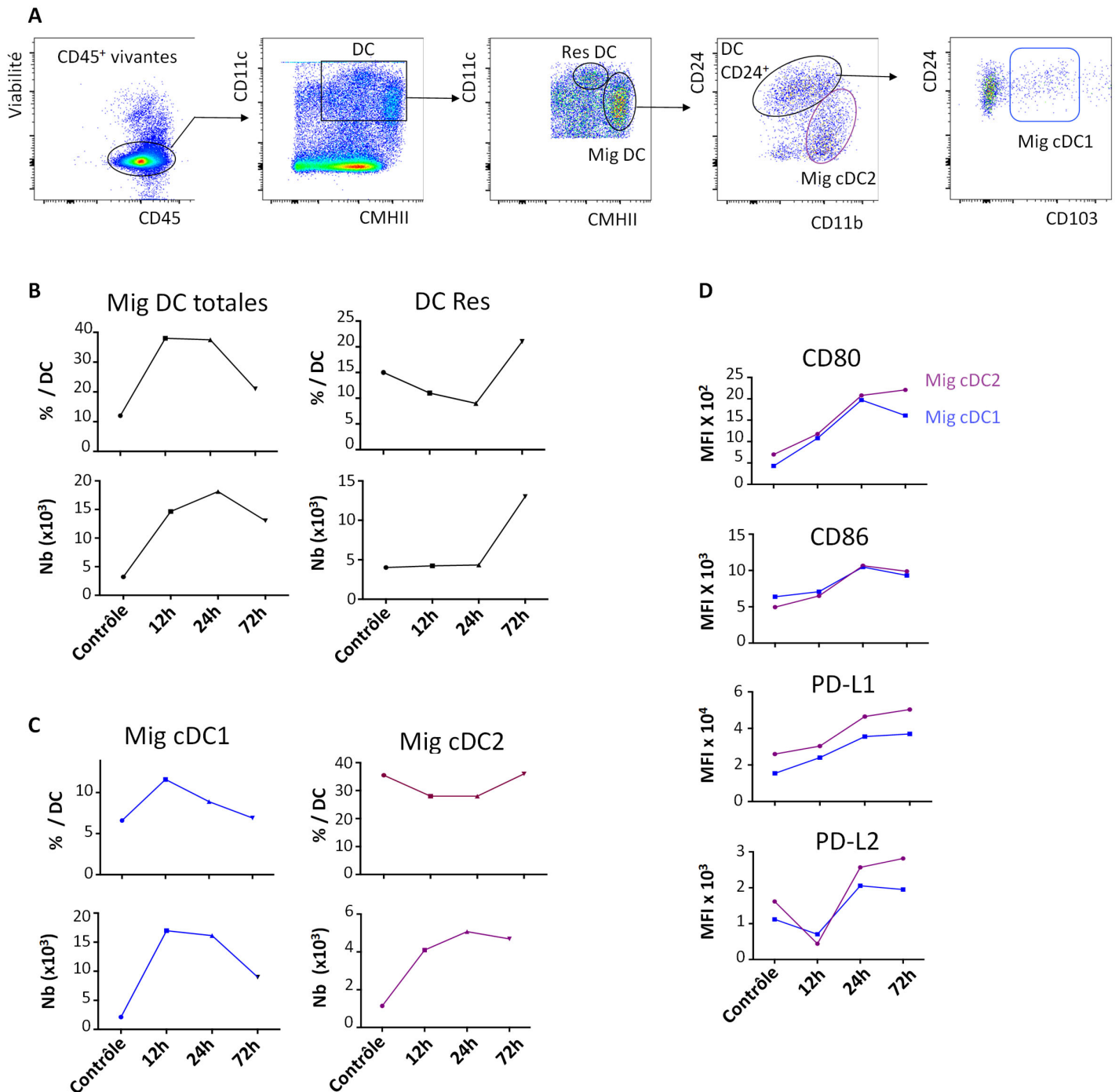


Figure 6 : Les cellules dendritiques infiltrant la tumeur migrent dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur en réponse au traitement et présentent un phénotype mature.

A. Stratégie d'analyse des DC des ganglions drainant les tumeurs TC-1 de 12 jours. Un enrichissement en cellules de basse densité (LDF) est effectué et les sous-populations de DC analysées par cytométrie de flux. La première fenêtre CD45⁺ correspond à la fraction dépourvue de débris et doublets. Le marqueur de viabilité utilisé est le NIR Zombie.

B.C. La fréquence et le nombre absolu des DC obtenus aux temps indiqués après administration péritumorale du traitement TLR9L+aIL-10R α sont comparés à ceux des DC de ganglions de souris non traitées. La cinétique est réalisée comme décrit précédemment (Figure 5A). La fréquence et le nombre des différentes populations de DC (B) et sous-populations Mig DC (C) infiltrant les ganglions drainant les tumeurs sont déterminés par cytométrie de flux après différents temps post-traitement et selon la stratégie d'analyse décrite en A. Chaque point expérimental correspond à la fréquence et au nombre moyens des DC provenant des ganglions poolés de trois souris.

D. Moyenne de Fluorescence (MFI) des marqueurs de maturation indiqués par les sous-types cDC1 et cDC2 parmi les Mig DC des ganglions en fonction du temps post-traitement, après marquage multiparamétrique et analyse par cytométrie de flux. Chaque point expérimental correspond à la MFI moyenne des DC provenant des ganglions drainants poolés de trois souris.

sous l'effet du traitement. Par contre, on note une augmentation dès 12 heures de leur nombre absolu d'un facteur 8 pour les Mig cDC1 et d'un facteur 4 pour les Mig cDC2 (**Figure 6C**). Ces données suggèrent que ces DC ont migré du tissu vers les ganglions sous l'effet de l'immunothérapie. Puis, nous avons ensuite analysé si la migration des populations de DC migratoires était associée à une augmentation de leur état de maturation en analysant le niveau d'expression des marqueurs de maturation CD80, CD86, PD-L2 et PD-L1. Comme montré dans la **Figure 6D**, l'expression de chacun de ces quatre marqueurs de maturation est augmentée dans les Mig cDC1 et Mig cDC2.

Ces données démontrent que des DC matures d'origine cutanée migrent et s'accumulent dans les ganglions drainant la tumeur sous l'effet du traitement.

Le traitement local TLR9L+aIL-10R α induit la reprogrammation des cellules dendritiques conventionnelles et de l'immunité anti-tumorale

Afin de déterminer si les DC migratoires présentes dans les ganglions jouent un rôle dans la différenciation de LT CD8 spécifiques de la tumeur, nous avons déterminé si elles ont acquis *in vivo* l'antigène protéique tumoral E7 exprimé par les tumeurs TC-1, l'ont processé et sont capables de présenter l'épitope T CD8 immunodominant (peptide E7aa49-57) dérivé de cet antigène E7. Pour cela, nous avons utilisé une approche *ex vivo* qui consiste à évaluer la capacité des DC des ganglions à activer des LT CD8 spécifiques de l'antigène E7 *ex vivo*. Si les DC capturent *in vivo* et processent l'antigène E7 exprimé par les cellules tumorales TC-1, elles doivent présenter dans leurs molécules de CMHI-Db un fragment peptidique immunodominant provenant de E7 (aa49-aa57). Le complexe Db-E7 ainsi formé peut être reconnu spécifiquement par le TCR de LT CD8 spécifiques du complexe Db-E7⁺ qui entrent alors dans un stade prolifératif. Les LT CD8 naïfs spécifiques de Db-E7 proviennent de souris transgéniques dites E7TCR- β qui sont pourvues de 1% de LT CD8 naïfs spécifiques de Db-E7. Nous avons ainsi analysé la prolifération des LT CD8 spécifiques de l'antigène E7 *via* la dilution du marquage CFSE, après co-culture avec des DC triées provenant des ganglions drainant les tumeurs dans des souris contrôles (DC contrôles) ou des souris ayant reçu le traitement local 36 heures avant le tri [DC(TLR9L+aIL-10R α)] (**Figure 7A**).

A titre d'exemple, la **Figure 7B** montre que les cDC2 des souris contrôles et traitées induisent la prolifération des LT CD8, ce qui démontre qu'elles sont capables de présenter l'antigène tumoral E7 acquis *in vivo*. De plus, l'ajout du peptide immunodominant Db-E7 dans la co-

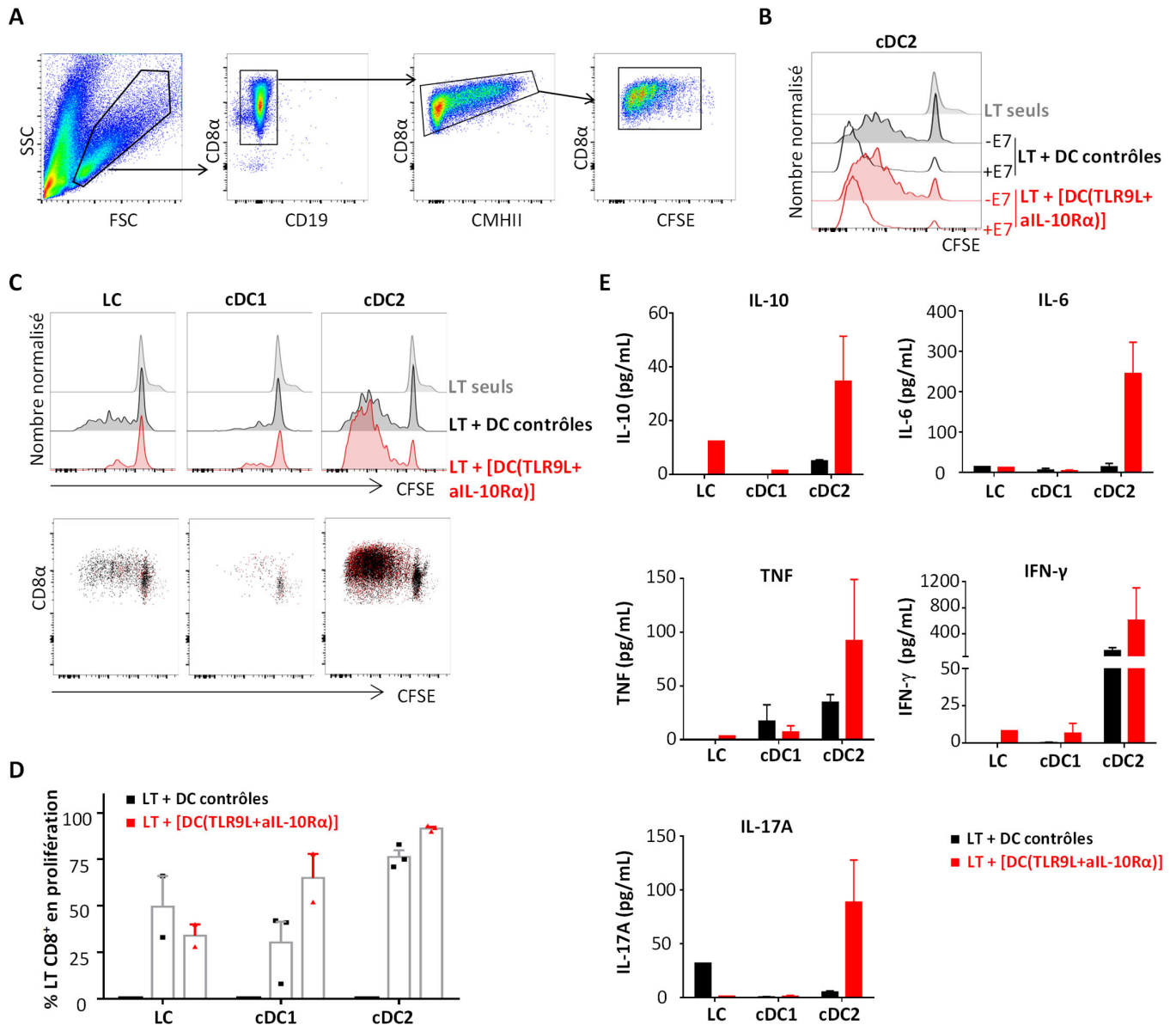


Figure 7. Les DC conventionnelles induisent l'expansion massive de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux

A.B.C. Les sous-populations de DC migratoires ont été triées à partir des ganglions drainant les tumeurs TC-1 de 14 jours, 36 heures après traitement local ou non par la combinaison TLR9L+aIL-10R α . Les DC migratoires (20 000/puits) ont été mises en co-culture durant 4 jours avec des LT CD8 spécifiques de E7 naïfs marqués au CFSE (250 000/puits). La prolifération spécifique de l'antigène a été évaluée en mesurant la dilution du CFSE par cytométrie en flux après marquage multiparamétrique avec des anticorps fluorescents contre CD8 α , CD19, CMHII.

A. Stratégie d'analyse des LT CD8 spécifiques de E7 en prolifération.

B. Histogrammes montrant la prolifération de LT CD8 spécifiques de E7 induites par les cDC2 isolées à partir des ganglions drainant les tumeurs TC-1 non traitées (LT+DC contrôles, lignes noires) ou de souris traitées [LT+DC(TLR9L+aIL-10R α)] avec ou sans addition de peptide Db-E7 (aa 49-aa57).

C. Histogrammes montrant la prolifération de LT CD8 spécifiques de E7 induites par les LC, cDC1 et cDC2 isolées à partir des ganglions drainants les tumeurs TC-1 non traitées (LT+DC contrôles, lignes noires) ou de souris traitées [LT+DC(TLR9L+aIL-10R α)] sans addition de peptide Db-E7 (aa 49-aa57) (E7).

D. Graphique à barres montrant les fréquences des LT CD8 prolifératifs parmi les LT CD8 marqués au CFSE totaux (\pm S.E.M), après co-culture *in vitro*. N = 2-3 expériences indépendantes.

E. Stimulation secondaire des LT CD8 en co-culture avec des splénocytes C57BL/6 (100 000/puits) chargés avec le peptide E7 pendant 4 jours supplémentaires. Les surnageants de culture ont été analysés par la technique CBA pour les cytokines indiquées. Les graphiques à barres montrent les concentrations de cytokines (\pm S.E.M). N = 2 expériences individuelles pour les groupes cDC1 et cDC2 et N = 1 expérience individuelle pour le groupe LC. Chaque point expérimental est le résultat de la stimulation primaire induite par les sous-populations de DC indiquées, enrichies à partir de 10 souris regroupées pour chaque condition.

culture augmente la prolifération des LT CD8 montrant que les cellules triées sont fonctionnelles (**Figure 7B**).

Pour déterminer l'impact du traitement sur la maturation fonctionnelle des différentes sous-populations de DC, nous avons ensuite comparé les proportions de LT CD8 prolifératifs sans aucun ajout de peptide E7 dans la co-culture. De façon surprenante, les cDC2 dérivées des tumeurs sont les DC les plus efficaces dans l'induction de la prolifération des LT CD8 spécifiques de l'antigène. En revanche, les sous-populations de LC et cDC1 migratoires induisent une prolifération limitée des LT (**Figure 7C-D**). A noter, que le traitement local TLR9L+aIL-10R α augmente la prolifération induite par les cDC2 et dans une moindre mesure par les cDC1, mais pas par les LC migratoires (**Figure 7D**). Ceci démontre que les DC conventionnelles cDC1 et cDC2 sont capables de présenter un épitope CD8 dérivé de l'antigène tumoral E7 acquis *in vivo* et que l'immunothérapie locale induit une maturation qui augmente leurs capacités présentatrices d'antigène.

Pour évaluer la capacité des DC tumorales à reprogrammer l'immunité anti-tumorale, nous avons ensuite analysé les cytokines produites par les LT CD8 éduqués par les différentes sous-populations de DC après stimulation secondaire avec 100 000 splénocytes chargés avec le peptide E7 pendant 4 jours supplémentaires de culture. Comme le montre la **Figure 7E**, les cDC2 sont les principales DC capables d'amorcer la production d'IFN- γ par les LT CD8 éduqués *in vivo* et le traitement local TLRL+aIL-10R α augmente leurs capacités d'éducation des LT. Le traitement a également induit la polarisation des LT CD8 vers la production de TNF et IFN- γ principalement par les cDC2.

L'ensemble de ces données démontre que le traitement local des tumeurs TC-1 avec TLR9L+aIL-10R α augmente fortement la maturation fonctionnelle des cDC, principalement des cDC2, conduisant à l'amorçage massif des LT CD8 producteurs d'IFN- γ ce qui peut expliquer la restauration de l'immunité adaptative anti-tumorale.

Conclusion

Nous avons démontré que les CEC humains et murins sont infiltrés par les sous-populations de DC décrites dans la peau (LC, cDC1, cDC2 et moDC), nous permettant ainsi de valider la pertinence du modèle murin TC-1 pour l'analyse du rôle des DC dans l'environnement tumoral

des CEC. Nous avons également identifié les cellules cibles du traitement TLR9L+aIL-10R α *in vitro*, mettant en évidence le rôle direct des cellules CMHII⁺F4/80⁻, à savoir, les cellules dendritiques, dans la production de l'IL-12, la cytokine clé impliquée dans la génération de l'immunité adaptative anti-tumorale. Ensuite, nous avons mis en évidence la mise en place d'une réponse T CD8 effectrice mémoire intra-tumorale qui contribue partiellement à la régression tumorale et au contrôle des tumeurs récidivantes. L'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α induit en effet l'activation des lymphocytes T CD8 naïfs dans les ganglions drainant la tumeur, qui deviennent alors producteurs d'IFN- γ et dotés de propriétés potentiellement cytotoxiques. En parallèle, nous avons mis en évidence que la proportion des sous-populations de DC infiltrant la tumeur diminue en réponse à l'immunothérapie locale en raison de leur migration et accumulation dans les ganglions lymphatiques drainants, associée à leur maturation. Pour finir, nous avons démontré que l'immunothérapie locale induit la reprogrammation des cellules dendritiques conventionnelles, principalement les cDC2, conduisant à l'amorçage massif des LT CD8 producteurs d'IFN- γ ce qui peut expliquer la restauration de l'immunité adaptative anti-tumorale. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans la dernière partie de la thèse.

Matériel et méthodes

Modèles murins

Les conditions d'élevage et de manipulation des souris ont été menées dans le respect des règles de maintien des souris de laboratoire et en accord avec le comité d'éthique pour l'expérimentation animale.

Modèle syngénique de tumeur intradermique

La lignée de cellules TC-1 générée à partir de cellules épithéliales pulmonaires de souris C57BL/6 transduites avec les oncogènes E6 et E7 de HPV16 ainsi que Ha-ras (Lin et al., 1996) et immortalisées a été utilisée pour l'obtention de tumeurs cutanées. Des souris C57BL/6 femelles de 8 semaines d'origine commerciale (Laboratoire Charles River, L'Abresle, France) ont été injectées avec 20 000 cellules TC-1 dans 10 μ L de PBS par voie intradermique grâce à une seringue à insuline sous anesthésie. La croissance tumorale est suivie par mesure au moment du sacrifice. Le volume tumoral de forme ellipsoïdale est calculé grâce à la formule suivante $\pi/6 \times$ longueur \times largeur \times profondeur.

Souris transgénique E7TCR-β

Les souris E7TCR-β de fond génétique C57BL/6 expriment la chaîne variable β12 du récepteur T des lymphocytes T. Dans ces souris 1% des LT CD8 possède un récepteur T (TCR) capable de reconnaître le fragment peptidique E7₄₉₋₅₇ dans le contexte de la molécule de CMHI H2-Db (Narayan et al., 2009).

Traitements in vivo

Des souris porteuses de tumeurs TC-1 de 30 à 50 mm³ (jour 7 post-injection) ont été réparties de manière homogène dans les groupes indiqués (n=3 à 7 souris par groupe) pour des traitements à jours 7 avec différents agonistes de TLR, comme indiqué, ou l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10Rα, injectés par voie péritumorale en 4 points (volume total 40 μL en PBS). Un groupe de souris a été traité avec le traitement de référence utilisé pour le carcinome basocellulaire qui est la crème Aldara®. Aldara® a été appliqué localement tous les deux jours sur la tumeur (20 mg/application).

Souris C57BL/6 porteuses de tumeurs secondaires

Des souris C57BL/6 dont la tumeur TC-1 a régressé totalement suite à l'injection locale du traitement TLR9L+aIL-10Rα ont été suivies durant 4 semaines. Après cicatrisation totale de la peau et repousse des poils, ces souris ont reçu une seconde greffe de tumeurs TC-1 en intradermique (tumeur secondaire), à un site d'injection distant du premier. Des souris témoins naïves reçoivent également une injection intradermique de 20 000 cellules tumorales TC-1 (tumeur primaire).

Souris C57BL/6 déplétées in vivo en LT CD8.

Des souris porteuses de tumeurs TC-1 dont la taille est comprise entre 30 et 100 mm³ ont été réparties de manière homogène dans les groupes indiqués et déplétées en LT CD8 *in vivo* par 3 injections intrapéritonéales consécutives par semaine de 100 μg d'anticorps monoclonal dirigé contre le marqueur de surface CD8β (clone H35-17.2, produit en ascites) selon la stratégie schématisée Figure 3A.

Biopsies de patients atteints de Carcinome Épidermoïde Cutané

Des biopsies de carcinome épidermoïde cutané ont été prélevées chez des patients opérés au service de chirurgie du Centre Antoine Lacassagne (Nice, France) conformément aux règles

éthiques institutionnelles. Les caractéristiques des patients sont rapportées dans le Tableau 1. Après digestion mécanique, les biopsies tumorales ont été digérées avec de la collagénase IV de *Clostridium histolyticum* (1,25 mg/mL) (Sigma-Aldrich) et de la DNase II-S de pancréas bovin (0,13 mg/mL) (Sigma-Aldrich) à 37°C pendant 40 minutes sous agitation constante. Les suspensions cellulaires ont été filtrées à travers un tamis cellulaire de 70 µm pour éliminer les agrégats. La concentration cellulaire est déterminée par numération sur une cellule de comptage de type KOVACS en présence d'éosine 0,15% afin d'exclure les cellules mortes. Les cellules sont ensuite marquées et analysées par cytométrie de flux afin d'analyser la fréquence des DC infiltrant les tumeurs.

Préparation des suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires de tumeurs sont préparées par digestion enzymatique de 20 minutes dans 5 mL de solution de milieu RPMI 1640 (Lonza) comprenant 1 mg/mL de collagénase IV et 0,2 mg/mL de DNase (Sigma). Après digestion, les cellules sont collectées dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (R10) et les débris éliminés par filtration sur un tamis cellulaire de 70 µm (BD Biosciences). La concentration cellulaire est déterminée par numération sur une cellule de comptage de type KOVACS en présence d'éosine 0,15% afin d'exclure les cellules mortes.

Afin d'évaluer les fonctions anti-tumorales des LT CD8 éduqués *ex vivo* par les sous-populations de DC infiltrant les ganglions drainants les tumeurs traitées ou non par l'immunothérapie locale, nous avons restimulé les LT par l'ajout de splénocytes chargés en peptide E7. Les suspensions de rates C57BL/6 sont préparées par dissociation mécanique et les cellules collectées dans du milieu R10. Les globules rouges sont lysés dans une solution ACK (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂ EDTA, pH 2,2) puis la concentration cellulaire est déterminée par numération sur une cellule de comptage de type KOVACS en présence d'éosine 0,15% afin d'exclure les cellules mortes.

Analyse par cytométrie de flux

Les suspensions cellulaires murines sont d'abord incubées dans du PSE (PBS EDTA 5 mM, SVF 3%) avec un anticorps purifié dirigé contre les FcγRII et III (CD16/CD32) (anticorps monoclonal 2.4G2 ; BD Biosciences), afin de saturer les récepteurs Fc et donc d'empêcher la fixation non-spécifique des anticorps. Les cellules sont ensuite incubées avec le mélange d'anticorps dirigés contre les différents marqueurs et couplés à différents fluorochromes en présence de Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences) pendant 30 minutes à 4°C afin d'empêcher

l'endocytose des anticorps suite à leur fixation sur certains récepteurs (cf Tableaux 2 et 3). Les cellules sont ensuite lavées en PSE et incubées avec un marqueur fluorescent (NIR Zombie, ou 7-AAD ; BD Biosciences) permettant d'exclure les cellules mortes. Les cellules tumorales humaines ont été pré-incubées avec du sérum de souris (1/10) (Biowest) et des IgG de sérum humain (100 pg/mL) (Sigma-Aldrich) 30 minutes à 4°C pour empêcher une liaison non spécifique. Des panels d'anticorps ont été préparés dans du PBS 0,1% d'albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich) 0,05% d'azide de sodium (Merck), 5 mM EDTA et incubés avec des cellules pendant 30 minutes à 4°C. Les sous-populations de cellules immunitaires sont ensuite caractérisées par cytométrie de flux (LSR Fortessa, Becton Dickinson). Les données sont analysées *via* les logiciels d'analyses DIVA, FlowJo et GraphPad Prism.

Sélections positive et négative des sous-populations de cellules immunitaires

Des tumeurs de 15 jours sont collectées et les suspensions cellulaires obtenues après digestion enzymatique sont regroupées pour obtenir une préparation homogène. La suspension cellulaire de tumeur est fractionnée en 9 conditions de 20 millions de cellules par condition. Après blocage des récepteurs Fc par un anticorps anti CD16/CD32 (anticorps monoclonal 2.4G2 ; BD Biosciences) pendant 15 minutes à 4°C dans du PSE (PBS EDTA 5mM, SVF 3%), chaque suspension cellulaire est incubée en PSE pendant 15 minutes à 4°C avec un anticorps monoclonal biotinylé permettant de cibler un type cellulaire donné (Tableau 3). Les cellules marquées avec les anticorps biotinylés sont ensuite incubées avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine (Miltenyi) selon le protocole recommandé par le fournisseur. Enfin, les cellules d'intérêt sont purifiées par sélection immunomagnétique sur une colonne Miltenyi de type MS qui permet de séparer physiquement une fraction cellulaire enrichie en un type cellulaire (les cellules CD45⁺ pour la suspension incubée avec l'anticorps anti-CD45 par exemple) et une fraction déplétée en ce même type cellulaire. Les cellules obtenues sont analysées par cytométrie de flux pour vérifier la pureté des fractions enrichies et déplétées.

Stimulation *in vitro* des suspensions cellulaires par TLR9L+aIL-10R α

Les suspensions tumorales totales ou déplétées en un type cellulaire et les fractions cellulaires enrichies sont stimulées *in vitro* dans une plaque de culture 96 puits fond plat à raison de 500 000 cellules par puits dans du milieu DMEM supplémenté par 10% de SVF, 200 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium en présence de 5 μ M de TLR9L et 10 μ M d'anticorps monoclonal purifié dirigé contre IL-10R α . Les surnageants de culture sont collectés après 24 heures et analysés pour leur contenu en cytokines IL-12p40, IL-12p70 et IL-10 par la

technique CBA (cytokine bead assay) selon les recommandations du fournisseur (BD Biosciences).

Marquages d'immunofluorescence sur coupe

Les tumeurs TC-1 ont d'abord été incubées en Antigenfix (Diapath) pendant 1 heure à 4°C afin de fixer le tissu. Les échantillons ont ensuite été lavés en PBS et incubés toute la nuit à 4°C dans du PBS contenant 30% de sucrose (Sigma) afin de les déshydrater. Les tumeurs sont ensuite incluses dans le l'OCT (Tissue-Tek) et congelée avant d'être coupées au cryostat (7 µm). Afin de procéder au marquage avec des anticorps immunofluorescents, les coupes de tumeur sont d'abord incubées à température ambiante pour une heure en solution de blocage comprenant 2% de BSA (Sigma), 1% de SVF et 9,5% de saponine (Sigma) en PBS. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps primaire purifié dirigé contre CD8 (Clone H35-17.2 ; BD Biosciences) toute la nuit à 4°C et sont ensuite incubées à température ambiante durant 2 heures avec un anticorps secondaire Donkey anti-rat A594 (ThermoFisher Scientific). Enfin, les noyaux sont marqués *via* le Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) à température ambiante durant 5 minutes. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Prolong Diamond (ThermoFisher Scientific). Les images ont été acquises avec un microscope confocal LSM780 (Zeiss).

Stimulation des lymphocytes T CD8 *in vitro*

Les suspensions cellulaires de ganglions lymphatiques sont préparées par digestion mécanique. Après filtration, les cellules sont comptées et mises en plaque 96 puits fond plat dans du milieu complet de culture DMEM (Life Technologies) supplémenté avec 10% SVF, 1 mM de sodium pyruvate (Life Technologies), 2 mM de L-Glutamine (Lonza), 100 U ml⁻¹ penicilline et 100 U ml⁻¹ streptomycine (Lonza) à raison de 1 million de cellules par puits dans 80 µL. Des billes α-CD3/CD28 (Dynabeads) sont ajoutées (1 million de billes / mL) dans 80 µL de milieu de culture. Après 15 heures de co-culture, 40 µL de Golgi Stop/Golgi Plug (BD Biosciences) sont ajoutés en même temps que l'anticorps fluorescent spécifique de CD107a et incubés durant 5 heures supplémentaires. A l'issue, les cellules sont lavées et le marquage extra cellulaire est effectué comme reporté ci-dessus. Afin de réaliser le marquage intra-cellulaire, les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées avec le kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps fluorescent spécifique de l'IFN-γ et analysées par cytométrie de flux.

Isolement de différentes sous-populations de DC par tri cellulaire

Les ganglions brachiaux et axillaires sont prélevés dans 3 groupes expérimentaux : le groupe contrôle sans tumeur (n=20), le groupe avec tumeur non traitée (n=26), et le groupe avec tumeur traitée (n=26). N=3 expériences indépendantes. Après digestion mécanique des ganglions comme décrit précédemment, un enrichissement en cellules dendritiques est effectué avec un gradient de densité d'optiprep (1 : 065 ProteoGenix). Les cellules sont ensuite marquées selon la stratégie de marquage décrite dans la Figure 6 et les différentes sous-populations de DC sont triées sur un cytomètre trieur FACS ARIA (Becton Dickinson). La pureté de chaque type cellulaire est vérifiée par cytométrie de flux et est supérieure à 90%.

Préparation des lymphocytes T CD8 marqués au CFSE

Les ganglions de souris E7TCR- β sont prélevés et les suspensions cellulaires sont préparées par dissociation mécanique. Les LT CD8 naïfs sont purifiés par déplétion magnétique des granulocytes, des cellules présentatrices d'antigène, des LT CD4 et des lymphocytes activés, en utilisant des anticorps monoclonaux de rat purifiés dirigés contre les molécules Gr1, CMHII, B220, CD4 et CD25 et des billes magnétiques anti-Rat selon les recommandations du fournisseur (DynaI®, Invitrogen). La pureté des LT CD8 naïfs après déplétion magnétique des cellules contaminantes est d'environ 90% et comprend 1% des LT CD8 spécifiques du complexe CMH-I-D^b-E7₄₉₋₅₇. Les cellules sont ensuite reprises dans du PBS à une concentration de 20.10⁶/mL puis incubées pendant 5 minutes avec 4 μ M de carboxyfluoresceine succinimidyl ester (CFSE) à température ambiante et à l'obscurité pour obtenir une population de LT CD8 couplés au CFSE. La dilution de la fluorescence du CFSE lors de la co-culture des lymphocytes avec les cellules dendritiques permet de mesurer leur prolifération.

Co-culture des LT CD8 et des DC ; analyse de la prolifération des LT CD8

Les populations de DC isolées par tri (20 000 cellules/puits) sont co-cultivées avec les LT CD8-CFSE (250 000/puits) dans des plaques de culture 96 puits à fond rond pendant quatre jours dans un incubateur à 5% de CO₂ dans 200 μ L de milieu DMEM (Lonza) comprenant 10% de SVF en présence de 200 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 100 U/ml de pénicilline et de streptomycine et 50 μ M de 2- β mercaptoéthanol.

Après quatre jours de culture, les cellules lavées sont incubées 30 minutes à température ambiante avec le pentamère du complexe CMHI-D^b-E7₄₉₋₅₇ couplé à la phycoerythrine (PE) (ProImmune). Cette sonde fluorescente permet de détecter spécifiquement les LT CD8 spécifiques de haute affinité du complexe D^b-E7₄₉₋₅₇. Les cellules sont ensuite marquées avec

des anticorps fluorescents dirigés contre les marqueurs CD8, CD19 et CMHII afin d'analyser les cellules CD8⁺Db-E7⁺CD19⁻CMHII⁻ sur le cytomètre de flux FACS Fortessa. Les lymphocytes spécifiques du complexe D^b- E7₄₉₋₅₇ sont identifiables grâce aux marqueurs CD8 et pentamère D^b-E7. La prolifération des LT CD8 est déterminée grâce aux marqueurs CD8 et CFSE. Le paramètre forward size scatter FSC (diffusion de la lumière) permet de séparer les cellules en fonction de leur taille et est utile pour identifier les LT en prolifération (cellules blastiques). Pour la restimulation secondaire, les cellules LT CD8 ont été incubées 4 jours supplémentaires avec des splénocytes C57BL/6 (100 000/puits) préchargés avec le peptide E7 (aa49-57) et les surnageants évalués pour les cytokines comme indiqué, en utilisant la technologie CBA (BD Biosciences).

Statistiques

Les groupes expérimentaux ont été comparés deux à deux en utilisant le test de Mann Whitney non apparié ou de Kruskal Wallis. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (Graph Software, San Diego, CA).

Informations supplémentaires

Anticorps anti-humains			
Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
CD1c	BV421	F10/ 21A3	BD
CD3	FITC	UCHT1	BD
CD19	FITC	HIB19	BD
CD56	FITC	B159	BD
CD15	FITC	HI98	BD
CD141	PE	1A4	BD
HLA-DR	PECF594	G46-6	BD
CD45	PerCP-Cy5.5	HI30	BD
CD11c	PeCy7	B-ly6	BD
CD304	APC	U21-1283	BD
CD16	A700	3G8	BD
CD14	APC H7	MOP9	BD

Tableau 2. Anticorps anti-humains utilisés en cytométrie de flux

Anticorps anti-souris			
Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
CD45	Biotine	30-F11	BD
CD11c	Biotine	N418	BD
F4/80	Biotine	BM8	BioLegend
Ly6G	Biotine	1A8	BioLegend
CD8	Biotine	53-6.7	BioLegend
CD49b	Biotine	DX-5	BD
CMHII	Biotine	2G9	BD
CD4	Biotine	GK1.5	BD
CD45	BV510	30-F11	BD
CD86/B7-2	BV510	GL1	BD
CD3	BV421	145-2C11	BD
CMHII	BV421	M5/114	BD
CD24	BV605	M1/69	BD
CD11c	BV650	N418	Biolegend
CD64	BV711	X54-5/7.1	Biolegend
CD8 α	BV786	53-6.7	BD
KLRG1	A488	2F1	BD
CD24	FITC	M1/69	BD
CD107a	FITC	1D4B	BD
CD326/EpCAM	BB515	G8.8	BD
CD45	PerCP	30-F11	BD
Ly6C	PerCP-Cy5.5	AL-21	BD
CD11c	PETR	N418	ThermoFisher scientific
CD11c	PEdazzle	N418	Biolegend
Ly6C	PeCF594	AL-21	BD
CD11b	PeCy7	M1/70	BD
CD62L	PE	MEL-14	BD
CD103	PE	M290	BD
CD274/PD-L1	PE	MIH5	BD
TLR9	PE	J15A7	BD
CD44	APC	IM7	BD
CD273/PD-L2	APC	TY25	Biolegend
IFN- γ	APC	XMG1.2	BD
CD64	A647	X54-5/7.1	BD
CD103	APC-R700	M290	BD
Ly6G	A700	1A8	BD
CD80/B7-1	Biotine	16-10A1	BD

Tableau 3. Anticorps anti-souris utilisés en cytométrie de flux

Autres réactifs		
Marqueur	Fluorochrome	Fournisseur
Streptavidine	APC	BD
Pentamère Db-E7	PE	Proimmune
CFSE		Thermo scientific
7-AAD		BD
Zombie	Near-infra red	Biologend
Zombie	Aqua	Biologend

Tableau 4. Réactifs utilisés en cytométrie de flux

Partie II – Papier 1 : Rôle de l'immunité innée dans le mécanisme d'action de l'immunothérapie locale

A local TLR9L+IL-10R α -based immunotherapy induces skin carcinoma regression through the coordinated action of CXCL1/2 producing mature macrophages and recruited anti-tumor neutrophils

Vermeulen O¹, Meghraoui-Kheddar A¹, Khou S^{1a}, Petti L¹, Morin L¹, Cazareth J¹, Braud VM¹ and Anjuère F^{1, §}.

¹Université Côte d'Azur, CNRS UMR7275, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France

Present address:

^aDepartment of Cell, Developmental & Cancer Biology, Oregon Health & Science University, 3181 SW Sam Jackson Park Road, Portland, OR, 97239, USA

[§] *corresponding author* : Dr. Fabienne Anjuère, anjuere@ipmc.cnrs.fr

ABSTRACT

Cutaneous squamous cell carcinomas (cSCC) are the 2nd deadliest skin cancer for which therapeutic alternatives to surgery are needed against advanced disease. We developed an innovative local immunotherapy for the treatment of invasive cSCC relying on the stimulation of the innate immunity through TLR9 and the blockage of IL-10 induced immunosuppression. We investigate here the nature and dynamics of the innate effectors involved in the early response to treatment in TC-1 mouse model of cSCC by combining immunophenotyping and functional analyses. We observed a rapid tumor shrinking associated with a diffuse hemorrhagic necrosis. We identified neutrophils massively recruited in the tumor bed and harboring an activated CXCR2^{low}CD62L^{low}ICAM-1^{bright} phenotype associated to cytotoxic functions including production of myeloperoxidase (MPO), Granzyme B enzyme and reactive oxygen species (ROS). *In vivo* depletion of these neutrophils reduced the treatment efficacy highlighting their critical role in the early steps of tumor regression. Importantly, subsets of macrophages abundantly represented in growing tumors were the first cells activated by the local immunotherapy and displayed a pivotal role in neutrophil recruitment and activation through the production of CXCL1 and CXCL2 chemokines. Lately, immature macrophages were recruited from the periphery to control tissue injury. Altogether, our data elucidated the sequential and complementary roles of tumor-associated macrophages and recruited neutrophils in response to a local anti-tumor immunotherapy by a mechanism involving the CXCL1/2-CXCR1/2 axis.

Key words: Cutaneous Squamous Cell Carcinoma, Local Immunotherapy, Innate myeloid immunity, Macrophage, Neutrophil

INTRODUCTION

Cutaneous squamous cell carcinomas (cSCC) are the 2nd deadliest skin cancer and their incidence is constantly increasing (Sung et al., 2020). They are mainly treated by surgery but can reach a stage of advanced disease associated with rapid local relapse (Stratigos et al., 2020; Chapalain et al., 2020). Blockade of the PD-1/PD-L1 inhibitory axis has provided promising results in cSCC patients (Migden et al., 2020), but the complete response rate below 10% was recently estimated insufficient by the French Health Authority which led to the rejection of the use of current anti-PD1 antibodies to cure patients with advanced non operable disease. It is therefore crucial to develop new therapeutic strategies against these tumors.

Tumor escape is associated with complex immune-suppressive mechanisms in place within tumors (Hanahan & Weinberg, 2011). It is now established that combined therapeutic strategies based on local immune stimulation and blockade of immunosuppressive mechanisms are the most promising and could lead to long-term protection. Trinchieri's group identified that peritumoral administration of TLR9 agonist combined with a chemokine agonist and the repeated systemic administration of an anti-IL-10R antibody represented a potent therapeutic cocktail to treat tumors (Guiducci et al., 2005).

Based on this precursor concept, we developed an innovative local immunotherapy for the treatment of invasive cSCC. This immunotherapy relies on the stimulation of the innate immunity through TLR9 and the blockage of IL-10 induced immunosuppression. It induces the complete regression of established DMBA/PMA induced cSCC and intradermal grafted TC-1 tumors after one peritumoral injection of the TLR9 agonist ODN CpG 2395 together with a blocking anti IL-10 receptor alpha antibody (as detailed in WO2018060514A1. 2018. F. Anjuère, C. Luci, F. Hacini-Rachinel, E. Vial. Methods and compositions combining at least one pattern recognition receptor (pr) agonist with an anti-IL-10 receptor antibody). The mechanism of action relies on the priming of tumor-specific CD8 T cells in the draining lymph nodes by the activation of tumor-derived dendritic cell subset 2, thus leading to the expansion of IFN- γ producing CD8 T lymphocytes required for long-term tumor control (Bourdely et al., in preparation). In addition to the local education of anti-tumor cytotoxic lymphocytes leading to the complete regression of established tumors in 80% of the cases, the treatment efficacy seems also to be dependent of the early innate immune response that remains to be elucidated.

In this report, we investigated the early events that occur between few hours to three days after peritumoral administration of the TLR9 agonist CpG ODN2395 with a blocking antibody targeting the IL-10R α in the TC-1 cSCC mouse model. We observed a rapid tumor shrinking

associated with a diffuse hemorrhagic necrosis and we elucidated the sequential and complementary roles of tumor-associated macrophages and neutrophils in the initial control of tumor growth by a mechanism involving the CXCL1/2-CXCR1/2 axis.

RESULTS

The local immunotherapy induces a rapid regression of established tumors associated with a diffuse necrosis.

To characterize the early events that occur during the 3 first days after local immunotherapy, established skin TC-1 tumors of size from 50 to 130 mm³ were homogeneously distributed in two groups. One group received the TLR9L+aIL-10R α local immunotherapy while the other group remained untreated. We first compared tumor volumes between 6 hours and 6 days and performed histologic analyses of frozen tumor tissue sections at the indicated time points. The local immunotherapy induced a rapid tumor regression within the 3 first days (**Figure 1A**, grey box). Microscopically, hematoxylin/eosin staining showed dense tumor tissue developing under the epidermis in control tumors while a rapid tumor shrinking of the tumor with a massive disruption of the tumor tissue was noticeable as early as 12 hours post-treatment (**Figure 1B and 1C**, left panels). Necrotic tumor areas corresponding to black aggregates and cellular debris were also visible from 12 hours to 48 hours on Masson's trichrome staining. In contrast, control group was characterized by live tumor area with cohesive fusiform tumor cells with red light-refractive cytoplasm (**Figure 1C**, right panel). In addition, blue labelling corresponding to collagen staining suggests tissue remodeling inside the disrupted tumor area (**Figure 1B and 1C**). Quantification by flow cytometry analysis of CD45⁻ non-immune cells accounting mainly for tumor cells and of CD45⁺ leukocytes showed a time-dependent decrease in CD45⁻ tumor cell numbers confirming tumor regression but the persistence of CD45⁺ immune cells (**Supplemental Figure 1A**). These data revealed the massive and rapid tumor necrosis induced by the local immunotherapy and suggest a role of the innate immunity in the early tumor regression, consistent with previous data (Guiducci et al., 2005).

The early dynamics of neutrophils and macrophages after local immunotherapy reveal their coordinated role in tumor necrosis and tissue repair.

To investigate the impact of the local immunotherapy on the phenotype and kinetics of the tumor-associated immune cell populations, we determined the abundance and numbers of phagocytes including macrophages and dendritic cells, neutrophils, T lymphocytes and NK

cells in TC-1 tumors before treatment and between 3 hours and 72 hours post-treatment by flow cytometry (**Supplemental Figure 1B and 1C**). Untreated TC-1 tumors were mainly infiltrated by macrophages accounting for 74% of CD45⁺ immune cells. In a lesser extent, they also contained some neutrophils ($6.2 \pm 4.5\%$), T lymphocytes ($5.4 \pm 0.5\%$), NK cells ($4.1 \pm 0.3\%$) and dendritic cells ($3 \pm 0.3\%$) (**Figure 1D**), consistent with the immunosuppressive environment of skin TC-1 tumors (Bourdely et al., in preparation). The immune infiltrate was rapidly reorganized few hours upon local immunotherapy (**Figure 1D**). The proportions of neutrophils dramatically peaked up at 12-24 hours post-treatment to represent more than 80% of the immune infiltrate while the other immune cell populations were decreasing to become rare populations 24 hours post-treatment, suggesting that neutrophils are massively recruited by the local immunotherapy. This was confirmed by their increased numbers in treated TC-1 tumors observed from 6 hours to 72 hours with a peak at 12 hours (**Figure 1D**, right panel, orange graph). Noticeably, some macrophages started to expand 72 hours post-treatment after a drop from 12 to 24 hours, suggesting the late recruitment of new monocytes.

To deeply characterize the dynamics of phagocytes and neutrophils within the tumor microenvironment, we then carried out 5-color multiparametric immunofluorescence on tumor sections by spectral imaging (**Figure 2 and Supplemental Figure 2**). Control TC-1 tumors were infiltrated by immature macrophages (magenta CD11b⁺ cells) and mature macrophages (red CD11b⁺MHCII⁺ cells), CD11c⁺MHCII⁺ cells that can correspond to tissue-resident macrophages or dendritic cells (light blue cells) previously described in control skin (Tamoutounour et al., 2013), while neutrophils (green CD11b⁺Ly6G⁺ cells) were rare cells, confirming flow cytometry data. In addition, both immature and mature macrophages were surrounding the tumor area as shown at tumor-stroma margin (**Figure 2A**, right image). By contrast, neutrophils started to accumulate massively at the tumor-stroma margin 6 hours post-immunotherapy and infiltrated the disrupted tumor from 12 to 48 hours (**Figure 2B**, upper panel). Of note, at 12 hours post-treatment, a massive accumulation of neutrophil clusters were observable in a necrotic area (**Figure 2B**, lower panel B1), previously identified by Masson's trichrome staining (**Figure 1C**). At this stage, images also revealed the co-localization of mature macrophages (red cells) and neutrophils (green cells) in the disrupted tumor (**Figure 2B**, lower panel B1) and at tumor-stroma margin, suggesting an interaction between these two major myeloid populations in TC-1 tumors (**Figure 2B**, lower panel B2). Finally, immature macrophages (magenta cells) were massively accumulating 48 hours post-treatment and were distributed around the disrupted tumor tissue (**Figure 2B**, lower panel B3), in an area of intense tissue remodeling as shown with collagen staining (**Figure 1C**). These macrophages could

correspond to the newly recruited macrophages quantified by flow cytometry and could contribute to tissue repair.

Altogether, these data suggest that newly recruited neutrophils are major players in the necrotic shrinking of the tumor and that different subsets of macrophages activated locally or recruited lately contribute to tumor regression and tissue repair.

The local immunotherapy induces the maturation and activation of tumor-associated macrophages and the recruitment of new monocytes.

To assess the heterogeneity of monocyte/macrophage populations over time post-treatment, we performed a comprehensive high-dimensional characterization of phagocyte subsets after multiparametric staining by flow cytometry. We designed a flow cytometry panel that includes CD64, Ly6C and CD11b markers to identify monocyte/macrophages within live CD45⁺Lineage⁻ cells (i.e Lineage: CD3, CD4, CD8, Ly6G), CD206 marker to characterize tumor-associated M2 macrophages, CX3CR1 and CCR2 markers to discriminate classical and non-classical monocyte-derived cells and Ly6C, CD11c, CD169 and MHCII markers to determine their maturation and activation status. The data generated at different time points after local immunotherapy were then analyzed using an unsupervised computational strategy (**Figure 3**). The t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) analysis revealed the difference of abundance of CX3CR1⁺ non-classical monocyte-derived cells and CCR2⁺ monocyte-derived cells in control and treated tumors as well as a time-dependent evolution of immature and mature phenotypes as shown with the differential density of CD169⁺, MHCII⁺ and Ly6C⁺ in untreated and treated tumors. CD206^{bright} macrophages were more abundant in control tumors compared to the other groups (**Figure 3A and 3B**). This analysis confirmed the phenotypic heterogeneity of the monocyte/macrophage subsets infiltrating tumors at different time points after local immunotherapy.

To identify the specific phenotypes of monocyte/macrophage subsets infiltrating TC-1 tumors at different time points after local immunotherapy, we separated the CD11b⁺ phagocyte subsets into 45 meta-clusters (MC) using the FlowSOM clustering tool. The complete linkage hierarchical clustering of samples and mean-centered MC cell proportions revealed five MC groups, named from G1 to G5, differentially represented at different time points after local immunotherapy (**Figure 3C**). This analysis discriminated early phagocyte subsets enriched in control tumors and in treated tumors 3 and 6 hours after treatment (**Figure 3C**, G1 to G3), and late phagocyte subsets overrepresented 12, 24 and 72 hours post-treatment (**Figure 3C**, G4 and G5). G1 identified two subsets of CCR2⁺ monocyte-derived macrophages prominent in control

tumors with different maturation status as shown with the differential expression of MHCII (**Figure 3D and 3E**, green color). G2 identified one subset of CX3CR1⁺ non classical monocyte-derived macrophages exhibiting an immature phenotype based on the expression of Ly6C and the absence of MHCII marker (**Figure 3D and 3E**, light blue color), present in equal proportions in control tumors as well as 3 and 6 hours after treatment. G3 gathered two subsets slightly more abundant 6 hours post-treatment. These populations could correspond to mature phenotypes of the G2 subset as they express CD11c or MHCII markers (**Figure 3D and 3E**, turquoise and dark blue colors). G4 characterized a subset of activated CD64⁺ monocyte-derived macrophages expressing bright levels of MHCII molecule. This latter subset is abundant 12 to 24 hours post-treatment, suggesting it differentiated locally from G1 subsets (**Figure 3D and 3F**). In addition, the functional activation of CD11b⁺ macrophages 12 hours post-treatment was confirmed by the higher numbers of macrophages expressing the nitric oxide synthetase 2 (NOS2) compared to control as shown by flow cytometry (**Supplemental Figure 3**). Finally, G5 gathered two subsets of CD64^{int}MHCII⁻ cells, one expressing high levels of Ly6C and the other one intermediate levels, both enriched 72 hours post-treatment, consistent with the recruitment of new monocytes from the periphery (**Figure 3D and 3F**).

Altogether, these data demonstrated that the immunotherapy induces the local maturation and activation of two types of tumor-associated macrophages and then the recruitment of new monocytes in necrotic tumor environment.

Newly recruited neutrophils have an activated phenotype and are highly cytotoxic

As neutrophils are massively recruited in tumors after treatment and are associated with necrosis, we then characterized their phenotype within tumors at different early time points post-treatment by flow cytometry.

We evaluated the expression of a selected set of markers known to be modulated in cSCC-infiltrating neutrophils (CXCR2, CD62L, ICAM-1, CD80, PD-L1 and Siglec F) (Khou et al., 2020) on live CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ cells from control and treated TC-1 tumors by flow cytometry and computational analysis (**Figure 4A-D**). tSNE analysis was used to create a common map of neutrophils across all the samples. Cell density maps of each experimental group showed the phenotypic specificity of neutrophils at each time point post-treatment compared to control group revealing a sequential maturation of recruited neutrophils rather than cell heterogeneity (**Figure 4A and 4B**). We then separated the CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils into 25 meta-clusters (MC) using the FlowSOM clustering tool and identified proportions of specific phenotypes after local immunotherapy (**Figure 4 C and 4D**). The complete linkage hierarchical

clustering of samples and mean-centered Log2-transformed MC cell proportions revealed that neutrophils from untreated tumors and tumors 3 and 6 hours post-treatment (groups 1 and 2) expressed low levels of the of activation markers Siglec F, PD-L1 and ICAM-1 and high levels of CD62L characterizing cells that resemble to immature circulating neutrophils (Eash et al., 2010). This suggests that neutrophils were constantly populating the tumor tissue in response to treatment, consistent with their kinetics post-treatment (**Figure 1D**). Neutrophils identified in tumors 12, 24 and 72 hours post-treatment (groups 3 and 4) expressed higher levels of the ICAM-1, Siglec F, PD-L1 and CD11b markers, known to be expressed by activated neutrophils in different inflammatory contexts (He et al., 2015 ; Khou et al., 2020). They also downregulated CD62L expression (**Figure 4C and 4D**). Overall, unsupervised phenotypic analysis at early time points after local immunotherapy suggest that blood neutrophils were constantly recruited until 12 hours and then activated in the tumor environment.

As at 12 hours post-immunotherapy, neutrophils proportions and numbers peaked up (**Figure 1D**) and they have acquired an activated phenotype (**Figure 3C and 3D**), we then investigated whether they displayed functional anti-tumor activity compared to neutrophils from untreated mice by flow cytometry (**Figure 4E and 4F**). We focused on expression of myeloperoxidase (MPO), a major component of the primary granules and granzyme B, two markers of cytotoxicity in neutrophils (Hedrick et al., 2021). The neutrophils infiltrating tumors 12 hours post-treatment expressed significantly higher levels of MPO and granzyme B, two molecules associated with an anti-tumor phenotype in neutrophils (**Figure 4E**). We also analyzed IL-1 β and IL-6 inflammatory cytokines as well as reactive oxygen species (ROS), known to be produced by activated neutrophils. We observed a significant increase in the expression of IL-1 β and IL-6 by neutrophils infiltrating the treated tumors, indicative of their functional maturation (**Figure 4E**). In addition to the production of granule enzymes and inflammatory cytokines, one of the main functions of activated neutrophils is the production of ROS. Using the dihydrorhodamine DHR123 ROS fluorescent indicator, we measured significant increase in ROS production in neutrophils from treated tumors compared to control (**Figure 4F**). Tumor-derived neutrophils were even shown able to produce some ROS after incubation at 4°C when they were from treated tumors, highlighting their high activation status upon local immunotherapy.

Altogether, these data revealed the activated phenotype and functional maturation of neutrophils infiltrating tumors after local immunotherapy as evidenced by inflammatory cytokine release, degranulation and ROS production.

Neutrophil *in vivo* depletion dramatically reduces the efficacy of the local immunotherapy

To establish the role of neutrophils in tumor regression, we depleted them *in vivo* before injection of local immunotherapy as described (**Figure 5A**). Neutrophil depletion was superior to 98% in blood and 90% in tumors (**Supplemental Figure 4 and data not shown**). The *in vivo* depletion of neutrophils significantly reduced the efficacy of the local immunotherapy. (**Figure 5B**). They are not the only players in the tumor regression as tumor growth is delayed in treated mice depleted in neutrophils, but not completely abolished, compared to untreated control either depleted or not in neutrophils (**Figure 5B and 5C**). This is consistent with our previous observation showing a critical role of CD8 T lymphocytes in treatment response (Bourdely et al., in preparation). In addition, neutrophil depletion in untreated tumors did not impact the tumor growth compared to untreated tumors with neutrophils showing that neutrophils did not significantly contribute in TC-1 skin tumor progression at this stage (**Figure 5C**), consistent with their low numbers in untreated tumors (**Figure 1D**).

Therefore, neutrophils play a role in the early regression induced by the local immunotherapy.

Macrophage-derived CXCL1 and CXCL2 chemokines contribute to neutrophil recruitment to the tumor site after the local immunotherapy

Unlike dendritic cells and monocytes and like lymphocytes, intra-tumor neutrophils do not express the TLR9 receptor (Bourdely et al., in preparation) suggesting that the treatment does not act directly on neutrophils and that their recruitment is mediated by factors produced by other tumor-infiltrating immune cells.

To investigate the factors involved in the massive recruitment of anti-tumor neutrophils after local immunotherapy, we first quantified selected chemokines and cytokines in total tumor lysates from mice 3 and 6 hours after the local immunotherapy compared to untreated control mice using chemokine/cytokine multiplex approach or ELISA technique. We focused our analysis on chemokines known to recruit neutrophils like CXCL1, CXCL2, CXCL5 and VEGF but also on cytokines like IFN type I (α and β), IFN- γ or TNF- α known to play a role in their activation. Other inflammatory or anti-tumoral chemokines and cytokines were also added. The increase in the production of the selected soluble factors after treatment was represented in a heatmap as fold change of treated tumors over untreated tumor (**Figure 6A**). The tumor-associated soluble factors exhibiting the highest increase in concentration 3 and 6 hours post-treatment included IFN- γ , IL-12p70 and TNF- α cytokines and CXCL1 and CXCL2 chemokines (**Figure 6A**).

To investigate whether the CXCR1 and CXCR2 signaling pathway played a role in neutrophil recruitment after local immunotherapy, we used the reparixin, a competitive inhibitor of CXCR1 and CXCR2, before and after treatment of tumor-bearing mice with TLR9L+aIL-10R α (**Figure 6B**). The tumor-infiltrating neutrophil proportions were significantly decreased 12 hours post-treatment in the mice receiving the reparixin inhibitor ($52.5 \pm 5.5\%$) compared to control mice ($69.4 \pm 4.4\%$), indicating the contribution of the CXCL1-2/CXCR1-2 axis in the neutrophil recruitment in response to the local immunotherapy together with other factors.

We then wondered which cells of the tumor environment were involved in the production of CXCL1 and CXCL2 in response to the local immunotherapy. To answer this question, we sorted CD45⁻ non-immune cells, CD11b⁻ lymphocytes, CD11b⁺Ly6G⁻ cells mostly accounting for monocyte/macrophages populations and CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils from untreated TC-1 tumors. These sorted populations were then stimulated with the TLR9L+aIL-10R α immunotherapy for 24 hours and the concentrations of CXCL1 and CXCL2 assessed in culture supernatants (**Figure 6C**). The CD11b⁺Ly6G⁻ monocyte/macrophage population was the cell population producing huge amounts of CXCL1 (4 ng/mL) and CXCL2 (12 ng/mL) after *in vitro* stimulation with the treatment, suggesting that early macrophages identified in TC-1 tumors (**Figure 3**) were involved in the massive recruitment of neutrophils.

To identify the macrophage subsets involved in CXCL1-2 production, we repeated the same experiment on five sorted subsets of TC-1 associated monocyte/macrophages subsets using the differential expression of Ly6C, CD64 and MHCII (**Figure 6D**) as identified in **Figure 3E and 3F** (blue and green early phagocyte subsets). After stimulation with the immunotherapy, the two populations of CD64⁺Ly6C⁻ macrophages produced the highest concentrations of CXCL1 and CXCL2 contrary to Ly6C⁺ populations (**Figure 6D**). Our data identified that macrophage-derived CXCL1/2 contribute to the massive recruitment of anti-tumor neutrophils in the tumor microenvironment.

DISCUSSION

We report here the innate events involved in the initial tumor regression occurring during the three first days post-treatment. Our data demonstrate that the early necrotic tumor regression induced by the TLR9L+aIL-10R α immunotherapy involves anti-tumor neutrophils massively recruited to the tumor site that become highly cytotoxic in the tumor microenvironment. Importantly, subsets of macrophages abundantly represented in growing tumors are the first cells activated by the local immunotherapy and display a pivotal role in neutrophil recruitment and activation through the production of CXCL1 and CXCL2 chemokines. Lately, immature macrophages are recruited from the periphery to control tissue injury.

Anti-tumor neutrophils also called N1 are characterized by their capacity to kill tumor cells through necrosis and to produce cytotoxic mediators such as myeloperoxidase (MPO) while pro-tumor neutrophils, N2 also named PMN-myeloid derived suppressor cells (PMN-MDSC) are known to promote tumor extracellular matrix remodeling, angiogenesis, metastasis and immune suppression (Gabrilovich et al., 2009 ; Brandau et al., 2013). While tumor-associated neutrophils are mainly associated with adverse prognosis in patients across many cancers (Gentles et al., 2015) and in advanced DMBA/PMA cSCC tumor model (Khou et al., 2020), neutrophils recruited by a local chemotherapy in mouse skin tumors were shown to promote tumor necrosis following activation of cytotoxic functions (Challacombe et al., 2006). Consistent with these data, the local immunotherapy with TLR9 agonist and anti-IL-10R α blocking antibody also induced the massive recruitment of neutrophils with anti-tumor functions.

Following recruitment, neutrophils are known to be activated by factors produced by the tumor microenvironment (TME). Among these factors, IFN- γ and TNF- α are upstream regulators of activated neutrophils in cSSC TME (Khou et al., 2020). In the same sense, Ohms et al., recently demonstrated that blood neutrophils can acquire a N1 phenotype and cytotoxic functions such as MPO and TNF production after *in vitro* stimulation with LPS, IFN- γ or IFN- β (Ohms et al., 2020). Upon local immunotherapy, high levels of IFN- γ and TNF- α were produced in the TME, suggesting that these factors contribute to the local activation of newly recruited neutrophils. IFN- γ can also stimulate ROS production by neutrophils (Ellis & Beaman, 2004), consistent with our data. In addition, the indirect activation of neutrophils by soluble factors produced in the TME after the local immunotherapy is consistent with our previous observation showing that neutrophils do not express TLR9 in TC-1 skin tumors, excluding the possibility that they can be directly stimulated by the local immunotherapy (Bourdely et al., in preparation).

The phenotype of the neutrophils characterized after the local immunotherapy includes expression of activation markers such as ICAM-1, PD-L1 and Siglec F and downregulation of markers like CXCR2 and CD62L. These markers do not seem to specifically characterize anti-tumor neutrophils but rather tissue-associated effector cells. Indeed, they were also identified in pro-tumor neutrophils. Thus, the expression of PD-L1 has been recently associated with a N2 phenotype and immunosuppressive functions (Khou et al., 2020). Siglec F marker was also described as a marker characterizing long-lived pro-tumor neutrophils in a mouse tumor model (Pfirschke et al., 2020). Altogether, these data highlight the difficulty to identify phenotypic markers able to differentiate N1 and N2 neutrophils.

Tumor-associated macrophages are known to harbor phenotypic and functional heterogeneity in the TME of several mouse models (Loyher et al., 2018 ; Etzerodt et al., 2019). In untreated TC-1 tumors, macrophages are the main immune cells infiltrating TC-1 tumors before treatment. These cells are phenotypically heterogeneous and comprise mature and immature macrophage subsets, some expressing high levels of monocytic markers such as CCR2 and Ly6C. This latter subset could correspond to monocyte-derived myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC) (Veglia et al., 2021). After local immunotherapy, macrophages start to over-express MHCII and NOS2 which is in agreement with *in situ* M1 polarization (Chavez-Galan et al., 2015). IFN- γ is known to play a role in M1 polarization and could be involved in our model since this cytokine is highly produced in treated tumors. Huge amounts of TNF- α are also found in the TME after local immunotherapy. This cytokine, known to be produced by immune cells including macrophages has angiogenic properties and can be associated with the hemorrhagic necrosis observed after local immunotherapy, as previously reported (Guiducci et al., 2005).

Tumor-associated macrophages produce the CXCL1 and CXCL2 chemokines, important mediators for neutrophil recruitment which is in agreement with previous report (Wang et al., 2018). Blockade of CXCR1/CXCR2 pathway using the reparixin competitive inhibitor only partially impaired neutrophil recruitment, suggesting that other signaling pathways can be involved.

Finally, we identified a possible role of newly recruited monocyte-derived cells in tissue remodeling and repair 48 hours after the local immunotherapy as suggested by collagen fibers deposition. Further work will be therefore important to unravel the role of tumor-associated macrophage subsets in tissue remodeling.

Altogether, our results show the critical requirement of anti-tumor neutrophils in early tumor necrosis and the pivotal role of macrophages in neutrophil recruitment and tissue remodeling

after local immunotherapy. The fine-tune regulation of these early events may help to improve the long-term efficacy of such local immunotherapy.

MATERIALS AND METHODS

All the reagents used in this study are listed in **Supplemental Table 1**.

Mouse strains. Five week-old female C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories and reared under specific pathogen-free conditions. The conditions for rearing and handling mice were carried out in compliance with the rules for maintaining laboratory mice and in agreement with the regional committee for animal experimentation (MESR2016111509544790, CIEPAL, Nice Côte d'Azur, France).

Syngeneic mouse model of TC-1 intradermal tumor. The TC-1 cell line (Lin et al., 1996) was grown in DMEM (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (GE Healthcare), 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies), 2mM L-Glutamine (Lonza), 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 U ml⁻¹ streptomycin (Lonza). TC-1 cells (20 000 cells) were injected intradermally in 10 µL of PBS with an insulin syringe on anesthetized mice after dorsal skin shaving. The tumoral volumes were measured using the ellipsoid formula $\pi/6 \cdot H \cdot W \cdot D$. The mice received the treatment when the tumors were reaching a size of 50 to 130 mm³.

In vivo treatments. Mice bearing TC-1 tumors of 50 to 130 mm³ (day 12-13 post-injection), homogeneously distributed within experimental groups were injected peritumorally. The combined treatment comprising 35 µg CpG ODN2395 (Invivogen) and 25 µg anti-IL-10R α monoclonal antibody (Clone 1B1-3A, BioXCell) was injected peritumorally only once. Mice depleted in neutrophils received repeated intraperitoneal injections of 200 µL solution containing 150 µg of monoclonal antibody against the Ly6G marker, clone 1A8 (BioXCell) every 2 days, starting 3 days before treatment injection. Control mice received an equivalent amount of isotypic control Rat IgG2a, clone 2A3 (BioXCell). Neutrophil depletion was monitored in the blood by flow cytometry. Reparixin (biotechne), a competitive inhibitor of CXCR1 and CXCR2, was used to inhibit neutrophil recruitment. Mice received 15 µg/g body weight of reparixin intraperitoneal 15 minutes before and 2 hours after immunotherapy TLR9L+aIL-10R α .

Histologic analysis. TC-1 tumors were fixed in Antigenfix (Diapath) for 1 hour at 4°C, washed in PBS and incubated in 30% sucrose (Sigma) overnight at 4°C with shaking. Fixed tumors were washed, embedded in OCT (Tissue-Tek), and frozen prior to cryostat sectioning. Tumor sections (10 µm) were cut using cryostat. For histologic analysis, tumor sections were stained with hematoxylin/eosin or with Masson's Trichrome according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence. Frozen tumor sections were incubated in blocking buffer (PBS with 2% BSA (Sigma), 1% FCS, and 0.5% saponin (Sigma) at room temperature (RT) for 1 hour. Sections were stained with CD11b-Biotin (BioLegend) and purified anti-CD11c (Pharm) for 1 hour in blocking buffer at RT. Slides were then washed 3 times for 5 minutes in PBS followed by an incubation with Streptavidin A555 (Invitrogen) and anti-hamster A594 (Jackson ImmunoResearch). Slides were washed 3 times for 5 minutes in PBS followed by an incubation with anti-Ly6G-FITC (BD Biosciences) together with anti-MHCII A647 (BD Biosciences) antibodies for 1 hour at RT. Finally, slides were washed as previously described, incubated for 5 minutes at RT with Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) to stain nuclei. After washes, slides were mounted with PermaFluor aqueous mounting medium (ThermoFisher Scientific). Sections were imaged with Vectra spectral microscope (Akoya).

Cell preparation. Tumor tissues were cut in small pieces and digested with a solution of collagenase IV (1 mg/mL ; Sigma-Aldrich) and DNase I (0.2 mg/mL ; Roche Diagnostics) at 37°C for 20 minutes under constant shaking. After digestion, cells were collected in RPMI medium (Lonza) + 3% heat-inactivated FCS (GE Healthcare) and debris removed by filtration on a 70 µm cell strainer (BD Biosciences). Blood was collected at tail vein into a tube containing ACK lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂ EDTA, pH 2.2), and use to monitor neutrophil depletion. Cells were then washed in FACS Buffer (PBS + 3% FCS + 5mM EDTA (Invitrogen)) before staining for multiparametric analysis in flow cytometry. Cell numbers were quantified with CasyTon Cell Counter. For chemokine analysis, cell subsets were sorted using the FACS ARIA after multiparametric staining.

Flow Cytometry. To characterize tumor-infiltrating immune cell populations, a multiparametric analysis was performed on FACS LSR Fortessa (Becton Dickinson). For extracellular stainings, cell suspensions were plated in a 96-well V-bottom plate at a density of 1.10⁶ cells per well and incubated in FACS Buffer, (PBS + 3% FCS + 5 mM EDTA) in the presence

of CD16/CD32 antibody to avoid non-specific stainings (2.4G2 monoclonal antibody ; BD Biosciences), in 25 μ L reaction volume for 15 minutes at 4°C. Cells were then incubated in antibody mix for 20 minutes at 4°C. The conjugated antibodies were ordered from BD Biosciences, BioLegend or eBiosciences (**Supplemental Table 1**). The cells were then washed in FACS buffer and resuspended in FACS Buffer in presence of 7-AAD death marker (BD Biosciences) to exclude dead cells. For the functional characterization of neutrophils, cells were incubated during 2 hours at 37°C in presence of 1 μ g/mL of Brefeldin A. Cells were then stained for extracellular markers as previously described and NIR Zombie dye (BioLegend) as a dead cell marker. They were then fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions, followed by intracellular staining for 20 minutes at 4°C with fluorochrome-conjugated anti-mouse antibodies (**Supplemental Table 1**).

Computational analysis. After Flow Cytometry data acquisition, data were exported in flow-cytometry (FCS file) format. Manual gating was done to exclude residual debris, doublets and dead cells using FlowJo Software. Dimensional reduction of the FACS data was performed selecting the indicated markers by t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) using the FlowJo package. Clusters were generated using the FlowSOM package. The frequency of each meta-cluster was represented as a heatmap (Mean-centered, log₂ transformation) using MeV software. Median intensity values per cluster for each marker were calculated and exported. The identity of each cluster was inferred based on the expression of each individual marker. Δ MFI corresponds to MFI/MFI⁻ with MFI⁻ measured in FMO or a negative population for the indicated marker.

Oxidative Burst Assay. Tumor cell suspensions were prepared as described previously. 1.10^6 cells were distributed in 96-well V-bottom plates and washed in FACS Buffer. After cell surface staining as described above (see Flow cytometry method), cells were incubated for 15 min at 4°C or 37°C in FACS Buffer with 1 μ M Dihydrorhodamine (DHR) 123 ROS indicator (ThermoFisher) and 50 μ g/mL catalase. Cells were then washed in FACS Buffer and resuspended in FACS Buffer and 7-AAD death marker to exclude dead cells. The fluorescence intensity of the oxidized DHR123 dye was measured by flow cytometry.

Preparation of supernatants for chemokine analysis. Tumors were collected in PBS and then cut with scissors in 300 μ L of FastPrep Buffer : 10 mM Tris pH8 (MP), 150 mM NaCl (sds), 5 mM EDTA (Invitrogen), 1% Igepal NP40 (Sigma), 10% Glycerol (Sigma), anti-foam 1%,

protease inhibitor (Roche), bidistilled water. Cell suspensions were mixed to dilaceration beads and shaken in FastPrep-24 (MP Biomedical) for 3 minutes according to manufacturer's instructions. After centrifugation of tumor lysates for 30 minutes at 10,000 rpm (4°C), the supernatants were collected and kept frozen.

Sorted cells were cultured for 24 hours in complete medium in presence or not of 5 µM TLR9L + 10 µg/mL blocking aIL-10Rα antibody. After stimulation, supernatants are collected and frozen. The chemokines and cytokines were analyzed by BioLegendPlex except VEGF that was analyzed by ELISA.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Alain Rubod and Estelle Cosson for hepful technical assistance and Dr Hélène Barelli for the access to the Akoya Vectra spectral imager (IPMC, Valbonne, France). This study was supported by the following funding agencies: French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" programs LABEX SIGNALIFE **ANR-11-LABX-0028** and IDEX UCAJedi **ANR-15-IDEX-01** ; Cancéropole PACA ; Centre National de la Recherche Scientifique ; Institut national de la santé et de la recherche médicale ; Université Côte d'Azur ; Région Provence-Alpes-Côte d'Azur ; Fondation ARC pour la recherche sur le Cancer ; Fondation de l'Avenir ; Ligue Nationale contre le Cancer ; Fondation d'entreprise SILAB Jean PAUFIQUE. We thank the IPMC's UCAGenomiX, Imaging/Flow cytometry and animal house core facilities for providing assistance.

REFERENCES

- Brandau, S., Dumitru, C. A., & Lang, S. (2013). Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Seminars in Immunopathology*, 35(2), 163–176
- Challacombe, J. M., Suhrbier, A., Parsons, P. G., Jones, B., Hampson, P., Kavanagh, D., Rainger, G. E., Morris, M., Lord, J. M., Le, T. T. T., Hoang-Le, D., & Ogbourne, S. M. (2006). Neutrophils Are a Key Component of the Antitumor Efficacy of Topical Chemotherapy with Ingenol-3-Angelate. *The Journal of Immunology*, 177(11), 8123–8132.
- Chapalain, M., Baroudjian, B., Dupont, A., Lhote, R., Lambert, J., Bagot, M., Lebbe, C., & Basset-Seguín, N. (2020). Stage IV cutaneous squamous cell carcinoma: treatment outcomes in a series of 42 patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.
- Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 1–15.
- Eash, K. J., Greenbaum, A. M., Gopalan, P. K., & Link, D. C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2423–2431.
- Ellis, T. N., & Beaman, B. L. (2004). Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*, 112(1), 2–12.
- Etzerodt, A., Tsalkitzi, K., Maniecki, M., Damsky, W., Delfini, M., Baudoin, E., Moulin, M., Bosenberg, M., Graversen, J. H., Auphan-Anezin, N., Moestrup, S. K., & Lawrence, T. (2019). Specific targeting of CD163+ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression.
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 9(3), 162–174.
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., & Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*, 21(8), 938–945.
- Guiducci, C., Vicari, A.P., Sangaletti, S., Trinchieri, G., Colombo, M.P. (2005). Redirecting *in vivo* elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells toward tumor rejection. *Cancer Research*.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*.
- He, G., Zhang, H., Zhou, J., Wang, B., Chen, Y., Kong, Y., Xie, X., Wang, X., Fei, R., Wei, L., Chen, H., & Zeng, H. (2015). Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1), 1–11.
- Hedrick, C. C., & Malanchi, I. (2021). Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nature Reviews. Immunology*, 0123456789.
- Khou, S., Popa, A., Luci, C., Bihl, F., Meghraoui-Kheddar, A., Bourdely, P., Salavagione, E., Cosson, E., Rubod, A., Cazareth, J., Barbry, P., Mari, B., Rezzonico, R., Anjuère, F., & Braud, V. M. (2020). Tumor-associated neutrophils dampen adaptive immunity and promote cutaneous squamous cell carcinoma development. *Cancers*, 12(7), 1–20
- Loyher, P. L., Hamon, P., Laviro, M., Meghraoui-Kheddar, A., Goncalves, E., Deng, Z., Torstensson, S., Bercovici, N., De Chanville, C. B., Combadière, B., Geissmann, F., Savina, A., Combadière, C., & Boissonnas, A. (2018). Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *Journal of Experimental Medicine*, 215(9), 1–18
- Migden, M.R., Khushalani, N.I., Chang, A.L.S., Lewis, K.D., Schmults, C.D., Hernandez-Aya, L., Meier, F., Schadendorf, D., Guminski, A., Hauschild, A., Et al., (2020). Cemiplimab in locally

- advanced cutaneous squamous cell carcinoma: Results from an open-label phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*, 21,294-305
- Ohms, M., Möller, S., & Laskay, T. (2020). An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–12.
- Pfirsichke, C., Engblom, C., Gungabeesoon, J., Lin, Y., Rickelt, S., Zilionis, R., Messemaker, M., Siwicki, M., Gerhard, G. M., Kohl, A., Meylan, E., Weissleder, R., Klein, A. M., & Pittet, M. J. (2020). Tumor-Promoting Ly-6G⁺ SiglecF^{high} Cells Are Mature and Long-Lived Neutrophils. *Cell Reports*, 32(12), 108164.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. Global Cancer Stat 2020. *CA Cancer J Clin*.
- Stratigos, A. J., Garbe, C., Dessinioti, C., Lebbe, C., Bataille, V., Bastholt, L., Dreno, B., Concetta, M., Forsea, A. M., Frenard, C., Harwood, C. A., Hauschild, A., Hoeller, C., Kandolf-sekulovic, L., Kaufmann, R., Kelleners-smets, N. W. J., Malvey, J., Middleton, M. R., Moreno-ramirez, D., ... On, J. G. (2020). ScienceDirect European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin : Part 2 . Treatment Association of Dermato-Oncology (EADO) and the European. *European Journal of Cancer*, 128, 83–102.
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B., Henri, S. (2013) Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*.
- Veglia, F., Sanseviero, E., & Gabrilovich, D. I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology*.
- Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., Li, M., Song, J., Zhang, F., Zhang, X., Wang, Q., & Wang, Z. (2018). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death and Disease*, 9(9).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The local immunotherapy induces a rapid regression of established tumors in a mouse model of cutaneous squamous cell carcinoma associated with a massive necrosis and the recruitment of neutrophils

(A) C57BL/6 mice bearing TC-1 intradermal tumors of 50 to 130 mm³ received a peritumoral injection of the TLR9L+aIL-10R α local immunotherapy. Graph showing tumor sizes at early time points post-treatment (treated, red squares, n=16) compared to control mice (untreated, black squares, n=15), 5 independent experiments. Two-way anova. ****p<0.0001. (B-C) Representative frozen sections of control and treated TC-1 tumors stained with Hematoxylin/Eosin (HE) and Masson's Trichrome (MT). Tumor (T) and tumor/stroma Margin (M) are delineated with white lines. Epidermis (E), Dermis (D), Necrotic areas (N) and Tissue Remodeling areas (TR) are also shown. Magnification x10 (B) and Magnification x20 (C). (D) Frequencies (left panel) and absolute numbers (right panel) of macrophages (green), dendritic cells (dark blue), neutrophils (orange), T lymphocytes (light blue) and NK cells (red) in tumors assessed by flow cytometry. n=10-15 mice per time point, 4 independent experiments. Bar graphs showing the mean values \pm S.E.M. One-way anova, Kruskal-Wallis test, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Figure 2. The *in situ* dynamics of neutrophils and macrophages after local immunotherapy reveal their functions in tumor necrosis and tissue repair

(A-B) Multiparametric immunofluorescence by spectral imaging of a representative control TC-1 tumor showing CD11c (cyan), MHCII (red), CD11b (magenta), Ly6G (green) markers. (A) Identification of CD11b⁺MHCII⁺ mature macrophages (red), CD11b⁺MHCII⁻ immature macrophages (magenta) and MHCII⁺CD11c⁺ DC (cyan). Nuclei are stained with Hoechst (grey). (B) Distribution of macrophages (red and magenta cells) and CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils (light green) at different time points after treatment. Accumulation of neutrophils in a necrotic area (N) at 12h (B1 zone). Interaction of neutrophils and mature macrophages in tumor and margin at 12h (B2 zone). Accumulation of CD11b⁺MHCII⁻ immature macrophages in tissue remodeling (TR) area at 48h (B3 zone). Interaction of neutrophils and macrophages around the disrupted tumor tissue at 48h (B4 zone). (A.B) White dashed line delineating tumor border. T: Tumor; M: tumor/stroma margin. Scale bar: 100 μ m.

Figure 3. Kinetics of tumor-associated monocyte/macrophage subsets after local immunotherapy

(A-E) Unsupervised flow cytometry analysis of CD45⁺Lin⁻ (CD3, CD4, CD8, Ly6G) phagocytes infiltrating TC-1 tumors at the indicated time points after the local immunotherapy using CD64, MHCII, CD11c, Ly6C, CX3CR1, CCR2, CD206, CD169, CD24 and CD11b markers, n=4-5 mice per time point. **(A)** Phagocyte heterogeneity assessed by t-distributed stochastic linear embedding (tSNE) dimensional reduction on pre-gated CD11b⁺ cells. tSNE maps showing expression of the indicated markers. **(B)** Cell density for the merged file of samples for each group (n=4-5) shown on a pseudocolor scale. **(C)** Phagocyte subsets separated into 45 meta-clusters (MC) by FlowSOM automatic clustering. Hierarchical clustering showing the mean-centered Log₂-transformed MC cell proportions for each group. **(D)** Heatmap representation of Median Fluorescence Intensity (MFI) of the indicated markers. The expression intensity is expressed as Δ MFI. Colored arrows identify groups of MC with different proportions in control and treated samples. **(E)** Five early monocyte/macrophage MC : Group 1 (G1) : green arrows and Group 2 and 3 (G2 and G3) : blue arrows shown in **(D)** and **(F)** three late monocyte/macrophage MC : Group 4 (G4) : red arrows and Group 5 (G5) : purple and pink arrows shown in **(D)** back-viewed on a tSNE_{dim1}/tSNE_{dim2} map and their frequencies represented as mean values \pm S.E.M among Lin⁻CD11b⁺CD45⁺ live cells for each sample. One-way anova, Kruskal-Wallis test, *p<0,05 ; **p<0,01.

Figure 4. Phenotypical and functional maturation of neutrophils infiltrating the tumors after local immunotherapy

(A-D) Unsupervised flow cytometry analysis of CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils infiltrating TC-1 tumors at the indicated time points after the local immunotherapy using PD-L1, ICAM-1, CD80, Siglec F, CXCR2, CD62L and CD11b markers, n=5 mice per group. **(A)** Neutrophil phenotypes assessed by t-distributed stochastic linear embedding (tSNE) dimensional reduction on pre-gated CD11b⁺Ly6G⁺ cells. tSNE maps showing expression of the indicated markers. **(B)** Cell density for the merged file of samples for each group (n=5) shown on a pseudocolor scale. **(C)** Neutrophil subsets separated into 25 meta-clusters (MC) by FlowSOM automatic clustering. Hierarchical clustering showing the mean-centered Log₂-transformed MC cell proportions for each group. **(D)** Heatmap representation of Median Fluorescence Intensity (MFI) of the indicated markers. **(E-F)** *Ex vivo* expression of myeloperoxidase (MPO), Granzyme B (GzmB), IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and reactive oxygen species (ROS) by neutrophils from TC-1 tumors from untreated mice (control) or mice that received the local immunotherapy 12 hours before analysis (treated) assessed by flow cytometry. **(E)** Expression of MPO, GzmB, IFN- γ , IL-1 β and IL-6 assessed after intracellular staining. n=8 mice per group from 2

independent experiments. Histograms showing the MFI for representative samples. Box plots showing median MFI with min. and max. values. One-way anova, Kruskal-Wallis test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **(F)** ROS production corresponding to DHR123 MFI as indicated. Bar graphs showing the mean \pm SD. $n=4-5$ mice per group from one experiment. One way anova, Kruskal-Wallis test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

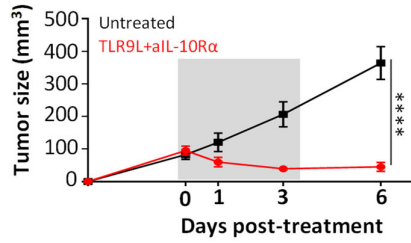
Figure 5. Neutrophil depletion reduces the treatment efficacy

(A) Experimental design. TC-1-bearing mice were injected intraperitoneally with anti-Ly6G depleting antibody or corresponding isotype control (IC) every 2 days, starting day 3 before local immunotherapy with TLR9L+aIL-10R α . Neutrophil depletion was monitored at the indicated time points in blood and in tumor at sacrifice (see supplemental Figure 4). **(B-C)** Graphs showing the tumor growth in mice that received the local immunotherapy (left) or in control TC1-bearing mice (right) either depleted in neutrophils (aLy6G) or injected with corresponding isotypic control (IC) antibody. aLy6G+TLR9L+aIL-10R α $n=14$; IC+TLR9L+aIL-10R α $n=15$; aLy6G+untreated $n=11$; IC+untreated $n=10$ from 3 to 4 independent experiments. Two-way ANOVA, *** $p < 0.001$, ns: not statistical.

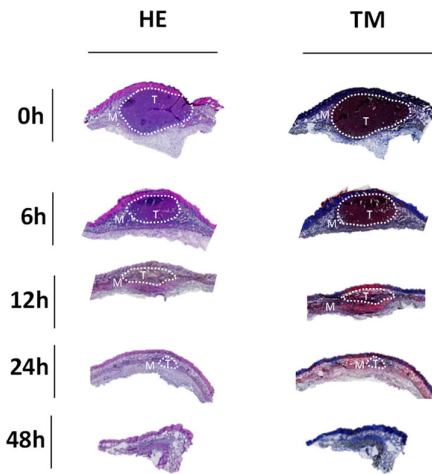
Figure 6. Neutrophils are recruited to the tumor site by CXCL1/CXCL2-producing macrophages

(A) Quantification of selected cytokines and chemokines in total TC-1 tumor lysates from control mice and mice that received the local immunotherapy 3 hours and 6 hours before analysis by BioLegend Plex technique for all the indicated factors except for VEGF done by ELISA. Data are expressed as mean fold change over untreated tumors normalized per 100 mg of tumor, $n=8$ per group from 3 independent experiments. **(B)** Impact of reparixin CXCR1/CXCR2 competitive inhibitor on neutrophil recruitment in TC-1 tumors from mice treated by local immunotherapy. Bar graph showing the frequency of tumor-associated neutrophils 12 hours after local immunotherapy without or after intraperitoneal injection of reparixin. Data are from 3 independent experiments. Mann-Whitney U test, * $p < 0,05$. **(C-D)** CD45 $^-$ non-immune cells, CD11b $^-$ lymphocytes, CD11b $^+$ Ly6G $^-$ myeloid cells and CD11b $^+$ Ly6G $^+$ neutrophils **(C)** and phagocyte subsets **(D)** were sorted from untreated TC-1 tumors and stimulated in culture with the local immunotherapy (black bars) or with medium alone (grey bars) for 24 hours. The concentration of CXCL1 and CXCL2 chemokines was assessed in culture supernatants by BioLegendPlex technique. Unstimulated : 1 or 2 for each condition. Stimulated : 2 or 3 for each condition from 3 independent experiments.

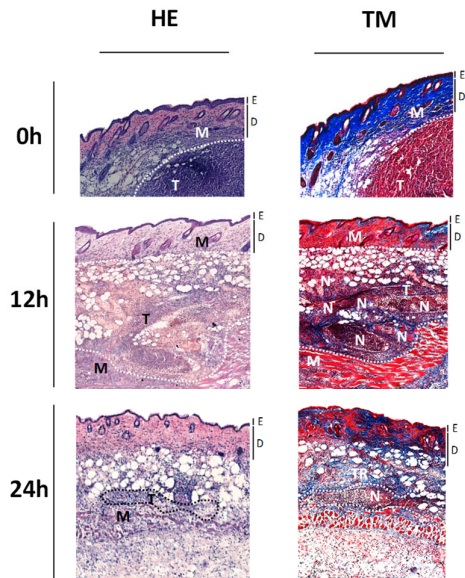
A



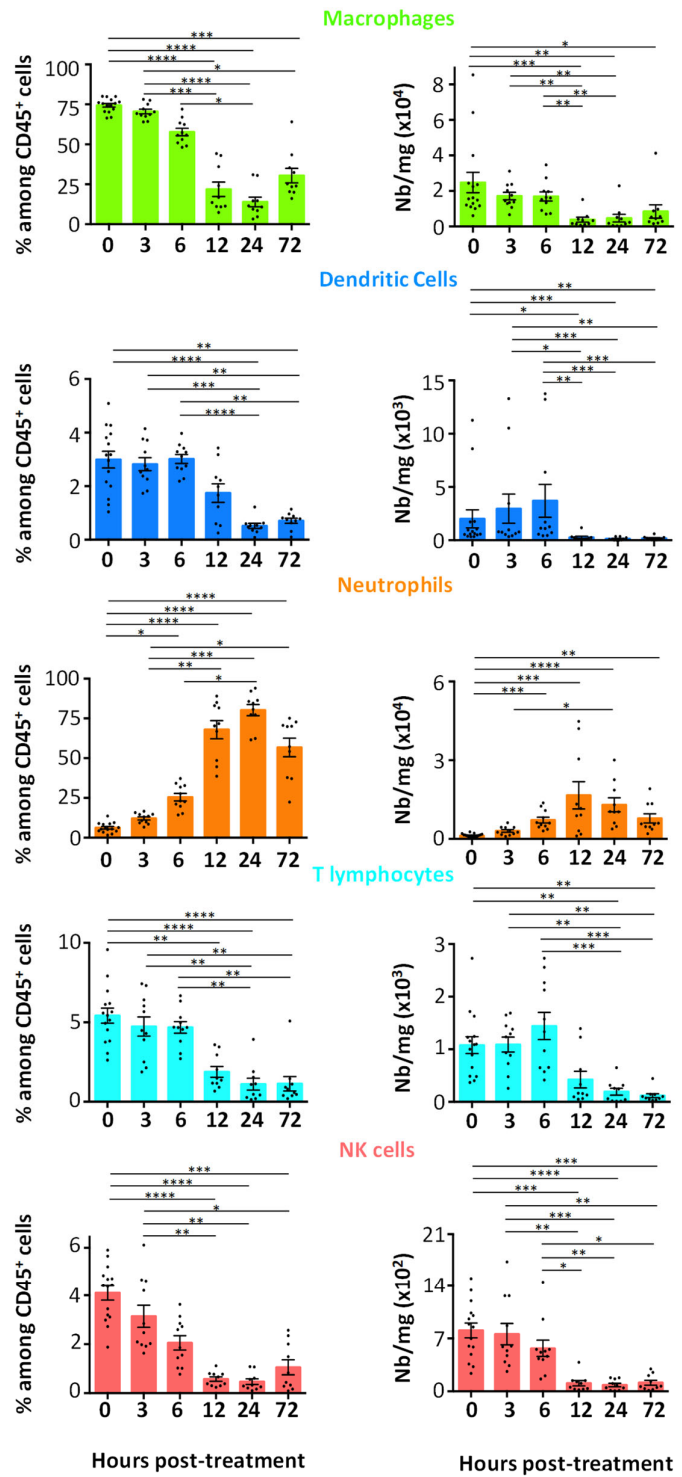
B

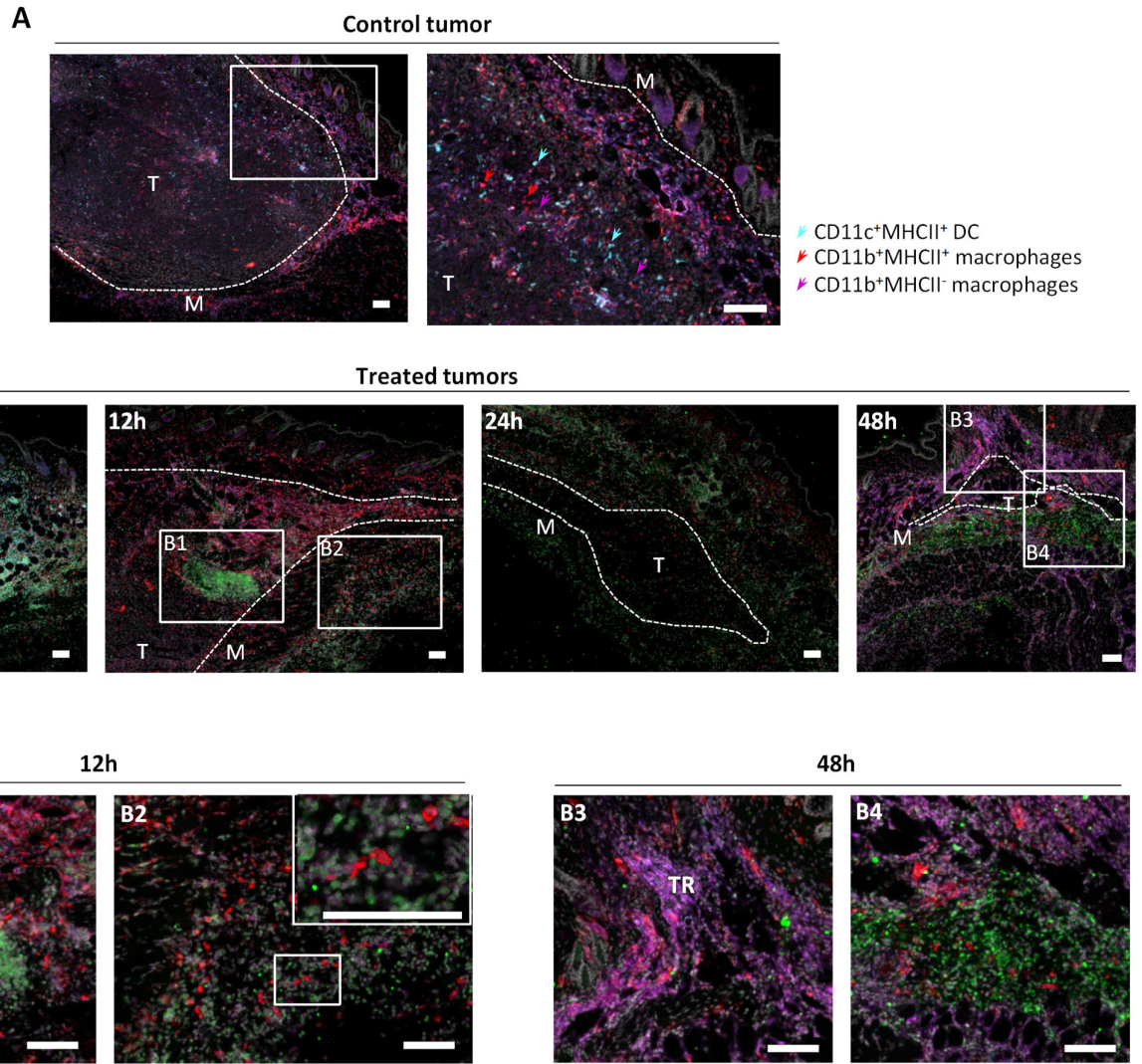


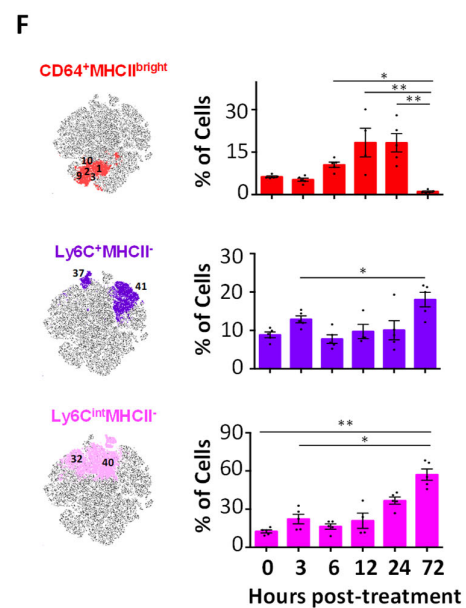
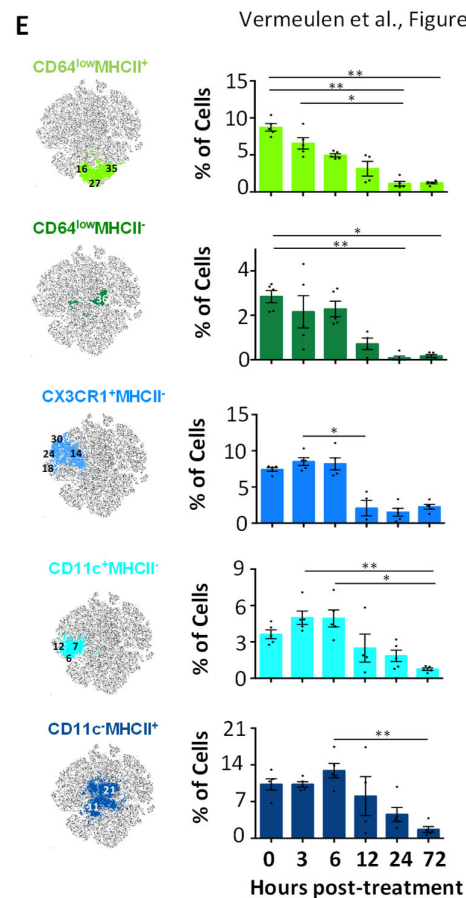
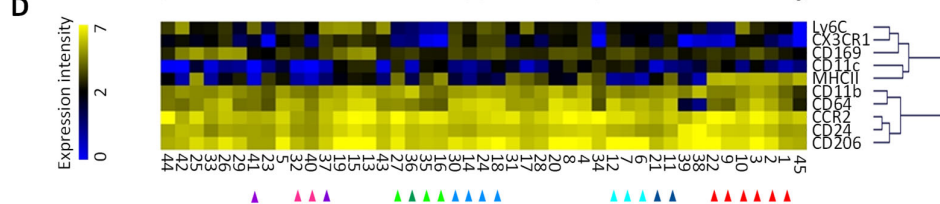
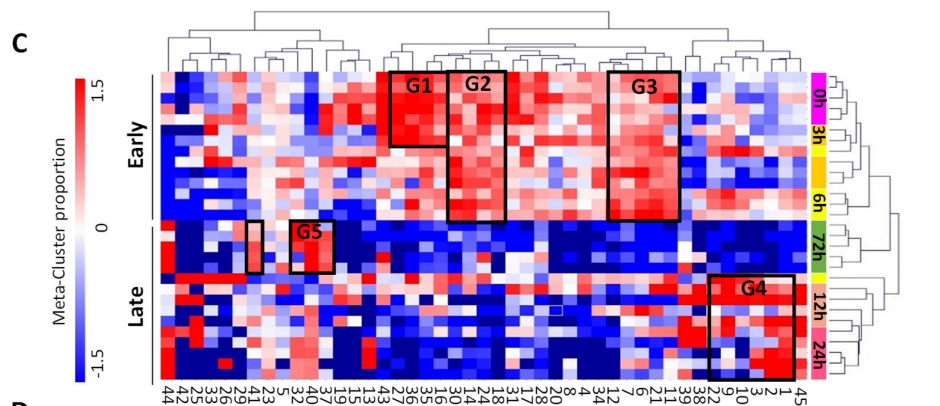
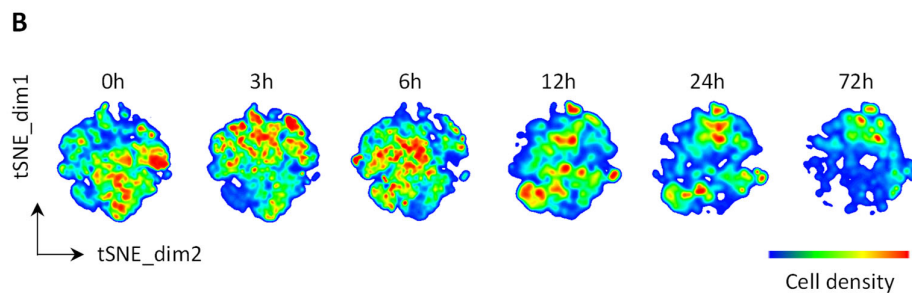
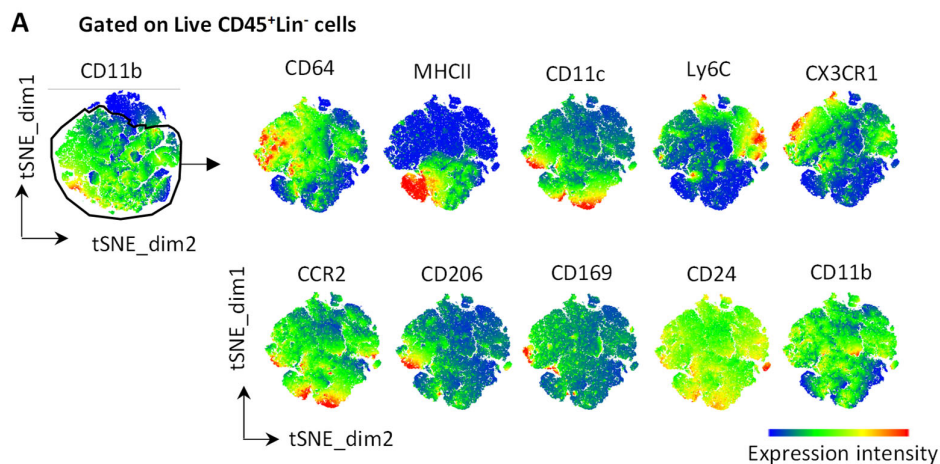
C

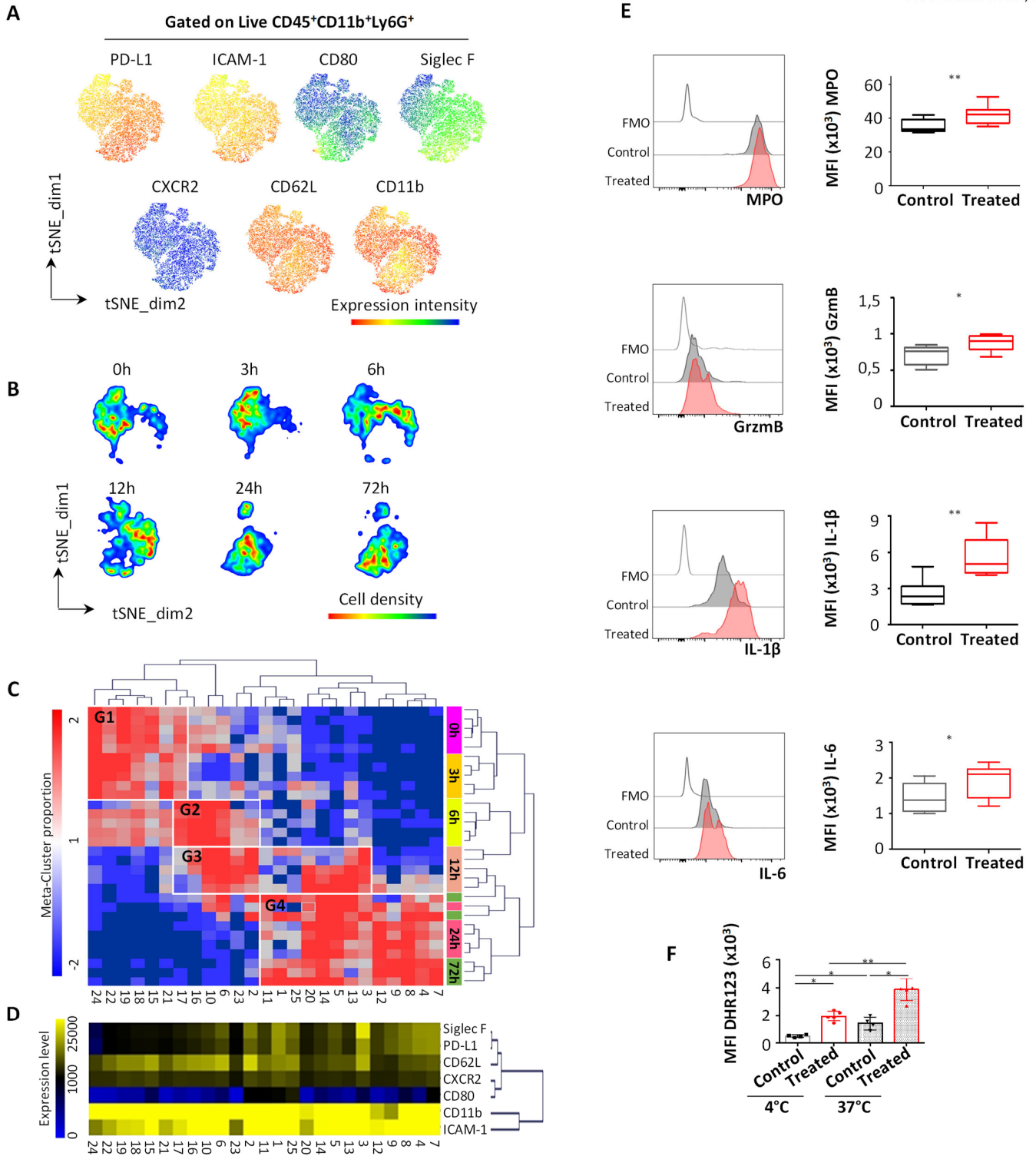


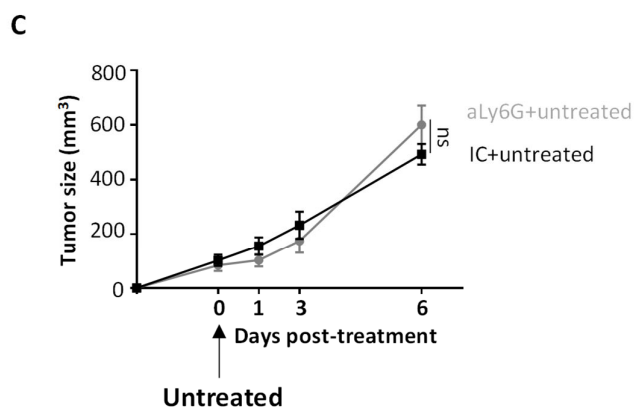
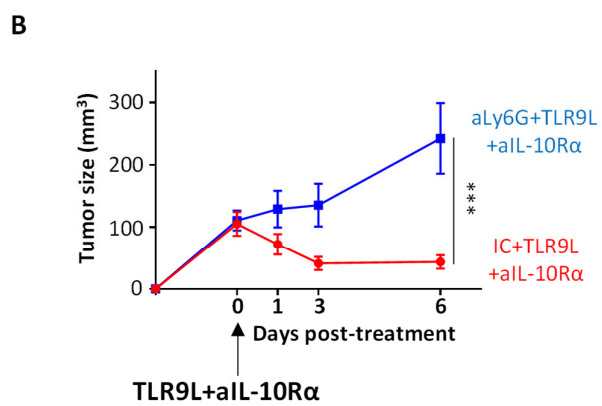
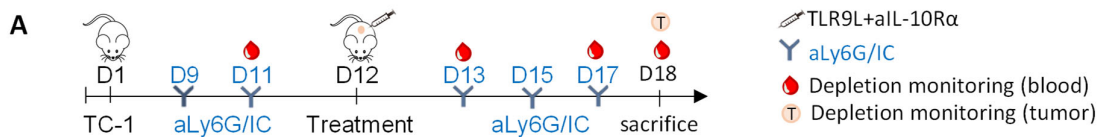
D

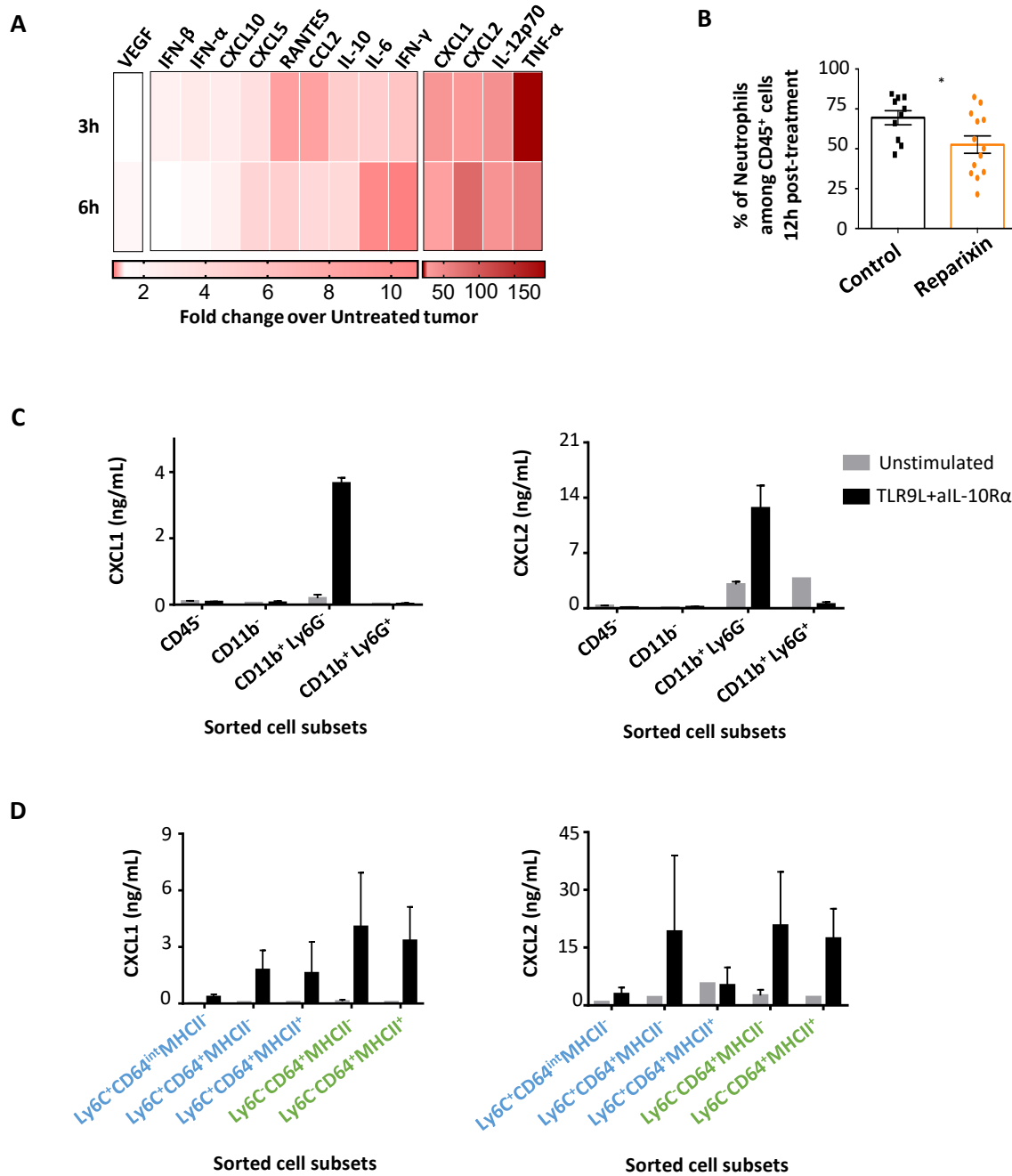








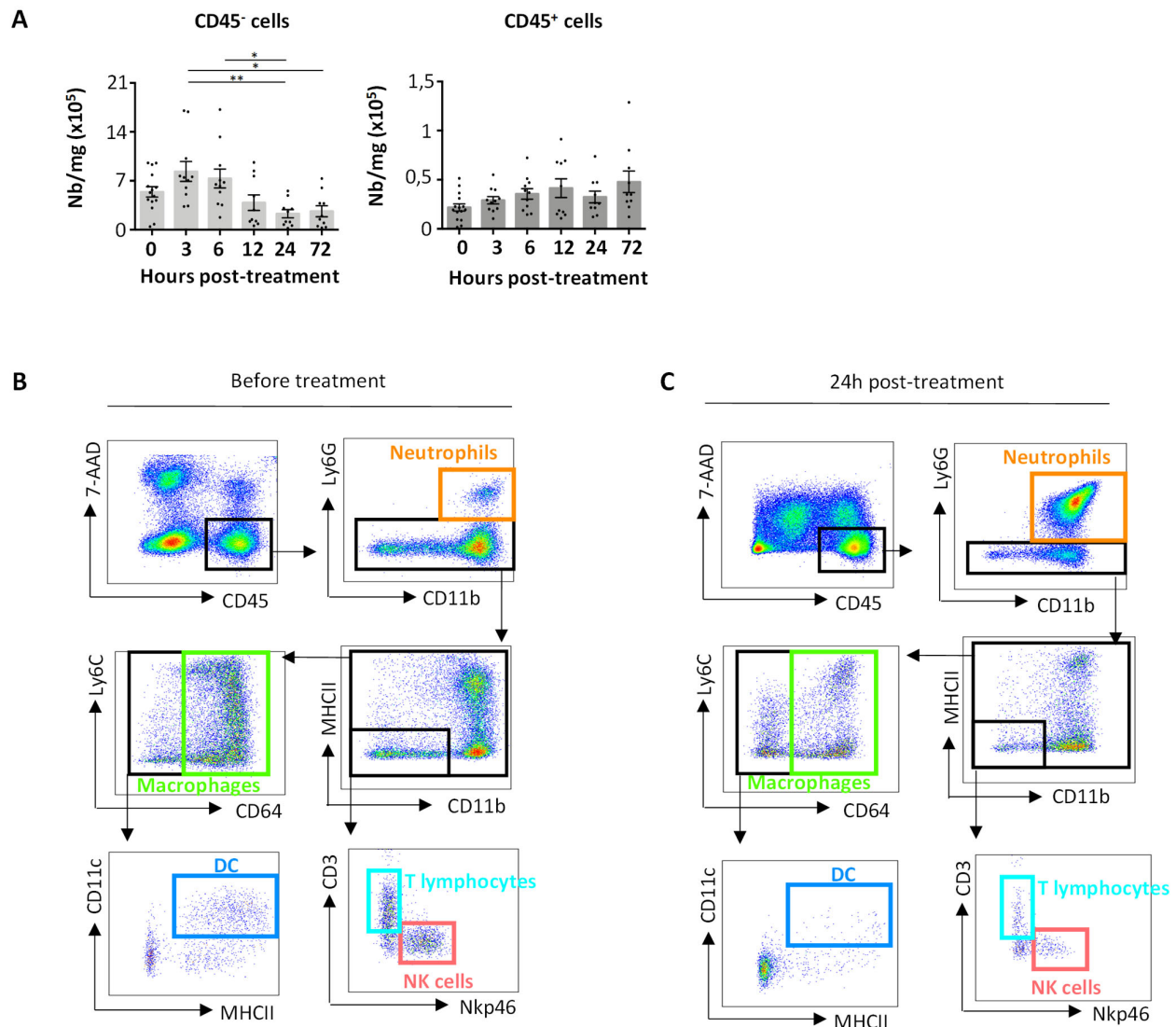




ADDITIONAL INFORMATIONS

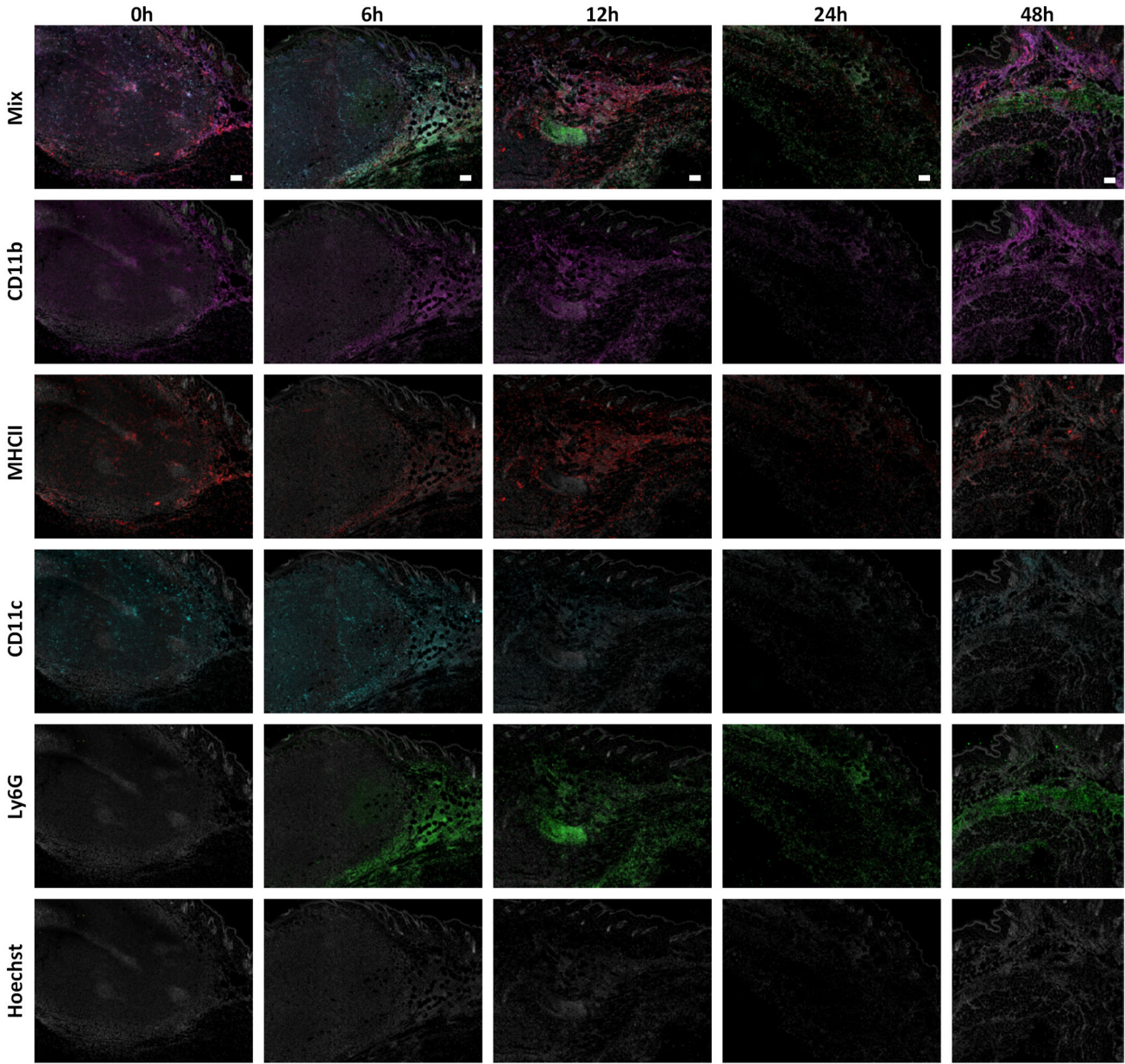
Supplementary information accompanies this paper (4 supplementary figures and 1 supplementary table)

Vermeulen et al., Supplemental Figure 1

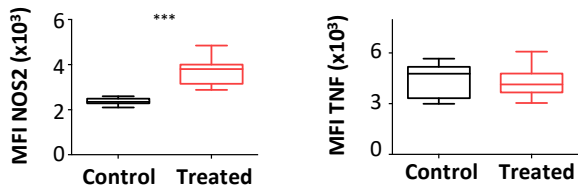


Supplemental Figure 1. Identification of immune cell populations in TC-1 tumors

(A) Kinetics of absolute numbers of CD45⁻ non-immune cells and CD45⁺ immune cells at early time points after treatment normalized per mg of TC-1 tumor assessed by flow cytometry analysis. Bar graphs showing mean values \pm S.E.M. One-way anova, Kruskal-Wallis test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **(B)** Gating strategy showing the different immune cells infiltrating untreated TC-1 tumors. Flow cytometry plots of cell suspension from untreated TC-1 tumor identifying CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophils, CD3⁺ T lymphocytes and Nkp46⁺ NK cells among CD11b⁺MHCII⁻ cells, MHCII⁺/CD11b⁺Ly6C⁺/CD64⁺ macrophages and CD64⁺MHCII⁺CD11c⁺ DC among CD11b⁺MHCII⁻ and MHCII⁺ cells. **(C)** Gating strategy showing the same immune cell populations 24 hours after local immunotherapy.

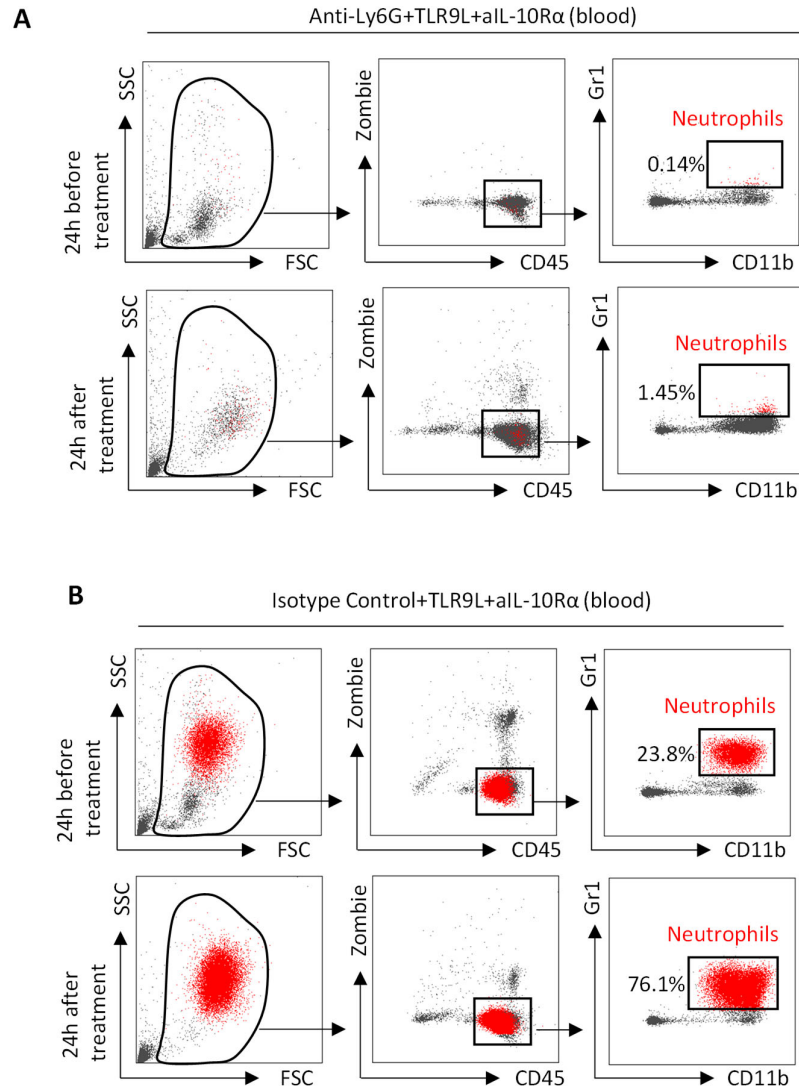


Supplemental Figure 2. Visualization of phagocyte populations and neutrophils in TC-1 tumors. Representative immunofluorescence by spectral imaging showing the overlaid staining (first row) in control TC-1 tumor and treated tumors at the indicated time points and corresponding single color images showing CD11b (magenta), MHCII (red), CD11c (blue), Ly6G (green) and nuclei (grey) expression. Scale bar: 100µm.



Supplemental Figure 3. Activation of macrophages after local immunotherapy.

Ex vivo expression of NOS2 and TNF by Live CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ cells infiltrating TC-1 tumors from untreated mice (control) or mice that received the local immunotherapy 12 hours before (treated) revealed by flow cytometry analysis after intracellular staining. Box plots showing median MFI with min. and max. values. One-way anova, Kruskal-Wallis test, *** $p < 0.001$.



Supplemental Figure 4 : Neutrophil depletion in C57BL/6J mice

(A-B) Flow cytometry dot plots showing the frequency of neutrophils (red) in blood, from mice injected with depleting anti-Ly6G antibody (A) or isotype control (Rat IgG2a) (B) 24 hours before and 24 hours after administration of local immunotherapy. Data from representative mice.

Supplemental Table 1. Reagents

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Reagents for cell culture		
DMEM	Gibco	Cat #41965-039
Fetal Calf Serum	Pan Biotech	Cat #P30-3306
NaPyruvate	Gibco	Cat #11360-039
PBS	Gibco	Cat #14190-094
Penicillin/Streptomycin	Gibco	Cat #15140
Trypsin-EDTA	Gibco	Cat #25300-054
Experimental mouse model		
Mouse:C57BL/6J	Charles River	Cat #632C57BL/6J
<i>In vivo</i> treatments		
Anti-Ly6G (1A8)	BioXCell	Cat #BE0075-1
Isotypic Control (2A3)	BioXCell	Cat #BE0089
Anti-IL-10R α CD210 (1B1.3A)	BioXCell	Cat #BP0050
Reparixin	R&D Systems	Cat #6957
TLR9L (ODN 2395)	InvivoGen	Cat #tlrl-2395-5
Cell suspension preparation		
Collagenase IV	Sigma-Aldrich	Cat #C5138-1G
Dnase I	Roche	Cat #11284932001
RPMI	Gibco	Cat #21875-034

Supplemental Table 1. Reagents

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Reagents for Flow Cytometry		
7-AAD	BD Biosciences	Cat #51-68981E
BV Buffer	BD Biosciences	Cat #566385
Dihydrorhodamine 123	Sigma-Aldrich	Cat #D1054-2MG
EDTA	Invitrogen	Cat #15575-038
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences	Cat #550028
NIR Zombie	BioLegend	Cat #423106
Antibodies used in flow Cytometry		
CD3 APCH7 (17A2)	BD Biosciences	Cat #560590
CD3 BV786 (145 2C11)	BD Biosciences	Cat #564379
CD4 APCH7 (GK1.5)	BD Biosciences	Cat #560181
CD4 FITC (SK3)	BD Biosciences	Cat #345768
CD8 APCH7 (53-6.7)	BD Biosciences	Cat #560182
CD8 BV605 (53-6.7)	BD Biosciences	Cat #563152
CD11b PeCy7 (M1/70)	BD Biosciences	Cat #552850
CD11c APCFire750 (N418)	BioLegend	Cat #117352
CD11c BV650 (N418)	BioLegend	Cat #117339
CD11c BV711 (HL3)	BD Biosciences	Cat #563048
CD16/CD32	BD Biosciences	Cat #553142
CD19 APCH7 (1D3)	BD Biosciences	Cat #560245
CD24 BV605 (M1/69)	BD Biosciences	Cat #563060
CD45 BV510 (30F11)	BD Biosciences	Cat #563891
CD54 / ICAM1 BV605 (3E2)	BD Biosciences	Cat #740343
CD62L BV786 (MEL-14)	BD Biosciences	Cat #564109
CD64 A647 (X54-5/7.1)	BD Biosciences	Cat #558539
CD64 BV711 (X54-5/7)	BioLegend	Cat #139311
CD80 A647 (16-10A1)	BD Biosciences	Cat #560016
CD103 APCR700 (M290)	BD Biosciences	Cat #565529
CD169 FITC (3D6.112)	BioLegend	Cat #142406
CD206 BV650 (C068C2)	BioLegend	Cat #141723
CCR2 BV786 (475301)	BD Biosciences	Cat #747966

Supplemental Table 1. Reagents

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies used in flow Cytometry		
CX3CR1 PE (SA011F11)	BioLegend	Cat #149006
CXCR2 BV421 (V48-2310)	BD Biosciences	Cat #566622
Gr1 APC (RB6-8C5)	BD Biosciences	Cat #553129
Granzyme B PE (NGZB)	eBiosciences	Cat #128898
IFN- γ BV605 (XMG1.2)	BD Biosciences	Cat #505840
IL-1 β pro form (NJTEN3)	eBiosciences	Cat #17-7114-80
IL-6 A488 (MP5-20F3)	BD Biosciences	Cat #561363
IL-10 BV421 (JES5-16E3)	BD Biosciences	Cat #563276
Ly6C PE (HK1.4)	BioLegend	Cat #128008
Ly6G APCH7 (1A8)	BD Biosciences	Cat #565369
Ly6G A700 (1A8)	BD Biosciences	Cat #561236
MHCII BV421 (M5/114)	BD Biosciences	Cat #562564
MPO FITC (8F4)	hycultbiotech	Cat #HM05F1
Nkp46 A647 (29A1.4)	BD Biosciences	Cat #560767
NOS2 APC (CXNFT)	eBiosciences	Cat #17-5920-82
PD-L1 CD274 PE (MIH5)	BD Biosciences	Cat #5558091
Siglec F PECF594 (E50-2440)	BD Biosciences	Cat #562757
TNF PE (MP6-XT22)	eBiosciences	Cat #12-7321-82
Reagents for Immunofluorescence staining		
AntigenFix	DIA Path	Cat #P0014
BSA	Sigma-Aldrich	Cat #A7906-100G
Isopentane	CarloERBAReagents	Cat #528492
Entellan	Merck	Cat #HX74982261
Masson's Trichrome	Merck	Cat #HT15-1KT
PermaFluor Aqueous Mounting Medium	ThermoFisher Scientific	Cat #TA006FM
Saponin	Sigma-Aldrich	Cat #57900
Sucrose	Sigma-Aldrich	Cat #57-50-1
SuperFrost Plus slides	ThermoFisher Scientific	Cat #J7800AMNZ
Tissue OCT	VWR Chemicals	Cat #00411243

Supplemental Table 1. Reagents

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies used for immunofluorescence staining		
CD11b Biotin (M1/70)	BioLegend	Cat #101204
Purified anti-mouse CD11c (HL3)	BD Biosciences	Cat #550283
MHCII A647 (M5/114.5.2)	BD Biosciences	Cat #562367
Ly6G FITC (1A8)	BD Biosciences	Cat #551460
Streptavidin A555	Invitrogen	Cat #S322355
Goat Anti-Hamster A594	Jackson Immunoresearch	Cat #127-585-160
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific	Cat #H1399
Mechanical Digestion of TC-1 tumors		
Glycérol	Sigma-Aldrich	Cat #G9012-100mL
IgePAL NP40	Sigma-Aldrich	Cat #I777
NaCl	sds	Cat #13805p12
Protease Inhibitor	Roche	Cat #11 836 153 001
TRIS	MP	Cat #819623
Cytokine/Chemokine quantification		
BioLegendPlex	BioLegend	Cat #740622
Mouse VEGF ELISA Kit	R&D	Cat #DY493-05
Softwares		
FlowJo	Treestar	
GraphPad Prism 7.0	Graphpad	
MeV	TM4 Software	
Others		
FACS LSR Fortessa	Becton Dickinson	
FACS Aria	Becton Dickinson	
FastPrep-24	MP Biomedical	

Partie III- Résumé des résultats obtenus au cours de la thèse

En résumé, l'ensemble de mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le mécanisme d'action de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α dans le modèle murin de tumeurs cutanées TC-1.

Dans une première partie, Nous avons démontré que les LT CD8 jouent un rôle majeur dans le contrôle de la croissance tumorale en réponse à l'immunothérapie locale car leur déplétion *in vivo* diminue la régression tumorale après traitement. Nous avons mis en évidence une immunité mémoire protectrice contre les récives en démontrant que la croissance de tumeurs TC-1 implantées dans la peau de souris ayant préalablement éliminé une tumeur primaire est retardée en comparaison à la croissance des tumeurs primaires. Cette immunité protectrice implique des LT CD8 recrutés massivement dans les tumeurs secondaires.

La génération des LT CD8 effecteurs anti-tumoraux est initiée dans les ganglions drainant la tumeur puisque 4 jours après immunothérapie locale nous détectons des LT CD8 au phénotype effecteur dans ces ganglions, témoignant ainsi de leur activation en réponse au traitement.

Nous nous sommes ensuite demandé quel était le rôle des DC dans l'activation des LT CD8 anti-tumoraux. Nous avons tout d'abord observé que suite à l'administration péri-tumorale de l'immunothérapie, la fréquence des DC associées aux tumeurs diminue progressivement au cours des 24 premières heures. En parallèle, la fréquence des DC dérivées de la peau (DC migratoires) augmente dans les ganglions lymphatiques entre 12 et 72 heures post-traitement et cette population exprime des niveaux plus élevés des marqueurs de maturation CD80, CD86, PD-L1 et PD-L2 dans les souris traitées. Ceci suggère que les DC associées aux tumeurs migrent dans les ganglions lymphatiques drainants pour initier la réponse T CD8 anti-tumorale.

Il restait à mettre en évidence la capacité des DC dérivées des tumeurs à présenter un antigène tumoral. Pour cela, je me suis appuyée sur le modèle TC-1 dont les cellules expriment l'antigène tumoral E7 et des souris transgéniques possédant des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'épitope immunodominant E7(aa49-57). Nous avons démontré que les DC migratoires sont capables d'activer *in vitro* la prolifération des LT CD8 spécifiques, et que les DC migratoires conventionnelles de type 2 sont les plus efficaces, démontrant ainsi leur capacité à acquérir un antigène en périphérie et à le présenter aux LT CD8 pour initier la réponse T CD8 et générer des LT CD8 effecteurs producteurs d'IFN- γ .

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le rôle de l'immunité innée dans le mécanisme d'action de ce traitement compte tenu du fait que l'immunothérapie locale induit une régression tumorale massive dans les 3 premiers jours suivant l'injection.

Nous avons d'abord observé la régression tumorale et le remaniement tissulaire *in situ* grâce à des marquages histologiques hématoxyline/éosine ainsi qu'une nécrose hémorragique grâce au marquage Trichrome Masson des coupes de tumeurs TC-1 dans les heures précoces qui suivent l'injection de l'immunothérapie locale.

Nous avons également analysé l'infiltrat immunitaire à différents temps post-traitement par cytométrie de flux. Les tumeurs TC-1 non traitées sont principalement infiltrées par une population hétérogène de macrophages. L'immunothérapie induit en quelques heures leur activation locale et le recrutement massif de neutrophiles. Des marquages d'immunofluorescence sur coupe ont permis de confirmer les données obtenues en cytométrie de flux et ont confirmé l'arrivée des neutrophiles par la périphérie de la tumeur. Nous avons également observé sur ces coupes de tumeur TC-1 que les macrophages expriment CMHII après 12 heures de traitement ce qui témoigne de leur activation locale. De plus, après 48 heures post-traitement, le recrutement de macrophages immatures et leur localisation en clusters dans des zones de remodelage tissulaire suggèrent qu'ils contribuent à la réparation du tissu lésé.

De plus, l'analyse phénotypique détaillée des macrophages dans les premières heures suivant l'immunothérapie nous a permis de mettre en évidence que les macrophages infiltrant les tumeurs entre 0 et 6 heures post-traitement ont un phénotype dit « early » que l'on peut assimiler à des macrophages de type M2, et que les macrophages dits « late » infiltrant les tumeurs entre 12 et 24 heures post-traitement ont un phénotype plutôt de type M1 associé à l'expression élevée de CMHII et l'expression de NOS2.

De même, l'analyse fine du phénotype et des fonctions des neutrophiles infiltrant les tumeurs à différents temps post-traitement a révélé que les neutrophiles issus de tumeurs traitées ont un phénotype activé (CD62L^{low}ICAM-1^{bright}) et des fonctions cytotoxiques (MPO, granzyme B et ROS) et un profil inflammatoire (production d'IL-1 β et IL-6). Nous avons également démontré que l'efficacité du traitement des tumeurs TC-1 est réduite dans des souris déplétées *in vivo* en

neutrophiles par l'injection d'anticorps déplétants anti-Ly6G, ce qui démontre que les neutrophiles contribuent à la régression tumorale précoce induite par l'immunothérapie. Enfin, nous avons identifié le mécanisme de recrutement des neutrophiles sur le site tumoral. L'analyse des cytokines et chimiokines présentes dans le microenvironnement tumoral, a révélé la présence abondante de 2 facteurs connus pour recruter les neutrophiles : CXCL1 et CXCL2. Nous avons ensuite démontré que la voie de signalisation au travers des récepteurs CXCR1 et CXCR2 (récepteurs de CXCL1 et CXCL2 notamment), est impliquée dans le recrutement des neutrophiles sur le site tumoral, grâce à l'injection d'un inhibiteur compétitif de ces 2 récepteurs *in vivo*, la réparixine. Enfin, nous avons démontré par une approche *in vitro* le rôle des macrophages tumoraux dans la production des 2 chimiokines CXCL1 et CXCL2 responsables en partie du recrutement des neutrophiles sur le site tumoral. L'ensemble des résultats générés au cours de ma thèse est résumé dans la Figure 58.

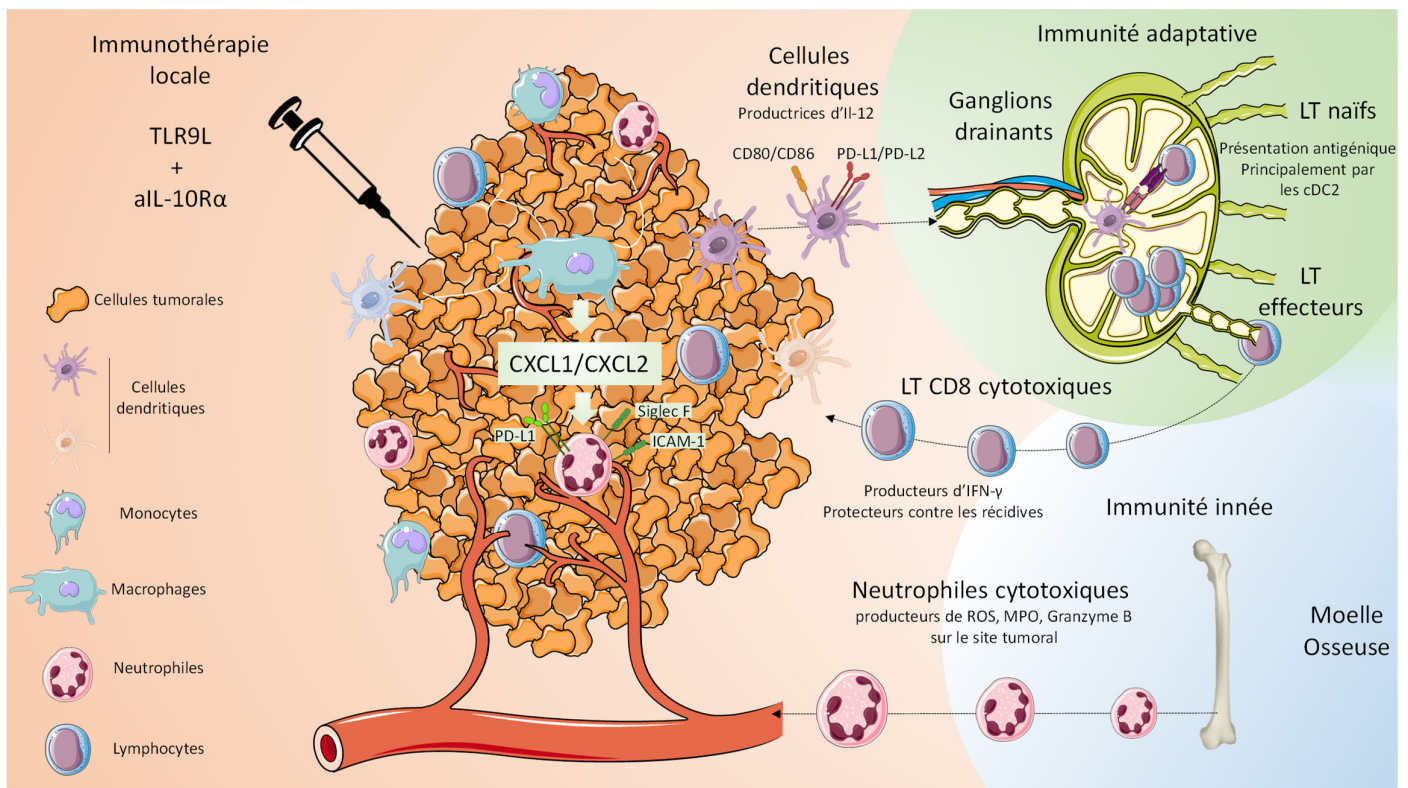


Figure 58. Conclusions : Mécanisme d'action de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10Rα

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. Rôle des DC dans la réponse au traitement

1. Caractérisation des DC dans les CEC

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la fréquence des DC infiltrant les CEC humains. Nous avons observé que la fréquence des différentes sous-populations de DC est inférieure à 1%, ce qui fait de ces-dernières des cellules très rares dans le microenvironnement tumoral. Ces données sont en accord avec le travail publié en 2015 par Gentles et al., qui établit la proportion de 22 types de cellules immunitaires, y compris les DC dans 25 types de cancers. Cette même étude démontre que l'infiltration de DC est associée à un bon pronostic chez les patients dans 71% des types de cancers étudiés (Gentles et al., 2015). Cependant, l'étude de Ji et al., publiée en 2020 dénombre une quantité plus importante de DC infiltrant les tumeurs dans les 10 patients atteints de CEC étudiés mais observe également une grande variabilité inter-patients (Ji et al., 2020). Il a également été démontré que les DC infiltrant les CEC, notamment les LC, induisent une réponse LT CD4 forte ainsi qu'une prolifération des LT CD8 producteurs d'IFN- γ qui favorisent l'immunité anti-tumorale (Fujita et al., 2012) mais qu'une diminution considérable des DC infiltrant les CEC a été observée. Ce processus peut constituer un mécanisme majeur permettant l'échappement des cellules tumorales (Pogorzelska et al., 2020). Aussi, notre étude met en évidence la présence de toutes les sous-populations de DC (cDC1, cDC2, moDC et pDC) dans les CEC humains et murins à l'exception des pDC dans le modèle TC-1 qui peut manquer à la compréhension complète du mécanisme d'action du traitement. Une analyse multiparamétrique des DC humaines *in situ* par une technique d'imagerie de masse de type « IMC » (Imaging Mass Cytometry), incluant des marqueurs phénotypiques (CD163, DNNGR1 ou encore CD204) et des marqueurs fonctionnels (CD80, CD86, PD-L1 ou CD209) permettrait de mieux appréhender leur rôle dans le microenvironnement tumoral des CEC (Elaldi et al., 2021).

2. Capacités migratoires des DC

La stimulation *in vitro* des DC dérivées des CEC montre que l'expression des marqueurs de maturation ainsi que les capacités d'éducation des LT sont plus faibles que celles des DC infiltrant la peau ce qui montre que le microenvironnement tumoral inhibe les fonctions anti-tumorales des DC (Bluth et al., 2009). Cela peut s'expliquer par les hauts niveaux d'expression

de PD-L1 et PD-L2 par les DC infiltrant les CEC humains (Jiao et al., 2017) ou par la proximité des DC avec les T reg (Jang et al., 2008).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une diminution de la fréquence des DC infiltrant les tumeurs associées à une augmentation de leur fréquence dans les ganglions lymphatiques drainants dans les heures qui suivent l'injection du traitement. Ces données suggèrent que, après stimulation locale, les DC migrent de la tumeur vers les ganglions lymphatiques. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'une partie des DC meurent sous l'effet du traitement. Nous avons aussi mis en évidence que les DC migratoires sur-expriment certains marqueurs d'activation tels que CD80, CD86, PD-L1 et PD-L2. Des études complémentaires par cytométrie de flux permettraient de caractériser la voie de signalisation impliquée dans leur migration jusqu'aux ganglions et d'identifier éventuellement le rôle de CCR7, le récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21 dans le processus (Villablanca et al., 2008). Enfin, des marquages sur coupes permettraient de caractériser la localisation des DC dans les ganglions et d'identifier leur proximité avec les vaisseaux lymphatiques notamment.

3. Capacités de présentation antigénique

De façon plus précise, nous avons mis en évidence que les DC infiltrant les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs sont capables de présenter un antigène tumoral E7 et que ces propriétés sont exacerbées en présence de l'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α . De manière surprenante, les capacités de présentation antigénique des cDC1 sont faiblement impactées par le traitement local alors que ces cellules sont connues pour leurs capacités supérieures de présentation antigénique croisée (Bedoui et al., 2009 ; Henri et al., 2011). De la même manière, les capacités de présentation antigénique des LC ne sont pas augmentées en réponse à l'immunothérapie locale alors que l'étude de Fujita et al., met en évidence le rôle primordial de ces cellules dans l'éducation des LT CD8 producteurs d'IFN- γ dans le contexte des CEC (Fujita et al., 2012). Aussi, les cDC2 acquièrent des capacités de présentation antigénique et d'éducation des LT CD8 accrues en réponse à l'immunothérapie locale ce qui est en désaccord avec bon nombre de travaux qui associent la présentation antigénique des cDC2 à l'éducation des LT CD4 uniquement (Laoui et al., 2016 ; Schlitzer et al., 2013).

Cette observation peut s'expliquer par les capacités immunosuppressives de l'antigène tumoral E7, retrouvé dans les cancers HPV⁺ tels que le cancer du col de l'utérus ou de la cavité buccale.

L'antigène tumoral E7 peut inhiber les capacités de présentation antigénique des DC (Chandra et al., 2016). Compte tenu de l'hétérogénéité des DC et des fonctions propres de chaque sous-population de DC il est possible que la protéine E7 influence différemment le comportement de chaque sous-population de DC. Afin d'évaluer le rôle de la protéine E7 sur les capacités de présentation antigénique des différentes sous-populations de DC, il serait intéressant de greffer des cellules tumorales TC-1 E7⁺OVA⁺ et TC-1 E7-OVA⁺ dans la peau du dos de souris C57BL/6. Ce protocole expérimental permettrait d'utiliser l'OVA comme antigène tumoral alternatif. Ceci permettrait de savoir si E7 affecte les capacités de présentation antigénique des DC.

Il serait également intéressant de comparer le profil d'expression génique des DC infiltrant les ganglions lymphatiques drainant la tumeur avant immunothérapie locale et 36 heures après (temps nécessaire à la migration des DC tumorales pour migrer vers les ganglions lymphatiques drainant après stimulation locale). Pour cela nous pourrions réaliser une analyse par une technique de Single cell RNASeq sur une population enrichie en DC. Cette étude permettrait de mettre en évidence les gènes différemment exprimés entre les sous-populations de DC des ganglions lymphatiques drainant les CEC et de comprendre plus en détail les fonctions et dysfonctions de certaines sous-populations, notamment celles des cDC1.

4. Rôle des sous-populations de cDC dans le contrôle de la croissance tumorale

Afin de confirmer le rôle différentiel des sous-populations de DC en réponse à notre immunothérapie locale et de déterminer *in vivo* le rôle de chacune dans la régression tumorale induite par le traitement, il serait intéressant de dépléter spécifiquement chaque sous-population de DC de façon conditionnelle. Pour cela, nous disposons au laboratoire de souris XCR1 Cre (marqueur spécifique des cDC1) (Crozat et al., 2011) que nous pourrions croiser avec des souris hDTR-Lox afin de dépléter spécifiquement les cellules XCR1⁺ de manière conditionnelle après injection de la toxine diphtérique (DT) humaine. Cependant, dans notre modèle tumoral, nous avons observé que les cDC1 diminuent l'expression de XCR1 ce qui peut rendre la déplétion des cDC1 infiltrant les tumeurs compliquée. Il serait également intéressant de comprendre le mécanisme conduisant à la diminution de l'expression de XCR1 à la surface de ces cellules. Böttcher et al., démontre en 2018 que la prostaglandine E2, produite par les cellules tumorales est responsable de la diminution de l'expression de XCR1 par les cDC1 tumorales ce qui

conduit à une réduction de leur recrutement sur le site tumoral, initié par les NK producteurs de CCL5 et XCL1 (Böttcher et al., 2018). Pour pallier le problème lié à la diminution de l'expression de XCR1 par les cDC1 tumorales, nous pourrions utiliser des souris Karma-hDTR, qui permettent une déplétion des cDC1 après injection de la DT, disponibles également au sein de notre laboratoire (Alexandre et al., 2016).

Nous disposons également de souris Zbtb46-hDTR, qui permettent de dépléter spécifiquement les cDC1 et cDC2 après injection de la DT. Cependant, il a été démontré dans ce modèle que l'injection de la DT est fatale dans les 24 à 48 heures chez ces souris suggérant un rôle primordial du gène Zbtb46 dans des cellules non immunitaires sur la viabilité des animaux. Afin d'identifier le rôle des cDC1 et cDC2 dans le mécanisme d'action du traitement il faudrait injecter des tumeurs TC-1 dans des souris C57BL/6 irradiées afin de supprimer la composante immunitaire de ces souris receveuses et effectuer un transfert adoptif de moelle osseuse à partir de souris Zbtb46-hDTR. Dans ces souris chimériques, l'injection de la DT permettrait de dépléter spécifiquement les DC conventionnelles, comme démontré par Meredith et al., en 2012. L'utilisation des 2 modèles, Karma-hDTR et zbtb46-hDTR donneraient ainsi des réponses complémentaires sur le rôle des cDC1 et cDC2 dans la réponse au traitement.

Enfin, des études récentes ont identifié une 3^{ème} sous-population de DC chez l'Homme caractérisée par l'expression de CD5⁻CD163⁺CD14⁺ dans le sang (Dutertre et al., 2019). Ces cellules, appartenant au groupe des DC2 ont été appelées les DC3. L'ontogénie de ces cellules fait l'objet de débats mais il semblerait que les DC3 dérivent d'un progéniteur différent de celui des cDC2 (Bourdely et al., 2020 ; Cytlak et al., 2020). Il a été démontré que les DC3 sont capables de produire de l'IL-12p70, IL-23, IL-10, TNF, IL-1 β , CCL5 et CCL22 en réponse à une stimulation TLR (poly(I :C)) et d'éduquer les LT CD8 CD103⁺ *in vitro*. Leur infiltration est corrélée à celle des LT résidents-mémoires CD8⁺CD69⁺CD103⁺ dans le cancer du poumon (Bourdely et al., 2020). Une étude récente dont l'objectif était d'étudier les fonctions des DC3 dans la peau saine et inflammatoire (dermatite atopique et psoriasis) a mis en évidence le rôle des DC3 dans la production d'IL-1 β et IL-23A, 2 cytokines favorisant le développement du psoriasis (Nakamizo et al., 2021). Chez la souris, cette population n'a pas été clairement identifiée bien que l'étude de Brown et al., identifie une hétérogénéité des cellules cDC2 chez la souris avec un parallèle chez l'Homme (Brown et al., 2019). Des études complémentaires sont donc indispensables chez la souris. Dans ce contexte, on peut se demander si la fraction cDC2 que nous avons triée dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs TC-1, dont

les capacités de présentation antigénique croisée sont exacerbées par le traitement est une population homogène. L'utilisation de marqueurs supplémentaires permettrait de caractériser plus en détail les capacités de présentation antigénique de ces cellules.

B. Rôle des LT dans la réponse au traitement

1. Rôle des LT CD4

Les cellules tumorales peuvent détourner la réponse immunitaire en induisant une polarisation des LT CD4 vers un phénotype pro-tumoral caractérisé par des réponses Th2, Th17 ou T reg (Girardi et al., 2004 ; Zhang et al., 2013). Il a été démontré dans un modèle de CEC chimio-induit, que les LT CD4 produisent préférentiellement de l'IL-4 et IL-10 (réponse Th2) et favorisent l'immunosuppression en inhibant les réponses Th1 et en recrutant les T reg (Yusuf et al., 2008). Les Th17 sont décrits aussi pour contribuer à la carcinogenèse en augmentant l'hyper-prolifération des cellules épithéliales (Wang et al., 2010). Wang et al., démontrent également en 2010 que l'IL-17 favorise l'infiltration de cellules myéloïdes et diminue l'infiltration de LT CD8 producteurs d'IFN- γ , favorisant ainsi un contexte immunosuppresseur au cours du développement du CEC. Il serait donc intéressant de caractériser les sous-types de LT CD4 dans notre modèle, notamment la fréquence et le nombre de T reg infiltrant les tumeurs avant et après traitement. L'immunothérapie locale permettant de stimuler efficacement les DC et ainsi l'éducation des LT, on peut s'attendre à ce que les LT CD4 infiltrant la tumeur après immunothérapie locale présentent un phénotype inflammatoire de type Th1. Nous avons observé dans notre modèle de tumeurs TC-1 que la déplétion *in vivo* des LT CD4 *via* l'injection d'anticorps déplétant anti-CD4, n'impacte pas significativement la réponse au traitement (données non montrées) ce qui supporte l'hypothèse que les LT CD4, au moment de l'injection de l'immunothérapie locale n'ont pas un phénotype activateur et n'impactent pas significativement la réponse au traitement.

2. Rôle des LT CD8

L'infiltration en LT CD8 dans les tumeurs est associée à un bon pronostic dans 16 types de cancers sur les 25 étudiés dans l'étude de Gentles et al., (Gentles et al., 2015). Dans notre modèle murin de tumeurs TC-1, la fréquence des LT CD8 représente environ 5% des leucocytes dans des tumeurs établies. Dans notre étude, nous avons déplété spécifiquement les LT CD8 *in*

vivo par l'injection intrapéritonéale d'anticorps anti-CD8 β au moment de l'immunothérapie. Les souris déplétées en LT CD8 parviennent à contrôler la croissance tumorale dans les premiers jours suivant l'injection de l'immunothérapie ce qui démontre que l'immunité innée n'est pas impactée par la déplétion. Cependant, après 8 jours post-traitement, la croissance tumorale repart de façon très rapide dans les souris déplétées en LT CD8 ce qui démontre que ces cellules jouent un rôle primordial dans le contrôle à long terme des tumeurs. Nous avons également démontré que la régression totale des tumeurs TC-1 après immunothérapie locale, permet de retarder la croissance de tumeurs secondaires ce qui met en évidence la mise en place d'une immunité mémoire fonctionnelle grâce à notre traitement. Cependant, notre immunothérapie locale ne permet pas de supprimer totalement l'apparition de tumeurs secondaires, bien que de nombreux LT CD8 soient présents. Cette observation peut s'expliquer par la capacité intrinsèque des cellules tumorales TC-1 à proliférer de manière exponentielle, par un mécanisme de résistance intrinsèque ou par la mise en place d'un environnement immunosuppresseur rapide. Des études complémentaires visant à caractériser l'activation des LT infiltrant les tumeurs secondaires permettrait d'identifier une inhibition éventuelle de leurs fonctions cytotoxiques. Pour cela, des marquages par cytométrie de flux pourraient permettre d'identifier l'expression de certains marqueurs d'exhaustion tels que PD-1, TIGIT, TIM3 ou LAG-3 notamment. Si ces études complémentaires révèlent une inhibition des fonctions cytotoxiques des LT nous pourrions optimiser notre stratégie d'immunothérapie locale en injectant simultanément des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (IC) tels que des anti-PD-1 par exemple.

C. Rôle des macrophages dans la réponse au traitement

1. Les macrophages « early » et « late » et leur phénotype

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une modulation du phénotype des macrophages infiltrant les tumeurs TC-1 dans les heures précoces qui suivent l'injection de notre immunothérapie locale. Nous avons ainsi identifié des macrophages dits « early », qui infiltrent les tumeurs entre 0 et 6 heures post-traitement et des macrophages dits « late » qui infiltrent les tumeurs entre 12 et 72 heures post-traitement. Les macrophages « early » expriment peu ou pas de CMHII. De plus, nous avons montré que les macrophages infiltrant les tumeurs TC-1 non traitées sont producteurs d'IL-10 et représentent un verrou dans la production d'IL-12 par les DC ce qui démontre leur rôle pro-tumoral et confirme les données de la littérature (Ruffel et

al., 2014). L'ensemble de ces données suggère que les macrophages infiltrant les tumeurs TC-1 avant traitement sont de type M2. Aussi, tous les macrophages tumoraux expriment CCR2 ou CX3CR1 ce qui démontre l'origine monocyttaire des macrophages infiltrant la tumeur. Il n'est pas surprenant d'observer l'absence de macrophages embryonnaires dans les tumeurs TC-1. En effet, le contexte hautement inflammatoire des tumeurs TC-1 favorise le recrutement continu de monocytes. Nous avons également démontré que les macrophages « late » expriment des niveaux élevés de CMHII ce qui témoigne d'une activation locale de ces derniers. Nous avons également mis en évidence la présence d'IFN- γ dans le microenvironnement tumoral et il a été décrit que la stimulation des macrophages par l'IFN- γ induit un phénotype M1 (Chavez-Galan et al., 2015). De plus, nous avons démontré que la fraction CD11b⁺Ly6G⁻ composée majoritairement de macrophages produit des niveaux plus importants du facteur NOS2, un marqueur M1, après immunothérapie locale (Chavez-Galan et al., 2015). L'ensemble de ces données suggère une conversion des macrophages « late » vers un phénotype M1.

2. Le processus de cicatrisation mis en place après le traitement

Le marquage histologique de coupes de tumeurs TC-1 par les colorants hématoxyline/éosine (HE) ou Trichrome Masson (MT) ont permis de mettre en évidence un processus de réparation tissulaire suggérant la mise en place d'un processus de cicatrisation dans les heures qui suivent l'injection du traitement local. Nous avons effectivement observé que les macrophages CD11b⁺CMHII⁻CD11c⁻Ly6G⁻ se regroupent sous l'épiderme endommagé 48 heures post-traitement mais nous n'avons pas démontré formellement leur rôle dans le processus de réparation. De plus, nous n'avons pas non plus évalué le rôle des fibroblastes dans ce processus. Les fibroblastes sont des cellules très hétérogènes qui s'activent au cours de la cicatrisation, de l'inflammation et des processus de fibrose (Chen and Song et al., 2019). Le rôle des fibroblastes dans le processus de réparation après immunothérapie n'a pas été évalué mais il serait intéressant de caractériser ces cellules dans le microenvironnement tumoral des CEC avant et après immunothérapie afin de déterminer leur rôle dans le processus de reconstruction du tissu après le phénomène de nécrose massive. De plus, lorsque la régression tumorale n'est pas totale, un phénomène de fibrose se développe, identifiable par palpation des tumeurs sur le dos des souris, qui semble servir de substrat à la croissance tumorale. Il serait donc intéressant de caractériser les fibroblastes et d'identifier les fibroblastes cicatriciels et fibrotiques en analysant les protéines matricielles produites par ces derniers afin d'identifier éventuellement le

mécanisme mis en place lorsque la régression tumorale n'est pas complète et associée à de la fibrose.

3. Rôle des macrophages dans le contrôle de la croissance tumorale après immunothérapie locale

Guiducci et al., utilisent une stratégie d'immunothérapie locale proche de la nôtre, qui consiste en l'application d'un agoniste de TLR9 en péri-tumoral et de l'administration répétée de l'anticorps bloquant anti-IL-10R par voie intrapéritonéale. Dans leur modèle de greffe de cellules tumorales TSA exprimant la chimiokine CCL16, les auteurs démontrent un rôle primordial des macrophages dans le phénomène de nécrose massive observé et ne mettent pas en évidence de rôle des neutrophiles contrairement à ce que nous démontrons dans le modèle TC-1. Cette différence peut s'expliquer de différentes façons : les modèles murins sont différents, l'agoniste de TLR9 utilisé aussi et la voie d'administration de l'anticorps anti-IL10R également. Enfin, ces auteurs stimulent avec CCL16 le recrutement massif de DC et macrophages de la périphérie conférant à leur tumeur un profil immunologique particulier. Néanmoins, dans notre étude, nous avons également observé une fréquence importante de macrophages infiltrant les tumeurs TC-1 établies ($74,4\% \pm 1,1$) pouvant ainsi jouer un rôle précoce dans la réponse au traitement. Nous nous sommes donc demandé quel était le rôle des macrophages dans la régression tumorale induite par le traitement TLR9L+aIL-10R α . Pour répondre à cette question nous avons essayé sans succès de dépleter *in vivo* les macrophages infiltrant les tumeurs. Compte tenu du fait que la déplétion des macrophages impacte la croissance tumorale dans plusieurs modèles murins (Fritz et al., 2014), nous avons d'abord essayé de dépleter *in vivo* les macrophages dans des souris porteuses de tumeurs TC-1 établies. Pour cela nous avons testé différents protocoles d'injection de liposomes clodronate (injection intrapéritonéale, intraveineuse, ou intradermique à doses variables) sans succès. A ce stade, nous avons supposé que la densité de cellules tumorales TC-1 ne permet pas le passage des liposomes rendant ainsi les macrophages inaccessibles. Nous avons donc testé les mêmes protocoles de déplétion des macrophages *in vivo* par l'injection de liposomes clodronate en commençant le jour de la greffe de tumeur TC-1. Cette approche nous a permis de réduire le nombre de macrophages infiltrant les tumeurs d'un facteur 2, avec en parallèle une augmentation du nombre de cellules CD64⁺-Ly6c⁺ dérivées des monocytes infiltrant la tumeur. Nous avons donc supposé que pour dépleter efficacement les macrophages tumoraux il était nécessaire de dépleter les macrophages par l'injection de liposomes clodronate et de bloquer le

recrutement de monocytes en utilisant un anticorps ciblant spécifiquement la molécule CSF-1R connue pour jouer un rôle primordial dans la migration des monocytes. Nous avons reproduit la cinétique d'injection des 2 composés utilisée par Zhu et al., en 2017 qui consiste en l'injection de 400 µg d'anti-CSF-1R à J1, J5, J9 et J12 après injection des cellules tumorales (injectées elles-mêmes à J1) et 2 mg de clodronate à J2 et 1 mg de clodronate à J6 et J10 mais là encore, nous ne sommes pas parvenus à dépléter efficacement les macrophages infiltrant les tumeurs (Zhu et al., 2017). A présent, l'objectif est d'utiliser un modèle de souris transgénique tel que les souris CD64-hDTR (Baranska et al., 2018) afin de dépléter efficacement les macrophages tumoraux et évaluer leur rôle dans le contrôle de la croissance tumorale en réponse à notre immunothérapie locale.

D. Rôle des neutrophiles

1. Rôle des neutrophiles dans le contrôle de la croissance tumorale en réponse au traitement

Il a été démontré que les neutrophiles infiltrant les CEC jouent un rôle majoritairement pro-tumoral dans des tumeurs très avancées (Khou et al., 2020). Des travaux montrent que les neutrophiles peuvent être protecteurs dans d'autres types de cancers (Liu et al., 2016 ; Ponzetta et al., 2019). Ces rôles contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que, dans le microenvironnement tumoral, des facteurs d'origine tumorale peuvent moduler leur phénotype et leur fonction. Les neutrophiles peuvent acquérir une activité anti-tumorale (N1) ou pro-tumorale (N2) et cette conversion peut être médiée par le TGF- β (Fridlender et al., 2009). Les neutrophiles anti-tumoraux N1 sont caractérisés par leur capacité à induire la nécrose des cellules tumorales et à produire des médiateurs cytotoxiques tels que MPO. Au contraire, les neutrophiles pro-tumoraux N2, également appelés polymorphonucléaires immunosuppresseurs (PMN-MDSC) sont connus pour leur capacité de remodelage de la matrice extracellulaire, l'induction de l'angiogenèse, la promotion des métastases et de l'immunosuppression (Gabrilovich et al., 2009 ; Brandau et al., 2013). Comme dans l'étude de Challacombe et al., nous avons mis en évidence un rôle anti-tumoral des neutrophiles suite au traitement, ce qui peut s'expliquer par l'impact du traitement sur les facteurs du microenvironnement tumoral (Challacombe et al., 2006).

2. Phénotype et fonctions des neutrophiles

Nous avons également démontré que l'immunothérapie locale induit une maturation des neutrophiles qui adoptent un phénotype activé que l'on peut associer à un phénotype de type N1. En effet, il a été démontré que la stimulation des neutrophiles sanguins humains par du LPS, IFN- γ ou IFN- β favorise leur polarisation vers un phénotype N1. Ohms et al., démontrent que l'utilisation *in vitro* de ces facteurs permet de différencier les neutrophiles sanguins en neutrophiles N1 chez l'Homme. Ces neutrophiles N1, expriment des niveaux plus élevés de ICAM-1, de faibles niveaux de CXCR2 et CD62L et produisent du MPO et du TNF, ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus. Ainsi, nous avons mis en évidence un phénotype N1 des neutrophiles anti-tumoraux recrutés en réponse au traitement (Ohms et al., 2020). De manière paradoxale les neutrophiles anti-tumoraux N1 recrutés en réponse au traitement expriment de hauts niveaux de PD-L1 alors que l'expression de ce marqueur à la surface des neutrophiles est généralement associée à un phénotype de type N2 pro-tumoral (Khou et al., 2020). Dans notre modèle, les neutrophiles anti-tumoraux jouent leur rôle protecteur par différents mécanismes tels que la production de ROS, Granzyme B ou encore IL-1 β . Il a également été démontré que l'IFN- γ favorise la production de ROS par les neutrophiles ce qui suggère qu'une boucle de régulation positive autocrine et/ou paracrine s'opère au sein des neutrophiles.

D'autre part Maier et al., démontrent que la production de l'IL-12 par les DC est dépendante de l'IFN- γ dans un modèle murin de cancer du poumon (Maier et al., 2020), ce qui suggère que la quantité importante d'IFN- γ observée dans le microenvironnement tumoral à 6 heures post-traitement, produite en partie par les neutrophiles, favorise l'activation des DC et leur production d'IL-12. Ainsi, nous nous sommes demandé si les neutrophiles influencent la maturation et la migration des DC en réponse au traitement. Pour répondre à cette question, nous avons déplété spécifiquement les neutrophiles *in vivo* dans notre modèle de tumeur TC-1 par l'injection intrapéritonéale d'anticorps déplétants anti-Ly6G. Nous avons ensuite étudié le phénotype des DC infiltrant les ganglions lymphatiques drainant la tumeur 36 heures après injection de l'immunothérapie locale dans des souris dépourvues de neutrophiles, qui ont reçu les anticorps déplétants anti-Ly6G, ou des souris contrôles. Les données obtenues n'ont pas permis de mettre en évidence une différence d'expression des marqueurs de maturation par les DC ce qui démontre que la maturation et la migration des DC dans les ganglions lymphatiques

drainant la tumeur en réponse à l'immunothérapie locale est un processus indépendant des neutrophiles.

D'autre part, les images d'immunofluorescence sur coupe révèlent la présence de neutrophiles circulaires, parfaitement identifiables en périphérie de la tumeur, ainsi que des neutrophiles agglutinés, au cœur de la tumeur, dont les limites cellulaires sont plus difficiles à déterminer et dont l'expression de Ly6G semble diffuse. Ces images suggèrent potentiellement un phénomène de NETose mis en place par les neutrophiles recrutés sur le site tumoral. Pour confirmer/infirmier cette hypothèse, il serait intéressant de faire un marquage de HMGB1 ou de l'Histone H3 citrullinée, marqueurs connus pour révéler un phénomène de NETose en immunofluorescence sur coupe ou Western Blot (Wang et al., 2009).

Enfin, le marquage Trichrome Masson sur coupes de tumeurs TC-1 à différents temps post-traitement révèle la présence importante d'érythrocytes et de structure larges et rondes suggérant la présence de vaisseaux sanguins. De plus, à l'échelle macroscopique, une quantité importante de sang est retrouvée au niveau de la tumeur. Il serait donc intéressant d'effectuer un marquage d'immunofluorescence utilisant un anticorps anti-CD31 par exemple, marqueur spécifique des vaisseaux sanguins, afin de mettre en évidence l'angiogénèse induite par le traitement et déterminer la proximité des neutrophiles avec les vaisseaux sanguins. D'autre part, nous avons identifié une population de neutrophiles CD80⁺ uniquement à 72 heures post-traitement qui ressemble aux neutrophiles phagocytiques capables d'éliminer les érythrocytes décrits par Meindert et al., (Meindert et al., 2019). Il serait ainsi intéressant de caractériser plus en détail cette population de neutrophiles présente à 72 heures post-traitement. Cependant les échantillons complètement nécrotiques à ce temps ne permettent de recueillir que peu de cellules. De plus, dans certains cas, la tumeur a totalement disparu à ce temps et ne laisse place qu'à un trou inutilisable en cytométrie de flux.

3. Recrutement des neutrophiles

Dans notre étude nous avons démontré que les neutrophiles étaient recrutés sur le site tumoral *via* la signalisation CXCL1/2 – CXCR1/2. Nous avons également quantifié la présence de VEGF dans les tumeurs étant donné que Janela et al., ont identifié ce facteur comme chémoattractant des neutrophiles dans un modèle d'infection par *Propionibacterium.acnes* (*P.acnes*) (Janela et al., 2019). Nous avons également démontré que la voie de signalisation au

travers des récepteurs CXCR1 et CXCR2 joue un rôle primordial dans le recrutement des neutrophiles par l'utilisation de la réparixine, un inhibiteur compétitif de ces 2 récepteurs. Bien que permettant d'identifier une différence significative dans la fréquence de neutrophiles infiltrant la tumeur 12 heures après traitement, cet inhibiteur ne réduit que d'un facteur 2 le nombre de neutrophiles ce qui suggère que d'autres voies de signalisation sont également impliquées dans le recrutement de ces cellules. Ces autres facteurs pourraient être identifiés par des approches complémentaires telles qu'une étude protéomique des facteurs solubles présents dans le microenvironnement tumoral en spectrométrie de masse ou un dosage par Single Molecule Array.

De plus, afin de confirmer le rôle de la voie de signalisation CXCR1/2 dans le recrutement des neutrophiles et le contrôle de la croissance tumorale, il faudrait injecter de la réparixine à répétition dans les souris et mesurer la taille des tumeurs dans les jours qui suivent l'injection du traitement. Afin de s'assurer que la réparixine ne joue pas un rôle direct sur la viabilité des cellules tumorales TC-1, il faudrait tester *in vitro* la cytotoxicité directe de la réparixine sur les cellules tumorales TC-1 en culture par un test de MTT ou rouge neutre. Un premier test a été réalisé *ex vivo* en ce sens, par la vérification de l'absence d'expression de CXCR2 par les cellules tumorales TC-1. Cependant, nous n'avons pas vérifié l'expression de CXCR1 par les cellules tumorales TC-1 *ex vivo*.

Nous avons également identifié les cellules productrices de CXCL1 et CXCL2 *in vitro* en réponse au traitement à savoir les macrophages, ce qui est en accord avec les données de Wang et al., (2018). Des études complémentaires permettraient de confirmer ce résultat. Il serait également intéressant d'observer la production des chimiokines *in situ* par les macrophages grâce à la colocalisation de CXCL1 et CXCL2 et des macrophages en marquage d'immunofluorescence sur coupe. Enfin, la démonstration formelle du rôle de ces 2 chimiokines produites par les macrophages dans le recrutement des neutrophiles et la régression tumorale nécessiterait l'utilisation de souris transgéniques dans lesquelles nous pourrions bloquer la production de ces 2 chimiokines spécifiquement et uniquement dans les macrophages.

E. Adaptation chez l'Homme

Notre stratégie d'immunothérapie locale se compose d'un agoniste de TLR9. Chez la souris, le TLR9 est exprimé par toutes les DC et produit donc un effet considérable sur l'ensemble de la population DC. Cependant chez l'Homme, seules les DC plasmacytoïdes expriment le TLR9.

Notre étude permet donc de mettre en évidence les capacités prometteuses d'une immunothérapie locale qui stimule l'ensemble de la population de DC tout en inhibant la voie de signalisation au travers du récepteur de l'IL-10. A terme, il faudra donc adapter la stratégie thérapeutique en stimulant un autre TLR exprimé par l'ensemble des DC humaines tels que TLR3 et TLR8. L'ampligen et l'hiltonol, 2 agonistes de TLR3 sont actuellement en essais cliniques pour traiter le cancer colorectal, de la prostate, du poumon ou encore le mélanome (LeNaour et al., 2020) et plusieurs essais cliniques sont également en cours pour traiter différents types de tumeurs solides par des agonistes de TLR8 (Frega et al., 2020). Et enfin le TLR8 fait partie des 2 TLR stimulés par l'Aldara, crème à application topique dont le principe actif est l'Imiquimod, utilisé pour traiter les carcinomes basocellulaires. Ainsi, utiliser une stratégie d'immunothérapie locale ciblant un TLR exprimé par la population globale de DC associée à un anticorps bloquant la voie de signalisation de l'IL-10 est une stratégie thérapeutique prometteuse pour traiter localement les CEC humains.

F. Conclusion générale

Au cours de ma thèse j'ai élucidé le mécanisme d'action de la stratégie d'immunothérapie locale TLR9L+aIL-10R α . Bien que mon travail ouvre de nombreuses perspectives qui devront être approfondies, j'ai pu mettre en évidence le rôle de l'immunité adaptative et de l'immunité innée dans la régression tumorale induite par le traitement. Dans ma première étude, j'ai pu démontrer le rôle des DC dans l'éducation et l'activation des LT CD8 cytotoxiques et la mise en place d'une immunité mémoire, protectrice contre les récurrences. Dans ma seconde étude, j'ai pu démontrer le rôle très précoce des macrophages activés localement dans le recrutement des neutrophiles anti-tumoraux activés et cytotoxiques. Des études complémentaires permettront d'optimiser ce traitement, possiblement *via* l'injection concomitante d'anticorps ciblant les points de contrôle immunitaire. A terme, l'adaptation d'une stratégie d'immunothérapie locale basée sur notre formulation (agoniste d'un TLR + aIL-10R) pourrait constituer un traitement de choix pour traiter localement les CEC chez l'Homme.

ANNEXES

Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Development Is Associated with a Temporal Infiltration of ILC1 and NK Cells with Immune Dysfunctions

Carmelo Luci^{1,2,9}, Franck Bihl^{1,9}, Pierre Bourdely^{1,3}, Sokchea Khou^{1,4}, Alexandra Popa^{1,5}, Aida Meghraoui-Kheddar¹, Ophelie Vermeulen¹, Roxane Elaldi^{1,6}, Gilles Poissonnet⁶, Anne Sudaka⁷, Alexandre Bozec⁶, Selma Bekri^{1,8}, Julie Cazareth¹, Gilles Ponzio¹, Pascal Barbry¹, Roger Rezzonico¹, Bernard Mari¹, Veronique M. Braud¹ and Fabienne Anjuère¹

NK cells and tissue-resident innate lymphoid cells (ILCs) are innate effectors found in the skin. To investigate their temporal dynamics and specific functions throughout the development of cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC), we combined transcriptomic and immunophenotyping analyses in mouse and human cSCCs. We identified an infiltration of NK cells and ILC1s as well as the presence of a few ILC3s. Adoptive transfer of NK cells in NK cell- and ILC-deficient *Nfil3*^{-/-} mice revealed a role for NK cells in early control of cSCC. During tumor progression, we identified a population skewing with the infiltration of atypical ILC1 secreting inflammatory cytokines but reduced levels of IFN- γ at the papilloma stage. NK cells and ILC1s were functionally impaired, with reduced cytotoxicity and IFN- γ secretion associated with the downregulation of activating receptors. They also showed a high degree of heterogeneity in mouse and human cSCCs with the expression of several markers of exhaustion, including TIGIT on NK cells and PD-1 and TIM-3 on ILC1s. Our data show an enrichment in inflammatory ILC1 at the precancerous stage together with impaired antitumor functions in NK cells and ILC1 that could contribute to the development of cSCC and thus suggest that future immunotherapies should take both ILC populations into account.

Journal of Investigative Dermatology (2021) –, –e–; doi:10.1016/j.jid.2021.03.018

INTRODUCTION

Cutaneous squamous cell carcinomas (cSCCs) are the second most deadly skin cancer. They are treated by surgery but can reach a stage of advanced disease associated with rapid local relapse (Karia et al., 2013). Blockade of the PD-1–PD-L1 inhibitory axis has provided promising results in patients with cSCC (Migden et al., 2020), leading to the approval of

cemiplimab for the treatment of patients with locally advanced or metastatic cSCC. The complete response rate is only 10%, highlighting that further understanding of the immunosuppressive tumor microenvironment (TME) may help to better predict response and to propose novel immunotherapies.

In addition to CD8⁺ cytotoxic T effectors, the tumor infiltration by NK cells is associated with favorable outcomes in solid cancers (Gentles et al., 2015). Nevertheless, NK cells can display functional alterations as cancer progresses (Myers and Miller, 2021). Therapeutic approaches targeting NK cell inhibitory receptors and NK cell functions have shown promising results in hematopoietic and solid cancers (Devillier et al., 2020; Myers and Miller, 2021). Immunotherapeutic strategies targeting NK cell engagers such as NKG2A or immune checkpoint inhibitors, including PD-1, TIM-3, LAG-3, and TIGIT, are under clinical investigation.

NK cells belong to a large family of innate lymphoid cells (ILCs) contributing to immunity and tissue homeostasis (Meininger et al., 2020). On the basis of cell surface markers, transcription factor requirement, and cytokine secretion, ILCs have been classified into NK cells, ILC1, ILC2, ILC3, and lymphoid tissue-inducer cells (Vivier et al., 2018). Contrary to ILCs that are mostly localized in epithelial tissues, NK cells can be recruited from the circulation and harbor potent perforin- and granzyme-dependent cytotoxicity after recognition of various stress signals from pathogenic cells. Group 1

¹Molecular and Cellular Pharmacology Institute, CNRS UMR7275, Côte d'Azur University, Valbonne, France; ²C3M, INSERM U1065, Côte d'Azur University, Nice, France; ³Inflammation Biology and Cancer Immunology, Peter Gorer Department of Immunobiology, King's College London, London, United Kingdom; ⁴Department of Cell, Developmental and Cancer Biology, Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, USA; ⁵CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; ⁶Head and Neck University Institute, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France; ⁷Pathology laboratory and Human biobank, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France; and ⁸The Tisch Cancer Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA

⁹These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Fabienne Anjuère, Molecular and Cellular Pharmacology Institute, CNRS UMR7275, Côte d'Azur University, Valbonne, France. E-mail: anjuere@ipmc.cnrs.fr

Abbreviations: cSCC, cutaneous squamous cell carcinoma; DMBA, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene; ILC, innate lymphoid cell; MC, metacuster; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; TME, tumor microenvironment

Received 9 December 2020; revised 24 February 2021; accepted 7 March 2021; accepted manuscript published online XXX; corrected proof published online XXX

ILCs, which include NK cells and ILC1, share expression of the activating receptor NKp46 and secretion of IFN- γ , but they display phenotypic and functional heterogeneity (Riggan et al., 2019). Besides, NKp46 marker is used to define a subset of epithelial ILC3 (Luci et al., 2009; Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). This extended family of ILCs has brought questions about their contribution in shaping immune responses during pathological processes. The role of ILC subsets in cancer immune surveillance alongside NK cells still needs to be thoroughly evaluated (Chiossone et al., 2018).

In this context, we investigated the nature and role of NKp46⁺ cells in mouse and human cSCCs, taking advantage of two mouse models of skin carcinogenesis and human cSCC biopsies. Our data reveal distinct *in vivo* dynamics and immune dysfunctions for NK cells and ILC1 infiltrating cSCCs that can regulate tumor development.

RESULTS

Early control of cSCC by NK cells

To assess the contribution of NKp46⁺ cells to cSCC progression, we used the well-established mouse model of chemically induced cutaneous carcinogenesis (Abel et al., 2009; Owens et al., 1999) (Supplementary Figure S1a). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) treatment promotes papillomas, which can develop into invasive cSCC (Supplementary Figure S1b and c). We also grafted mice intradermally with the mSCC38 murine cell line (Gastaldi et al., 2014) and monitored tumor development (Supplementary Figure S1d) (Khou et al., 2020). In these two cSCC models, tumors are infiltrated with NKp46⁺ cells (Figure 1a and b). Reduced proportions and absolute numbers of NKp46⁺ cells were observed at the papilloma stage compared with those in the other conditions (Figure 1a and b).

To investigate their role, we monitored cSCC outgrowth in *Nfil3*^{-/-} mice. These mice display immune dysfunctions, including a lack of NK cells and other ILC subsets (Daussy et al., 2014; Geiger et al., 2014), although tissue-resident NK cells have been found in *Nfil3*^{-/-} C57BL/6 mice (Sojka et al., 2014). On FVB/N background, NKp46⁺ cells were found absent in the skin, papillomas, tumors, and lymph nodes of DMBA and PMA-treated *Nfil3*^{-/-} FVB/N mice (Supplementary Figure S1e). When compared with wild-type littermates, *Nfil3*^{-/-} mice developed significantly more papillomas (Figure 1c), indicating that the immune dysfunction of *Nfil3*^{-/-} mice increased their susceptibility to skin carcinogenesis. The growth of mSCC38 tumors was also increased in *Nfil3*^{-/-} mice compared with that in wild-type littermates (Figure 1d). Tumor growth was significantly increased at early time points in both models (Figure 1c and d, gray boxes). We then addressed the direct contribution of NK cells by transferring cell-sorted NK cells in mSCC38 tumor-bearing *Nfil3*^{-/-} mice (Supplementary Figure S1f), which reduced tumor burden to a level comparable with that in the wild-type littermates (Figure 1d). Thus, NKp46⁺ NK cells contribute to the early control of cSCC.

Distinct temporal infiltration of NK cells and ILC1 in cSCC To deeply characterize the nature of infiltrated NKp46⁺ cells over the course of cSCC progression, we performed a transcriptomic analysis of cell-sorted NKp46⁺ cells from papillomas, tumors, and perilesional skins of DMBA and PMA-treated mice and from the skin of control PMA-treated mice. Exploratory principal component analysis was generated on the 10% most variable probesets. Principal component 1 axis explaining the largest percentage of variability (65.4%) separated papillomas from skins and tumors. Principal component 2 axis (17.9%) highlighted the singularity of tumor-associated NKp46⁺ cells (Figure 2a). Hierarchical clustering underlined the unique gene expression profiles of papilloma and tumor samples (Figure 2b). The highest numbers of differentially expressed genes were found in the contrasts, including papilloma-associated NKp46⁺ cells, stressing that at this stage, the cells harbored the most divergent gene signature (Figure 2c).

Because NKp46 is expressed by NK cells, ILC1, and ILC3, we examined the heterogeneity of NKp46⁺ cells. Taking advantage of published gene signatures (Robinette et al., 2015), we selected two restricted cores of genes that were able to discriminate NK cells from other ILC (Figure 3a and Supplementary Table S1). The comparison of these gene signatures with our transcriptomic data showed that papilloma-associated NKp46⁺ cells were enriched in genes from the ILC core, such as *Il7r* or *Cxcr6*, and were poor in genes from the NK core, such as *Eomes*, *Zeb2*, or *Irf8*. We then used the Cell type Identification By Estimating relative Subsets Of known RNA Transcripts computational method (Newman et al., 2015) and an NK and ILC public dataset (Robinette et al., 2015) to build specific gene signatures that discriminate NK cells, ILC1, and ILC3 (Supplementary Table S2). We confronted these signatures with our dataset to quantify the proportion of each NKp46⁺ subset. This highlighted an enrichment in ILC1 within papilloma-associated NKp46⁺ cells compared with those in the other samples that were enriched in NK cells (Figure 3b). We also detected a small proportion of ILC3 (3.5% and 4.8% of the NKp46⁺ cells in papillomas and PMA-treated skin, respectively).

The transcription factor EOMES is critical for NK cell development, and the IL-7 receptor α chain (CD127) is mostly associated with ILC1 and ILC3 phenotypes (Daussy et al., 2014; Gordon et al., 2012; Robinette et al., 2015; Serafini et al., 2015). We confirmed by flow cytometry that the proportion of EOMES⁺NKp46⁺ cells in papillomas was lower than that in the tumors and skin samples (Figure 3c and d). Conversely, the fraction of CD127⁺NKp46⁺ cells was higher in papillomas than in other samples (Figure 3d).

These data highlight the heterogeneity of NKp46⁺ cells during skin carcinogenesis and show that papilloma-associated NKp46⁺ cells are enriched in ILC1, whereas NK cells are prominent in tumors and skin surrounding lesions.

Functional dysregulations of NK cells and ILC1 characterize papilloma and tumor stages

We next assessed the functional properties of papilloma and tumor-associated NKp46⁺ cells. We found that a lower proportion of NKp46⁺ cells expressed IFN- γ at papilloma and

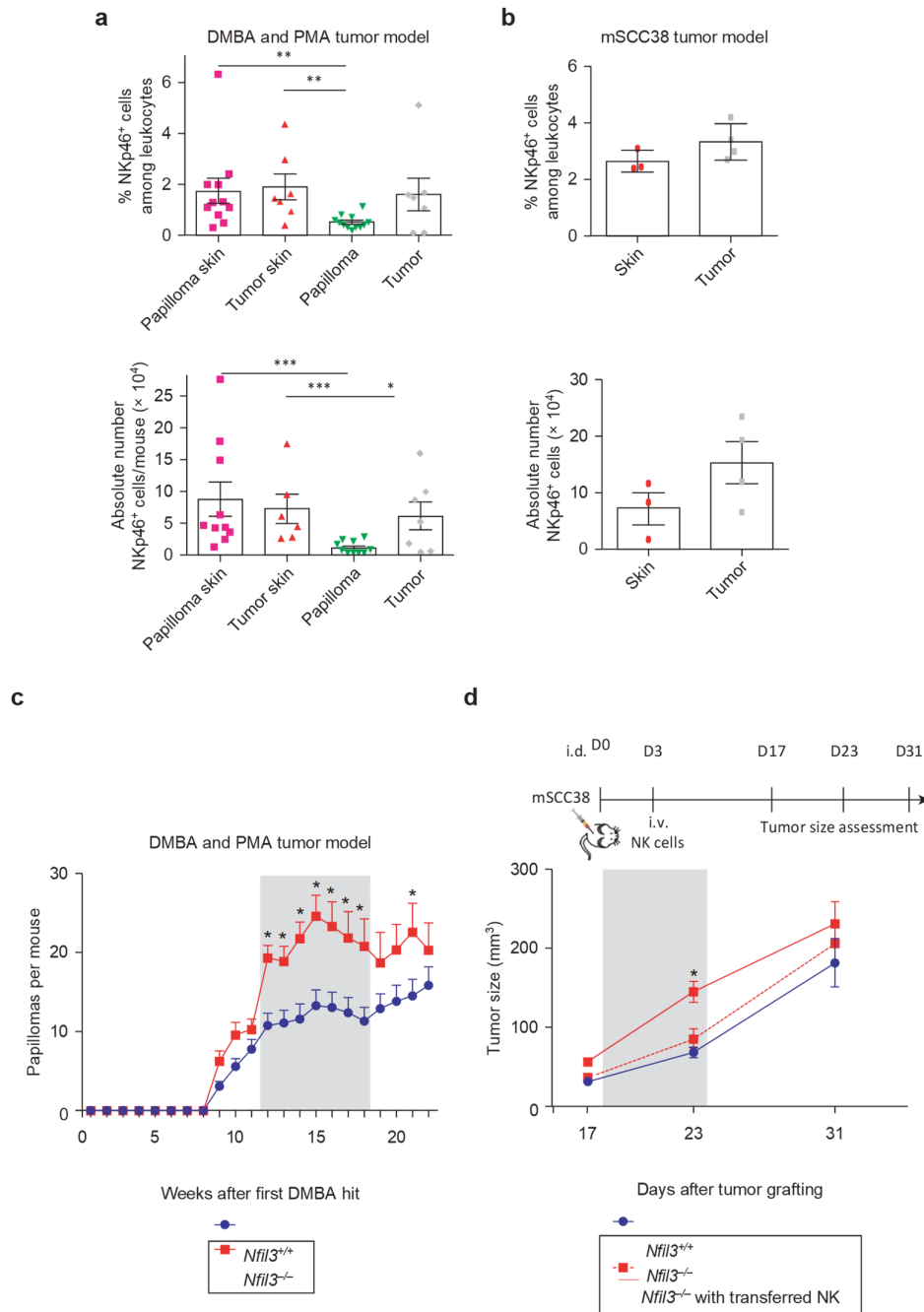


Figure 1. Reconstitution of *Nfil3*^{-/-} mice with NK cells restores cSCC immune surveillance. (a, b) Frequencies and absolute numbers of CD3⁻NKp46⁺ cells in (a) DMBA and PMA-treated mice (n = 7–11, mean values ± SEM from three independent experiments; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, Mann–Whitney U test) and (b) mSCC38-bearing mice, (n = 3–4 mice per group, mean values ± SD, no statistical difference). Skin surrounding papilloma indicates papilloma skin, skin surrounding tumor indicates tumor skin, papilloma indicates DMBA and PMA-induced precancerous lesions, and tumor indicates DMBA and PMA-induced carcinoma. (c) Kinetics of development of papillomas in *Nfil3*^{-/-} mice (n = 19) and *Nfil3*^{+/+} littermate controls (n = 16) (mean numbers of papillomas ± SEM of two independent experiments, **P* < 0.05, Holm–Sidak test). (d) Schematic representation of mSCC38 tumor model and mSCC-38 tumor growth in *Nfil3*^{+/+} littermates (n = 23) and in *Nfil3*^{-/-} mice transferred (n = 8) or

not transferred (n = 16) with cell-sorted spleen NK cells on day 3 after the mSCC38 intradermal grafting (mean ± SEM of three independent experiments; **P* < 0.05, Mann–Whitney U test). (c, d) Gray boxes show the time points with statistical differences. cSCC, cutaneous squamous cell carcinoma; D, day; DMBA, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene; i.d., intradermal; i.v., intravenous; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

tumor stages in response to in vitro stimulation with IL-12 and IL-18 cytokines (Figure 4a). The reduced expression of IFN- γ by NKp46⁺ cells was also detected on stimulation with PMA and ionomycin at the papilloma stage and was associated with a reduced degranulation (Figure 4b, left and right panels). Thus, NKp46⁺ cells are dysfunctional at papilloma and tumor stages compared with their skin counterparts.

To further understand the functional differences between papilloma- and tumor-associated NKp46⁺ cells, we analyzed the genes associated with cytotoxicity. The hierarchical clustering of these genes underlined the unique functional features of NKp46⁺ cells at papilloma and tumor stages (Figure 4c). *Tnfsf10* encoding TNF-related apoptosis-inducing ligand was significantly enriched at the papilloma stage contrary to

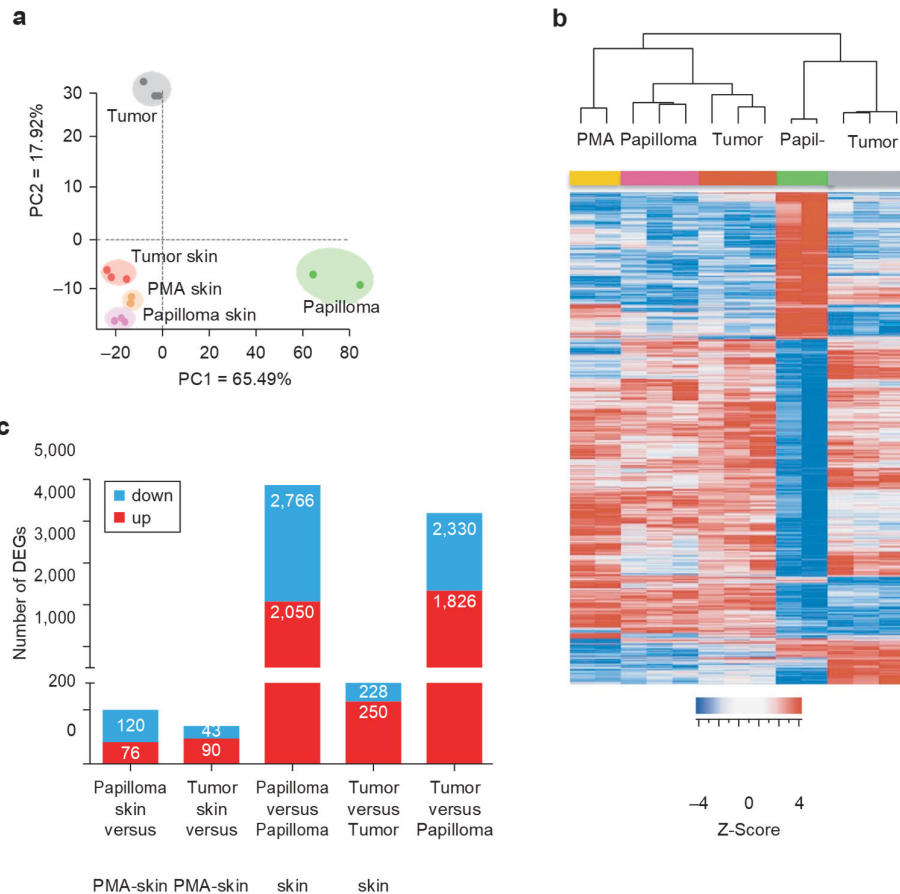
granzyme B gene *Gzmb* and perforin gene *Prf* (Figure 4c and Supplementary Figure 2a). In addition, several granzymes, including granzymes D, E, F, and G genes, that is, *Gzmd*, *Gzme*, *Gzmf*, and *Gzmg* genes, respectively, were only expressed at the tumor stage (Figure 4c and Supplementary Table S3). These results are consistent with the distinct temporal infiltration of NK cells and ILC1 seen in the Cell type Identification By Estimating relative Subsets Of known RNA Transcripts analysis. We confirmed this result at the protein level using flow cytometry by showing that TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing ILC1s were increased in papillomas, as described for tissue-resident ILC1 (Figure 4d) (Daussy et al. 2014; Luci et al., 2015). These ILC1s did not express much of granzymes A and B, whereas a majority of NK

Figure 2. Gene expression profiles of NKp46⁺ cells reveal stage-specific signatures. (a–c) Transcriptomic analyses were performed on cell-sorted CD3⁺NKp46⁺ cells purified from the pools of the skin of PMA-

treated mice (n = 19 mice, two experiments) and the pools of the skin surrounding papillomas (n = 15 mice, three experiments), the skin surrounding tumors (n = 17 mice, three experiments), papillomas (118 papillomas from n = 5 mice, two experiments), and tumors (23 tumors from n = 13 mice, three experiments) from DMBA and PMA-treated mice. (a) Two-dimensional PCA, (b) hierarchical clustering of the 10% most variable probesets with a minimum log₂ average expression of 6, and (c) DEGs in pairwise comparisons (minimum log₂ average expression of 6, an absolute logfold change of at least 1, and an adjusted P-value of P ≤ 0.05). Numbers of genes up and down are indicated. DEG, differentially expressed gene; DMBA, 7,12-dimethylbenz[a]

anthracene; PC, principal component; PCA, principal component analysis; PMA, phorbol 12-myristate 13-

acetate.



cells expressed granzyme B but displayed reduced levels of granzyme A (Figure 4d). Thus, the reduced cytotoxicity in NKp46⁺ cells at the papilloma stage is consistent with an increased proportion of poorly cytolytic ILC1.

We then analyzed the cytokines that exhibited detectable levels of transcripts at least in one tissue sample (Figure 4e and Supplementary Table S3). The hierarchical clustering revealed the cytokines mostly expressed at the papilloma stage, namely *Csf2* encoding GM-CSF and *Cxcl1* and *Cxcl2* encoding mouse homologs of IL-8, TNF, and several ILs (*Il1b*, *Il17a*, *Il17f*, *Il4*, *Il13*, *Il6*). At the tumor stage, *Il2* and *Ifng* genes were decreased compared with those in the other conditions. At the protein level, as detected by flow cytometry, NK cells and ILC1 secreted IFN- γ on PMA and ionomycin stimulation, but a lower proportion of ILC1 secreted IFN-g at the papilloma stage (Figure 4f). TNF- α was produced predominantly by ILC1 in all the samples (Figure 4f). Interestingly, we detected a significantly increased expression of IL-6 by ILC1 at the papilloma stage, indicating that they display an inflammatory phenotype.

These data show that ILC1s are enriched at the papilloma stage, are poorly cytolytic, and switch from an IFN-g to an IL-6 inflammatory profile. Tumor-associated NK cells have impaired cytolytic function and IFN-g production that can be partially restored on in vitro stimulation.

NK cells and ILC1 infiltrating mouse cSCC display markers of exhaustion

To investigate the mechanisms associated with impaired

functions of NK cells and ILC1, we analyzed the genes associated with NK cell and/or ILC1 activation. Consistent with impaired functions, we detected that several genes encoding activating receptors were downregulated in NKp46⁺ cells from papillomas and/or tumors, including *Klrc2* (NKG2C), *Cd226* (DNAM-1), *CD28*, *Klrb1c* (NKR-P1C), and *Klrk1* (NKG2D), whereas the coinhibitory receptors associated with exhaustion, such as *Cd96*, *Pdcd1* (PD-1), *Havcr2* (TIM-3), *Ctla4*, *Tigit*, and *Lag3*, were upregulated at the tumor stage (Figure 5a, Supplementary Figure 2c and b, and Supplementary Table S3).

To identify a potential heterogeneity at the protein level, we first evaluated the differential expression of CD49b, CD49a, PD-1, TIM-3, LAG-3, and CTLA-4 markers in live CD3⁺NKp46⁺ cells from mSCC38 tumors by flow cytometry using t-distributed stochastic neighbor embedding analysis (Figure 5b). NK cells and ILC1 were discriminated by the expression of CD49b and CD49a, respectively, and the expression of either one or two exhaustion markers pinpointed their heterogeneity (Figure 5b). In addition, two additional flow cytometry stainings showed that most exhaustion markers (CD96, PD-1, TIM-3, and LAG-3) and activating receptors (NKG2D and DNAM-1) were expressed by a significantly higher proportion of ILC1 than NK cells (Figure 5c and d). The combination of markers also identified TIM-3⁺PD-1⁺ ILC1 and CD96⁺CD28⁺ ILC1 (Figure 5b and c). Conversely, 50% of NK cells expressed NKG2D, but they did not express DNAM-1 known to promote the killing of cells expressing the CD112 and CD155 ligands (Stanietsky et al., 2009), consistent with their TGF β imprinting (Cortez

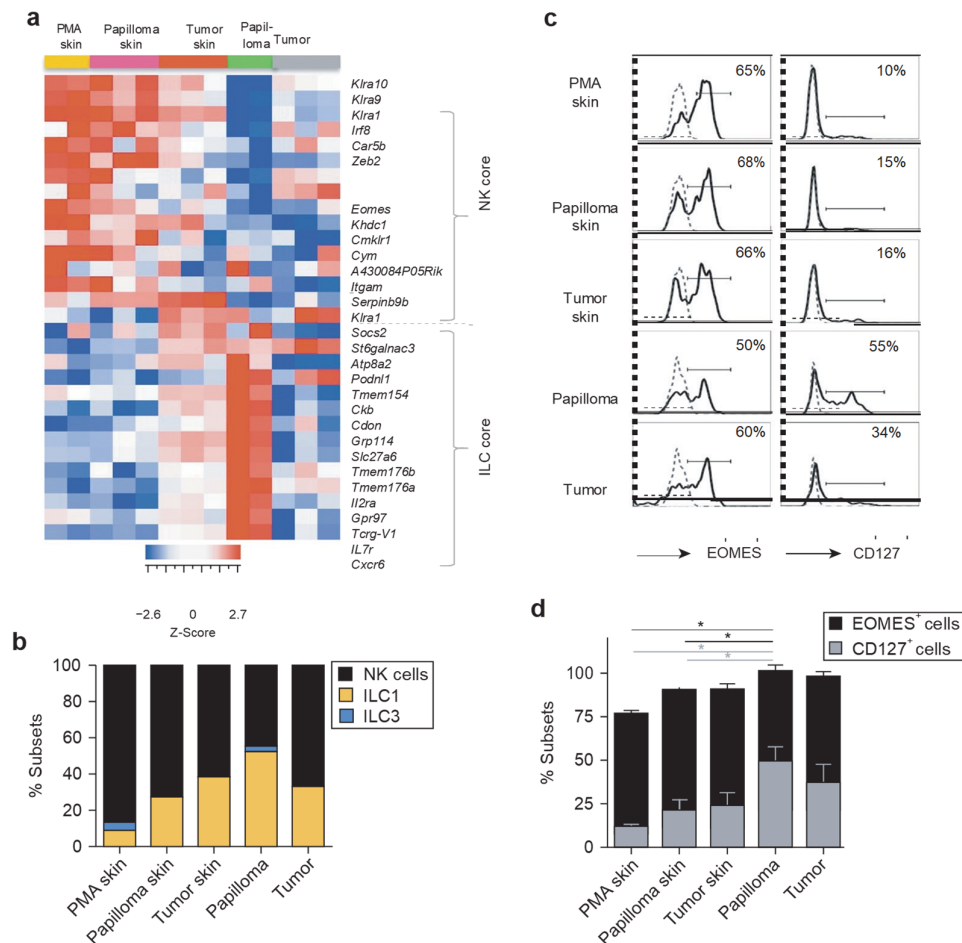


Figure 3. The enriched proportion of ILC1 within papilloma-associated NKp46⁺ cells. (a) Heatmap representation showing the median-centered expression values of selected NK cell and ILC core genes (Robinette et al., 2015) in NKp46⁺ cells purified

from papillomas, tumors, and control skin. (b) Relative proportions of NK cells, ILC1, and ILC3 determined by CIBERSORT analysis. (c, d) Proportions of EOMES⁺ cells and CD127⁺ cells among CD3⁻ NKp46⁺ cells. Histogram bars represent the results from three independent experiments, expressed as mean values ± SEM, n = 20 mice per group. *P < 0.05, Mann-Whitney U test. CIBERSORT, Cell type Identification By Estimating Relative Subsets of known RNA Transcripts; ILC, innate lymphoid cell; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

et al., 2017). Tumor-associated NK cells expressed the highest proportion of the coinhibitory molecule TIGIT as well as the coinhibitory receptor CD96 also interacting with CD112 and/or CD155 (Figure 5d).

Our data identified heterogeneous subsets of mouse NK cells and ILC1 displaying different combinations of exhaustion markers and NK cells exhibiting an unbalanced expression of DNAM-1, TIGIT, and CD96 receptors that may explain their dysfunctions in the TME.

Human cSCCs are infiltrated with heterogeneous subsets of NK cells and NKp46⁺ ILC

To extend our findings to human cSCCs, we assessed the proportions of NK cells and ILC subsets in fresh biopsies by flow cytometry (Supplementary Table S4). Using CD56, CD127, CD117, and CD294 markers to differentiate between NK cells, ILC1, ILC2, and ILC3 (Vély et al., 2016), we found that human cSCCs were mainly infiltrated with NK cells, ILC1, and a small subset of ILC3 but not with ILC2 (Figure 6a and Supplementary Figure S3a). Using an antibody panel targeting NKp46, CD56, and CD127 markers together with the lineage markers CD3, CD14, CD15, and CD19, we identified NKp46⁺ NK cells expressing variable levels of CD56 as the most prominent cell population and subsets of NKp46⁺CD127⁺ ILC consistent with ILC1 and ILC3

phenotypes (Figure 6b and Supplementary Figure S3b). These results are in agreement with the NKp46⁺ subsets identified in mouse cSCCs (Figure 3b, c, and d).

We next evaluated the coexpression of a selected set of NK cell and/or ILC surface receptors (CD56, NKp46, CD127) with coinhibitory receptors (CD161, TIGIT, TIM-3, PD-1) on live CD3⁻CD19⁻CD15⁻CD14⁻ cells from healthy distant skin, perilesional skin, and cSCC biopsies by flow cytometry and computational analysis (Figure 6c). The t-distributed stochastic neighbor embedding analysis revealed that the NKp46⁺ and CD56⁺ NK cell populations were the most abundant in the tumors, whereas CD127⁺ ILCs were the most prominent in the distant and perilesional skins, consistent with their tissue residency (Figure 6c and d).

To identify the specific phenotypes of NK cells and ILCs infiltrating the tumors, we separated NK cells and ILC subsets into 40 metaclusters (MCs) using the FlowSOM clustering tool. The complete linkage hierarchical clustering of samples and mean-centered MC cell proportions revealed four MC groups significantly enriched in tumor samples and corresponding to NK cell subsets (Figure 6e; red, purple, blue, and green arrows). The first MC group identified CD56⁺NKp46⁺ cells as the most enriched subset in tumor samples (Figure 6f; red cells from MC8, MC9, and MC17). These cells did not express CD127 (Figure 6c). The second MC group gathered

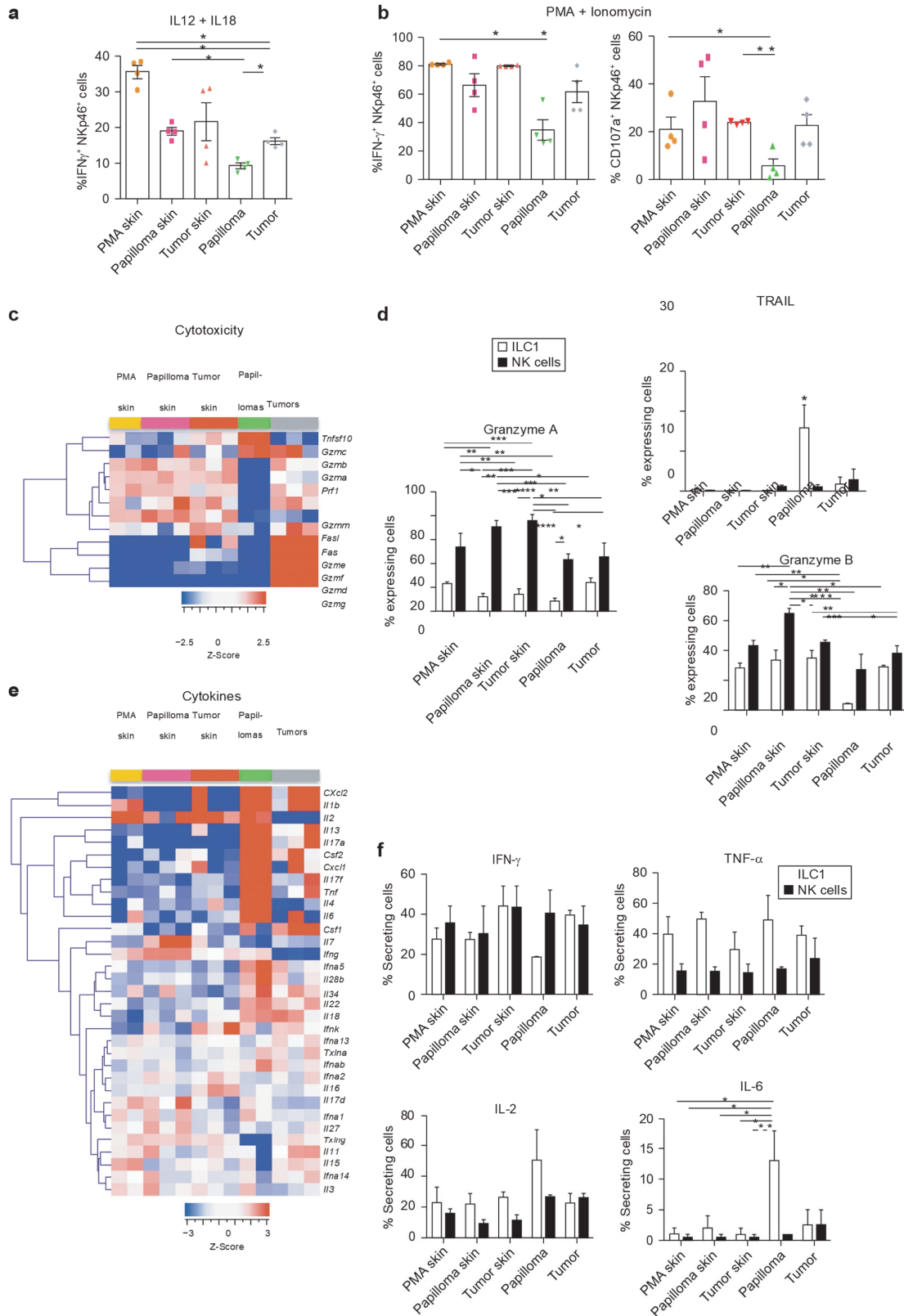


Figure 4. NKp46⁺ cells display decreased cytotoxicity and IFN- γ production together with the increased secretion of inflammatory cytokines by ILC1 at the papilloma stage. (a, b) Frequencies of NKp46⁺ cells secreting IFN- γ on in vitro stimulation with (a) IL-12 and IL-18 cytokines and (b) PMA and ionomycin (left panel). (b) Frequencies of NKp46⁺ cells degranulating on PMA and ionomycin stimulation (right panel). (a, b) Mean values \pm SEM of four independent experiments (each individual value = pool of five mice, n = 20 per group), * P < 0.05, Mann-Whitney U test. (c) Hierarchical clustering of the genes associated with cytotoxicity. (d) Frequencies of TRAIL and granzymes A and B expressing cells in EOMES⁺NKp46⁺ cells (NK cells) and EOMES⁻NKp46⁺ cells (ILC1s). Mean values \pm SEM, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001; two-way ANOVA with Tukey posthoc test. (e) Hierarchical clustering of cytokine genes. (f) Frequencies of cytokine-secreting NK cells and ILC1 on PMA and ionomycin stimulation. Mean values \pm SEM, * P < 0.05; two-way ANOVA with Tukey posthoc test. ILC, innate lymphoid cell; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

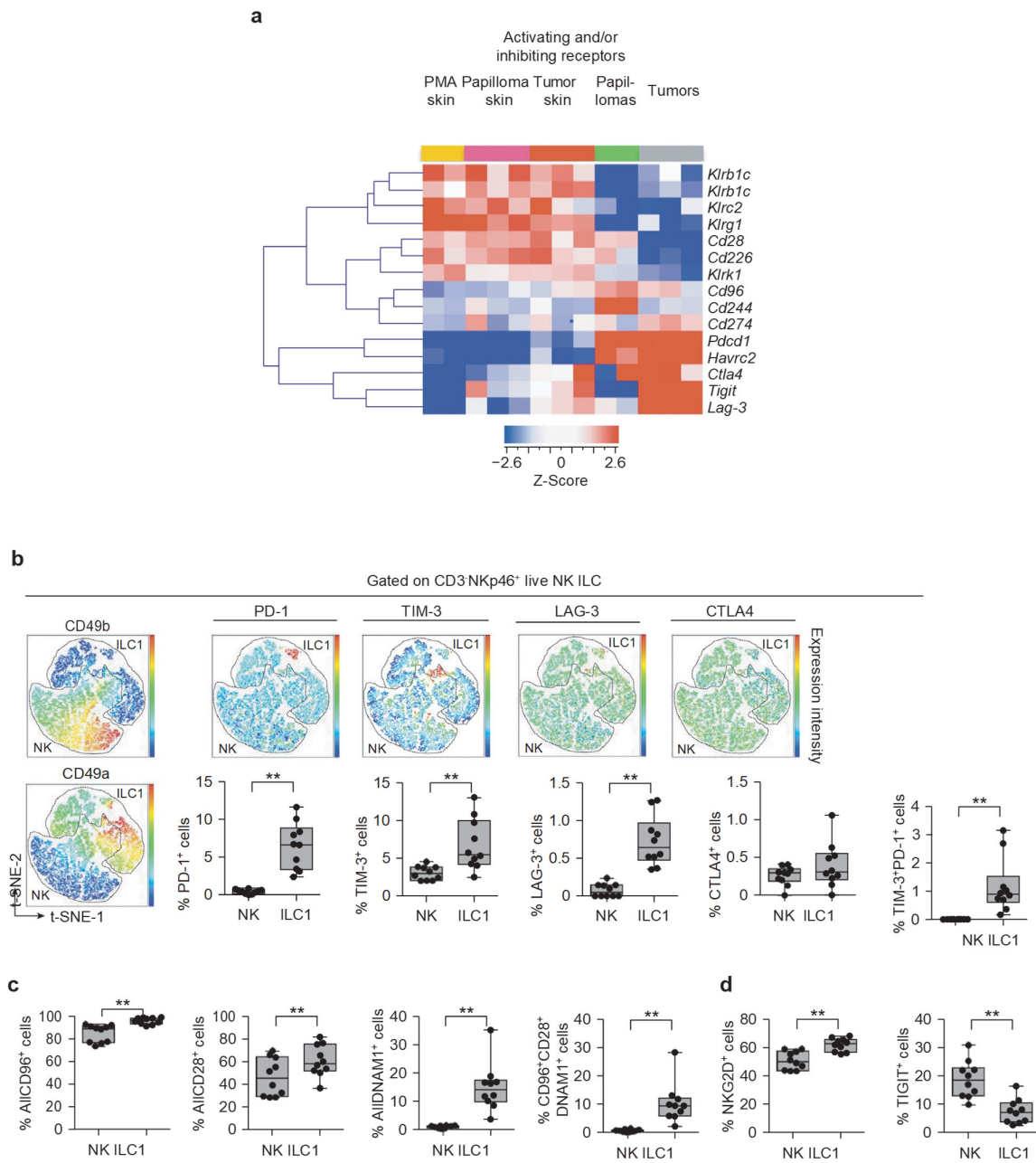


Figure 5. Differential expression of activating and inhibitory receptors expressed by NK cells and ILC1 infiltrating mouse cSCC. (a) Hierarchical clustering of activating and inhibitory receptor genes with a minimum \log_2 average expression of 6. (b) Heterogeneity of CD3⁺NKp46⁺ cells in mSCC38 carcinoma assessed by t-SNE dimensional reduction using CD49b, CD49a, PD-1, TIM-3, LAG-3, and CTLA-4 markers and the proportions of manually gated NK cells and ILC1 populations. (c, d) Proportions of gated NK cells and ILC1 expressing (c) CD28, CD96, and/or DNAM-1 or (d) NKG2D or TIGIT in mSCC38 carcinoma, $**P < 0.01$; one-way ANOVA and Kruskal–Wallis test. cSCC, cutaneous squamous cell carcinoma; ILC, innate lymphoid cell; t-SNE, t-distributed stochastic neighbor embedding.

CD56⁺NKp46^{low/-} cells that may correspond to NK cells that have downregulated the NKp46 activating receptor (Figure 6f; purple cells from MC5, MC10, and MC11). Some of these cells expressed low levels of TIGIT, TIM-3, or PD-1 markers. The third MC group identified CD56^{low}NKp46⁺TIGIT⁺ cells significantly enriched in tumors compared with those in distant skin (Figure 6f; blue cells from MC14, MC15, MC20, and MC21), consistent

with the functionally compromised NK cells identified in mouse cSCCs (Figure 5). The fourth MC group corresponding to CD56⁺NKp46⁺TIGIT⁺PD-1⁺TIM-3⁺ cells was restricted to tumor samples and accounted for around 3% of total NK cells and/or ILCs (Figure 6f; green cells from MC25).

Thus, human cSCCs are infiltrated with NK cells, ILC1, and a few ILC3. NK cells are the most abundant ILCs of human

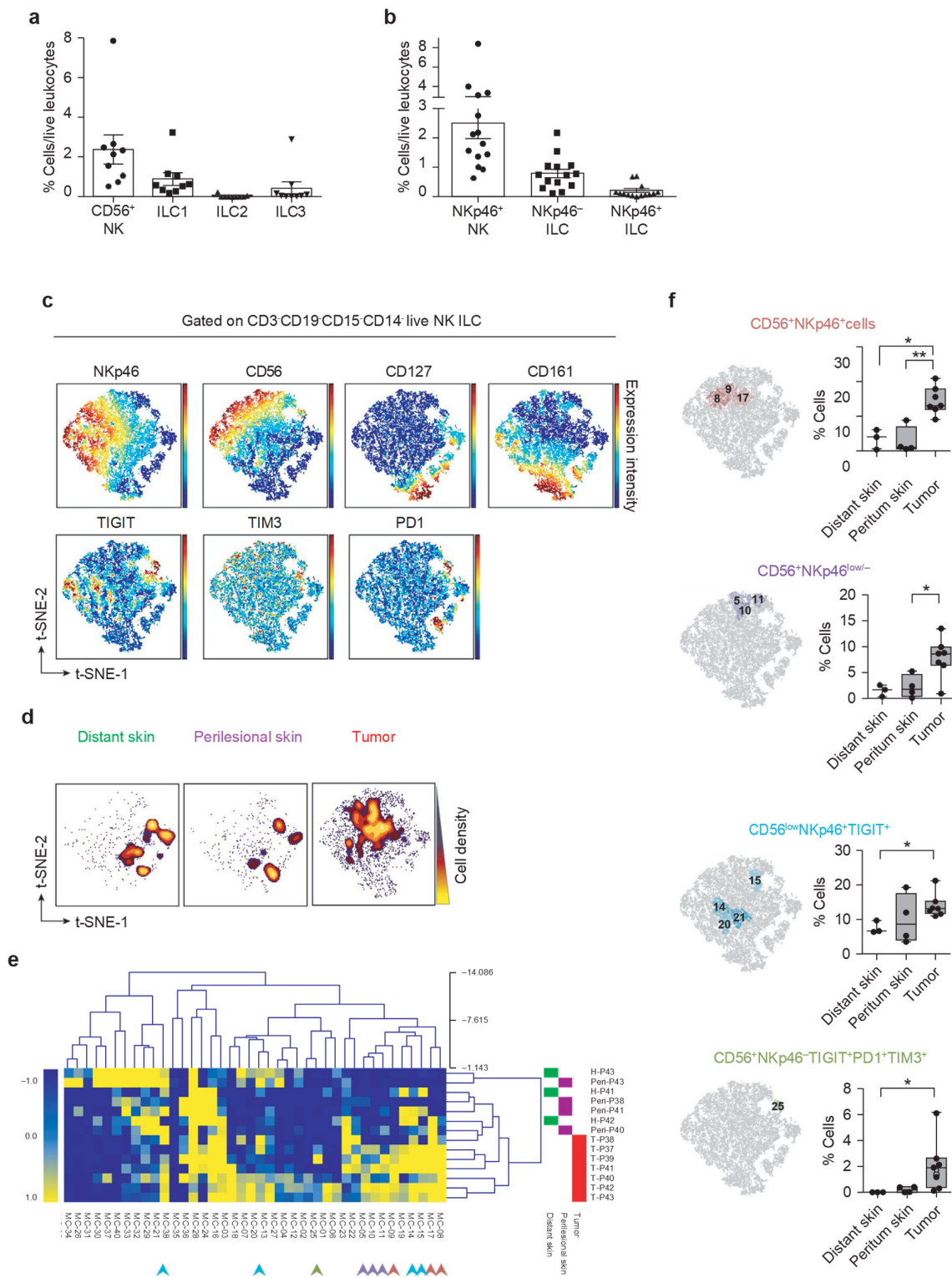


Figure 6. Infiltration of human cSCCs with heterogeneous subsets of NK cells and ILCs. (a, b) The frequencies of indicated NK cells and ILC populations in human cSCC biopsies; mean values \pm SEM, (a) $n = 9$, (b) $n = 14$. (c) NK cell and ILC heterogeneity assessed by t-SNE dimensional reduction using CD56, NKp46, CD127, CD161, TIGIT, TIM-3, and PD-1 markers ($n = 7$). (d) Cell density for the merged file of healthy distant skin (green), perilesional skin (purple), and tumor (red) samples shown on a black to yellow heat scale. (e) Hierarchical clustering of NK cell and ILC FlowSOM MCs depicted in a heatmap of MC cell proportions. (f) Tumor-specific MC groups (red, purple, blue, and green arrows) shown in e and corresponding groups back viewed on t-SNE-1 and/or t-SNE-2 map in f with their frequencies for each sample, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, one-way ANOVA and Kruskal–Wallis test. cSCC, cutaneous squamous cell carcinoma; ILC, innate lymphoid cell; MC, metacluster; t-SNE, t-distributed stochastic neighbor embedding.

cSCCs and express several specific exhaustion markers, particularly TIGIT, suggesting a TIGIT-induced inhibitory axis.

DISCUSSION

NK cells and skin-resident ILC subsets are innate effectors found in the skin. In this study, we analyze the composition of NKp46⁺ type-I ILC infiltrating mouse and human cSCCs, which reveals heterogeneous subsets of NK cells, ILC1s, and very few ILC3s over the course of cSCC. ILC1s are prominent at the papilloma stage and harbor an atypical cytokine secretion pattern with reduced IFN- γ production and secretion of IL-2, IL-6 and TNF- α . NK cells and ILC1s from lesions are dysfunctional with reduced cytotoxicity and IFN- γ secretion, associated with the downregulation of activating receptors and the expression of coinhibitory molecules. Thus, our study shows that the enrichment of inflammatory ILC1 at the precancerous stage together with impaired antitumor functions of NK cells and ILC1 could contribute to cSCC development.

NK cells are innate effectors eliminating cancer cells, and their infiltration in solid tumors has been associated with favorable clinical outcomes (Gentles et al., 2015). They act as the first line of defense and can enhance adaptive immune responses (Bihl et al., 2010; Smyth et al., 2001). In two mouse models of cSCCs, the antitumor activity observed at early time points was attributed to NK cells. The detection of significant proportions of ILC1 and a few ILC3 raise the question about their role in cancer. Indeed, they share with NK cells phenotypes and functions that vary across tissues and states of activation, making them difficult to differentiate (Riggin et al., 2019). Our study reveals distinct *in vivo* dynamics for NK cells and ILC1 throughout cSCC development. We postulate that the enrichment of ILC1 at the papilloma stage, which participates in the impaired cytotoxicity and IFN- γ secretion of NKp46⁺ cells, is one mechanism that favors the conversion of papillomas into tumors. This may be linked with differential recruitment of NK cells and ILC1 or local redistribution of tissue-resident ILC1s. Recent studies showed that on TGF- β exposure, NK cells convert into ILC1-like cells (Cortez et al., 2017; Cuff et al., 2019). In cSCC, TGF- β was identified as a main upstream regulator using Ingenuity Pathway Analysis of the NKp46⁺ transcriptomic dataset (not shown). The enrichment in ILC1 over NK cells at the papilloma stage may therefore be explained by the local repression of EOMES by TGF- β .

Specialized functional features characterize NK cells and ILC1s. ILC1s express TNF-related apoptosis-inducing ligand and are poorly cytotoxic at the papilloma stage, consistent with the properties of tissue-resident ILC1 (Serafini et al., 2015) and thus differ from cytotoxic type-I-like ILCs recently reported in a breast cancer model (Dadi et al., 2016). Papilloma-associated ILC1s also have an atypical proinflammatory cytokine phenotype with the secretion of IL-2, IL-6, IL-17, and TNF- α , cytokines previously reported as protumor factors of the TME. IL-6 signaling decreases major histocompatibility complex II expression and IL-12 production by dendritic cells, thus reducing IFN- γ production by CD4⁺ T cells (Narita et al., 2013; Ohno et al., 2016). IL-17 was shown to induce signal transducer and activator of transcription 3 activation and neutrophil infiltration,

associated with a bad prognosis in DMBA and PMA skin carcinogenesis (Khou et al., 2020). IL-17-secreting cells resemble ILC3 previously shown to promote inflammation at mucosal surfaces (Chan et al., 2014; Kirchberger et al., 2013). TNF- α has known angiogenic and protumor properties (Balkwill, 2009). Papilloma-associated ILC1s have the highest ratio of TNF- α ⁺ to IFN- γ ⁺ cells, suggesting that these ILC1s contribute to tumor progression, similarly to ILC1s reported in a chemo-induced fibrosarcoma model (Gao et al., 2017). NK cells also show impaired functions at the tumor stage, but *in vitro* stimulation with PMA and ionomycin restores IFN- γ production and significant cytotoxicity in NK cells, whereas IL-12- and IL-18-driven production of IFN- γ remains altered. This can be explained by a defect in the IL-18 receptor pathway in NK cells in the TME, as previously described in the hypoxic TME of mouse lymphoma model (Ni et al., 2020). This indicates that the TME acts on different receptors to promote NK cell and ILC1 immune dysfunctions.

Such role of the TME can be exemplified by the downregulation of activating receptors and the expression of coinhibitory receptors in mouse and human cSCCs. Markers of exhaustion have been reported on NK cells and ILC subsets, and immunotherapy has therefore enhanced antitumor activity of NK cells and/or ILCs (Crinier et al., 2019; Devillier et al., 2020; Myers and Miller, 2021; Sivori et al., 2019). Exhaustion markers include PD-1, TIM-3, LAG-3, and TIGIT (Cortez et al., 2017; Gao et al., 2017). More specifically, PD-1/PD-L1 and TIGIT blockade led to sustained tumor-specific T-cell immunity in an NK cell-dependent manner (Hsu et al., 2018; Zhang et al., 2018). TIGIT is a dominant marker of tumor-associated NK cells in mouse and human cSCCs, suggesting that it plays a role in NK cell dysfunction. Besides, the consequences of the expression of immune checkpoint markers, mainly PD-1 and TIM-3 on NK cells and ILC1, remain to be clarified. Further works based on *in situ* integrative analyses, including multiplexed imaging and spatial transcriptomics of human squamous cell carcinoma in line with recent data (Ji et al., 2020) and including markers to discriminate subsets of NK cells and other ILCs, will be therefore important to unravel the specific contribution of ILC1s and NK cells subsets within the cSCC TME. Altogether, our results show functional alterations combined with phenotypic modulations leading to the infiltration of cSCCs by heterogeneous subsets of ILC1 and NK cells in a temporal manner, which might participate in cSCC progression. This study is valuable for future immunotherapies targeting cSCCs and particularly for patients at high risk of relapse.

MATERIALS AND METHODS

Mice and mouse tumor models

The DMBA and PMA model of chemically induced cutaneous carcinogenesis and the mSCC38 tumor model, described in the [Supplementary Material and Methods](#), were developed in FVB/N mice (Charles River Laboratories, Saint-Germain-Nuelles, France), Nfil3^{-/-} mice, and littermate control mice on FVB/N background. All the experiments have been approved by the regional committee for animal experimentation (NCE/2013-86 and MESR 2018081018546379, CIEPAL, Nice, France).

Patient biopsies

cSCC biopsies and control skins were obtained from patients who underwent surgical excision at the Centre Antoine Lacassagne (Nice, France) and who signed an informed consent according to the Declaration of Helsinki under Centre Antoine Lacassagne institutional review board approval.

Cell preparations

Cell suspensions from mouse skins, mouse papilloma, and tumor tissues and human samples were prepared enzymatically as described in the [Supplementary Materials and Methods](#).

Flow cytometry and computational analysis

Flow cytometry stainings were performed with the antibodies listed in [Supplementary Tables S5](#) and [S6](#) on mouse and human cells, respectively. NK cells and ILCs were analyzed using computational tools as described in the [Supplementary Materials and Methods](#).

Functional assays

Cytokine production and degranulation were measured after in vitro stimulation on mouse cell suspensions as described in the [Supplementary Materials and Methods](#).

RNA extraction and microarrays

RNA was extracted from sorted NKp46⁺ cells, and cRNAs were hybridized to SurePrint G3 Mouse GE 8x60K microarrays (Agilent Technologies, Massy, France). The microarray data were normalized, and differential analysis was performed as provided in the [Supplementary Materials and Methods](#).

Transcriptomic data analysis

The transcriptomes were compared using principal component analysis and exploratory hierarchical clustering tools. The cell populations in NKp46⁺ samples were quantified using the Cell type Identification By Estimating relative Subsets Of known RNA Transcripts method (Newman et al., 2015) and the specific signatures for ILC1, ILC3, and NK cells (Robinette et al., 2015) as described in the [Supplementary Materials and Methods](#).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with Prism software, version 6.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA).

Data availability statement

The data have been deposited in the Gene Expression Omnibus database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) [accession number GSE84027].

ORCIDi

Carmelo Luci: <http://orcid.org/0000-0001-9687-4164>
 Franck Bihl: <https://orcid.org/0000-0002-8808-8152>
 Pierre Bourdely: <https://orcid.org/0000-0002-4162-1490>
 Sokchea Khour: <https://orcid.org/0000-0002-5386-9856>
 Alexandra Popa: <https://orcid.org/0000-0001-7156-272X>
 Aida Meghraoui-Kheddar: <https://orcid.org/0000-0002-7440-5495>
 Ophelie Vermeulen: <https://orcid.org/0000-0003-4611-2916>
 Roxane Elaldi: <https://orcid.org/0000-0002-0381-6481>
 Gilles Poissonnet: <https://orcid.org/0000-0002-9022-4352>
 Anne Sudaka: <https://orcid.org/0000-0001-5729-0465>
 Alexandre Bozec: <https://orcid.org/0000-0002-8576-3052>
 Selma Bekri: <https://orcid.org/0000-0003-2045-386X>
 Julie Cazareth: <https://orcid.org/0000-0002-8482-209X>
 Giles Ponzio: <https://orcid.org/0000-0003-2741-0248>
 Pascal Barbry: <https://orcid.org/0000-0001-9632-6483>
 Roger Rezzonico: <https://orcid.org/0000-0002-8460-1641>
 Bernard Mari: <https://orcid.org/0000-0002-0422-9182>
 Veronique M. Braud: <https://orcid.org/0000-0001-8213-3947>
 Fabienne Anjuère: <https://orcid.org/0000-0003-3144-8652>

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the following funding agencies: French Government (National Research Agency) through the Investments for the Future programs LABEX SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028 and IDEX UCAJedi ANR-15-IDEX-01, Cancéropole PACA, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut national de la santé et de la recherche médicale, Université Côte d'Azur, Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, Fondation ARC pour la recherche sur le Cancer, Fondation de l'Avenir, Ligue Nationale contre le Cancer, and Fondation d'entreprise SILAB Jean PAUFIQUE. We would like to thank Vanina Simon, Kelly Nouhen, Hadi Zarif, Sébastien Grosso, Alain Rubod, Morgane Roulot, and Belinda Desrues for helpful technical assistance. We thank Isabelle Peyrottes, Juliette Haudebourg, and Julien Boyer as well as all the technical staff of the pathology laboratory of the Centre Antoine Lacassagne (Nice, France) for the extemporaneous preparation of human biopsies and histological analyses. We thank the Institute of Molecular and Cellular Pharmacology's UCAGenomiX, Imaging/Flow cytometry, and animal house core facilities for providing assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: CL, FB, VMB, FA; Formal Analysis: CL, FB, PBo, SK, AP, AMK, OV, SB, FA; Funding Acquisition: CL, VMB, FA; Project Administration: VMB, FA; Resources: RE, GPoi, AS, AB, JC, GPon, PBa, RR, BM; Supervision: FA; Writing - Original Draft Preparation: CL, VMB, FA

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.03.018>.

REFERENCES

- Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 2009;4:1350-62.
- Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:361-71.
- Bihl F, Pecheur J, Bréart B, Poupon G, Cazareth J, Julia V, et al. Primed antigen-specific CD4⁺T cells are required for NK cell activation in vivo upon Leishmania major infection. *J Immunol* 2010;185:2174-81.
- Chan IH, Jain R, Tessmer MS, Gorman D, Mangadu R, Sathe M, et al. Interleukin-23 is sufficient to induce rapid de novo gut tumorigenesis, independent of carcinogens, through activation of innate lymphoid cells. *Mucosal Immunol* 2014;7:842-56.
- Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer [published correction appears in *Nat Rev Immunol* 2018;18:726]. *Nat Rev Immunol* 2018;18:671-88.
- Cortez VS, Ulland TK, Cervantes-Barragan L, Bando JK, Robinette ML, Wang Q, et al. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF- β signaling. *Nat Immunol* 2017;18:995-1003.
- Crinier A, Vivier E, Bléry M. Helper-like innate lymphoid cells and cancer immunotherapy. *Semin Immunol* 2019;41:101274.
- Cuff AO, Sillito F, Dertschnig S, Hall A, Luong TV, Chakraverty R, et al. The obese liver environment mediates conversion of NK cells to a less cytotoxic ILC1-like phenotype. *Front Immunol* 2019;10:2180.
- Dadi S, Chhangawala S, Whitlock BM, Franklin RA, Luo CT, Oh SA, et al. Cancer immunosurveillance by tissue-resident innate lymphoid cells and innate-like T cells. *Cell* 2016;164:365-77.
- Daussy C, Faure F, Mayol K, Viel S, Gasteiger G, Charrier E, et al. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med* 2014;211:563-77.
- Devillier R, Chrétien AS, Pagliardini T, Salem N, Blaise D, Olive D. Mechanisms of NK cell dysfunction in the tumor microenvironment and current clinical approaches to harness NK cell potential for immunotherapy [e-pub ahead of print]. *J Leukoc Biol* 2020. <https://doi.org/10.1002/JLB.SMR0920-198RR> (accessed 1 December 2020).
- Gao Y, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Bald T, Ng SS, Young A, Ngiw SF, et al. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2017;18:1004-15.

- Gastaldi C, Bertero T, Xu N, Bourget-Ponzio I, Lebrigand K, Fourre S, et al. miR-193b/365a cluster controls progression of epidermal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2014;35:1110-20.
- Geiger TL, Abt MC, Gasteiger G, Firth MA, O'Connor MH, Geary CD, et al. Nfil3 is crucial for development of innate lymphoid cells and host protection against intestinal pathogens. *J Exp Med* 2014;211:1723-31.
- Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 2015;21:938-45.
- Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC, et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 2012;36:55-67.
- Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, Nicolai CJ, Bourgeois-Daigneault MC, Trevino TN, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J Clin Invest* 2018;128:4654-68.
- Ji AL, Rubin AJ, Thrane K, Jiang S, Reynolds DL, Meyers RM, et al. Multimodal analysis of composition and spatial architecture in human squamous cell carcinoma. *Cell* 2020;182:1661-2.
- Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol* 2013;68:957-66.
- Khou S, Popa A, Luci C, Bihl F, Meghraoui-Kheddar A, Bourdely P, et al. Tumor-associated neutrophils dampen adaptive immunity and promote cutaneous squamous cell carcinoma development. *Cancers (Basel)* 2020;12:1860.
- Kirchberger S, Royston DJ, Boulard O, Thornton E, Franchini F, Szabady RL, et al. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J Exp Med* 2013;210:917-31.
- Luci C, Bekri S, Bihl F, Pini J, Bourdely P, Nouhen K, et al. NKp46+ innate lymphoid cells dampen vaginal CD8 T cell responses following local immunization with a cholera toxin-based vaccine. *PLoS One* 2015;10:e0143224.
- Luci C, Reynders A, Ivanov II, Cognet C, Chiche L, Chasson L, et al. Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ populations in gut and skin. *Nat Immunol* 2009;10:75-82.
- Meininger I, Carrasco A, Rao A, Soini T, Kokkinou E, Mjösberg J. Tissue-specific features of innate lymphoid cells. *Trends Immunol* 2020;41: 902-17.
- Migden MR, Khushalani NI, Chang ALS, Lewis KD, Schmults CD, Hernandez-Aya L, et al. Cemiplimab in locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma: results from an open-label, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2020;21:294-305.
- Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18:85-100.
- Narita Y, Kitamura H, Wakita D, Sumida K, Masuko K, Terada S, et al. The key role of IL-6-arginase cascade for inducing dendritic cell-dependent CD4(0) T cell dysfunction in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2013;190: 812-20.
- Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 2015;12:453-7.
- Ni J, Wang X, Stojanovic A, Zhang Q, Wincher M, Bühler L, et al. Single-cell RNA sequencing of tumor-infiltrating NK cells reveals that inhibition of transcription factor HIF-1alpha unleashes NK cell activity. *Immunity* 2020;52:1075-87.e8.
- Ohno Y, Kitamura H, Takahashi N, Ohtake J, Kaneumi S, Sumida K, et al. IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2016;65:193-204.
- Owens DM, Wei S, Smart RC. A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1999;20:1837-44.
- Riggan L, Freud AG, O'Sullivan TE. True detective: unraveling group 1 innate lymphocyte heterogeneity. *Trends Immunol* 2019;40:909-21.
- Robinette ML, Fuchs A, Cortez VS, Lee JS, Wang Y, Durum SK, et al. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol* 2015;16:306-17.
- Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, et al. RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009;10:83-91.
- Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, et al. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008;29:958-70.
- Serafini N, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol* 2015;15:415-28.
- Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol* 2019;16:430-41.
- Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 2001;13:459-63.
- Sojka DK, Plougastel-Douglas B, Yang L, Pak-Wittel MA, Artyomov MN, Ivanova Y, et al. Tissue-resident natural killer (NK) cells are cell lineages distinct from thymic and conventional splenic NK cells. *Elife* 2014;3:e01659.
- Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:17858-63.
- Vély F, Barlogis V, Vallentin B, Neven B, Piperoglou C, Ebbo M, et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans [published correction appears in *Nat Immunol* 2016;17:1479]. *Nat Immunol* 2016;17: 1291-9.
- Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell* 2018;174:1054-66.
- Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol* 2018;19:723-32.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nature Protocol*.
- Adris, S. K., Klein, S., Jansis, M. A., Chuluyan, E., Ledda, M. F., Bravo, A. I., Carbone, C., Chernajovsky, Y., & Podhajcer, O. L. (1999). IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response. *Gene Therapy*, 6(10), 1705–1712. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301012>
- Affairs, V., Tretinoiu, T., & Trial, C. (2009). Actinic Keratoses. 2523–2530. <https://doi.org/10.1002/cncr.24284>
- Ahrens, S., Zelenay, S., Sancho, D., Hanč, P., Kjær, S., Feest, C., Fletcher, G., Durkin, C., Postigo, A., Skehel, M., Batista, F., Thompson, B., Way, M., Reis e Sousa, C., & Schulz, O. (2012). F-Actin Is an Evolutionarily Conserved Damage-Associated Molecular Pattern Recognized by DNGR-1, a Receptor for Dead Cells. *Immunity*, 36(4), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.00>
- Ajami, B., Bennett, J.L., Kriegger, C., Tetzlaff, W., Rossi, F.M.V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 10,1538-1543.
- Alam, M. (2001). Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 344(13), 975–983.
- Alam, M., Armstrong, A., & Baum, C., Bordeaux, J.S., [...] Moyer, J., Olenecki, T., Rodgers, P. (2018). *Guidelines of care for the management of cutaneous squamous cell carcinoma*. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.10.007>
- Alexandre, Y.A., Ghilas, S., Sanchez, C., Le Bon, A., Crozat, K., Dalod, M. (2016). XCR1+ dendritic cells promote memory CD8+ T cell recall upon secondary infections with *Listeria monocytogenes* or certain viruses. *J Exp Med*. 213, 75-92
- Alves-Filho, J. C., Freitas, A., Souto, F. O., Spiller, F., Paula-Neto, H., Silva, J. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, M. M., Ferreira, S. H., & Cunha, F. Q. (2009). Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 4018–4023. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900196106>
- Andersson, T., Dahlgren, C., Lew, P. D., & Stendahl, O. (1987). *Cell Surface Expression of fMet-Leu-Phe Receptors*. 79(April), 1226–1233.
- Anderson, A. C., Joller, N., & Kuchroo, V. K. (2016). L1 Anderson, A. C., Joller, N. and Kuchroo, V. K. (2016) Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, NIH Public Access 44, 989–1004.ag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44(5), 989–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>.Lag-3
- Angel, C. E., Lala, A., Chen, C. J. J., Edgar, S. G., Ostrovsky, L. L., & Dunbar, P. R. (2007). CD14 + antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a + counterparts. *International*

- Immunology*, 19(11), 1271–1279.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxm096>
- Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpınarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.-C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., Rosenberg, S.A., Restifo, N.P. (2005). CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self antigen is augmented by CD4 T helper and hindered by naturally occurring T regulatory cells
- Antsiferova, M., Piwko-Czuchra, A., Cangkrama, M., Wietecha, M., Sahin, D., Birkner, K., Amann, V. C., Levesque, M., Hohl, D., Dummer, R., & Werner, S. (2017). Activin promotes skin carcinogenesis by attraction and reprogramming of macrophages. *EMBO Molecular Medicine*, 9(1), 27–45.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606493>
- Apalla. (2017). *Skin Cancer : Epidemiology , Disease Burden , Pathophysiology , Diagnosis , and Therapeutic Approaches*. 7, 5–19.
<https://doi.org/10.1007/s13555-016-0165-y>
- Arango Duque, G., & Descotaux, A. (2014) Macrophage cytokines : involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 7;5:491.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Ardi, V. C., Kupriyanova, T. A., Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2007). Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20262–20267.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706438104>
- Asami, J., & Shimizu, T. (2021). Structural and functional understanding of the toll-like receptors. In *Protein Science*.
<https://doi.org/10.1002/pro.4043>
- Atkins, M. B., Robertson, M. J., Gordon, M., Lotze, M. T., DeCoste, M., DuBois, J. S., Ritz, J., Sandler, A. B., Edington, H. D., Garzone, P. D., Mier, J. W., Canning, C. M., Battiato, L., Tahara, H., & Sherman, M. L. (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clinical Cancer Research*, 3(3), 409–417.
- Augier, S., Ciucci, T., Luci, C., Carle, G.F., Blin-Wakkach, C., Wakkach, A. (2013). Inflammatory blood monocytes contribute to tumor development and represent a privileged target to improve host surveillance. *The Journal of Immunology*.
- Aunan, J. R., Cho, W. C., & Sør, K. (2017). The Biology of Aging and Cancer : A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. 8(5), 628–642.
- B**
- Bachem A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzl, P.-M., Gurka, S., Kroczeck, R.A. (2010). Superior antigen-cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺ CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med*, 1273-1281.
<https://doi.org/10.1084/jem.20100348>
- Bachem, A., Hartung, E., Güttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., Henn, V., Mages, H. W., & Kroczeck, R. A. (2012). Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation. *Frontiers in Immunology*, 3(JUL), 1–12.

- <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00214>
- Bahadoran, P., & Ortonne, J. (2002). *Que "trafiquent" les mélanosomes ?* 205–209.
- Bajetta, E., del Vecchio, M., Mortarini, R., Nadeau, R., Rakhit, A., Rimassa, L., Fowst, C., Borri, A., Anichini, A., & Parmiani, G. (1998). Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 4(1), 75–85.
- Bal, S. M., Golebski, K., & Spits, H. (2020). Plasticity of innate lymphoid cell subsets. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 552–565. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0282-9>
- Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R., & Fay, J. (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Research*, 61(17), 6451–6458.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. [Review] [103 refs]. *Nature*, 392(6673), 245–252.
- Baranska, A., Shawket, A., Jouve, M., ... , Malissen, M., Henri, S., Malissen, B. (2018). Unveiling skin macrophage dynamics explains both tattoo persistence and strenuous removal. *J Exp Med*.
- Baron-Bodo, V., Doceur, P., Lefebvre, M. L., Labroquère, K., Defaye, C., Cambouris, C., Prigent, D., Salcedo, M., Boyer, A., & Nardin, A. (2005). Anti-tumor properties of human-activated macrophages produced in large scale for clinical application. *Immunobiology*, 210(2–4), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.05.021>
- Bhattacharyya, N. D., & Feng, C. G. (2020). Regulation of T Helper Cell Fate by TCR Signal Strength. *Frontiers in Immunology*, 11(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00624>
- Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R. S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F. R., Brooks, A. G., & Heath, W. R. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature Immunology*, 10(5), 488–495. <https://doi.org/10.1038/ni.1724>
- Belani, C., Nemunaitis, J.J., Chachoua, A., Eisenberg, P.D., Raez, L.E., Cuevas, J.D., Mather, C.B., Benner, R.J., Meech, S.J. (2011). Randomized phase II trial of erlotinib with or without PF-3512676 (CPG 7909, a toll-like receptor 9 [TLR9] agonist) in patients with advanced recurrent epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Biology & Therapy*, 3512676(July), 557–563.
- Belgiovine, C., Digifico, E., Anfray, C., Ummarino, A., Andon, F.T. (2020). *Journal of Clinical Medicine*, 9, 3226. <https://doi.org/10.3390/jcm-9103226>.
- Bennett, B. Y. I. L. (1953). Studies on the pathogenesis of fever. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. *J Exp Med*, 493–508.
- Berger-Achituv, S., Brinkmann, V., Abed, U. A., Kühn, L. I., Ben-Ezra, J., Elhasid, R., & Zychlinsky, A. (2013). A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in Immunology*, 4(MAR), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00048>
- Berman, B., & Cockerell, C.J. (2012). Pathobiology of actinic keratosis:

- Ultraviolet-dependent keratinocyte proliferation. *JAAD*.
- Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., Velde, A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Mjösberg, J.M., Spits, H. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature Immunology* 14,221-229.
- Berntsen, A., Geertsen, P. F., & Svane, I. M. (2006). Therapeutic Dendritic Cell Vaccination of Patients with Renal Cell Carcinoma. *European Urology*, 50(1), 34–43.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.03.061>
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., & Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235–238.
<https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Bevan, M.J. (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of Experimental Medicine*
- Beyrau, M., Bodkin, J. V., & Nourshargh, S. (2012). Neutrophil heterogeneity in health and disease: A revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biology*, 2(NOV).
<https://doi.org/10.1098/rsob.120134>
- Binnewies, M., Mujal, A. M., Pollack, J. L., Combes, A. J., Hardison, E. A., Barry, K. C., Tsui, J., Ruhland, M. K., Kersten, K., Abushawish, M. A., Spasic, M., Giurintano, J. P., Chan, V., Daud, A. I., Ha, P., Ye, C. J., Roberts, E. W., & Krummel, M. F. (2019). Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity. *Cell*, 177(3), 556-571.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.005>
- Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*, 35(5), 585–600.
<https://doi.org/10.1007/s00281-013-0367-7>
- Blaisdell, A., Crequer, A., Columbus, D., Daikoku, T., Mittal, K., Dey, S.K., Erlebacher, A. (2015). Neutrophils oppose uterine epithelial carcinogenesis via debridement of hypoxic tumor cells. *Cancer Cell*, 28(6): 785-799.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.11.005>
- Blau, H. M., Pavlath, G. K., Hardeman, E. C., Chiu, C. P., Silberstein, L., Webster, S. G., Miller, S. C., & Webster, C. (1985). Plasticity of the differentiated state. *Science*, 230(4727), 758–766.
<https://doi.org/10.1126/science.2414846>
- Blum, V., Muller, B., Hofer, S., Pardo, E., Zeidler, K., Diebold, J., Strobel, K., Brand, C., Aebi, S., Gautschi, O. (2018). Nivolumab for recurrent cutaneous squamous cell carcinoma: Three cases. *Eur J Dermatol.* 28, 78-81
- Bluth, M. J., Zaba, L. C., Moussai, D., Suárez-Fariñas, M., Kaporis, H., Fan, L., Pierson, K. C., White, T. R., Pitts-Kiefer, A., Fuentes-Duculan, J., Guttman-Yassky, E., Krueger, J. G., Lowes, M. A., & Carucci, J. A. (2009). Myeloid dendritic cells from human cutaneous squamous cell carcinoma are poor stimulators of T-cell proliferation. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(10), 2451–2462.
<https://doi.org/10.1038/jid.2009.96>
- Bonaventura, P., Shekarian, T., Alcazer, V., Valladeau-Guilemond, J., Valsesia-Wittmann, S., Amigorena, S., Caux, C., & Depil, S. (2019). Cold

- tumors: A therapeutic challenge for immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.0168>
- Böttcher, J. P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerizo, M., Sammicheli, S., ... Reis e Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*, 172(5), 1022–1037.e14.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004>
- Bourdely, P., Anselmi, G., Vaivode, K., ... , Piaggio, E., Helft, J., Guermonprez, P. (2020). Human dendritic cells identifies a CD163⁺ subset priming CD8⁺ CD103⁺ T Cells. *Immunity* 53, 1-18.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.002>
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
- Boyer, A., Andreu, G., Romet-Lemonne, J. L., Fridman, W. H., & Teillaud, J. L. (1999). Generation of phagocytic MAK and MAC-DC for therapeutic use: Characterization and in vitro functional properties. *Experimental Hematology*, 27(4), 751–761.
[https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(98\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(98)00070-8)
- Bradford, P. T., Goldstein, A. M., Tamura, D., Khan, S. G., Ueda, T., Boyle, J., Oh, K., Imoto, K., Inui, H., Moriwaki, S., Emmert, S., Pike, K. M., Raziuddin, A., Plona, T. M., Digiovanna, J. J., Tucker, M. A., & Kraemer, K. H. (2011). *Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum : long term follow-up characterises the role of DNA repair*.
<https://doi.org/10.1136/jmg.2010.083022>
- Brandau, S., Dumitru, C. A., & Lang, S. (2013). Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Seminars in Immunopathology*, 35(2), 163–176
- Brignone, C., Gutierrez, M., Mefti, F., Brain, E., Jarcau, R., Cvitkovic, F., Bousetta, N., Medioni, J., Gligorov, J., Grygar, C., Marcu, M., & Triebel, F. (2010). First-line chemoimmunotherapy in metastatic breast carcinoma: Combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3Ig) enhances immune responses and antitumor activity. *Journal of Translational Medicine*, 8, 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-71>
- Brody, J. D., Ai, W. Z., Czerwinski, D. K., Torchia, J. A., Levy, M., Advani, R. H., Kim, Y. H., Hoppe, R. T., Knox, S. J., Shin, L. K., Wapnir, I., Tibshirani, R. J., & Levy, R. (2010). In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: A phase I/II study. *Journal of Clinical Oncology*, 28(28), 4324–4332.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.9793>
- Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Wen, Z., Schreiber, R. D., & Darnell, J. E. (1996). Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon α and interferon γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7673–7678.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7673>
- Brooks, D.G., Lee, A.M., Elsaesser, H., McGavern, D.B., Oldstone, M.B. (2008). IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *J. Exp. Med.*
- Brown, C. C., Gudjonson, H., Pritykin, Y., Deep, D., Lavallée, V. P., Mendoza,

- A., Fromme, R., Mazutis, L., Ariyan, C., Leslie, C., Pe'er, D., & Rudensky, A. Y. (2019). Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell*, 179(4), 846-863.e24.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.035>
- Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., Amigorena, S., van'tVeer, L. J., Sperling, A. I., Wolf, D. M., & Krummel, M. F. (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell*, 26(5), 638–652.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>
- Bruchard, M., & Ghiringhelli, F. (2019). Deciphering the roles of innate lymphoid cells in cancer. *Frontiers in Immunology*, 10(APR), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00656>
- Bryceson, Y. T., Chiang, S. C. C., Darmanin, S., Fauriat, C., Schlums, H., Theorell, J., & Wood, S. M. (2011). Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *Journal of Innate Immunity*, 3(3), 216–226.
<https://doi.org/10.1159/000325265>
- Bursch, L. S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D. H., & Hogquist, K. A. (2007). Identification of a novel population of Langerin + dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3147–3156.
<https://doi.org/10.1084/jem.20071966>
- C**
- Cacalano, G., Lee, J., Kikly, K., Ryan, A. M., Pitts-meek, S., Hultgren, B., Wood, W., & Moore, M. W. (1994). Lack the Murine IL-8 Receptor Homolog. *Genomics*, 265(July), 265–267.
- Cance, J. C., Crozat, K., Dalod, M., & Mattiuz, R. (2019). Are conventional type 1 dendritic cells critical for protective antitumor immunity and how? *Frontiers in Immunology*, 10(FEB).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00009>
- Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope : a model of cell death in skin.
<https://doi.org/10.1038/nrm1619>
- Canton, J., Blees, H., Henry, C.M., Buck, M.D., Schulz, O., Rogers, N.C., Childs, E., Zelenay, S., Rhys, H., Domart, M-C., Collinson, L., Alloatti, A., Ellison, C.J., Amigorena, S., Papayannopoulos, V., Thomas, D.C., Randow, F., Reis e Sousa, C. (2021). The receptor DNGR-1 signals for phagosomal rupture to promote cross-presentation of dead-cell-associated antigens.
<https://doi.org/10.1038/s41590-020-00824x>
- Canton, J., Neculai, D., Grinstead, S. (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Review Immunology*, 621-634.
- Capuano, C., Pighi, C., Battella, S., Federicis, D. De, Galandrini, R., & Palmieri, G. (2021). *Harnessing CD16-Mediated NK Cell Functions to Enhance Therapeutic Efficacy of Tumor-Targeting mAbs*. 1–24.
- Carrega, P., Loiacono, F., Di Carlo, E., Scaramuccia, A., Mora, M., Conte, R., Benelli, R., Spaggiari, G. M., Cantoni, C., Campana, S., Bonaccorsi, I., Morandi, B., Truini, M., Mingari, M. C., Moretta, L., & Ferlazzo, G. (2015). NCR + ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nature Communications*, 6.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9280>
- Carreno, B.M., Magrini, V., Becker-Hapak, M., Kaabinejadian, S., Humdal, J., Petti, A.A., Ly, A., Lie, W-R., Hildebrand, W.H., Mardis,

- E.R., Linette, G.P. (2015). A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Cancer Immunotherapy*
- Ceeraz, S., Nowak, E. C., & Noelle, R. J. (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunology*, 34(11), 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.003>
- Cela, E. M., Friedrich, A., Paz, M. L., Vanzulli, S. I., Leoni, J., & González Maglio, D. H. (2015). Time-course study of different innate immune mediators produced by UV-irradiated skin: Comparative effects of short and daily versus a single harmful UV exposure. *Immunology*, 145(1), 82–93. <https://doi.org/10.1111/imm.12427>
- Challacombe, J. M., Suhrbier, A., Parsons, P. G., Jones, B., Hampson, P., Kavanagh, D., Rainger, G. E., Morris, M., Lord, J. M., Le, T. T. T., Hoang-Le, D., & Ogbourne, S. M. (2006). Neutrophils Are a Key Component of the Antitumor Efficacy of Topical Chemotherapy with Ingenol-3-Angelate. *The Journal of Immunology*, 177(11), 8123–8132.
- Chan, E., Kwak, E. L., Hwang, J., Heiskala, M., De La Bourdonnaye, G., & Mita, M. (2015). Open-label phase 1b study of FOLFIRI plus cetuximab plus IMO-2055 in patients with colorectal cancer who have progressed following chemotherapy for advanced or metastatic disease. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(4), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2682-2>
- Chandra, J., Miao, Y., Romoff, N., & Frazer, I. H. (2016). Epithelium expressing the E7 oncoprotein of HPV16 attracts immune-modulatory dendritic cells to the skin and suppresses their antigen-processing capacity. *PLoS ONE*, 11(3), 2–3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152886>
- Chang, Y., Li, He., Guo, Z. (2014). *Mesenchymal Stem Cell-Like Properties in Fibroblasts*. *Cellular Physiology and Biochemistry* 601, 703–714. <https://doi.org/10.1159/000363035>
- Chapalain, M., Baroudjian, B., Dupont, A., Lhote, R., Lambert, J., Bagot, M., Lebbe, C., & Basset-Seguin, N. (2020). Stage IV cutaneous squamous cell carcinoma: treatment outcomes in a series of 42 patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. <https://doi.org/10.1111/jdv.16007>
- Chappert, P., Leboeuf, M., Rameau, P., Lalfer, M., Desbois, S., Liblau, R. S., Danos, O., Davoust, J. M., & Gross, D. A. (2010). Antigen-specific Treg impair CD8+ T-cell priming by blocking early T-cell expansion. *European Journal of Immunology*, 40(2), 339–350. <https://doi.org/10.1002/eji.200839107>
- Chaudhary, B. & Elkord, E. (2016). Regulatory T cells in the tumor microenvironment and cancer progression: role and therapeutic targeting. *Vaccines*. <https://doi.org/10.3390/vaccines4030028>
- Chauvin, J. M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., Kirkwood, J. M., Chen, T. H. T., Maurer, M., Korman, A. J., & Zarour, H. M. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8+ T cells in melanoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 2046–2058. <https://doi.org/10.1172/JCI80445>
- Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 1–15.

- Chen, X., and Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Drug Dis.* 18, 99–115. doi: 10.1038/s41573-018-0004-1
- Chen, J., Zhao, Y., Chu, X., Lu, Y., Wang, S., & Yi, Q. (2016). Dectin-1-activated dendritic cells: A potent Th9 cell inducer for tumor immunotherapy. *Oncology*, 5(11), 1–3. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1238558>
- Chen, S., Wang, X., Wu, X., Wei, M.Q., Zhang, B., Liu, X., Wang, Y. (2014). IL-10 signalling blockade at the time of immunization inhibits human papillomavirus 16 E7 transformed TC-1 tumour cell growth in mice. *290:145-151*
- Chevalier, M. F., TrabANELLI, S., Racle, J., Salomé, B., Cesson, V., Gharbi, D., Bohner, P., Domingos-Pereira, S., Dartiguenave, F., Fritschi, A. S., Speiser, D. E., Rentsch, C. A., Gfeller, D., Jichlinski, P., Nardelli-Haeffliger, D., Jandus, C., & Derré, L. (2017). ILC2-modulated T cell-to-MDSC balance is associated with bladder cancer recurrence. *Journal of Clinical Investigation*, 127(8), 2916–2929. <https://doi.org/10.1172/JCI89717>
- Chiang, M. C., Tullett, K. M., Lee, Y. S., Idris, A., Ding, Y., McDonald, K. J., Kassianos, A., Leal Rojas, I. M., Jeet, V., Lahoud, M. H., & Radford, K. J. (2016). Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *European Journal of Immunology*, 46(2), 329–339. <https://doi.org/10.1002/eji.201546023>
- Choksawangkarn, W., Graham, L. M., Burke, M., Lee, S. B., Ostrand-rosenberg, S., Fenselau, C., & Edwards, N. J. (2018). Peptide-based systems of inflammation induced myeloid-derived suppressor cells reveals diverse signaling pathways. *Proteomics* <https://doi.org/10.1002/pmic.201500102>.
- Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K. J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J. B., Groves, R., & Geissmann, F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3089–3100. <https://doi.org/10.1084/jem.20091586>
- Chow, M. T., Möller, A., & Smyth, M. J. (2012). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 22(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.004>
- Chraa, D., Naim, A., Olive, D., & Badou, A. (2019). T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(2), 243–255. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-097R>
- Christensen, L., Suggs, A., Baron, E., (2017). *Ultraviolet Photobiology in Dermatologymelanocytes*. Advances in Experimental Medicine and Biology. p89- p105
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tyminska, A. (2013). *Skin melanocytes : biology and development*. 30–41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>
- Clarck, R.A., Huang, S.J., Murphy, G.F., Mollet, I.G., Hijnen, D., Muthukuru, M., Schanbacher, C.F., Edwards, V., Miller, D.M., Kim, J.E., Lamber, J., Kupper, T.S., (2005). Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin znf recruitment of regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2221-2234 <https://doi.org/10.1084/jem.20071190>

- Coffelt, S. B., Wellenstein, M. D., & De Visser, K. E. (2016). Neutrophils in cancer: Neutral no more. *Nature Reviews Cancer*, *16*(7), 431–446. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.5>
- Collin, M., McGovern, N., & Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, *140*(1), 22–30. <https://doi.org/10.1111/imm.12117>
- Condamine, T., Gabrilovich, D. I., Dominguez, G. A., Youn, J.-I., Kossenkoy, A. V., Mony, S., Alicea-Torres, K., & T. (2016). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. In *Science immunology* (Vol. 1, Issue 2). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aa f8943>.Lectin-type
- Corchado-Cobos, R., García-Sancha, N., González-Sarmiento, R., Pérez-Losada, J., & Cañueto, J. (2020). Cutaneous squamous cell carcinoma: From biology to therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082956>
- Coulie, P. G., Van Den Eynde, B. J., Van Der Bruggen, P., & Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *14*(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nrc3670>
- Coussens, L. M. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: A magic bullet? (Science (286)). *Science*, *340*(6127), 1522. <https://doi.org/10.1126/science.339.6127.1522-c>
- Coussens, L.M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and Cancer. *Nature*, *420*(6917):860-867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- Coxon, A. T., Johanss, T. M., & Dunn, G. P. (2020). An Innovative Immunotherapy Vaccine with Combination Checkpoint Blockade as a First Line Treatment for Glioblastoma in the Context of Current Treatments. *Missouri Medicine*, *117*(1), 45–49.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *1283-1292*. <https://doi.org/10.1084/jem.20100223>
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Guilliams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., Henri, S., & Dalod, M. (2011). Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8 α + Type . *The Journal of Immunology*, *187*(9), 4411–4415. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101717>
- Curjel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, *10*(9), 942–949. <https://doi.org/10.1038/nm1093>
- Cytlak, U., Resteu, A., Pagan, S., ..., Doody, G., Collin, M., Bigley, V. (2020). Differential IRF8 transcription factor requirement defines two pathways of dendritic cell development in humans. *Immunity*

D

- Dallegrì, F., Ottonello, L., Ballestrero, A., Dapino, P., Ferrando, F., Patrone, F., & Sacchetti, C. (1991). Tumor cell lysis by activated human neutrophils: Analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation*, *15*(1), 15–30. <https://doi.org/10.1007/BF00917906>
- Damiano, V., Caputo, R., Bianco, R., D'Armiento, F. P., Leonardi, A., De Placido, S., Bianco, A. R., Agrawal, S., Ciardiello, F., & Tortora, G. (2006). Novel toll-like receptor 9 agonist induces epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibition and synergistic antitumor activity with EGFR inhibitors. *Clinical Cancer Research*, *12*(2), 577–583. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1943>
- Dario A. A. Vignali, L. W. C. and C. J. W. (2008). How regulatory K cells work. *Nat Rev Immunol*, *8*(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>.How
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology and Therapy*, *20*(11), 1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- de Bruijn, M. F. T. R., Slieker, W. A. T., van der Loo, J. C. M., Voerman, J. S. A., van Ewijk, W., & Leenen, P. J. M. (1994). Distinct mouse bone marrow macrophage precursors identified by differential expression of ER-MP12 and ER-MP20 antigens. *European Journal of Immunology*, *24*(10), 2279–2284. <https://doi.org/10.1002/eji.1830241003>
- de Mingo Pulido, Á., Gardner, A., Hiebler, S., Soliman, H., Rugo, H. S., Krummel, M. F., Coussens, L. M., & Ruffell, B. (2018). TIM-3 Regulates CD103+ Dendritic Cell Function and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Cell*, *33*(1), 60–74.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.019>
- de Vries, I. J. M. De, Krooshoop, D. J. E. B., Scharenborg, N. M., Krooshoop, J. E. B., Lesterhuis, W. J., Heleen, J. S., Adema, G. J., Punt, C. J. A., & Figdor, C. G. (2003). Effective Migration of Antigen-pulsed Dendritic Cells to Lymph Nodes in Melanoma Patients Is Determined by Their Maturation State. *Cancer Research*, *63*, 12–17.
- Dees, S., Ganesan, R., Singh, S., & Grewal, I. S. (2021). Regulatory T cell targeting in cancer: Emerging strategies in immunotherapy. *European Journal of Immunology*, *51*(2), 280–291. <https://doi.org/10.1002/eji.202048992>
- Delorme, E.J. (1964). Treatment of primary fibrosarcoma in the rat with immune lymphocytes. *The Lancet* *117–120*.
- Demehri, S., Turkoz, A., Manivasagam, S., Yockey, L. J., Turkoz, M., & Kopan, R. (2012). Elevated Epidermal Thymic Stromal Lymphopoietin Levels Establish an Antitumor Environment in the Skin. *Cancer Cell*, *22*(4), 494–505. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.017>
- Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, T. A., Scadden, D. T., & Wagner, D. D. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(32), 13076–13081. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200419109>
- Den Haan, J. M. M., & Bevan, M. J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8+ and CD8- dendritic cells in vivo. *Journal*

- of *Experimental Medicine*, 196(6), 817–827.
<https://doi.org/10.1084/jem.20020295>
- Den Haan, J. M. M., Lehar, S. M., & Bevan, M. J. (2000). CD8+ but not CD8- dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 192(12), 1685–1695.
<https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1685>
- Deng, W. W., Mao, L., Yu, G. T., Bu, L. L., Ma, S. R., Liu, B., Gutkind, J. S., Kulkarni, A. B., Zhang, W. F., & Sun, Z. J. (2016). LAG-3 confers poor prognosis and its blockade reshapes antitumor response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology*, 5(11), 1–14.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1239005>
- Deryugina, E., Carré, A., Ardi, V., Muramatsu, T., Schmidt, J., Pham, C., & Quigley, J. P. (2020). Neutrophil Elastase Facilitates Tumor Cell Intravasation and Early Metastatic Events. *IScience*, 23(12).
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101799>
- Desai, R., Coxon, A. T., & Dunn, G. P. (2021). Therapeutic applications of the cancer immunoediting hypothesis. *Seminars in Cancer Biology*, November 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.002>
- Dessinioti, C., Antoniou, C., Katsambas, A., & Stratigos, A. J. (2011). *Invited Review Melanocortin 1 Receptor Variants : Functional Role and Pigmentary Associations*. 18, 978–987. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00970.x>
- De Vito, N., Plebanek, M., Theivanthiran, B., Hanks, B.A. (2019). Role of tumor-mediated dendritic cell tolerization in immune evasion. *Front Immunol*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02876>
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Mortarini, R., Baldassari, P., Guidetti, A., Gallino, G. F., Del Vecchio, M., Ravagnani, F., Magni, M., Chaplin, P., Cascinelli, N., Parmiani, G., Gianni, A. M., & Anichini, A. (2004). Boosting T cell-mediated immunity to tyrosinase by vaccinia virus-transduced, CD34+-derived dendritic cell vaccination: A phase I trial in metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 10(16), 5381–5390.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0602>
- Di Piazza, M., Nowell, C. S., Koch, U., Durham, A. D., & Radtke, F. (2012). Loss of Cutaneous TSLP-Dependent Immune Responses Skews the Balance of Inflammation from Tumor Protective to Tumor Promoting. *Cancer Cell*, 22(4), 479–493.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.016>
- Díaz-Montero, C. M., Naga, O., Zidan, A.-A. A., Salem, M. L., Pallin, M., Parmigiani, A., Walker, G., Wieder, E., Komanduri, K., Cole, D. J., Montero, A. J., & Lichtenheld, M. G. (2011). Synergy of brief activation of CD8 T-cells in the presence of IL-12 and adoptive transfer into lymphopenic hosts promotes tumor clearance and anti-tumor memory. *American Journal of Cancer Research*, 1(7), 882–896.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915391>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3170749>
- Dong, C. (2021). Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annual Review of Immunology*, 39, 51–76.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053702>
- Donini, C., D'Ambrosio, L., Grignani, G., Aglietta, M., & Sangiolo, D. (2018). Next generation immune-checkpoints for cancer therapy. *Journal of Thoracic Disease*, 10(CI), S1581–S1601.

- <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.02.79>
- Driskell, R. R., & Watt, F. M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in Cell Biology*, 25(2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.001>
- Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J., & Zhang, L. (2020). Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer*, 6(7), 605–618. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.02.022>
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3-991-998.
- Dustin, M. L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*, 2(11), 1023–1033. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161>
- Dutertre, C. A., Becht, E., Irac, S. E., Khalilnezhad, A., Narang, V., Khalilnezhad, S., Ng, P. Y., van den Hoogen, L. L., Leong, J. Y., Lee, B., Chevrier, M., Zhang, X. M., Yong, P. J. A., Koh, G., Lum, J., Howland, S. W., Mok, E., Chen, J., Larbi, A., ... Ginhoux, F. (2019). Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*, 51(3), 573-589.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.008>
- Dzierżęga-Łęcznar, A., & Stępień, K. (2019). *Differential expression of inflammatory cytokines and chemokines in lipopolysaccharide-stimulated melanocytes from lightly and darkly pigmented skin. February*, 551–560. <https://doi.org/10.1111/exd.13908>
- Eash, K. J., Greenbaum, A. M., Gopalan, P. K., & Link, D. C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2423–2431. <https://doi.org/10.1172/JCI41649>
- Easom, N. J. W., Stegmann, K. A., Swadling, L., Pallett, L. J., Burton, A. R., Odera, D., Schmidt, N., Huang, W. C., Fusai, G., Davidson, B., & Maini, M. K. (2018). IL-15 overcomes hepatocellular carcinoma-induced NK cell dysfunction. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01009>
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., & Declercq, W. (2013). *Biochimica et Biophysica Acta Cell death by cornification* ☆. 1833, 3471–3480. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.010>
- Eigentler, T. K., Leiter, U., Häfner, H. M., Garbe, C., Röcken, M., & Breuninger, H. (2017). Survival of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective Cohort Study. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(11), 2309–2315. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.06.025>
- Eisenring, M., Vom Berg, J., Kristiansen, G., Saller, E., & Becher, B. (2010). IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Nature Immunology*, 11(11), 1030–1038. <https://doi.org/10.1038/ni.1947>
- Ejrnaes, M., Filippi, C.M.; Martinic, M.M., Ling, E.M., Togher, L.M., Crotty, M.G., von Herrath, M.G., (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J. Exp. Med.* 203:2461-2472
- Elaldi, R., Hemon, P., Petti, L., Cosson, E., Desrues, B., Sudaka, A., Poissonnet, G., Van Obberghen-Schilling, E., Pers, J-O., Braud, V.M., Anjuère, F.,

E

- Meghraoui-Kheddar, A. (2021). High Dimensional imaging Mass cytometry panel to visualize the tumor immune microenvironment contexture. *Frontiers in Immunology*.
- Engelhardt, C., Curiel-Lewandrowski, C., Warneke, J., & Cranmer, L. (2011). Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma responding to erlotinib therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(1), 237–238.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.12.042>
- Engels, B., Engelhard, V.H., Sidney, J., ... , Meredith, S.C., Rowley, D.A., Schreiber, H. (2013). Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-MHC affinity. *Cancer Cell*. 23(4): 516-526.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.018>
- Epstein, E. H. (2015). *Basal cell carcinomas : attack of the hedgehog*. 8(10), 743–754.
<https://doi.org/10.1038/nrc2503>.Basal
- Erol, A. (2011). Deciphering the intricate regulatory mechanisms for the cellular choice between cell repair , apoptosis or senescence in response to damaging signals. *Cellular Signalling*, 23(7), 1076–1081.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.11.023>
- Eruslanov, E. B., Bhojnagarwala, P. S., Quatromoni, J. G., Stephen, T. L., Ranganathan, A., Deshpande, C., Akimova, T., Vachani, A., Litzky, L., Hancock, W. W., Conejo-Garcia, J. R., Feldman, M., Albelda, S. M., & Singhal, S. (2014). Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 124(12), 5466–5480.
<https://doi.org/10.1172/JCI77053>
- Etzerodt, A., Tsalkitzi, K., Maniecki, M., Damsky, W., Delfini, M., Baudoin, E., Moulin, M., Bosenberg, M., Graversen, J. H., Auphan-Anezin, N., Moestrup, S. K., & Lawrence, T. (2019). Specific targeting of CD163+ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression. *Journal of Experimental Medicine*, 216(10), 2394–2411.
<https://doi.org/10.1084/jem.20182124>
- Evrard, M., Kwok, I. W. H., Chong, S. Z., Teng, K. W. W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J. L., Penny, H. L., Ching, G. C., Devi, S., Adrover, J. M., Li, J. L. Y., Liong, K. H., Tan, L., Poon, Z., Foo, S., Chua, J. W., Su, I. H., Balabanian, K., ... Ng, L. G. (2018). Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity*, 48(2), 364-379.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.002>
- F**
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., & Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(12), 1206–1212.
<https://doi.org/10.1038/ni1003>
- Fearon, D. T., & Collins, L. A. (1983). Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 130(1), 370–375.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6847888>
- Fidler, I. J. (1974). Inhibition of Pulmonary Metastasis by Intravenous Injection of Specifically Activated Macrophages. *Cancer Research*, 34(5), 1074–1078.
- Fife, B. T., & Bluestone, J. A. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews*, 224(1), 166–182.

- <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x>
- Finisguerra, V., Di Conza, G., Di Matteo, M., Serneels, J., Costa, S., Thompson, A. A. R., Wauters, E., Walmsley, S., Prenen, H., Granot, Z., Casazza, A., & Mazzone, M. (2015). MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*, *522*(7556), 349–353.
<https://doi.org/10.1038/nature14407>
- Finney, H. M., Akbar, A. N., & Lawson, A. D. G. (2004). Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from CD28, Inducible Costimulator, CD134, and CD137 in Series with Signals from the TCR ζ Chain. *The Journal of Immunology*, *172*(1), 104–113.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.104>
- Flacher, V., Sparber, F., Tripp, C. H., Romani, N., & Stoitzner, P. (2009). Targeting of epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: Attempts to harness their properties for immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *58*(7), 1137–1147.
<https://doi.org/10.1007/s00262-008-0563-9>
- Flaherty, K. T., Hodi, F. S., & Fisher, D. E. (2012). *From genes to drugs : targeted strategies for melanoma*. 12(May).
<https://doi.org/10.1038/nrc3218>
- Floros, T., & Tarhini, A. A. (2015). Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Seminars in Oncology*, *42*(4), 539–548.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.015>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, *198*(3), 986–992.
<https://doi.org/10.1038/ni904>
- Franz, K. M., & Kagan, J. C. (2017). Innate Immune Receptors as Competitive Determinants of Cell Fate. *Molecular Cell*, *66*(6), 750–760.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.009>
- Frega, G., Wu, Q., Le Naour, J., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Kroemer, G., Kepp, O. (2020). Trial watch : experimental TLR7/TLR8 agonists for oncological indications. *Oncoimmunology*. *9*, 1, 1–10.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, *16*(3), 183–194.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>
- Friedlaender, A., Addeo, A., & Banna, G. (2019). New emerging targets in cancer immunotherapy: The role of TIM3. *ESMO Open*, *4*, 1–5.
<https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000497>
- Friedlander, Z.G., Sun, J., Mishalan, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., et al. (2012). Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PloS one*, *7*:e31524
- Fritz, J.M., Tennis, M.A., Orlicky, D.J., ... , Merrick, D.T., Malkinson, A.M., Dwyer-Nield, L.D. (2014). Depletion of tumor-associated macrophages slows the growth of chemically induced mouse lung adenocarcinomas. *Frontiers in Immunology*. [https://doi:10.3389/fimmu.2014.00587](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00587). eCollection 2014.
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Leonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., Colonna, M. (2013). Intraepithelial type 1 innate lymphoid

cells are a unique subset of cytokine responsive interferon- γ -producing cells. *Immunity*, 38(4):769-781.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>

Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., & Gajewski, T. F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 2005–2016.

<https://doi.org/10.1084/jem.20101159>

Fujita, H., Suarez-Farinas, M., Mitsui, H., Gonzalez, J., Bluth, M.J., Zhang, S., Felsen, D., Krueger, J.G., Carucci, J.A. (2012). Langerhans cells from human cutaneous squamous cell carcinoma induce strong type 1 immunity. *J Invest Dermatol*, 132(6): 1645-1655.

<https://doi.org/10.1038/jid.2012.34>

Furio, L., Berthier-Vergnes, O., Ducarre, B., Schmitt, D., & Peguet-Navarro, J. (2005). UVA radiation impairs phenotypic and functional maturation of human dermal dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(5), 1032–1038.

<https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23904.x>

G

Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 9(3), 162–174.

Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 253–268.

<https://doi.org/10.1038/nri3175>

Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 9(3), 162–174.

<https://doi.org/10.1038/nri2506>

Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res*, 5(1): 3-8.

<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-160297>

Gajewski, T.F., Schreiber, H., Fu Y-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunol*, 14(10), 1014-1022

<https://doi.org/10.1038/ni.2703>

Gao, Y., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Bald, T., Ng, S. S., Young, A., Ngiow, S. F., Rautela, J., Straube, J., Waddell, N., Blake, S. J., Yan, J., Bartholin, L., Lee, J. S., Vivier, E., Takeda, K., Messaoudene, M., Zitvogel, L., Teng, M. W. L., Belz, G. T., ... Smyth, M. J. (2017). Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, 18(9), 1004–1015.

<https://doi.org/10.1038/ni.3800>

Garris, C. S., Arlauckas, S. P., Kohler, R. H., Trefny, M. P., Garren, S., Piot, C., Engblom, C., Pfirschke, C., Siwicki, M., Gungabeesoon, J., Freeman, G. J., Warren, S. E., Ong, S. F., Browning, E., Twitty, C. G., Pierce, R. H., Le, M. H., Algazi, A. P., Daud, A. I., ... Pittet, M. J. (2018). Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity*, 49(6), 1148-1161.e7.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.024>

Gato, M., Blanco-Luquin, I., Zudaire, M., de Morentin, X.M., Perez-Valderrama, E., Zabaleta, A., et al. (2016). Drafting the proteome landscape of myeloid-derived suppressor cells. *Proteomics*. 16:367-78.

Gattinoni, L., Finkelstein, S. E., Klebanoff, C. A., Antony, P. A., Palmer, D. C., Spiess, P. J., Hwang, L. N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D. M., Surh, C. D., Rosenberg, S. A., &

- Restifo, N. P. (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 907–912.
<https://doi.org/10.1084/jem.20050732>
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., Mazloom, A.R., Ma'ayan, A., Chua, W.-J., Hansen, T.H., Turley, S.J., Merad, M., Randolph, G.J., Immunological Genome Consortium. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, 13(11): 1529-2908.
<https://doi.org/10.1038/ni.2419>
- Geisse, J., Caro, I., Lindholm, J., Golitz, L., Stampone, P., & Owens, M. (2004). Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *Journal of the American Academy of Dermatology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.11.066>
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1), 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Geissman, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661
- Gellatly, M., Reilly, E. C., Mervak, J. E., Mervak, B. M., Del, C., Box, P. O., & Rico, P. (2020). Metastatic basal cell carcinoma with atypical. *Radiology Case Reports*, 15(12), 2641–2644.
<https://doi.org/10.1016/j.radcr.2020.09.054>
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., & Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*, 21(8), 938–945.
<https://doi.org/10.1038/nm.3909>
- Gerner, M.Y., Heltemes-Harris, L.M., Fife, B.T., Mesher, M.F. (2013). IL-12 and type I IFN differentially program CD8 T cells for PD-1 re-expression levels and control tumor. *J Immunol*. 191(3):1011-1015.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300652>
- Ghalbzouri, A. el, Jonkman, A. M. F., Dijkman, R., & A. M. P. (2005). Basement Membrane Reconstruction in Human Skin Equivalents Is Regulated by Fibroblasts and / or Exogenously Activated Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(1), 79–86.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23549.x>
- Ginhoux, F., Collin, M. P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., Snoeck, H., Randolph, G., & Merad, M. (2007). Blood-derived dermal langerin + dendritic cells survey the skin in the steady state . *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3133–3146.
<https://doi.org/10.1084/jem.20071733>
- Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult

- microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845
- Ginhoux, F. & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Review*.
- Girardi, M., Oppenheim, D., Glusac, E. J., Filler, R., Balmain, A., Tigelaar, R. E., et al. (2004). Characterizing the protective component of the alphabeta T cell response to transplantable squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* 122, 699–706. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22342.x>
- Glogau, R. G., & Francisco, S. (2000). The risk of progression to invasive disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(1), S23–S24.
<https://doi.org/10.1067/mjd.2000.103339>
- Goldinger, S. M., Dummer, R., Baumgaertner, P., Mihic-Probst, D., Schwarz, K., Hammann-Haenni, A., Willers, J., Geldhof, C., Prior, J. O., Kündig, T. M., Michielin, O., Bachmann, M. F., & Speiser, D. E. (2012). Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and -9 ligands triggers memory and effector CD8 + T-cell responses in melanoma patients. *European Journal of Immunology*, 42(11), 3049–3061. <https://doi.org/10.1002/eji.201142361>
- Goudot, C., Coillard, A., Villani, A. C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T. L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., Amigorena, S., & Segura, E. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity*, 47(3), 582-596.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.016>
- Grange, M., Buferne, M., Verdeil, G., Leserman, L., Schmitt-Verhulst, A-M., Auphan-Anezin, N. (2012). Activated STAT5 promotes long-lived cytotoxic CD8+ T Cells that induce regression of autochthonous melanoma. *Cancer Research*.
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E. A., King, T. A., Norton, L., & Benezra, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*, 20(3), 300–314. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.012>
- Gröne, A. (2002). *Keratinocytes and cytokines*. 88, 1–12.
- Guilliams, M., Dutertre, C. A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., Tavernier, S. J., Low, I., Irac, S. E., Mattar, C. N., Sumatoh, H. R., Low, G. H. L., Chung, T. J. K., Chan, D. K. H., Tan, K. K., ... Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, 45(3), 669–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.015>
- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., & Malissen, B. (2010). From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *European Journal of Immunology*, 40(8), 2089–2094. <https://doi.org/10.1002/eji.201040498>
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>

H

- Hamakawa, M., Sugihara, A., Okamoto, H., & Horio, T. (2006). Ultraviolet B radiation suppresses Langerhans cell migration in the dermis by down-regulation of $\alpha 4$ integrin. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 22(3), 116–123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2006.00187.x>

- Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, ... , Collin, M., Casanova, J-L., Gros, P. (2011). IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*.
- Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X. N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., Hilkens, C., Merad, M., & Collin, M. (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Experimental Medicine*, 206(2), 371–385.
<https://doi.org/10.1084/jem.20081633>
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V, ..., Bertoletti, A., Collin, M., Ginhoux, F. (2012). Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*
- Harjunpää, H., Asens, M.L., Guenther, C., Fagerholm, S.C. (2019). Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*.
<https://doi.org/10.3339/fimmu.2019.01078>
- Harman, A. N., Bye, C. R., Nasr, N., Sandgren, K. J., Kim, M., Mercier, S. K., Botting, R. A., Lewin, S. R., Cunningham, A. L., & Cameron, P. U. (2013). Identification of Lineage Relationships and Novel Markers of Blood and Skin Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 190(1), 66–79.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200779>
- Has, C. (2015). *Epidermal Basement Membrane in Health and Disease*. 76.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.05.003>
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 792-804.
- Hattar, K., Franz, K., Ludwig, M., Sibeliu, U., Wilhelm, J., Lohmeyer, J., Savai, R., Subtil, F. S. B., Dahlem, G., Eul, B., Seeger, W., Grimminger, F., & Grandel, U. (2014). Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(12), 1297–1306.
<https://doi.org/10.1007/s00262-014-1606-z>
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Smyth, M. J., van Kaer, L., Okumura, K., & Saiki, I. (2002). IFN- γ -mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, α -galactosylceramide. *Blood*, 100(5), 1728–1733.
https://doi.org/10.1182/blood.V100.5.1728.h81702001728_1728_1733
- He, G., Zhang, H., Zhou, J., Wang, B., Chen, Y., Kong, Y., Xie, X., Wang, X., Fei, R., Wei, L., Chen, H., & Zeng, H. (2015). Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0256-0>
- Hearing, V. J. (2011). *Determination of Melanin Synthetic Pathways*.
<https://doi.org/10.1038/skinbio.2011.4>
- Hedrick, C. C., & Malanchi, I. (2021). Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nature Reviews. Immunology*, 0123456789.
- Heger, L., Balk, S., Lühr, J. J., Heidkamp, G. F., Lehmann, C. H. K., Hatscher, L., Purbojo, A., Hartmann, A., Garcia-Martin, F., Nishimura, S. I., Cesnjevar, R., Nimmerjahn, F., &

- Dudziak, D. (2018). CLEC10A Is a specific marker for human CD1c⁺ dendritic cells and enhances their toll-like receptor 7/8-Induced cytokine secretion. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.0744>
- Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., Yamane, T., Ogawa, M., Nishikawa, S. I., Ryoike, K., Inaba, K., Hayashi, S. I., & Kunisada, T. (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- β 1-dependent cells. *International Immunology*, 13(5), 695–704.
<https://doi.org/10.1093/intimm/13.5.695>
- Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S. (2020). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(January), 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00160>
- Henri, S., Poulin, L. F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., De Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., & Malissen, B. (2010). CD207⁺ CD103⁺ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(1), 189–206.
<https://doi.org/10.1084/jem.20091964>
- Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975; 16: 230–239.
- Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 1975; 16: 216–229.
- Hieronymus, T., Zenke, M., Baek, J. H., & Seré, K. (2015). The clash of Langerhans cell homeostasis in skin: Should I stay or should I go? *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 41, 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.009>
- Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B., Unanue, E. R., Diamond, M. S., Schreiber, R. D., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2008). Supporting Online Material for Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Published Science*, 322(November), 1097–1101.
<https://doi.org/10.1126/science.1164206>
- Hilf, N., Kuttruff-Coqui, S., Frenzel, K., Bukur, V., Stevanović, S., Gouttefangeas, C., Platten, M., Tabatabai, G., Dutoit, V., van der Burg, S. H., Thor Straten, P., Martínez-Ricarte, F., Ponsati, B., Okada, H., Lassen, U., Admon, A., Ottensmeier, C. H., Ulges, A., Kreiter, S., ... Wick, W. (2019). Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature*, 565(7738), 240–245.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0810-y>
- Hirsh, V., Paz-Ares, L., Boyer, M., Rosell, R., Middleton, G., Eberhardt, W. E. E., Szczesna, A., Reiterer, P., Saleh, M., Arrieta, O., Bajetta, E., Webb, R. T., Raats, J., Benner, R. J., Fowst, C., Meech, S. J., Readett, D., & Schiller, J. H. (2011). Randomized phase III trial of paclitaxel/carboplatin with or without PF-3512676 (toll-like

- receptor 9 agonist) as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(19), 2667–2674. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.8971>
- Hoechst, B., Gamrekashvili, J., Manns, M.P., Greten, T.F., Korangy, F. (2011). Plasticity of human Th17 cells and iTreg is orchestrated by different subset of myeloid cells. *Blood*, 117(24):6532-41. <https://doi.org/10.1182/blodd-2010-11-317321>
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S. H. Y., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S. J., Stanley, E. R., Chan, J. K. Y., Ng, L. G., Samokhvalov, I. M., Merad, M., & Ginhoux, F. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1167–1181. <https://doi.org/10.1084/jem.20120340>
- Höfer, T., Krichevsky, O., Altan-Bonnet, G. (2012). Competition for IL-2 between regulatory and effector T cells to chisel immune response. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00268>
- Hofmann, M.A., Kors, C., Audring, H., Walden, P., Sterry, W., Trefzer, U. (2002). Phase I evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J Immunother*, 31(5):520-527.
- Hollenbaugh, J. A., & Dutton, R. W. (2006). IFN- γ Regulates Donor CD8 T Cell Expansion, Migration, and Leads to Apoptosis of Cells of a Solid Tumor. *The Journal of Immunology*, 177(5), 3004–3011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3004>
- House, I. G., Savas, P., Lai, J., Chen, A. X. Y., Oliver, A. J., Teo, Z. L., Todd, K. L., Henderson, M. A., Giuffrida, L., Petley, E. V., Sek, K., Mardiana, S., Gide, T. N., Quek, C., Scolyer, R. A., Long, G. V., Wilmott, J. S., Loi, S., Darcy, P. K., & Beavis, P. A. (2020). Macrophage-derived CXCL9 and CXCL10 are required for antitumor immune responses following immune checkpoint blockade. *Clinical Cancer Research*, 26(2), 487–504. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1868>
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C. H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S. J., & Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *The Journal of Immunology*, 195(8), 3665–3674. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402898>
- Hu, Z., Ott, P. A., & Wu, C. J. (2018). Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nature Reviews Immunology*, 18(3), 168–182. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.131>
- Huang, A. Y. C., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., & Levitsky, H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science*, 264(5161), 961–965. <https://doi.org/10.1126/science.7513904>
- I**
- Ikutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S., & Takatsu, K. (2012). Identification of Innate IL-5–Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. *The Journal of*

- Immunology*, 188(2), 703–713.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101270>
- Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P. W., Matsushima, K., & Yoshie, O. (1999). Selective recruitment of CCR4-bearing T(h)2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *International Immunology*, 11(1), 81–88.
<https://doi.org/10.1093/intimm/11.1.81>
- Imai, K., Matsuyama, B.M., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence : an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet*.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03231-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03231-1)
- Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I. C., Pui, C. H., Geiger, T. L., & Campana, D. (2004). Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18(4), 676–684.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403302>
- Imhof, B. A., Jemelin, S., & Emre, Y. (2017). Toll-like receptors elicit different recruitment kinetics of monocytes and neutrophils in mouse acute inflammation. *European Journal of Immunology*, 47(6), 1002–1008.
<https://doi.org/10.1002/eji.201746983>
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 1;88(3):577-83.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelletier, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*, 126(6), 1121–1133.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10), 987–995.
<https://doi.org/10.1038/ni1112>
- ### J
- Janela, B., Patel, A. A., Lau, M. C., Goh, C. C., Msallam, R., Kong, W. T., Fehlings, M., Hubert, S., Lum, J., Simoni, Y., Malleret, B., Zolezzi, F., Chen, J., Poidinger, M., Satpathy, A. T., Briseno, C., Wohn, C., Malissen, B., Murphy, K. M., ... Ginhoux, F. (2019). A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGF α -Mediated Recruitment of Neutrophils. *Immunity*, 50(4), 1069-1083.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.001>
- Jang, T. J. (2008). Prevalence of Foxp3 positive T regulatory cells is increased during progression of cutaneous squamous tumors. *Yonsei Medical Journal*, 49(6), 942–948.
<https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.6.942>
- Janson, D., Rietveld, M., Mahé, C., Saintigny, G., & el Ghalbzouri, A. (2017). Differential effect of extracellular matrix derived from papillary and reticular fibroblasts on epidermal development in vitro. *European Journal of Dermatology*.
<https://doi.org/10.1684/ejd.2017.2984>
- Jayaraman, S. S., Rayhan, D. J., Hazany, S., & Kolodney, M. S. (2014). Mutational Landscape of Basal Cell Carcinomas by Whole-Exome Sequencing. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(1), 213–220.
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.276>

- Jarnicki, A. G., Lysaght, J., Todryk, S., & Mills, K. H. G. (2006). Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- β -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4 + and CD8 + Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 177(2), 896–904. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.896>
- Ji, A. L., Rubin, A. J., Thrane, K., Jiang, S., Reynolds, D. L., Meyers, R. M., Guo, M. G., George, B. M., Mollbrink, A., Bergenstr hle, J., Larsson, L., Bai, Y., Zhu, B., Bhaduri, A., Meyers, J. M., Rovira-Clav , X., Hollmig, S. T., Aasi, S. Z., Nolan, G. P., ... Khavari, P. A. (2020). Multimodal Analysis of Composition and Spatial Architecture in Human Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Cleaner Production*, 497–514. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.039>
- Jiao, Q., Liu, C., Li, W., Fang, F., Qian, Q., Zhang, X. (2017). Programmed death-1 ligands 1 and 2 expression in cutaneous squamous cell carcinoma and their relationship with tumour-infiltrating dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 557–569. <https://doi.org/10.1038/nri3254>
- Johanns, T. M., Miller, C. A., Liu, C. J., Perrin, R. J., Bender, D., Kobayashi, D. K., Campian, J. L., Chicoine, M. R., Dacey, R. G., Huang, J., Fritsch, E. F., Gillanders, W. E., Artyomov, M. N., Mardis, E. R., Schreiber, R. D., & Dunn, G. P. (2019). Detection of neoantigen-specific T cells following a personalized vaccine in a patient with glioblastoma. *OncoImmunology*, 8(4), 1–10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1561106>
- John, H., Balszuweit, F., Steinritz, D., Kehe, K., Worek, F., & Thiermann, H. (2020). Toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819090-6.00052-0>
- Johnson, L. A., Heemskerk, B., Powell, D. J., Cohen, C. J., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Robbins, P. F., & Rosenberg, S. A. (2006). Gene Transfer of Tumor-Reactive TCR Confers Both High Avidity and Tumor Reactivity to Nonreactive Peripheral Blood Mononuclear Cells and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 177(9), 6548–6559. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6548>
- K**
- Kalyan, S., & Kabelitz, D. (2014). When neutrophils meet T cells: Beginnings of a tumultuous relationship with underappreciated potential. *European Journal of Immunology*, 44(3), 627–633. <https://doi.org/10.1002/eji.201344195>
- Kamath, A. T., Henri, S., Batty, F., Tough, D. F., & Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood*, 100(5), 1734–1741. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176895>
- Kamiya, S., Owaki, T., Morishima, N., Fukai, F., Mizuguchi, J., & Yoshimoto, T. (2004). An Indispensable Role for STAT1 in IL-27-Induced T-bet Expression but Not Proliferation of Naive CD4 + T Cells. *The Journal of Immunology*, 173(6), 3871–3877. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3871>
- Karapetyan, L., Luke, J.J., Davar, D. (2020). Toll-like receptor 9 agonists in cancer. *OncoTargets and Therapy*.

- <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31817a4df>
- Karbach, J., Gnjjatic, S., Bender, A., Neumann, A., Weidmann, E., Yuan, J., Ferrara, C. A., Hoffmann, E., Old, L. J., Altorki, N. K., & Jäger, E. (2010). Tumor-reactive CD8+ T-cell responses after vaccination with NY-ESO-1 peptide, CpG 7909 and Montanide® ISA-51: Association with survival. *International Journal of Cancer*, 126(4), 909–918. <https://doi.org/10.1002/ijc.24850>
- Karimkhani, C., Green, D. A. C., & Nijsten, T. (2017). *The global burden of melanoma : results from the Global Burden of Disease Study 2015 **. 2015.
- Keller, M., Ru, A., Werner, S., & Beer, H. (2008). *Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion*. 818–831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.040>
- Kellogg, D. L. (2021). In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges during heat stress and cold stress in humans. 1709–1718. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01071.2005>
- Kennedy, D. W., & Abkowitz, J. L. (1998). Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14944–14949. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14944>
- Khou, S., Popa, A., Luci, C., Bihl, F., Meghraoui-Kheddar, A., Bourdely, P., Salavagione, E., Cosson, E., Rubod, A., Cazareth, J., Barbry, P., Mari, B., Rezzonico, R., Anjuère, F., Braud, VM. (2020). Tumor-associated neutrophils dampen adaptive immunity and promote cutaneous squamous cell carcinoma development. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers1207860>
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., & Shuttleworth, C. A. (2002). *Elastic fibres*.
- Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5: 117–121.
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5: 112–117.
- Kilinc, M. O., Aulakh, K. S., Nair, R. E., Jones, S. A., Alard, P., Kosiewicz, M. M., & Egilmez, N. K. (2006). Reversing Tumor Immune Suppression with Intratumoral IL-12: Activation of Tumor-Associated T Effector/Memory Cells, Induction of T Suppressor Apoptosis, and Infiltration of CD8 + T Effectors . *The Journal of Immunology*, 177(10), 6962–6973. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6962>
- Kim, Y.H., Girardi, M., Duvic, M., et al., (2010). Phase I trial of a Toll-like receptor 9 agonist, PF-3512676 (CPG 7909), in patients with treatment-refractory, cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*, 63(6):975-983. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.12.052>
- Kirchberger, S., Royston, D. J., Boulard, O., Thornton, E., Franchini, F., Szabady, R. L., Harrison, O., & Powrie, F. (2013). Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *Journal of Experimental Medicine*, 210(5), 917–931. <https://doi.org/10.1084/jem.20122308>

- Kishwer, S., & Bichakjian, C.K. (2018). Update on Keratinocyte Carcinomas. 363–374. *The New England Journal of Medicine*.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1708701>
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C. H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., Saeland, S., Davoust, J., & Malissen, B. (2005). Dynamics and function of langerhans cells in vivo: Dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating langerhans cells. *Immunity*, 22(5), 643–654.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.004>
- Klose, C. S. N., Kiss, E. A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., D’Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A. L., Waisman, A., Tanriver, Y., & Dieffenbach, A. (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ t + innate lymphoid cells. *Nature*, 494(7436), 261–265.
<https://doi.org/10.1038/nature11813>
- Kobayashi, S. D., & Deleo, F. R. (2012). Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine*, 1(3), 309–333.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.32>
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Kong, P., Christia, P., Saxena, A., Su, Y., & Frangogiannis, N. G. (2021). Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. 1363–1372.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00395.2013>
- Koster, M. I., & Roop, D. R. (2007). *Mechanisms Regulating Epithelial Stratification*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123357>
- Kowolik, C. M., Topp, M. S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D. D., Forman, S. J., Jensen, M. C., & Cooper, L. J. N. (2006). CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Research*, 66(22), 10995–11004.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0160>
- Kristo, M., Situm, M., Ceovic, R. (2020). Systemic therapies for advanced basal cell and cutaneous squamous cell carcinomas: novel targeted therapies and immunotherapies. *Acta Dermatovenerol*, 28(2):80-92
- Krummel, B. M. F., & Allison, J. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 459–465.
- Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., Berthiaume, F. (2018). The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in Physiology*.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>
- Kuhn, S., Hyde, E. J., Yang, J., Rich, F. J., Harper, J. L., Kirman, J. R., & Ronchese, F. (2013). Increased Numbers of Monocyte-Derived Dendritic Cells during Successful Tumor Immunotherapy with Immune-Activating Agents. *The Journal of Immunology*, 191(4), 1984–1992.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301135>
- Kuhn, S., Yang, J., & Ronchese, F. (2015). Monocyte-derived dendritic cells are essential for CD8+ T cell activation and antitumor responses after local

- immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6(NOV), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00584>
- Kundu, N., Fulton, A.M..(1997). Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis. *Cell. Immunol.* 180: 55-61
- L**
- Lai, G. N., Hsu, A., Mandell, M. A., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., Iparraguirre, A., Cavanagh, L. L., Triccas, J. A., Beverley, S. M., Scott, P., & Weninger, W. (2008). Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathogens*, 4(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000222>
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2013). Structure and function of skin, hair and nails. In *Medicine (United Kingdom)*.
<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.04.017>
- Langenkamp, A., Casorati, G., Garavaglia, C., Dellabona, P., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2002). T cell priming by dendritic cells: Thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification. *European Journal of Immunology*, 32(7), 2046–2054.
[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200207\)32:7<2046::AID-IMMU2046>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200207)32:7<2046::AID-IMMU2046>3.0.CO;2-M)
- Laoui, D., Keirsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichien, D., Serneels, J., Scott, C. L., Boon, L., De Baetselier, P., Mazzone, M., Guillems, M., & Van Ginderachter, J. A. (2016). The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nature Communications*, 7, 1–17.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13720>
- Largeot, A., Pagano, G., Gonder, S., Moussay, E., Paggetti, J. (2019) The B-side of cancer immunity: the underrated tune. *Cells*, 8(5):449.
<https://doi.org/10.3390/cells8050449>
- Lau, J., Cheung, J., Navarro, A., Lianoglou, S., Haley, B., Totpal, K., Sanders, L., Koeppen, H., Caplazi, P., McBride, J., Chiu, H., Hong, R., Grogan, J., Javinal, V., Yauch, R., Irving, B., Belvin, M., Mellman, I., Kim, J. M., & Schmidt, M. (2017). Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nature Communications*, 8.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14572>
- Le Naour, J., Galluzzi, L., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Vacchelli, E. (2020). Trial watch: TLR3 agonists in cancer therapy. *OncImmunology*, 9(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1771143>
- Lebre, M. C., van der Aar, A. M. G., van Baarsen, L., van Capel, T. M. M., Schuitemaker, J. H. N., Kapsenberg, M. L., & de Jong, E. C. (2007). Human keratinocytes express functional toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(2), 331–341.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>
- Lee, A., Duggan, S., & Deeks, E. D. (2020). Cemiplimab: A Review in Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. In *Drugs*.
<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01302-2>
- Lee, C. H., Wu, S. B., Hong, C. H., Yu, H. S., & Wei, Y. H. (2013). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: The implication in UV-based phototherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6414–6435.
<https://doi.org/10.3390/ijms14036414>
- Leliefeld, P. H. C., Koenderman, L., & Pillay, J. (2015). How neutrophils shape adaptive immune responses.

- Frontiers in Immunology*, 6(SEP), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00471>
- Lenzi, R., Rosenblum, M., Verschraegen, C., Kudelka, A. P., Kavanagh, J. J., Hicks, M. E., Lang, E. A., Nash, M. A., Levy, L. B., Garcia, M. E., Platsoucas, C. D., Abbruzzese, J. L., & Freedman, R. S. (2002). Phase I study of intraperitoneal recombinant human interleukin 12 in patients with Müllerian carcinoma, gastrointestinal primary malignancies, and mesothelioma. *Clinical Cancer Research*, 8(12), 3686–3695.
- Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., & Ryan, J. L. (1997). Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12 associated toxicity and interferon- γ production. *Blood*, 90(7), 2541–2548.
<https://doi.org/10.1182/blood.V90.7.2541>
- Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghi, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J. A., Candido, S., & Libra, M. (2018). Cutaneous melanoma : From pathogenesis to therapy (Review). *International Journal of Oncology* 1071–1080.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>
- Leung-Theung-Long, S., & Guerder, S. (2008). Les cellules Th17. Une nouvelle population de cellules T CD4 effectrices pro-inflammatoires. *Medecine/Science* 2008 ; 24 :972-6.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 678–689.
<https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Li, Y., Wang, L-X., Yang, G., Hao, F., Urba, W.J., Hu, H-M. (2008). Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Research*, 68(17), 6889-6895.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0161>
- Li, M.O., & Rudensky, A.Y. (2014). T cell receptor signaling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol*, 16(4) : 220-223.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.26>.
- Lin, K-Y., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F. (1996). Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Research*.
- Lin, L., Rayman, P., Pavicic, P. G., Tannenbaum, C., Hamilton, T., Montero, A., Ko, J., Gastman, B., Finke, J., Ernstoff, M., & Diaz-Montero, C. M. (2019). Ex vivo conditioning with IL-12 protects tumor-infiltrating CD8 + T cells from negative regulation by local IFN- γ . *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(3), 395–405.
<https://doi.org/10.1007/s00262-018-2280-3>
- Lin, E. Y., & Pollard, J. W. (2007). Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Research*, 67(11), 5064–5066.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0912>
- Little, R. F., Pluda, J. M., Wyvill, K. M., Rodriguez-Chavez, I. R., Tosato, G., Catanzaro, A. T., Steinberg, S. M., & Yarchoan, R. (2006). Activity of subcutaneous interleukin-12 in AIDS-related Kaposi sarcoma. *Blood*, 107(12), 4650–4657.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4455>
- Liu, Y.; O'Leary, C.E.; Wang, L.S.; Bhatti, T.R.; Dai, N.; Kapoor, V.; Liu, P.; Mei, J.; Guo, L.; Oliver, P.M.; et al. CD11b+Ly6G+ cells inhibit tumor growth by suppressing IL-17 production at early stages of

- tumorigenesis. *Oncoimmunology* **2016**, 5, e1061175.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., & Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunology*, 8(6), 578–583. <https://doi.org/10.1038/ni1462>
- Lomas, A., Leonardi-Bee, J., Bath-Hextall, F. (2012). A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *BJD*. 1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10830.x>
- Loscalzo, D. E. H. R. C. J. (2011). 基因的 改变NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00403-012-1265-x>.The
- Loser, K., Apelt, J., Voskort, M., Mohaupt, M., Balkow, S., Schwarz, T., Grabbe, S., & Beissert, S. (2007). IL-10 Controls Ultraviolet-Induced Carcinogenesis in Mice. *The Journal of Immunology*, 179(1), 365–371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.365>
- Loyher, P.L., Hamon, P., Laviron, M., Meghraoui-Kheddar, A., Goncalves, E., Deng, Z., Tortensson, S., Bercovi, N., Baudesson de Chanville, C., Combadiere, B., et al. (2018). Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J. Exp. Med*, 215, 2536–2553.
- Lu, Y. A. N., Zhu, W., Tan, C., Yu, G., & Gu, J. (2002). *Melanocytes are Potential Immunocompetent Cells : Evidence from Recognition of Immunological Characteristics of Cultured Human Melanocytes*. 454–460.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Yang, J., Qian, J., & Yi, Q. (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4160–4171. <https://doi.org/10.1172/JCI65459>
- Luber, C. A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O’Keeffe, M., & Mann, M. (2010). Quantitative Proteomics Reveals Subset-Specific Viral Recognition in Dendritic Cells. *Immunity*, 32(2), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.01.013>
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., Roers, A., & Eming, S. A. (2010). Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3964–3977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>
- Lugini, L., Cecchetti, S., Huber, V., Luciani, F., Macchia, G., Spadaro, F., ... Fais, S. (2012). Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2833–2842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101988>
- Lyle, S., Christofidou-solomidou, M., Liu, Y., Elder, D. E., Albelda, S., & Cotsarelis, G. (1998). *The C8 / 144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells*. 3188, 3179–3188.

M

- Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S. R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J. P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., Martins, I., Schlemmer, F., Michaud, M., Kepp, O., Sukkurwala, A. Q., Menger, L., Vacchelli, E., Droin, N., Galluzzi, L., ... Kroemer, G. (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 38(4), 729–741. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.003>
- Madan, V., Lear, J. T., & Szeimies, R. (2010). Non-melanoma skin cancer.

- The Lancet*, 375(9715), 673–685.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61196-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61196-X)
- Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Rivière, I., & Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nature Biotechnology*, 20(1), 70–75. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-70>
- Maier, B., Leader, A. M., Chen, S. T., Tung, N., Chang, C., LeBerichel, J., Chudnovskiy, A., Maskey, S., Walker, L., Finnigan, J. P., Kirkling, M. E., Reizis, B., Ghosh, S., D'Amore, N. R., Bhardwaj, N., Rothlin, C. V., Wolf, A., Flores, R., Marron, T., ... Merad, M. (2020). A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity. *Nature*, 580(7802), 257–262. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2134-y>
- Malissen, B., Tamoutounour, S., & Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 417–428. <https://doi.org/10.1038/nri3683>
- Mamessier, E., Sylvain, A., Thibault, M. L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., Viens, P., Birnbaum, D., Bertucci, F., Moretta, A., & Olive, D. (2011). Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3609–3622. <https://doi.org/10.1172/JCI45816>
- Manegold, C., van Zandwijk, N., Szczesna, A., Zatloukal, P., Au, J. S. K., Blasinska-Morawiec, M., Serwatowski, P., Krzakowski, M., Jassem, J., Tan, E. H., Benner, R. J., Ingrosso, A., Meech, S. J., Readett, D., & Thatcher, N. (2012). A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 23(1), 72–77. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr030>
- Manegold, Christian, Gravenor, D., Woytowicz, D., Mezger, J., Hirsh, V., Albert, G., Al-Adhami, M., Readett, D., Krieg, A. M., & Leichman, C. G. (2008). Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(24), 3979–3986. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.5807>
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., & Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231–234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
- Mannino, M.H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., wakefield, M.R., Fang, Y. (2015). The paradoxal role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett* 367:103-107
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8), 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Marin-Acevedo, J. A., Dholaria, B., Soyano, A. E., Knutson, K. L., Chumsri, S., & Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: New developments and challenges. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0582-8>

- Mariuzza, R.A., Agnihotri, P., Orban, J. (2020). The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *JBC Review*. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009411>
- Marks, R., Nichols, S., King, C. S., National, W., Park, H., Cf, C., Marks, R., & King, S. (1981). Studies on isolated corneocytes. *258*, 251–258.
- Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., van Loo, P., McLaren, S., wedge, D.C., Fullman, A., Alexandrov, L.B., Tubio, J.M., et al. (2015). Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science*, *348*, 880–886
- Martín-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U. E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2003). Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node. *The Journal of Experimental Medicine*, *198*(4), 615–621. <https://doi.org/10.1084/jem.20030448>
- Massena, S., Christoffersson, G., Vågesjö, E., Seignez, C., Gustafsson, K., Binet, F., Hidalgo, C. H., Giraud, A., Lomei, J., Weström, S., Shibuya, M., Claesson-Welsh, L., Gerwins, P., Welsh, M., Kreuger, J., & Phillipson, M. (2015). Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood*.
- Maturo, M. G., Rac, S., Heidenreich, B., Pellegrini, C., Srinivas, N., Requena, C., Serra-guillen, C., Lombart, B., Sanmartin, O., Guillen, C., Nardo, L. di, Peris, K., Fagnoli, M. C., Nagore, E., & Rajiv, K. (2020). *Coding and noncoding somatic mutations in candidate genes in basal cell carcinoma*. 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65057-2>
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *371*(16), 1507–1517. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1407222>
- McDaniel, B., Badri, T., Steele, R.B. (2020). Basal Cell Carcinoma. *StatPearls*.
- McGrath, J. A. (2016). *Structure and function of the skin*.
- Meindert, S. M., Baker, G., Van Wijk, S., Beuger, B. M., Geissler, J., Jansen, M. H., Saris, A., Brinke, A. Ten, Kuijpers, T. W., Van Den Berg, T. K., & Van Bruggen, R. (2019). Neutrophils acquire antigen-presenting cell features after phagocytosis of IgG-opsinized erythrocytes. *Blood Advances*, *3*(11), 1761–1773. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018028753>
- Melero-Jerez, C., Ortega, M. C., Moliné-Velázquez, V., & Clemente, D. (2016). Myeloid derived suppressor cells in inflammatory conditions of the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1862*(3), 368–380. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.015>
- Meng, Y., Carpentier, A. F., Chen, L., Boissier, G., Simon, J. M., Mazon, J. J., & Delattre, J. Y. (2005). Successful combination of local CpG-ODN and radiotherapy in malignant glioma. *International Journal of Cancer*, *116*(6), 992–997. <https://doi.org/10.1002/ijc.21131>
- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I.,

- Weissman, I. L., Cyster, J. G., & Engleman, E. G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology*, 3(12), 1135–1141. <https://doi.org/10.1038/ni852>
- Meredith, M. M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A. O., Schreiber, H. A., Guermonprez, P., Idoyaga, J., Cheong, C., Yao, K.-H., Niec, R. E., & Nussenzweig, M. C. (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1153–1165. <https://doi.org/10.1084/jem.20112675>
- Migden, M. R., Rischin, D., Schmults, C. D., Guminski, A., Hauschild, A., Lewis, K. D., Chung, C. H., Hernandez-Aya, L., Lim, A. M., Chang, A. L. S., Rabinowits, G., Thai, A. A., Dunn, L. A., Hughes, B. G. M., Khushalani, N. I., Modi, B., Schadendorf, D., Gao, B., Seebach, F., ... Fury, M. G. (2018). PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1805131>
- Migden, M.R., Khushalani, N.I., Chang, A.L.S., Lewis, K.D., Schmults, C.D., Hernandez-Aya, L., Meier, F., Schadendorf, D., Guminski, A., Hauschild, A., Et al., (2020). Cemiplimab in locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma: Results from an open-label phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*, 21,294-305
- Mildner, A., & Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, 40(5), 642–656. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>
- Minutti, C. M., Knipper, J. A., Allen, J. E., & Zaiss, D. M. W. (2017). Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 61, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.006>
- Modi, B. G., Neustadter, J., Binda, E., Lewis, J., Filler, R. B., Roberts, J., Kwong, B. Y., Reddy, S., Overton, J. D., Galan, A., Cai, L., Fu, P., Shlomchik, M., Kaplan, D. H., Hayday, A., & Girardi, M. (2012). *Langerhans cells facilitate epithelial dna damage*. 335(6064), 104–108. <https://doi.org/10.1126/science.1211600.Langerhans>
- Montaudié, H., Viotti, J., Combemale, P., Dutriaux, C., Dupin, N., Robert, C., Mortier, L., Kaphan, R., Duval-Modeste, A. B., Dalle, S., De Quatrebarbes, J., Stefan, A., Brunet-Possenti, F., Kogay, M., Picard-Gauci, A., Poissonnet, G., & Peyrade, F. (2020). Cetuximab is efficient and safe in patients with advanced cutaneous squamous cell carcinoma: A retrospective, multicentre study. *Oncotarget*, 11(4), 378–385. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27434>
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., ... , Rogers-Freezer, L.J., Mavroukakis, S.A., Rosenberg, S.A. (2006). Cancer Regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 126-129
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Moskalev, A. A., Shaposhnikov, M. v, Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., & Fraifeld, V. E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*, 12(2), 661–684.

- <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- Motzer, R. J., Rakhit, A., Schwartz, L. H., Olencki, T., Malone, T. M., Sandstrom, K., Nadeau, R., Parmar, H., & Bukowski, R. (1998). Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 4(5), 1183–1191.
- Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T. K., Plimack, E. R., Barthélémy, P., Porta, C., George, S., Powles, T., Donskov, F., Neiman, V., Kollmannsberger, C. K., Salaman, P., Gurney, H., Hawkins, R., Ravaud, A., Grimm, M.-O., ... Escudier, B. (2018). Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 378(14), 1277–1290. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1712126>
- Moussai, D., Mitsui, H., Pettersen, J. S., Pierson, K. C., Shah, K. R., Suárez-Fariñas, M., Cardinale, I. R., Bluth, M. J., Krueger, J. G., & Carucci, J. A. (2011). The human cutaneous squamous cell carcinoma microenvironment is characterized by increased lymphatic density and enhanced expression of macrophage-derived VEGF-C. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(1), 229–236. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.26>
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van Bossche, J. Den, Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., & Van Ginderachter, J. A. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Research*, 70(14), 5728–5739. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4672>
- Mumm, J. B., Emmerich, J., Zhang, X., Chan, I., Wu, L., Mauze, S., Blaisdell, S., Basham, B., Dai, J., Grein, J., Sheppard, C., Hong, K., Cutler, C., Turner, S., LaFace, D., Kleinschek, M., Judo, M., Ayanoglu, G., Langowski, J., ... Oft, M. (2011). IL-10 Elicits IFN γ -Dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell*, 20(6), 781–796. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.003>
- Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., & Murphy, T. L. (2000). Signaling and Transcription in T Helper development. 451–494
- ### N
- Nakamizo, S., Dutertre, C—A., Khalilnezhad, A., ..., Hacini-Rachinel, F., Kabashima, K., Ginhoux, F. (2021). Single-cell analysis of human skin identifies CD14+ type 3 dendritic cells co-producing IL1B and IL23A in psoriasis. *J. Exp. Med.*
- Nakagawa, S., Koomen, C. W., Bos, J. D., & Teunissen, M. B. (1999). Differential modulation of human epidermal Langerhans cell maturation by ultraviolet B radiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(10), 5192–5200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553039>
- Narayan, S., (2009). Epithelial expression of human papillomavirus type 16 E7 protein results in peripheral CD8 T-cell suppression mediated by CD4+CD25+ T cells. *Eur Journal of Immunology*
- Nemunaitis, J., Fong, T., Shabe, P., Martineau, D., Ando, D. (2001).

- Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest* 19: 239-247
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J-Z., Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Review Immunology*.
- Nguyen, K.G., Vrabel, M.R., Mantooth, S., Hopkins, J.J., Wagner, E.S., Gabaldon, T.A., Zaharoff, D.A. (2020). Localized interleukin-12 for cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575597>
- Ngwa, W., Irabor, O. C., Schoenfeld, J. D., Hesser, J., Demaria, S., & Formenti, S. C. (2018). Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nature Reviews Cancer*, 18(5), 313–322.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2018.6>
- Nishibu, A., Ward, B. R., Jester, J. V., Ploegh, H. L., Boes, M., & Takashima, A. (2006). Behavioral responses of epidermal Langerhans cells in situ to local pathological stimuli. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(4), 787–796.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700107>
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2), 141–151.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8)
- Nissinen, L., Farshchian, M., Riihilä, P., & Kähäri, V. M. (2016). New perspectives on role of tumor microenvironment in progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 691–702.
<https://doi.org/10.1007/s00441-016-2457-z>
- Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Bell, D., Burkeholder, S., Kraus, E. T., Davoust, J., & Palucka, K. A. (2000). Dendritic Cells Capture Killed Tumor Cells and Present Their Antigens to Elicit Tumor-Specific Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 165(7), 3797–3803.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3797>
- O**
- O’Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8(3), 275–283.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80533-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80533-6)
- O’Garra, A., Barrat, F.J., Castro, A.G., Vicari, A., Hawrylowicz, C. (2008). Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 223: 114-131
- O’Keeffe, M., Mok, W. H., & Radford, K. J. (2015). Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(22), 4309–4325.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2005-0>
- Ohms, M., Möller, S., & Laskay, T. (2020). An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–12.
- Orkin, S.H., & Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132, 631–644.
- Otegbeye, F., Ojo, E., Moreton, S., Mackowski, N., Lee, D. A., De Lima, M., & Wald, D. N. (2018). Inhibiting TGF-beta signaling preserves the function of highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models. *PLoS ONE*, 13(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191358>
- Ott, P. A., Hu, Z., Keskin, D. B., Shukla, S. A., Sun, J., Bozym, D. J., Zhang, W., Luoma, A., Giobbie-Hurder, A., Peter, L., Chen, C., Olive, O., Carter,

- T. A., Li, S., Lieb, D. J., Eisenhaure, T., Gjini, E., Stevens, J., Lane, W. J., ... Wu, C. J. (2017). An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*, *547*(7662), 217–221.
<https://doi.org/10.1038/nature22991>
- Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., & Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*, *9*(5), 745–755.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80671-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80671-8)
- P**
- Park, J., Li, H., Zhang, M., Lu, Y., Hong, B., Zheng, Y., He, J., Yang, J., Qian, J., & Yi, Q. (2014). Murine Th9 cells promote the survival of myeloid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *63*(8), 835–845.
<https://doi.org/10.1007/s00262-014-1557-4>
- Pashenkov, M., Goëss, G., Wagner, C., Hörmann, M., Jandl, T., Moser, A., Britten, C. M., Smolle, J., Koller, S., Mauch, C., Tantcheva-Poor, I., Grabbe, S., Loquai, C., Esser, S., Franckson, T., Schneeberger, A., Haarmann, C., Krieg, A. M., Stingl, G., & Wagner, S. N. (2006). Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(36), 5716–5724.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.9129>
- Passlick, B., Flieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, *74*(7), 2527–2534.
<https://doi.org/10.1182/blood.v74.7.2527.2527>
- Peranzoni, E., Lemoine, J., Vimeux, L., Feuillet, V., Barrin, S., Kantari-Mimoun, C., Bercovici, N., Guérin, M., Biton, J., Ouakrim, H., Régnier, F., Lupo, A., Alifano, M., Damotte, D., & Donnadieu, E. (2018). Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(17), E4041–E4050.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1720948115>
- Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M., & Schneck, J. (2015). Adoptive T Cell Immunotherapy For Cancer. *Rambam Maimonides Medical Journal*, *6*(1), e0004.
<https://doi.org/10.5041/rmmj.10179>
- Piccard, H., Muschel, R. J., & Opdenakker, G. (2012). On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *82*(3), 296–309.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.06.004>
- Pickering, C. R., Zhou, J. H., Lee, J. J., Drummond, J. A., Peng, S. A., Saade, R. E., Tsai, K. Y., Curry, J. L., Tetzlaff, M. T., Lai, S. Y., Yu, J., Muzny, D. M., Doddapaneni, H., Shinbrot, E., Covington, K. R., Zhang, J., Seth, S., Caulin, C., Clayman, G. L., ... Frederick, M. J. (2014). *Mutational Landscape of Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma*. *20*(6), 6582–6593.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1768>
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M., & Koenderman, L. (2013). Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: Similarities and differences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(20), 3813–3827.

- <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1286-4>
- Plager, D. A., Bieber, T., & Pittelkow, M. R. (2014). Structure of the Skin and Cutaneous Immunology. In *Middleton's Allergy: Principles and Practice: Eighth Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08593-9.00034-6>
- Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., André, P., Dieu-Nosjean, M. C., Alifano, M., Régnard, J. F., Fridman, W. H., Sautès-Fridman, C., & Cremer, I. (2011). Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Research*, *71*(16), 5412–5422. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4179>
- Pogorzelska-Dyrbuś, J., & Szepietowski, J. C. (2020). Density of Langerhans Cells in Nonmelanoma Skin Cancers: A Systematic Review. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8745863>
- Pollard, R., & W., J. (2015). Tumor-associated macrophages : from mechanisms to therapy. *Immunity*, *41*(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010.Tumor-associated>
- Ponzetta, A.; Carriero, R.; Carnevale, S.; Barbagallo, M.; Molgora, M.; Perucchini, C.; Magrini, E.; Gianni, F.; Kunderfranco, P.; Polentarutti, N.; et al. Neutrophils Driving Unconventional T Cells Mediate Resistance against Murine Sarcomas and Selected Human Tumors. *Cell* **2019**, *178*, 346–360.
- Portielje, J. E. A., Lamers, C. H. J., Kruit, W. H. J., Sparreboom, A., Bolhuis, R. L. H., Stoter, G., Huber, C., & Gratama, J. W. (2003). Repeated Administrations of Interleukin (IL)-12 Are Associated with Persistently Elevated Plasma Levels of IL-10 and Declining IFN- γ , Tumor Necrosis Factor- α , IL-6, and IL-8 Responses. *Clinical Cancer Research*, *9*(1), 76–83.
- Postow, M.A., Callahan, M.K., Barker, C.A., ... , Lesokhin, A.M., Gnjatic, S., Wolchok, J.D. (2012). Immunologic correlates of the abscopal effect in patient with melanoma. *The New England Journal of Medicine*.
- Poulin, L. F., Henri, S., de Bovis, B., Devillard, E., Kissenpfennig, A., & Malissen, B. (2007). The dermis contains langerin + dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells . *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(13), 3119–3131. <https://doi.org/10.1084/jem.20071724>
- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J-L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., Le Moine, A., Faure, F., Donckier, V., Sancho, D., Cerundolo, V., Bonnet, D., Reis e Sousa, C. (2010). Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse C8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med* *207*(6): 1261-1271. <https://doi.org/10.1084/jem.20092618>
- Poulin, L.F., Reyat, Y., Urenon-Hansson, H., Schraml, B., Sancho, D., Murphy, K.M., Hkansson, U.K., Moita, L.F., Agace, W.W., Bonnet, D., Reis e Sousa, C. (2012). DNNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1182/blood-2112-01-406967>
- Powderly, J., Cote, G., Flaherty, K., Szmulewitz, R. Z., Ribas, A., Weber, J., Loo, D., Baughman, J., Chen, F., Moore, P., Bonvini, E., Vasselli, J., Wigginton, J., Cohen, R., Burris, H., & Chmielowski, B. (2015). Interim results of an ongoing Phase I, dose

escalation study of MGA271 (Fc-optimized humanized anti-B7-H3 monoclonal antibody) in patients with refractory B7-H3-expressing neoplasms or neoplasms whose vasculature expresses B7-H3. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(Suppl 2), O8.
<https://doi.org/10.1186/2051-1426-3-S2-O8>

Pradhan, S., Kim, H. K., Thrash, C. J., Cox, M. A., Mantena, S. K., Wu, J.-H., Athar, M., Katiyar, S. K., Elmets, C. A., & Timares, L. (2008). A Critical Role for the Proapoptotic Protein Bid in Ultraviolet-Induced Immune Suppression and Cutaneous Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 181(5), 3077–3088.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3077>

Proietto, A.I., Mittag, D., Roberts, A.w., Sprigg, N., Wu, L. (2012). The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34⁺ stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin. *Cellular & Molecular Immunology*, 446 – 454.

Puza, C. J., Beasley, G. M., Barbas, A. S., & Mosca, P. J. (2020). Type of Organ Transplanted Impacts the Risk and Presentation of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Transplant Recipients. 93–97.
<https://doi.org/10.6002/ect.2018.0238>

Q

Qian, B-Z., Li, J., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. *Nature*, 475(7355):222-225.
<https://doi.org/10.1038/nature10138>

Qu, P., Du, Du, H., W, X., Y, C. (2009). Matrix-metalloproteinase 12 overexpression in lung epithelial cells plays a key role in emphysema to lung bronchioalveolar adenocarcinoma

transition. *Cancer Res.* 69(18):7252-7261. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0577>

Queen, M. M., Ryan, R. E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., & Jorcyk, C. L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: Potential implications for tumor progression. *Cancer Research*, 65(19), 8896–8904.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1734>

R

Raaby, L., Rosada, C., Langkilde, A., Lauridsen, K. L., Vinter, H., Ommen, P., Kjellerup, R. B., Johansen, C., & Iversen, L. (2017). Langerhans cell markers CD1a and CD207 are the most rapidly responding genes in lesional psoriatic skin following adalimumab treatment. *Experimental Dermatology*, 26(9), 804–810.
<https://doi.org/10.1111/exd.13304>

Rangel-huerta, E., & Maldonado, E. (2017). *Review Article Transit-Amplifying Cells in the Fast Lane from Stem Cells towards Differentiation*. 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/7602951>

Rao, H. L., Chen, J. W., Li, M., Xiao, Y. B., Fu, J., Zeng, Y. X., Cai, M. Y., & Xie, D. (2012). Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS ONE*, 7(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030806>

Read, W. L., Brumund, K. T., Weisman, R. A., & Nguyen, A. Q. (2015). Squamous cell carcinomas of the skin responsive to erlotinib: 5 cases. *JAAD Case Reports*, 1(3), 153–156.
<https://doi.org/10.1016/j.jdc.2015.02.014>

Reeves, E. & James, E. (2016). Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology*.

- Reid, C.D., Stackpoole, A., Maeger, A., Tikerpa, J. (1992) Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth *in vitro* from early bipotent CD34⁺ progenitors in human bone marrow. *J Immunol*, 149(8):2681-8.
- Reiner, S.L. E (2007). Development in motion: Helper T cells at work. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.019>
- Reis E Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*, 6(6), 476–483. <https://doi.org/10.1038/nri1845>
- Ricard-blum, S. (2011). *The Collagen Family*. 1–19.
- Rivera-gonzalez, G., Shook, B., & Horsley, V. (2014). *Adipocytes in Skin Health and Disease*. 1–18.
- Roda, J. M., Parihar, R., Magro, C., Nuovo, G. J., Tridandapani, S., & Carson, W. E. (2006). Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Research*, 66(1), 517–526. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2429>
- Rodero, M. P., & Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(7), 643–653.
- Roediger, B., Ng, L. G., Smith, A. L., Barbara, B. F., & Weninger, W. (2008). Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6), 1131–1146. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0531-7>
- Romani, B. N., Koide, S., Crowley, M., Pack, M. W., Livingstone, A. M., Fathman, C. G., Inaba, K., & Steinman, R. M. (1989). Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones.
- Romani, N., Thurnher, M., Idoyaga, J., Steinman, R. M., & Flacher, V. (2010). Targeting of antigens to skin dendritic cells: Possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunology and Cell Biology*, 88(4), 424–430. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.39>
- Rook, A. H., Wood, G. S., Yoo, E. K., Elenitsas, R., Kao, D. M. F., Sherman, M. L., Witmer, W. K., Rockwell, K. A., Shane, R. B., Lessin, S. R., & Vonderheid, E. C. (1999). Interleukin-12 therapy of cutaneous T-cell lymphoma induces lesion regression and cytotoxic T-cell responses. *Blood*, 94(3), 902–908. https://doi.org/10.1182/blood.v94.3.902.415k23_902_908
- Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., Simpson, C., R.N., Carter, C., et al., (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM198812223192527>
- Rozali, E. N., Hato, S. V., Robinson, B. W., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2012). Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/656340>
- Rubinstein, M.P., Cloud, C.A., Garrett, T.E., Moore, C.J., BA., Schwartz, K.M., Jonhson, C.B., Craig, D.H., Salem, M.L., Paulos, C.M., Cole, D.J. (2012). Ex vivo IL-12-priming during CD8⁺ T cell activation dramatically improves adoptive T cell transfer anti-tumor efficacy in a lymphodepleted host. *J Am Coll Surg*. 214(4):700-708.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijamcollsurg.2011.12.034>.
- Rudman, S. M., Philpott, M. P., Thomas, G. A., & Kealey, T. (1997). The role of IGF-I in human skin and its appendages: Morphogen as well as mitogen? *Journal of Investigative Dermatology*, *109*(6), 770–777. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12340934>
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M. T., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E. S., Rugo, H. S., & Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 Blocks CD8⁺ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell*, *26*(5), 623–637. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.006>
- Rulifson, I. C., Sperling, A. I., Fields, P. E., Fitch, F. W., & Bluestone, J. A. (1997). CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *158*(2), 658–665. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8992981>
- Ruiz, E. S., Karia, P. S., Besaw, R., & Schmults, C. D. (2019). Performance of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 8th Edition vs the Brigham and Women’s Hospital Tumor Classification System for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Dermatology*. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2019.0032>
- S**
- Sahin, U., Derhovanessian, E., Miller, M., Kloke, B. P., Simon, P., Löwer, M., Bukur, V., Tadmor, A. D., Luxemburger, U., Schrörs, B., Omokoko, T., Vormehr, M., Albrecht, C., Paruzynski, A., Kuhn, A. N., Buck, J., Heesch, S., Schreeb, K. H., Müller, F., ... Türeci, Ö. (2017). Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*, *547*(7662), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature23003>
- Sallusto, F., Mackay, C. R., & Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*, *277*(5334), 2005–2007. <https://doi.org/10.1126/science.277.5334.2005>
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *Journal of Experimental Medicine*, *179*(4), 1109–1118. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>
- Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M-C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(3):899-910. <https://doi.org/10.1172/JCI45817>
- Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M-C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of Clinical Investigation*.
- Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., Chakarov, S., Rivera, C., Hogstad, B., Bosenberg, M., Hashimoto, D., Gnjatic, S., Bhardwaj, N., Palucka, A. K., Brown, B. D., ... Merad, M. (2016). Expansion and Activation of CD103⁺ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site

- Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*, 44(4), 924–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.03.012>
- Saporona, M., Pala, L., conforti, F., Rubatto, M., De Risi, I., Spagnolo, F., Guida, M., Bossi, P., Quaglini, P., Queirolo, P. (2020). Patients with locally advanced and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma treated with immunotherapy in the era of COVID-19: stop or go? Data from five Italian referral cancer centers. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. <https://doi.org/10.1177/14588359207977002>
- Sawanobori, Y., Ueha, S., Kurachi, M., Shimaoka, T., Talmadge, J. E., Abe, J., Shono, Y., Kitabatake, M., Kakimi, K., Mukaida, N., & Matsushima, K. (2008). Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood*, 111(12), 5457–5466. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-136895>
- Schade, N., Esser, C., & Krutmann, J. (2005). Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: Molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4(9), 699–708. <https://doi.org/10.1039/b418378a>
- Schlitzer, A., McGovern, N., & Ginhoux, F. (2015). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 41, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.011>
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A. W. S., See, P., Shin, A., Wasan, P. S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H. A., Hilkens, C. M. U., Tam, J., Poidinger, M., ... Ginhoux, F. (2013). IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity*, 38(5), 970–983. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.011>
- Schmults, C. D., Karia, P. S., Carter, J. B., Han, J., & Qureshi, A. A. (2013). Factors Predictive of Recurrence and Death From Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Dermatology*. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.2139>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoeediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Grandien, A., & Ljunggren, H. G. (2005). Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Molecular Immunology*, 42(4 SPEC. ISS.), 495–499. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.033>
- See, P., Dutertre, C. A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S. E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., Bin Sumatoh, H. R., Ruffin, N., Jouve, M., Gea-Mallorquí, E., Hennekam, R. C. M., Lim, T., Yip, C. C., Wen, M., Malleret, B., ... Ginhoux, F. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*, 356(6342), 1–23. <https://doi.org/10.1126/science.aag3009>
- Segura, E., & Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in Immunology*, 34(9), 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.001>
- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiochia, G.,

- Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., & Amigorena, S. (2013). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity*, 38(2), 336–348.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.018>
- Seiji, M., Fitzpatrick, T. B., & Birbeck, M. S. C. (1960). The Melanosome: A Distinctive Subcellular Particle of Mammalian Melanocytes and the Site of Melanogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, 36(4), 243–252.
<https://doi.org/10.1038/jid.1961.42>
- Senoo, M. (2013). *Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin*. 2(6), 273–282.
<https://doi.org/10.1089/wound.2012.0372>
- Serre, G., Mils, V., Haftek, M., Vincent, C., Croute, F., Réano, A., Ouhayoun, JP., Bettinger, D., Soleilhavoup, JP. (1991). *Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in reorganised desmosomes and bound to cross-linked envelope*. *J Invest Dermatol*, 1991;97:1061-1072.
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 345–358.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
- Shaver, K. A., Croom-Perez, T. J., & Copik, A. J. (2021). Natural Killer Cells: The Linchpin for Successful Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12(April), 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.679117>
- Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M., & Swartz, M. A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, 328(5979), 749–752.
<https://doi.org/10.1126/science.1185837>
- Silvestre-Roig, C., Hidalgo, A., & Soehnlein, O. (2016). Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 127(18), 2173–2181.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-688887>
- Slaney, C. Y., Kershaw, M. H., & Darcy, P. K. (2014). Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Research*, 74(24), 7168–7174.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2458>
- Śledzińska, A., Vila de Mucha, M., Bergerhoff, K., Hotblack, A., Demane, D. F., Ghorani, E., Akarca, A. U., Marzolini, M. A. V., Solomon, I., Vargas, F. A., Pule, M., Ono, M., Seddon, B., Kassiotis, G., Ariyan, C. E., Korn, T., Marafioti, T., Lord, G. M., Stauss, H., ... Quezada, S. A. (2020). Regulatory T Cells Restrain Interleukin-2- and Blimp-1-Dependent Acquisition of Cytotoxic Function by CD4+ T Cells. *Immunity*, 52(1), 151-166.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.007>
- Slingluff, C. L., Petroni, G. R., Chianese-Bullock, K. A., Smolkin, M. E., Hibbitts, S., Murphy, C., Johansen, N., Grosh, W. W., Yamshchikov, G. v., Neese, P. Y., Patterson, J. W., Fink, R., & Rehm, P. K. (2007). Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multipeptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting. *Clinical Cancer Research*, 13(21), 6386–6395.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0486>
- Smith, D. A., Conkling, P., Richards, D. A., Nemunaitis, J. J., Boyd, T. E., Mita, A. C., De La Bourdonnaye, G., Wages, D., & Bexon, A. S. (2014). Antitumor activity and safety of combination therapy with the Toll-like receptor 9 agonist IMO-2055, erlotinib, and bevacizumab in advanced or metastatic non-small cell

- lung cancer patients who have progressed following chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(8), 787–796.
<https://doi.org/10.1007/s00262-014-1547-6>
- Smith, S. G., Koppolu, B. prasanth, Ravindranathan, S., Kurtz, S. L., Yang, L., Katz, M. D., & Zaharoff, D. A. (2015). Intravesical chitosan/interleukin-12 immunotherapy induces tumor-specific systemic immunity against murine bladder cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(6), 689–696.
<https://doi.org/10.1007/s00262-015-1672-x>
- Smoller, B. R. (2006a). Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathology*, 19, 34–40.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800508>
- Smoller, B. R. (2006b). *Squamous cell carcinoma : from precursor lesions to high-risk variants*. 88–92.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800509>
- Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2004). *Fibroblast heterogeneity : more than skin deep*.
<https://doi.org/10.1242/jcs.01005>
- Speiser, D. E., Liénard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A. M., Cerottini, J.-C., & Romero, P. (2005). Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 739–746.
<https://doi.org/10.1172/jci200523373>
- Spiegel, A., Brooks, M. W., Houshyar, S., Reinhardt, F., Ardolino, M., Fessler, E., Chen, M. B., Krall, J. A., Decock, J., Zervantonakis, I. K., Iannello, A., Iwamoto, Y., Cortez-Retamozo, V., Kamm, R. D., Pittet, M. J., Raulet, D. H., & Weinberg, R. A. (2016). Neutrophils suppress intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. *Cancer Discovery*, 6(6), 630–649.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1157>
- Spits, H., & Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: Emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annual Review of Immunology*, 30, 647–675.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075053>
- Spranger, S., & Gajewski, T. (2013). Rational combinations of immunotherapeutics that target discrete pathways. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 1, 1–14.
<https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-16>
- Spranger, S., & Gajewski, T. F. (2016). Tumor-intrinsic oncogene pathways mediating immune avoidance. *OncoImmunology*, 5(3), 1–7.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1086862>
- Stanoszek, L. M., Wang, G. Y., & Harms, P. W. (2017). *Histologic Mimics of Basal Cell Carcinoma*. 141(November).
<https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0222-RA>
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., Müller, G., Schuler, G., Knop, J., & Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen- specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, 93(5), 1634–1642.
<https://doi.org/10.1182/blood.v93.5.1634>
- Steinert, P. M., & Marekov, L. N. (1995). The Proteins Elafin , Filaggrin , Keratin Intermediate Filaments , Loricrin , and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodi-peptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope *. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 270(30), 17702–17711.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17702>
- Steinman, R. M., & Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449(7161), 419–426.
<https://doi.org/10.1038/nature06175>
- Stratigos, A. J., Garbe, C., Dessinioti, C., Lebbe, C., Bataille, V., Bastholt, L., Dreno, B., Concetta, M., Forsea, A. M., Frenard, C., Harwood, C. A., Hauschild, A., Hoeller, C., Kandolf-sekulovic, L., Kaufmann, R., Kelleners-smets, N. W. J., Malvehy, J., Middleton, M. R., Moreno-ramirez, D., ... On, J. G. (2020). ScienceDirect European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin : Part 2 . Treatment Association of Dermato-Oncology (EADO) and the European. *European Journal of Cancer*, 128, 83–102.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.01.008>
- Strid, J., Roberts, S. J., Filler, R. B., Lewis, J. M., Kwong, B. Y., Schpero, W., Kaplan, D. H., Hayday, A. C., & Girardi, M. (n.d.). 1, 4, 5. Lc.
- Styrt, B., & Klempner, M.S. (1988). Lysosomotropic amines modulate neutrophil calcium homeostasis. *J Cell Physiol*, 135(2):309-16.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1041350219>
- Sunderkötter, C., Nikolic, T., Dillon, M. J., van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D. A., & Leenen, P. J. M. (2004). Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, 172(7), 4410–4417.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4410>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. Global Cancer Stat 2020. *CA Cancer J Clin*.
- Tagliamento, M., Bironzo, P., & Novello, S. (2020). New emerging targets in cancer immunotherapy: The role of VISTA. *ESMO Open*, 4.
<https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000683>
- Takeshima, T., Pop, L. M., Laine, A., Iyengar, P., Vitetta, E. S., & Hannan, R. (2016). Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11300–11305.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1613187113>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., MontananaSanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B., & Henri, S. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, 39(5), 925–938.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>
- Tampa, M., Mitran, C. I., Mitran, M. I., Nicolae, I., Dumitru, A., Matei, C., Manolescu, L., Popa, G. L., Caruntu, C., & Georgescu, S. R. (2020). The Role of Beta HPV Types and HPV-Associated Inflammatory Processes in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Immunology Research*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/5701639>
- Tan, H.L., Yong, C., Tan, B.Z., Fong, W.J., Padmanabhan, J., Chin, A., Ding, V., Lau, A., Zheng, L., Bi, X., Yang, Y., Choo, A. (2018). Conservation of oncofetal antigens on human embryonic stem cells enables discovery of monoclonal antibodies

T

- against cancer. *Nature Comm.*
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-300700-z>
- Tarhini, A. A., Leng, S., Moschos, S. J., Yin, Y., Sander, C., Lin, Y., Gooding, W. E., & Kirkwood, J. M. (2012). Safety and immunogenicity of vaccination with MART-1 (26-35, 27L), gp100 (209-217, 210M), and tyrosinase (368-376, 370D) in adjuvant with PF-3512676 and GM-CSF in metastatic melanoma. *Journal of Immunotherapy*, 35(4), 359–366.
<https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31825481fe>
- Tazzyman, S., Lewis, C. E., & Murdoch, C. (2009). Neutrophils: Key mediators of tumour angiogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 222–231.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00641.x>
- Tecchio, C., Huber, V., Scapini, P., Calzetti, F., Margotto, D., Todeschini, G., Pilla, L., Martinelli, G., Pizzolo, G., Rivoltini, L., & Cassatella, M. A. (2004). IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*, 103(10), 3837–3844. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2806>
- Tennenberg, S. D., Zemlan, F. P., & Solomkin, J. S. (1988). Characterization of receptors on human neutrophils. Effects of isolation and temperature on receptor expression and functional activity. *The Journal of Immunology*, 141(11), 3937–3944.
- Tepper, R. I., Coffman, R. L., & Leder, P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*, 257(5069), 548–551.
<https://doi.org/10.1126/science.1636093>
- Terhorst, D., Chelbi, R., Wohn, C., Malosse, C., Tamoutounour, S., Jorquera, A., Bajenoff, M., Dalod, M., Malissen, B., & Henri, S. (2015). Dynamics and Transcriptomics of Skin Dendritic Cells and Macrophages in an Imiquimod-Induced, Biphasic Mouse Model of Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 195(10), 4953–4961.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500551>
- Thompson, J. F., Scolyer, R. A., & Kefford, R. F. (2005). *Cutaneous melanoma*. 365, 687–701.
- Thompson, J.A., Kuzel, T., Drucker, B.J., Urba, W.J., Bukowski, R.M.. (2009). Safety and efficacy of PF-3512676 for the treatment of stage IV renal cell carcinoma: an open-label multicenter phase I/II study. *Clin Genitourin Cancer*.
<https://doi.org/10.3816/CGC.2009.n.025>
- Thurner, B. B., Haendle, I., Röder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., Driesch, P. V. Den, Bröcker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kämpgen, E., & Schuler, G. (1999). Vaccination with Mage-3A1 Peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 1669-1678
- Ting, C-C., Lavrin, D.H., Shiu, G., Herberman, R.B. (1972). Expression of fetal antigens in tumor cells. *Proc. Nat.; Acad. Sci*, 1664-1668
- Tissot, F. S., Boulter, E., Estrach, S., & Féral, C. C. (2016). European Journal of Cell Biology The body's tailored suit : Skin as a mechanical interface. *European Journal of Cell Biology*, 95(11), 475–482.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.07.001>

- Toh, B., Wang, X., Keeble, J., Sim, W.J., Khoo, K., Wong, W-C., Kato, M., Prevost-Blondel, A., Thiery, J-P., Abastado, J-P. (2011). Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *Plos Biology*
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., & Lenz, H. J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - a target for novel cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 63, 40–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>.CXCL9
- Tommasino, M. (2019). HPV and skin carcinogenesis. *Papillomavirus Research*, 7(April), 129–131.
<https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.003>
- Tracy, L. E., Minasian, R. A., & Caterson, E. J. (2016). *Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound*. 5(3), 119–136.
<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0561>
- Trotta, R., Puorro, K. A., Paroli, M., Azzoni, L., Abebe, B., Eisenlohr, L. C., & Perussia, B. (1998). Dependence of both spontaneous and antibody-dependent, granule exocytosis-mediated NK cell cytotoxicity on extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Immunology*, 161(12), 6648–6656.
- Twyman-Saint Victor, C., Rech, A.J., Maity, A., ... , Wherry, E.J., Vonderheide, R.H., Minn, A.J. (2015). Radiation and Dual checkpoint blockade activates non redundant immune mechanism in cancer. *Nature*, 520(7547): 373-377.
<https://doi.org/10.10388/nature14292>
- U
- Uchi, H., Terao, H., Koga, T., & Furue, M. (2000). Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of Dermatological Science*, 24(SUPPL. 1), 29–38.
[https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00138-9](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00138-9)
- V
- Valmori, D., Souleimanian, N. E., Tosello, V., Bhardwaj, N., Adams, S., O'Neill, D., Pavlick, A., Escalon, J. B., Cruz, C. M., Angiulli, A., Angiulli, F., Mears, G., Vogel, S. M., Pan, L., Jungbluth, A. A., Hoffmann, E. W., Venhaus, R., Ritter, G., Old, L. J., & Ayyoub, M. (2007). Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 8947–8952.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703395104>
- van Herpen, C. M. L., van der Laak, J. A. W. M., de Vries, I. J. M., van Krieken, J. H., de Wilde, P. C., Balvers, M. G. J., Adema, G. J., & de Mulder, P. H. M. (2005). Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clinical Cancer Research*, 11(5), 1899–1909.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1524>
- Vanhakendover, L., Lebas, E., Libon, F., Wauters, O., Dezfoulian, B., Marchal, N., Rorive, A., Piret, P., Quatresooz, P., Jacquemin, D., & Nikkels, A. F. (2019). Locally advanced and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma treated with cemiplimab. *Revue Medicale de Liege*.
- van Mierlo, G. J. D., Boonman, Z. F. H. M., Dumortier, H. M. H., den Boer, A. T., Franssen, M. F., Nouta, J., van der Voort, E. I. H., Offringa, R., Toes, R. E. M., & Melief, C. J. M. (2004).

- Activation of Dendritic Cells That Cross-Present Tumor-Derived Antigen Licenses CD8 + CTL to Cause Tumor Eradication . *The Journal of Immunology*, 173(11), 6753–6759.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6753>
- Veglia, F., Sanseviero, E., & Gabrilovich, D. I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-00490-y>
- Végran, F., Berger, H., Boidot, R., Mignot, G., Bruchard, M., Dosset, M., Chalmin, F., Rébé, C., Dérangère, V., Ryffel, B., Kato, M., Prévost-Blondel, A., Ghiringhelli, F., & Apetoh, L. (2014). The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of T H9 cells. *Nature Immunology*, 15(8), 758–766.
<https://doi.org/10.1038/ni.2925>
- Veselá, S., Kingma, B. R. M., Frijns, A. J. H., & Marken, W. D. van. (2019). Effect of local skin blood flow during light and medium activities on local skin temperature predictions. *Journal of Thermal Biology*, 84(April), 439–450.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.033>
- Vignali, D.A.A, Collison, L.W., Workman, C.J (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev immunol*.
<https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Vigneron, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Research International*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/948501>
- Vijg, J. (2000). Somatic mutations and aging : a re-evaluation. *Mutation Research*.
- Villablanca, E. J., Zhou, D., Valentinis, B., Negro, A., Raccosta, L., Mauri, L., Prinetti, A., Sonnino, S., Bordignon, C., Traversari, C., & Russo, V. (2008). Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(3), 871–879.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0108047>
- Villani, A. C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., Jardine, L., Dixon, D., Stephenson, E., Nilsson, E., Grundberg, I., McDonald, D., Filby, A., Li, W., De Jager, P. L., ... Hacohen, N. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*, 356(6335).
<https://doi.org/10.1126/science.aah4573>
- Villegas, F.F., Coca, S., Villarrubia, V., Jiménez, R., Jesús Chillón, M., Jareno, J., Zuñil, M., Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*.35(1):23-8
[https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(01\)00292-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(01)00292-6)
- Villiers, E. de. (2013). Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, 445, 2–10.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.023>
- Vishwanath, M., Nishibu, A., Saeland, S., Ward, B. R., Mizumoto, N., Ploegh, H. L., Boes, M., & Takashima, A. (2006). Development of intravital intermittent confocal imaging system for studying Langerhans cell turnover. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(11), 2452–2457.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700448>
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., ... Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174(5), 1054–1066.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- Vo, J. L. N., Yang, L., Kurtz, S. L., Smith, S. G., Koppolu, B. prasanth,

- Ravindranathan, S., & Zaharoff, D. A. (2014). Neoadjuvant immunotherapy with chitosan and interleukin-12 to control breast cancer metastasis. *OncoImmunology*, 3(12), 1–10. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.968001>
- Von Boehmer, H., & Daniel, C. (2013). Therapeutic opportunities for manipulating TReg cells in autoimmunity and cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(1), 51–63. <https://doi.org/10.1038/nrd3683>
- von Domarus, H., & Stevens, P.J., (1984). Metastatic Basal Cell Carcinoma. *Clinical Review*.
- Vu Manh, T. P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., & Dalod, M. (2015). Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions. *Frontiers in Immunology*, 6(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.0260>
- W**
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P. Y., Mendrzyk, R., Hilf, N., Schoor, O., Fritsche, J., Mahr, A., Maurer, D., Vass, V., Trautwein, C., Lewandrowski, P., Flohr, C., ... Singh-Jasuja, H. (2012). Muropeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature Medicine*, 18(8), 1254–1261. <https://doi.org/10.1038/nm.2883>
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone hyperacetylation mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 205–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>
- Wang, L., Yi, T., Zhang, W., Pardoll, D. M., and Yu, H. (2010). IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res*, 70, 10112– 10120. doi: 10.1158/0008-5472.can-10-0775
- Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., Li, M., Song, J., Zhang, F., Zhang, X., Wang, Q., & Wang, Z. (2018). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF-κB/SOX4 signaling. *Cell Death and Disease*, 9(9).
- Wang, H., Rayburn, E. R., Wang, W., Kandimalla, E. R., Agrawal, S., & Zhang, R. (2006). Immunomodulatory oligonucleotides as novel therapy for breast cancer: Pharmacokinetics, in vitro and in vivo anticancer activity, and potentiation of antibody therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 2106–2114. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0158>
- Wang, Y., Sztretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M. (2012). *Nat Immunol*, 13(8):753-760. <https://doi.org/10.1038/ni.2360>.
- Wang, S., Campos, J., Gallotta, M., Gong, M., Crain, C., Naik, E., Coffman, R. L., & Guiducci, C. (2016). Intratumoral injection of a CpG oligonucleotide reverts resistance to PD-1 blockade by expanding multifunctional CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), E7240–E7249. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608555113>
- Wang, G. Y. (2012). *Basal Cell Carcinomas Arise From Hair Follicle Stem Cells in Ptc1 +/- Mice*. 19(1), 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.007.Basal>

- Wang, W., Ollila, H.M., Whittmore, A.S., Demehri, S., Loannidis, N.M., Jorgenson, E., Mignot, E., Asgari, M.M. (2018). Genetic variants in the HLA class II region associated with high risk of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 67(7): 1123-1133. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2168-2>
- Wang, J.-N., & Li, M. (2020). The Immune Function of Keratinocytes in Anti-Pathogen Infection in the Skin. *International Journal of Dermatology and Venereology*, 3(4), 231–238. <https://doi.org/10.1097/jd9.0000000000000094>
- Wang, S., Wu, P., Chen, Y., & Chai, Y. (2020). Ambiguous roles and potential therapeutic strategies of innate lymphoid cells in different types of tumor (Review). *Oncology Letters*, 20(2), 1513–1525. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11736>
- Watkins, S. K., Egilmez, N. K., Suttles, J., & Stout, R. D. (2007). IL-12 Rapidly Alters the Functional Profile of Tumor-Associated and Tumor-Infiltrating Macrophages In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1357–1362. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1357>
- Watt, F. M., & Fujiwara, H. (2011). Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005124>
- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>
- Weber, J. S., Zarour, H., Redman, B., Trefzer, U., O'Day, S., Van Den Eertwegh, A. J. M., Marshall, E., & Wagner, S. (2009). Randomized phase 2/3 trial of CpG oligodeoxynucleotide PF-3512676 alone or with dacarbazine for patients with unresectable stage III and IV melanoma. *Cancer*, 115(17), 3944–3954. <https://doi.org/10.1002/cncr.24473>
- Wehrauch, M.R., Richly, H., von Bergwelt-baildon, M.S., et al., (2015). Phase I clinical study of the toll-like receptor 9 agonist MGN1703 in patients with metastatic solid tumours. *Eur J Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.11.002>
- Weinlich, G., Heine, M., Stossel, H., Zanella, M., Stoitzner, P., Ortner, U., Smolle, J., Koch, F., Sepp, N. T., Schuler, G., & Romani, N. (1998). Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 110(4), 441–448. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00161.x>
- Weizman, O-E., Adams, N.M., Schuster, I., Krishna, C., Pritykin, Y., Lau, C., Degli-Esposti, M.A., Leslie, C.S., Sun, J.C., O'Sullivan, T.E. (2017). ILC1 confer early host protection at initial sites of viral infection. *Cell*, 171(4):795-808.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.052>
- Wheeler, D. L., Dunn, E. F., & Harari, P. M. (2010). Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(9), 493–507. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.97>
- Whiteman, D. C., Parsons, P. G., & Green, A. C. (1999). *Determinants of melanocyte density in adult human skin*. 511–516.
- Wilkinson, H. N., Hardman, M. J., & Wilkinson, H. N. (2020). *Wound*

- healing : cellular mechanisms and pathological outcomes.*
- Willenborg, S., Lucas, T., Van Loo, G., Knipper, J. A., Krieg, T., Haase, I., Brachvogel, B., Hammerschmidt, M., Nagy, A., Ferrara, N., Pasparakis, M., & Eming, S. A. (2012). CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*, *120*(3), 613–625. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403386>
- Wislez, M., Rabbe, N., Marchal, J., Milleron, B., Crestani, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P., & Cadranet, J. (2003). Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: Role in tumor progression and death. *Cancer Research*, *63*(6), 1405–1412.
- Wolchok, J. D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Dummer, R., Hill, A., Hogg, D., Haanen, J., Carlino, M. S., Bechter, O., Maio, M., Marquez-Rodas, I., ... Larkin, J. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, *377*(14), 1345–1356. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1709684>
- Wolchok, J. D., Kluger, H., Callahan, M. K., Postow, M. A., Rizvi, N. A., Lesokhin, A. M., Segal, N. H., Ariyan, C. E., Gordon, R.-A., Reed, K., Burke, M. M., Caldwell, A., Kronenberg, S. A., Agunwamba, B. U., Zhang, X., Lowy, I., Inzunza, H. D., Feely, W., Horak, C. E., ... Sznol, M. (2013). Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, *369*(2), 122–133. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1302369>
- Wong-Rolle, A., Wei, H. K., Zhao, C., & Jin, C. (2021). Unexpected guests in the tumor microenvironment: microbiome in cancer. *Protein and Cell*, *12*(5), 426–435. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00813-8>
- Worah, K., Mathan, T. S. M., Vu Manh, T. P., Keerthikumar, S., Schreiber, G., Tel, J., Duiveman-de Boer, T., Sködl, A. E., van Spruel, A. B., de Vries, I. J. M., Huynen, M. A., Wessels, H. J., Gloerich, J., Dalod, M., Lasonder, E., Figdor, C. G., & Buschow, S. I. (2016). Proteomics of Human Dendritic Cell Subsets Reveals Subset-Specific Surface Markers and Differential Inflammasome Function. *Cell Reports*, *16*(11), 2953–2966. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.023>
- Wu, Y., Chen, W., Xu, Z.P., Gu, W. (2019). PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy blockade, knockdown, or inhibition. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02022>
- Wysong, A. (2013). *Update on Metastatic Basal Cell Carcinoma : A summary of published cases from 1981 through 2011*. *149*(5), 615–616.
- Yamada, K., Nakao, M., Fukuyama, C., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Ohe, Y., Ohki, E., Hashimoto, J., & Tamura, T. (2010). Phase I study of TLR9 agonist PF-3512676 in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Science*, *101*(1), 188–195. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01361.x>

Y

- Yan, J., Kloecker, G., Fleming, C., Bousamra, M., Hansen, R., Hu, X., Ding, C., Cai, Y., Xiang, D., Donninger, H., Eaton, J. W., & Clark,

- G. J. (2014). Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *OncImmunity*, 3(7), e950163. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.950163>
- Yanez, D.A., Lacher, R.K., Vidyarthi, A., Colegio, O.R. (2017). The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflügers Arch*, 469(3-4): 455-453. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1953-7>
- Yang, A. S., & Chapman, P. B. (2009). The History and Future of Chemotherapy for Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(3), 583–597. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.03.006>
- Yanofsky, V. R., Mercer, S. E., Phelps, R. G., Sinai, M., Gustave, O., & Place, L. L. (2011). *Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma : A Review. 2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/210813>
- Yi, W., Su, M., Shi, Y., Jiang, S., Xu, S., & Lei, T. (2018). *Degraded melanocores are incompetent to protect epidermal keratinocytes against UV damage. 4101*. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1456601>
- Yin, X., Yu, H., Jin, X., Li, J., Guo, H., Shi, Q., Yin, Z., Xu, Y., Wang, X., Liu, R., Wang, S., & Zhang, L. (2017). Human Blood CD1c + Dendritic Cells Encompass CD5 high and CD5 low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions . *The Journal of Immunology*, 198(4), 1553–1564. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600193>
- Yona, S., Kim, K., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Brecker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophage under homeostasis. *Immunity*, 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Youssef, K. K., Keymeulen, A. van, Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., Sotiropoulou, P. A., & Blanpain, C. (2010). *Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. 12(3)*. <https://doi.org/10.1038/ncb2031>
- Yuan, S., Qiao, T., Li, X., Zhuang, X., Chen, W., Chen, X., & Zhang, Q. (2018). Toll-like receptor 9 activation by CPG oligodeoxynucleotide 7909 enhances the radiosensitivity of A549 lung cancer cells via the p53 signaling pathway. *Oncology Letters*, 15(4), 5271–5279. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7916>
- Yusuf, N., Nasti, T. H., Katiyar, S. K., Jacobs, M. K., Seibert, M. D., Ginsburg, A. C., et al. (2008). Antagonistic roles of CD4+ and CD8+ T-cells in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene cutaneous carcinogenesis. *Cancer Res*. 68, 3924–3930. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-3059

Z

- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S., & Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 188(12), 2375–2380. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2375>
- Zhang, S., Fujita, H., Mitsui, H., Yanofsky, V. R., Fuentes-Duculan, J., Pettersen, J. S., et al. (2013). Increased Tc22 and Treg/CD8 ratio contribute to aggressive growth of transplant associated squamous cell carcinoma.

- PLoS One* 8:e62154. doi: 10.1371/journal.pone.0062154
- Zhang, H., Liu, L., Yu, D., Kandimalla, E. R., Sun, H. Bin, Agrawal, S., & Guha, C. (2012). An in situ autologous tumor vaccination with combined radiation therapy and TLR9 agonist therapy. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038111>
- Zhao, Y., Chu, X., Chen, J., Wang, Y., Gao, S., Jiang, Y., Zhu, X., Tan, G., Zhao, W., Yi, H., Xu, H., Ma, X., Lu, Y., Yi, Q., & Wang, S. (2016). Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumour immunity through the induction of Th9 cells. *Nature Communications*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms12368>
- Zheng, W-P., & Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 587-596
- Zheng, L.M., Ojcius, D.M., Garaud, C., Roth, E., Maxwell, Z., Li, H., Rong, J., Chen, X.Y., Wang, J.J., Catino, I., King. (1996). Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J.Exp. Med.* 184: 579-584
- Zhu, Y., Herndon, J.M., Sojka, D.K., ... , Fields, R.C., Randolph, G.J., DeNardo, D.G. (2017). Tissue-resident macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma originate from embryonic hematopoiesis and promote tumor progression. *Immunity*, 47, 323-328. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.014>
- Zieglerl, A., & Haven, N. (1994). *Tumor Suppressor Gene Mutations and Photocarcinogenesis*. 1991, 1991–1994.
- Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatioglu, H. D., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C. V., Kerwin, C. M., Choi, S., Richards, W. G., De Rienzo, A., Tenen, D. G., Bueno, R., Levantini, E., Pittet, M. J., & Klein, A. M. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity*, 50(5), 1317-1334.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009>
- Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 295–307. <https://doi.org/10.1038/nri1806>
- Zouboulis, C. C., & Zouboulis, C. C. (2009). *The skin as an endocrine organ The skin as an endocrine organ*. 1980, 1–4. <https://doi.org/10.4161/derm.1.5.9499>