



Caractérisation des cellules dendritiques cDC1 et de leur synthèse d'Interféron de type III dans l'immunité antitumorale

Margaux Hubert

► To cite this version:

Margaux Hubert. Caractérisation des cellules dendritiques cDC1 et de leur synthèse d'Interféron de type III dans l'immunité antitumorale. Immunologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1350 . tel-02320658

HAL Id: tel-02320658

<https://theses.hal.science/tel-02320658>

Submitted on 19 Oct 2019

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

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



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1350

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
BMIC Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 20/12/2018, par :
Margaux HUBERT

Caractérisation des cellules dendritiques cDC1 et de leur synthèse d'interféron de type III dans l'immunité antitumorale

Devant le jury composé de :

FAURE Mathias
ANJUERE Fabienne
CREMER Isabelle
DALOD Marc
SISIRAK Vanja
VALLADEAU-GUILEMOND Jenny

PU, UCBL
CR INSERM, IPMC
PU, UPMC
DR CNRS, CIML
CR CNRS, ImmunoConcEpT
CR INSERM, CRCL

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

A Gégé et tous ceux qui se sont battus.

A ma maman et toutes celles qui se battent encore.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme *Fabienne Anjuère* et Mme *Isabelle Cremer* pour avoir consacré un temps précieux à l'évaluation de mon travail de thèse, ainsi que M. *Marc Dalod* et M. *Vanja Sisirak* d'avoir volontiers accepté de prendre part à mon jury en tant qu'examinateurs lors de ma soutenance. Je remercie également M. *Mathias Faure* pour m'avoir enseigné l'immunologie avec passion et pour m'avoir donné envie de continuer dans ce domaine. Je suis donc particulièrement honorée de vous compter parmi les membres du jury de ma soutenance de thèse et je tiens aussi à vous remercier d'avoir accepté de la présider. Mes remerciements vont également à M. *David Durantel* et une nouvelle fois à *Marc Dalod* pour leur participation assidue à mes trois comités de suivi de thèse au cours desquels ils m'ont donné de nombreux conseils avisés pour faire le bilan de mes travaux et poursuivre la suite de l'histoire.

Cette histoire ne serait rien sans *Christophe*, mon chef d'équipe que je remercie tout particulièrement pour son intégrité scientifique, son humilité, son intérêt pour tous les sujets abordés ainsi que sa bienveillance. Merci à toi de toujours garder ta porte grande ouverte pour les petites ou grandes discussions, d'avoir à cœur d'améliorer sans cesse le ressenti de tout le personnel du laboratoire permettant ainsi une cohésion certaine et indispensable à une bonne entente. Plus de 5 années se sont écoulées depuis mon stage de M1 et je suis aujourd'hui persuadée que je n'aurais pas pu mieux tomber. Les nombreuses thématiques abordées par l'équipe permettent l'acquisition de connaissances étendues dans le domaine de l'immunologie, et les valeurs que tu véhicules nous apportent la meilleure des formations pour devenir de jeunes chercheurs, qui je l'espère, pourront un jour te rendre fier. Enfin je te remercie de m'avoir fait confiance jusqu'ici et de continuer à le faire pour la suite.

Jenny, je te remercie également pour cette confiance que tu as eue en moi pendant toutes ces années en me donnant tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce projet de thèse. Tu as su prendre le temps de me former scientifiquement avant de me laisser prendre une certaine autonomie dans mon travail. J'ai énormément appris à tes côtés, et surtout, j'ai aimé apprendre, découvrir et réfléchir. Je pourrais soulever toutes tes qualités scientifiques, comme par exemple ton impressionnante capacité à mémoriser les articles de biblio, mais ici j'aimerais surtout te remercier pour le reste. Pour moi, tu es en effet bien plus qu'une simple directrice de thèse. Je tiens vraiment à te remercier pour ta bienveillance, ta profonde gentillesse et ta générosité. Je ne l'ai encore jamais fait jusque-là, mais je te remercie de n'avoir pas considéré la maternité comme un problème pour avancer un projet. Je termine cette thèse en me considérant vraiment chanceuse, chanceuse d'avoir pu apprendre à tes côtés, chanceuse d'avoir développé des liens avec toi qui vont au-delà de la science et chanceuse de savoir qu'ils perdureront malgré la fin de cette relation étudiante-directrice de thèse qui nous liait jusqu'à présent.

Dans le groupe « cDC1 » je tiens également à remercier *Anne-Claire*. Tu m'as formée sur les différentes techniques, toujours avec beaucoup de pédagogie et énormément de patience. J'ai beaucoup apprécié toutes ces heures passées ensemble à manipuler, notamment en culture, à discuter science (mais pas que). Merci pour ton aide précieuse pour l'avancée de mon projet et ton soutien permanent pour tout le reste. Tous les stagiaires et étudiants qui sont passés par ici ont eu de la chance

d'être formés par toi, comme par exemple Nabil qui va prendre la suite de ce projet. *Nabil* je te refille le bébé (le projet... pas Anne-Claire !) et te souhaite une belle thèse. Tu as déjà généré de nombreux résultats importants et je te remercie pour ton aide au cours de ces derniers mois. Ne te laisse pas déstabiliser par les gens qui diront que tu étudies des artefacts de cytométrie, ce sont les cellules les plus importantes au monde ;) ! Bon courage pour la suite. Je remercie également tous les étudiants déjà partis ou encore présents dans notre sous-groupe, notamment *Erine* dont on retient, malgré son passage rapide, un sourire constant et un investissement incroyable. *Christophe S.* et *Elisa*, merci de ne pas avoir baissé les bras pour rendre possible la visualisation des cDC1 *in situ* sur coupes FFPE. *Jenny* pourra en témoigner, ça n'a pas été simple d'y arriver donc chapeau bas !

L'équipe ne se résume pas au groupe « cDC1 » mais constitue un environnement exceptionnel pour étudier l'immunologie des tumeurs, chaque Chargé de Recherche portant à bras le corps sa thématique. Chacun de ces piliers de l'équipe Caux mérite donc tous mes remerciements. Je remercie tout d'abord *Isabelle* qui possède toutes les qualités d'une voisine de bureau idéale : la discrétion dans les moments où le calme est de rigueur, un humour toujours bien placé et une gentillesse sans pareille. *Nathalie*, ma deuxième « référence DC » après *Jenny*, je te remercie vraiment pour ton aide précieuse et ton investissement tout au long de mon projet. Tu as effectivement toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions, corriger mes figures, participer à mon CST... le tout avec un regard bienveillant et une réelle envie de faire avancer les choses. Je tiens à préciser ici que je n'ai même pas eu à te soudoyer avec des tablettes de chocolat, tu m'as toujours aidée spontanément. Je te remercie également pour ta jovialité et ton engouement pour mes pâtisseries (même pas forcément au chocolat !). *Marie-Cécile*, je tiens à te remercier pour ta spontanéité, ta disponibilité et ta joie de vivre perpétuelle. Tu es vraiment toujours là pour discuter, échanger et même booster les étudiants quelque fois en panne de motivation. Je te remercie enfin pour ta franchise, car en plus de ne pas hésiter à soulever les limites des projets, tu es probablement la première à féliciter les gens pour leurs résultats, leurs présentations... et ça fait du bien. *Christine*, je te remercie pour ta disponibilité constante et ton implication dans la vie de l'équipe. Merci également d'avoir eu pitié de la petite étudiante de M2 que j'étais, perdue au milieu des virologistes, et d'avoir pris du temps pour corriger mon rapport de stage qui portait sur un sujet complètement différent du tien. Je n'ai pas (encore) pu travailler directement avec toi, donc ton aide à ce moment-là m'a réellement touchée. Venons-en ensuite à *Bertrand* dont la ténacité permet sa survie dans cette équipe très féminine. Merci pour tes remarques toujours pertinentes qui permettent à chacun d'entre nous de se confronter aux limites de nos projets et donc de toujours avancer. Enfin je tiens à remercier sincèrement *Yenkel*. Selon moi ton passage de quelques mois n'aurait pas pu être plus productif car tu nous as donné un nombre incalculable de conseils utiles et avisés. Merci d'être toujours là pour aider, pour discuter et évidemment aussi pour boire un coup !

Passer plus de 5 années dans une équipe c'est avoir l'opportunité de rencontrer et de travailler avec un bon nombre de personnalités différentes. J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont rendu mon quotidien plus qu'agréable, joyeux et animé. Je remercie tout d'abord la « team sarcome », à l'époque composée de *Marie P.* et *Mehdi*. Vous m'avez accueillie avec un sourire et une curiosité qui vous définissent bien. J'entends encore le bruit des chaises de bureau qui roulent jusqu'au milieu de notre petit coin, suivi de quelques chuchotements et de nombreux rires. Encore une fois, je n'aurais pas pu mieux tomber. *Marie*, merci pour tous ces moments partagés, à Lyon, à Paris, en Haute-Savoie ou ailleurs, merci pour toutes ces années terminées et ces années débutées à tes côtés, merci pour

tous les concerts (variés...) et surtout merci d'être toujours là malgré la distance qui nous sépare et les années qui passent. Je dois également remercier toutes les autres personnes qui faisaient partie de cette joyeuse bande lors de mes débuts dans l'équipe. Commençons par mon autre voisin de bureau de l'époque, *Amélien*. Merci d'avoir été et d'être toujours si gentil et si drôle. Les chansons de Nostalgie ne résonnent plus dans les pièces d'analyse FlowJo, nous ne traversons plus le sas de culture pour passer d'une pièce à l'autre, je ne te demande plus de coupler mes anticorps gratuitement... mais je suis tellement reconnaissante de te savoir toujours présent. Plus présent que jamais. Je remercie également les autres thésards de l'époque, *Nicolas, Nelly, Rodrigo, Armelle* et *Elena*. J'ai beaucoup appris à vos côtés, scientifiquement et humainement. Nicolas, je ne te remercie pas encore pour le Nutella... J'attends la bonne occasion pour te rendre la pareille. Le départ de chacun d'entre vous a été pour moi, et probablement pour tous les autres, un vrai pincement au cœur. Il y a heureusement des personnes qui restent. *Céline*, tu as toujours répondu présente pour répondre à mes questions diverses et variées. Merci de m'avoir transmis avec patience et pédagogie ton savoir concernant les dosages en tout genre, merci pour ton aide pendant toutes ces années, merci d'avoir pris soin de moi lorsque les vertiges ou les cryostats prenaient le dessus sur moi. En enfin merci pour ta franchise et ta présence lors des moments difficiles.

Il y a d'autres personnes que j'aimerais remercier pour leur présence et leur soutien inconditionnels. Elles possèdent de si grandes qualités qu'on ne peut qu'être fière de travailler à leurs côtés et de les compter parmi nos amis proches. Amélien tu aurais pu (dû ?) apparaître dans ce paragraphe, mais il faut rappeler que tu es vieux avant tout, donc avec les anciens ;) . *Julie*, la force tranquille, je te remercie pour ta bonne humeur constante et pour les valeurs que tu véhicules, comme par exemple la rigueur dans ton travail, une qualité qui devrait en inspirer plus d'un. *Coline*, je pense que tu es celle que j'ai le plus sollicitée pendant ma thèse (ta place dans l'open space n'a pas aidé) et je te remercie d'avoir toujours répondu à mes interrogations plus ou moins farfelues sans jamais rechigner. Je suis vraiment admirative de tout le travail que tu accomplis tout en étant toujours disponible pour la communauté. Merci pour ton aide au quotidien car tu as toujours mis la main à la pâte pour m'avancer un bout de manip ou pour me faire gagner du temps en t'occupant d'Adèle. Je garde un souvenir mémorable des moments passés avec toi, que ce soit au labo ou ailleurs, à terre ou en l'air, et j'ai hâte d'en vivre d'autres, en France ou aux USA. *Marion* et *Anaïs*, mes « super nannies », vous portez bien votre surnom donc merci d'avoir joué le rôle de « tata Maïon » et « tata Naïs » à plusieurs reprises. Marion, quelle chance j'ai eu de te voir débarquer à mes côtés dans l'open space. Merci pour ton énergie communicative, ta bonne humeur, tes anecdotes toujours croustillantes et ta disponibilité pour l'équipe. Toujours partante pour aider, collaborer et faire avancer les choses. Par contre je ne te remercie pas de m'avoir transmis une certaine addiction pour le chocolat à la pâte d'amande (Nath me comprendra...)! Anaïs, merci de m'avoir fait découvrir de jolis endroits où festoyer, de m'avoir fait rire un sacré paquet de fois et merci pour les discussions qui remontent le moral. La petite étudiante est devenue une brillante doctorante et je suis bien contente de rester ici encore quelque temps pour t'accompagner jusqu'au bout de ta thèse. J'espère que cette fin de parcours sera accompagnée de brunchs, cocktails, ventes de plantes (trop) matinales et bijoux faits main (on se lance quand tu veux !).

Pacôme, autre « jeune » doctorant (plus tant que ça finalement), merci de m'avoir accompagnée dans l'aventure rémoise du congrès de la SFI (à tes côtés je me sens moins alcoolique)

et merci d'avoir enrichi mon vocabulaire : on se « refait la cerise » quand tu veux (tant que ce qui se passe à Reims reste à Reims) ! J'aimerais juste te donner un conseil pour la suite : oublie les barres de toit. *Suzanne*, je te remercie de m'avoir tenu compagnie pendant la longue formation expé animale. Je l'avoue, je n'en ai retenu que peu de notions, mais j'en suis ressortie avec une certaine passion pour les barbecues et la gentiane. J'ai vraiment apprécié ton passage au labo et j'espère te croiser plus souvent par la suite. Je remercie également tous les autres doctorants et post-doctorants actuels que je connais moins, pour l'instant. *Matthieu* je te remercie pour le fou rire de 20min et ta prestation cinématographique digne des plus grands acteurs d'Hollywood. Merci également à *Anthony*, *Yasmine*, *Vincent* et *Olivia* : je vous souhaite un peu de courage et une belle réussite. *Aurélien* je te dois une fière chandelle : tu aurais pu m'abandonner en pleine nuit dans le brouillard au bord d'une route de campagne, mais tu n'en as rien fait. Alors merci et promis, je ne blaguerai plus au sujet des auvergnats ! *Paola* merci d'avoir amené un peu de soleil d'Italie chez nous.

Nous vu passer un certain nombre de médecins par ici. Leur vision médicale apporte un point de vue différent de notre vision de chercheur en biologie. Je remercie *Marie L.* et *Benoit* pour leur gentillesse, leur humour ainsi que leur culture G hyper développée et bien utile pour les cash shows collectifs. *Benoit* merci aussi à toi d'avoir consacré une partie du temps de ton master à la bio-info pour nous aider à avancer notre projet. Je remercie aussi *Hélène V.* dont le passage au labo a marqué tout le monde.

Il n'y a évidemment pas que des chercheurs et des étudiants dans ce laboratoire. *Dominique*, merci de t'occuper, avec Anne-Claire, de tout ce qu'on ne voit pas forcément. Je me suis souvent dit qu'on avait bien de la chance de ne jamais manquer de rien, de rarement courir après des consommables... et bien c'est grâce à vous. Merci également pour ta gentillesse, ta douceur et tes bonbons très souvent déposés anonymement dans le couloir (tu es démasquée !). *Lyvia*, j'aurais aimé te remercier pour ta transmission de compétences en biomol, mais j'avais piscine le jour où on avait prévu une qPCR, alors je t'ai envoyé Musclor. Ne me remercie pas pour ça... je suis certaine que toi et la hotte de culture en reprenez un souvenir mémorable ;) En revanche je te remercie pour ta joie de vivre, ton investissement dans toutes les chorégraphies de l'équipe (qui, il faut l'avouer, n'aurait pas eu la même tronche sans toi). *Adèle* te remercie de l'avoir bien bisouillée, ses joues sont extrêmement fermes grâce à toi. *Estelle*, s'il y a bien une chose pour laquelle je dois te remercier, c'est ton humour. Merci d'être toujours là pour lâcher les blagues que les autres n'oseraient jamais faire (moi y compris !). J'espère sincèrement que tu t'épanouiras professionnellement et personnellement au pays de la bière et des frites. Tu vas certainement beaucoup manquer à toute l'équipe, en particulier à tes acolytes *Axelle* et *Charlotte*. *Axelle*, merci d'avoir été si gentille lors de notre exil au cheney B. Tu as vraiment tout fait pour qu'on s'y sente bien, si bien qu'on aurait presque voulu y rester ! *Charlotte* tu as fait partie de l'aventure rémoise avec Pacôme. Merci pour ces bons moments dont je garde par exemple en tête un repas très alcoolisé bien animé. J'espère que tu as pu te refaire la cerise depuis... *Justine*, je te remercie pour ton implication dans la mise au point des marquages *in situ* en tout genre et pour avoir trouvé l'algorithme parfait permettant de scanner les lames de RNAscope. D'un point de vue beaucoup moins professionnel, merci pour ta douceur et ta gentillesse. *Fanny*, je te remercie de mettre tant de motivation pour nous aider à étudier les cDC1 chez la souris. Je suis certaine que ces efforts vont aboutir à de beaux résultats. J'aurais aimé être plus disponible pour t'aider à avancer, mais ça ne saurait tarder. Merci également pour ta franchise, ta spontanéité et ton humour. *Virginie*, tu es arrivée depuis moins de temps mais je ne doute pas que nous arrivions à mieux te connaître par la suite. *Franceline*, merci pour l'aide considérable que tu as apportée au « groupe tumeur ». Je pense

qu'on est tous d'accord pour dire que nous te regrettons depuis ton départ, mais évidemment pas seulement pour l'aspect professionnel. Merci pour la spontanéité et la joie de vivre que tu as apportées au labo le temps de ton passage. Enfin la Vita qui sommeille en moi tient à sincèrement remercier *Odile*. Nous formions un duo de légende qui a enchaîné les représentations (je pense même en avoir oublié certaines à cause de... la fatigue !). Merci également d'avoir pris Erine sous ton aile pour la mise au point des western blots, domaine dans lequel j'ai brillé par mon incompetence.

En effet, même en thèse on ne peut pas tout faire tout seul. Heureusement qu'un bon nombre de personnes sont là, même en dehors l'équipe, pour nous épauler ou nous aider à apprivoiser des domaines jusque-là inconnus. Je n'aurais par exemple jamais pu trier les quelques cDC1 des tumeurs de sein et d'ovaire si *Isabelle D.* n'avait pas donné de sa personne et de son temps. Isabelle je te remercie donc pour l'investissement et la gentillesse dont tu as fait preuve lors de ces soirées interminables. Je remercie également *Thibault* pour m'avoir formée à la cytométrie au CIRI, enseigné les analyses non supervisées et donné envie de jouer avec le CyTOF. Ne pas avoir pu concrétiser ce projet reste l'un de mes plus grands regrets. Je remercie également la plateforme de bio-informatique Synergie Lyon Cancer, et plus particulièrement *Laurie, Janice, Roxanne* et *Hélène L.M.* pour leur aide précieuse. *Thien*, merci pour ton investissement et ce séjour marseillais riche en découvertes autour du GSEA. Je n'ai jamais aussi bien compris ce genre d'analyses que lorsque tu as pris le temps de nous les expliquer. J'espère sincèrement que nous continuerons à collaborer. Merci également à *Laetitia, Amélie, Isabelle T.* et *Nicolas G.* pour leur réactivité et leurs conseils pour tout ce qui touche aux marquages *in situ* des tumeurs. Enfin merci à la plateforme Ex Vivo et Sophie d'avoir tout donné pour analyser un bon nombre de tumeurs en un temps record : challenge réussi !

Avant de passer à toutes les personnes extérieures au CRCL, merci au *service de sécurité du CLB* de ne pas nous avoir puni à cause des multiples alarmes incendie. Car oui, l'équipe de Christophe n'est pas seulement connue pour sa science de qualité, mais également pour sa bouilloire, ses bougies, ses pastaboxs, son compteur électrique et une nouvelle fois pour sa bouilloire.

J'aimerais également remercier *Christine Delprat* pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir une autre facette de l'immunologie : celle de l'enseignement. Cette expérience fut plus qu'enrichissante. Je suis bien contente d'avoir donné envie à au moins 3 étudiants de faire une thèse chez Christophe. Et je suis surtout très reconnaissante d'avoir appris tellement de choses aux côtés d'enseignantes hors pair. *Karène* et *Aurore*, merci d'avoir été si accueillantes, bienveillantes et pédagogues. Les étudiants ont énormément de chance de vous avoir et c'est avec un grand regret que j'ai dû arrêter l'enseignement en 4^{ème} année de thèse.

Cette thèse n'aurait pas eu lieu sans le soutien d'amis merveilleux, pour la plupart présents à mes côtés jusqu'au master. *Sarah C., Marlène, François, Geoffrey, Pauline* et *Sarah P.* : merci d'avoir rendu si belles et si animées les années passées sur les bancs de la fac. Je ne suis pas peu fière de voir ce que nous devenons, en empruntant tous des voies différentes mais en gardant toujours à l'esprit que l'amitié est une des choses les plus précieuses au monde. Merci les copains.

Papa, maman, je ne vous remercierai jamais assez pour votre aide. C'est grâce à vous si ces études supérieures sont allées aussi loin. Même si ce que je fais doit vous paraître quelques fois obscure, je sais que vous y portez un grand intérêt et que vous avez tout fait pour me pousser jusque-là. Maman, tu mérites largement quelques mots pour te remercier d'être si forte et si combative. Tu me rappelles tous les jours l'intérêt de faire avancer la recherche. J'aurais pu changer de thématique pour m'éloigner le plus possible du cancer, mais tu m'as donné une nouvelle motivation. Merci aussi à mes deux ~~vieux~~ grands frères et leurs femmes. Vous avez toujours su me faire décompresser et surtout me faire marrer pendant les weekends qui entrecoupaient les semaines plutôt intenses. Je vous considère tous les 4 comme de véritables modèles, jusqu'à en avoir des étoiles dans les yeux... Enfin je remercie ma tout petite fille, arrivée au beau milieu de la thèse comme le plus joli résultat jamais attendu. *Adèle*, du haut de tes 3 ans tu t'adaptes à la vie d'une maman thésarde. Peu d'enfants de ton âge peuvent se vanter d'avoir participé à un tri de cDC1 des tumeurs ou au dernier jour de l'écriture d'un manuscrit de thèse. Tu vas finir par connaître le labo comme ta poche. Reste à savoir quel PI t'acceptera en stage l'année prochaine.

Merci à tous...

Table des matières

ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
Préambule	19
Chapitre I : Diversité et spécificités des cellules dendritiques, Focus sur les cDC1 et leur synthèse d'IFN-III	23
I. Généralités	23
1. Fonctions générales des DC	23
2. Identification des sous-populations de DC	25
II. Diversité des cellules dendritiques	27
1. Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)	27
1.1 Développement des pDC	27
1.2 Phénotype et distribution des pDC	27
1.3 Propriétés fonctionnelles des pDC	29
2. Cellules dendritiques conventionnelles	30
2.1 Sous-populations de cDC	30
2.2 Cellules dendritiques cDC2	30
3. Autres populations de cellules dendritiques	33
3.1 Cellules de Langerhans (LC)	33
3.2 Cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC)	35
4. Technologies haut-débit et transcriptome des populations de cellules dendritiques	36
4.1 Limites des technologies classiques et émergence de technologies à haut débit	36
4.2 Impact de l'activation sur le transcriptome des cellules	36
4.3 Similarités inter-tissus et inter-espèces	37
4.4 Identification de nouvelles population de DC humaines	37
4.5 RNAseq et définition de signatures de DC	38
III. Focus sur les cDC1	38
1. Origine et distribution des cDC1	38
1.1 Développement des cDC1	38
1.2 Distribution tissulaire des cDC1	39
2. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cDC1	41
2.1 Phénotype des cDC1	41
2.2 Reconnaissance et internalisation des Ag	42
2.3 Détection de PAMP et synthèse de cytokines/chimiokines	42
2.4 Induction de réponses Th1 et Th2	45
2.5 Migration et interactions croisées avec les effecteurs cytotoxiques	45
2.6 Présentation croisée d'Ag et activation de réponses CTL efficaces	46
3. cDC1 et IFN de type III	49
3.1 Identification et diversité des IFN de type III	49

3.2	Production d'IFN de type III	51
3.3	Récepteur et signalisation des IFN-III	53
3.4	Fonctions des IFN de type III	56

Chapitre II : Contribution des cellules dendritiques et des IFN-I et III dans l'immunité antitumorale 61

I. *Présence et impact pronostique des DC dans les tumeurs solides*..... 63

1.	Mise en évidence de DC dans les tumeurs solides.....	63
1.1	Visualisation <i>in situ</i> des DC associées aux tumeurs	63
1.2	Identification des sous-populations de TA-DC par cytométrie	66
2.	TA-DC et impact pronostique.....	68
2.1	Maturité des DC et pronostic des patients	68
2.2	Sous-populations de DC et impact pronostique	68

II. *DC et IFN : implications dans la surveillance et l'échappement des tumeurs*..... 72

1.	Rôle des DC dans l'immunosurveillance.....	72
2.	Rôle des IFN-I et III dans l'immunosurveillance.....	72
2.1	IFN-I et immunosurveillance	73
2.2	IFN et thérapies antitumorales	73
2.3	IFN-III et immunosurveillance	75
3.	Mécanismes d'échappement aux cellules dendritiques.....	76
3.1	Altération du développement et de la survie des DC	77
3.2	Inhibition de la maturation des DC et de la présentation antigénique	77
3.3	Altération de la synthèse d'IFN- α par les pDC	78

III. *cDC1 et immunité antitumorale*..... 79

1.	Recrutement des cDC1 dans les tumeurs solides.....	79
1.1	Chimiokines et cytokines impliquées dans le recrutement intratumoral des cDC1	79
1.2	Altérations oncogéniques et exclusion des cDC1	79
2.	Rôle des cDC1 dans l'activation d'effecteurs cytotoxiques et le rejet des tumeurs.....	81
3.	cDC1 et immunothérapies antitumorales.....	83
3.1	cDC1 et anti-ICP	83
3.2	cDC1 et transfert adoptif de LT	85
3.3	Ciblage des cDC1	85

Objectifs de la thèse 88

RESULTATS 91

DISCUSSION 131

I. *Infiltration des tumeurs de sein et d'ovaire par diverses populations de DC*.....133

1.	Identification des populations de TA-DC.....	133
----	--	-----

2. Caractérisation phénotypique des TA-DC et importance du choix des marqueurs.....	134
3. Recrutement des populations de DC dans les tumeurs.....	135
<i>II. Association entre l'infiltration des tumeurs par les sous-populations de DC et le pronostic des patients.....</i>	<i>135</i>
1. Sous-populations de DC et impact sur la survie des patients.....	135
2. pDC et pronostic des patientes : discordances ou évolution des techniques ?.....	139
<i>III. TA-cDC1 et réponses antitumorales Th1/CTL.....</i>	<i>140</i>
1. Capture et apprêtement des antigènes.....	140
2. Présentation des Ag.....	140
<i>IV. cDC1, IFN-III : recrutement et activation de effecteurs immunitaires cytotoxiques ?..</i>	<i>141</i>
1. cDC1 et effecteurs cytotoxique.....	141
2. cDC1 et IFN-III : première démonstration d'un lien dans l'immunité antitumorale.....	142
3. IFN-III et effecteurs immunitaires cytotoxiques.....	142
<i>V. Ciblage thérapeutique des cDC1.....</i>	<i>143</i>
1. Poly(I:C) et activation des cDC1 : intérêt thérapeutique ?.....	143
2. Ciblage des cDC1 par le poly(I:C) et mise en place d'une réponse antitumorale Th1.....	145
<i>VI. Conclusion générale.....</i>	<i>146</i>
REFERENCES	147
ANNEXES	179

Abréviations

Ag : Antigène

APC : Ag presenting cell

ARNm : ARN messenger

BATF3 : Basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3

BDCA : Blood dendritic cell antigen

CAR-T : Chimeric antigen receptor T cell

CD : Cluster de différenciation

cDC : Conventiønnal dendritic cells

CLEC : C-type lectin domain containing

CLR : C-type Lectin receptor

CMH-I/-II : Complexe majeur d'histocompatibilité de type I/II

CRTAM : Class-I restricted T cell-associated molecule

CTL : Cytotoxic T lymphocytes

CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4

CyTOF : Cytométrie de masse

DAMP : Danger associated molecular pattern

DC : Dendritic cells

ER : Estrogen receptor

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

Flt-3 : Fms-related tyrosine kinase 3

GAS : IFN-gamma activated sequence

GM-CSF : Granulocyte monocyte colony stimulating factor

HBV : Hepatitis B virus

HCV : Hepatitis C virus

HIV : Human immunodeficiency virus

HMGB1 : High mobility group box 1

HSC : Hematopoietic stem cells

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN : interféron

IFNAR : IFN-alpha receptor

IFNGR : IFN-gamma receptor

IFN-I : IFN de type I

IFN-II : IFN de type II

IFN-III : IFN de type III

Ig : Immunoglobuline

IHC : Immunohistochimie

IL : Interleukine

IRF : Interferon regulatory factor

ISG : Interferon stimulated gene

ISGF3 : Interferon-stimulated gene factor 3

ISRE : Interferon-stimulated response element

JAK : Janus kinase

KO : Knocked out

LB : Lymphocytes B

LC : Cellule de Langerhans

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

LTreg : Lymphocyte T régulateur

MAPK : Mitogen associated protein kinase

MAVS : Mitochondrial antiviral signaling protein

MCMV : Mouse cytomegalovirus

M-CSF : Macrophage colony stimulating factor

mDC : Myeloid dendritic cells

MDM : Macrophages dérivés de monocytes

MoDC : DC dérivée de monocyte

Myd88 : Myeloid differentiation primary response protein 88

NECL2 : Nectin-like protein 2

NK : Natural killer cell

NKT : Natural killer T cell

OLS : Organe lymphoïde secondaire

OVA : Ovalbumine

PAMP : Pathogen associated molecular pattern

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells

PD-1/PD-L1 : Programmed death 1 / programmed death ligand 1

pDC : Plasmacytoid dendritic cells

polyI:C : Polyinosine-polycytidylic acid

PR : progesterone receptor

PRR : pathogen recognition receptor

RIG-I : RIG-i-like receptor

RLR : RIG-like receptor

RNAseq : RNA sequencing

ROS : Reactive oxygen species

SCF : Stem cell factor

scRNAseq : Single cell RNAseq

SIRP α : Signal regulatory protein α

SOCS1 : Suppressor of cytokine signaling 1

TA-DC : Tumor-associated DC

TGF- β : Transforming growth factor β

Th : Helper T cell

TIL : Tumor infiltrating lymphocyte

TLR : Toll-like receptor

TNBC : Triple negative breast cancer

TNF- α : Tumor necrosis factor α

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon

TYK : Tyrosine kinase

VEGF : Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Préambule

Bien qu'elles ne représentent qu'une très faible proportion des leucocytes, les cellules dendritiques (DC) occupent une place centrale dans le système immunitaire (Banchereau et al., 2000). Leurs rôles de cellules sentinelles et de cellules présentatrices d'antigène (APC) leur confèrent des capacités inégalées d'activation des lymphocytes T (LT), établissant ainsi le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. La diversité et les caractéristiques des DC humaines seront présentées en détail dans ce manuscrit, avec une attention particulière portée sur la caractérisation des cDC1 et leur synthèse d'interféron (IFN) de type III (IFN-III) dans l'immunité antitumorale. Mais avant cela, les décennies de recherche et de découvertes à l'origine de l'étendue des connaissances actuelles concernant les DC et l'importance du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs méritent de s'y attarder pendant quelques lignes.

Il faut remonter en 1868 pour trouver la première description de cellules présentant une morphologie étoilée faite par Paul Langerhans dans la peau humaine (Langerhans, 1868). Mais ce n'est qu'en 1973 que Ralph Steinman utilisa le terme de DC pour décrire une population de cellules présentes dans la rate des souris (Steinman and Cohn, 1973, 1974). La première vraie caractérisation des DC humaines du sang fut apportée en 1982 par Van Voorhis *et al.* (Van Voorhis et al., 1982). L'approfondissement des connaissances fut longtemps ralenti par les difficultés techniques liées à la rareté des DC *in vivo*. C'est pourquoi l'une des découvertes capitales du domaine fut le développement de protocoles permettant la génération de DC *in vitro* à partir de différentes cellules progénitrices, telles que les cellules souches hématopoïétiques (Caux et al., 1992, 1996; Romani et al., 1994) ou les monocytes isolés du sang (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Ces modèles permirent de progresser dans la compréhension de nombreuses fonctions des DC. Cependant, ce type d'APC ne permet pas de répondre à toutes les questions. Effectivement, bien que ce genre de culture *in vitro* ait évolué depuis, notamment en modifiant la nature des cocktails de cytokines utilisés, aucun protocole ne permet actuellement de reproduire la diversité des populations de DC observées *in vivo*. Nous verrons par la suite qu'il existe en effet plusieurs populations de DC pouvant être distinguées phénotypiquement à l'aide de marqueurs plus ou moins spécifiques, une diversité mise en évidence pour la première fois par l'équipe de Ken Shortman à partir de DC purifiées d'organes lymphoïdes secondaires (OLS) de souris (Vremec et al., 1992). La spécialisation fonctionnelle de ces différentes populations de DC orchestrée par le profil d'expression de nombreux récepteurs permet alors l'induction d'une grande diversité de réponses immunitaires adaptées.

En parallèle des DC, les connaissances de l'immunité antitumorale ont elles aussi énormément avancé. Le concept d'immunosurveillance, sujet à de nombreux débats depuis plus d'un siècle (Burnet, 1970), trouva sa place dans le monde de la recherche en cancérologie dans les années 1990, en particulier grâce à la mise en évidence du rôle de l'IFN- γ dans le contrôle du développement tumoral par l'équipe de R. D. Schreiber (Dighe et al., 1994; Shankaran et al., 2001). L'interaction entre les cellules tumorales et le système immunitaire est aujourd'hui considérée comme un processus dynamique composé de 3 phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Cette notion a donné son nom à la théorie des 3E en 2004 (Dunn et al., 2004). Grâce à leurs propriétés de cellules sentinelles,

les DC sont au cœur de la phase précoce d'immunosurveillance. Cependant, certaines de leurs fonctions peuvent être inhibées lors des phases plus tardives pendant lesquelles les cellules tumorales mettent en place divers mécanismes d'immuno-échappement. De nombreuses observations, notamment chez la souris, permirent de mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans la réponse antitumorale ainsi que l'immuno-échappement, offrant ainsi des perspectives thérapeutiques prometteuses. Ces connaissances ont ainsi permis l'entrée des immunothérapies dans l'arsenal thérapeutique aujourd'hui utilisé pour traiter de multiples cancers. Contrairement aux traitements tels que la chimiothérapie, la radiothérapie ou les thérapies ciblées, ces nouvelles molécules (principalement des anticorps monoclonaux) ne visent pas directement les cellules tumorales mais le système immunitaire des patients afin de stimuler la réponse antitumorale, validant définitivement chez l'Homme le rôle du système immunitaire dans la lutte contre les tumeurs. De plus en plus d'indices démontrent justement l'intérêt de faire évoluer la prise en charge thérapeutique des patients vers l'utilisation de combinaisons de traitements ciblant à la fois les cellules tumorales et les acteurs de l'immunité.

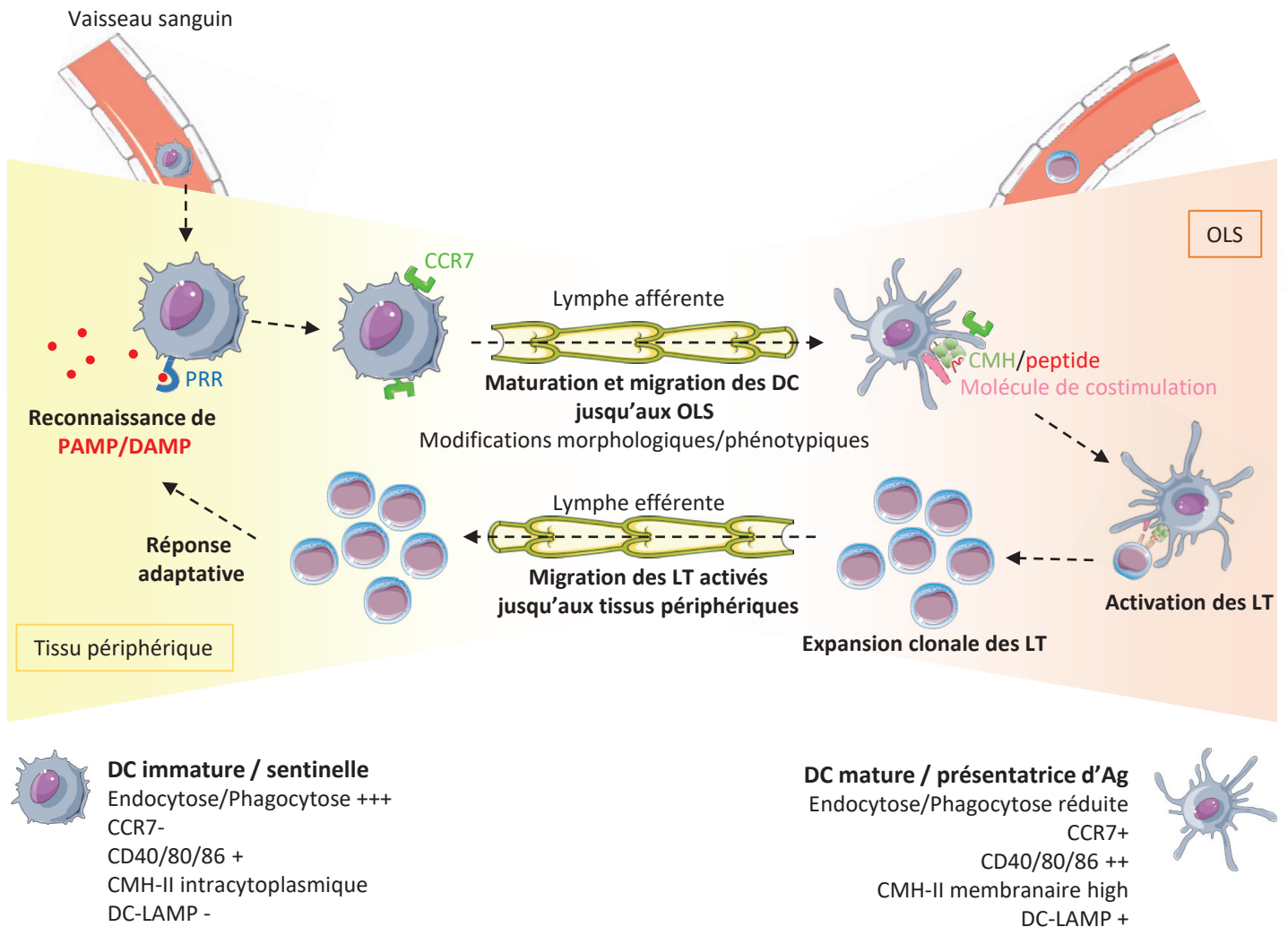


Figure 1 - Maturation des DC et activation des réponses adaptatives médiées par les LT

A l'état basal les DC atteignent les tissus périphériques par les vaisseaux sanguins et jouent le rôle de cellules sentinelles grâce à leur forte propension à la phagocytose/endocytose. La reconnaissance de PAMP ou DAMP par divers PRR entraîne alors leur maturation. L'expression de récepteurs à chimiokines tels que CCR7 va permettre leur migration *via* la lymphe afférente jusqu'aux OLS drainant le tissu. Les molécules de CMH permettant la présentation des Ag, ainsi différentes molécules de costimulation permettent alors l'activation des LT. Ces effecteurs activés migrent alors jusqu'aux tissus périphérique par la lymphe efférente.

CHAPITRE I

Diversité et spécificités des cellules dendritiques

Focus sur les cDC1 et leur synthèse d'IFN-III

I. Généralités

1. Fonctions générales des DC

L'un des principaux rôles des DC est d'orchestrer l'activation des cellules effectrices de l'immunité adaptative telles que les lymphocytes T spécifiques d'antigène. En effet, les DC représentent les APC les plus efficaces : elles capturent et apprêtent les antigènes (Ag) en périphérie, migrent jusqu'aux OLS par voie lymphatique, expriment des molécules de costimulation des lymphocytes et sécrètent diverses cytokines afin d'orienter les réponses immunitaires qu'elles initient. Mais le rôle de ces cellules ne se résume pas seulement à une fonction d'activation des réponses immunitaires. En effet, en conditions homéostatiques, elles sont aussi impliquées dans la tolérance centrale et périphérique pour protéger l'hôte des réactions auto-immunes. Les DC induisent alors la délétion ou l'anergie des LT auto-réactifs et favorisent le développement de LT régulateurs (LTreg) (Steinman et al., 2003).

En lien avec leur rôle de cellules sentinelles, les DC expriment un large panel de récepteurs de danger appelés **PRR** (*Pattern Recognition Receptors*) spécialisés dans la détection de motifs moléculaires associées aux pathogènes (PAMP) ou aux dommages cellulaires (DAMP), et dont les mieux caractérisés sont les **TLR** (*Toll-Like Receptors*) et **CLR** (*C-type Lectin Receptors*) (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Sancho and Reis e Sousa, 2012; Takeda et al., 2003). L'engagement de ces PRR induit leur maturation et module leurs fonctions de façon adaptée [Figure 1]. En effet, alors que les DC immatures possèdent une forte capacité de phagocytose et d'apprêtement des Ag (Inaba et al., 1993; Mellman and Steinman, 2001; Reis e Sousa et al., 1993), leur **maturation** induit une réduction de ces fonctions et une régulation positive de l'expression membranaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et de costimulation lymphocytaire (telles que CD40, CD80, CD86), aboutissant ainsi à une remarquable augmentation de leurs capacités d'activation des lymphocytes T. Ces changements fonctionnels s'accompagnent de modifications morphologiques, se traduisant par une réorganisation des réseaux de microfilaments et la formation de nombreux prolongements cytoplasmiques. Parallèlement, les DC perdent l'expression de récepteurs aux chimiokines impliquées dans le recrutement aux sites inflammatoires périphériques au profit de récepteurs permettant leur migration tels que CCR7 (Caux et al., 2000). Les DC matures quittent alors les tissus périphériques pour migrer, *via* la lymphe, vers les OLS permettant une proximité entre les DC chargées en périphérie et les LT afin d'initier des réponses immunitaires adaptées aux signaux de danger reconnus.

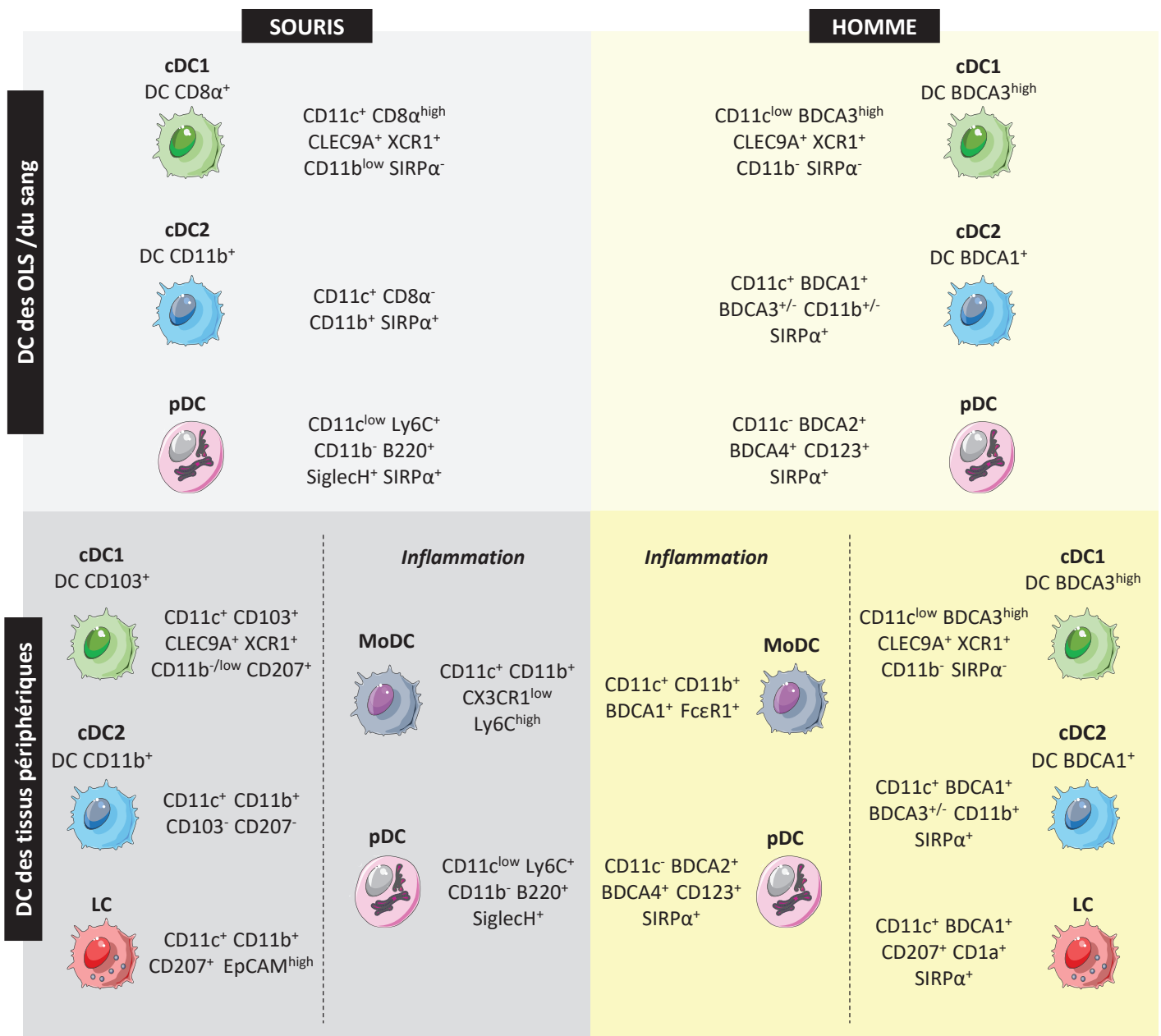


Figure 2 – Classification des cellules dendritiques humaines et murines

Les DC sont classées en deux grandes catégories : les DC résidentes présentes dans les OLS ainsi que dans le sang, et les DC circulantes retrouvées dans les tissus non lymphoïdes. Les cDC1 et cDC2 (dont la nomenclature a récemment été uniformisée entre l'Homme et la souris) sont présentes dans tous ces compartiments. Les tissus périphériques contiennent d'autres populations de DC telles que les LC dans les épithéliums et les muqueuses. En cas d'inflammation (auto-immunité, infection, tumeur...), les pDC et DC dérivées de monocytes peuvent également infiltrer les tissus périphériques.

2. Identification des sous-populations de DC

Les DC forment une large famille de cellules immunitaires pouvant être divisée en plusieurs sous-populations en fonction de leur origine, leur localisation et leurs fonctions [Figure 2]. Ces différentes populations présentent chacune de nombreuses spécificités, permettant au système immunitaire de reconnaître une multitude de signaux de danger et d'induire une réponse adaptée *via* la synthèse de multiples cytokines dont les interférons (IFN) et l'activation des populations lymphocytaires adaptées. Depuis la première caractérisation des DC chez l'Homme, les avancées technologiques ont permis l'identification de plusieurs populations bien distinctes (Collin and Bigley, 2018), premièrement sur la base de leur phénotype. Cette classification manque cependant d'homogénéité car selon les marqueurs étudiés, l'origine tissulaire et le contexte inflammatoire, une même population de DC possède diverses appellations. De plus, identifier de véritables marqueurs spécifiques de chaque population reste d'une grande difficulté. Plusieurs méthodologies sont aujourd'hui utilisées pour définir les différentes populations (Satpathy et al., 2012; Vu Manh et al., 2015). Elles comprennent le phénotypage de surface généralement effectué par cytométrie en flux (Dzionek et al., 2000; MacDonald et al., 2002), l'analyse ontogénique principalement menée chez la souris afin d'identifier leurs progéniteurs et les facteurs de transcription impliqués dans leur développement (Belz and Nutt, 2012; Guilliams et al., 2014; Satpathy et al., 2011; Watchmaker et al., 2014), la caractérisation fonctionnelle et enfin les analyses moléculaires haut débit permettant d'aller plus en profondeur grâce à l'analyse du transcriptome des sous-populations (Guilliams et al., 2016; See et al., 2017; Villani et al., 2017). Ces différentes approches sont complémentaires les unes des autres et permettent une définition des populations de DC qui est encore évolutive et parfois discutée. Cependant, le mouvement actuel tend vers l'utilisation d'une nomenclature unifiée pour décrire les populations de DC de manière homogène entre les différents tissus et les différentes espèces, comme celle proposée par Guilliams *et al.* (Guilliams et al., 2014).

En attendant un réel consensus, la distinction entre les deux lignages **plasmacytoïde** et **myéloïde/conventionnel** reste la classification généralement utilisée pour les DC du sang chez l'Homme (Dzionek et al., 2000; MacDonald et al., 2002), une distinction également retrouvée parmi les DC résidentes des tissus lymphoïdes (Lindstedt et al., 2005; Segura et al., 2012). Ces deux grandes familles sont elles-mêmes subdivisées en différentes sous-populations en fonction de leur phénotype et de leur spécialisation fonctionnelle. En plus de ces deux lignages classiques, d'autres populations sont retrouvées dans les tissus périphériques et présentent des spécificités en fonction de leur localisation tissulaire, comme les cellules de Langerhans (LC), ou en fonction du contexte inflammatoire, comme les DC inflammatoires dérivées de monocytes (MoDC). Ces différents types de DC seront abordés dans ce manuscrit, avec une attention particulière portée sur la population de DC myéloïdes appelée cDC1.

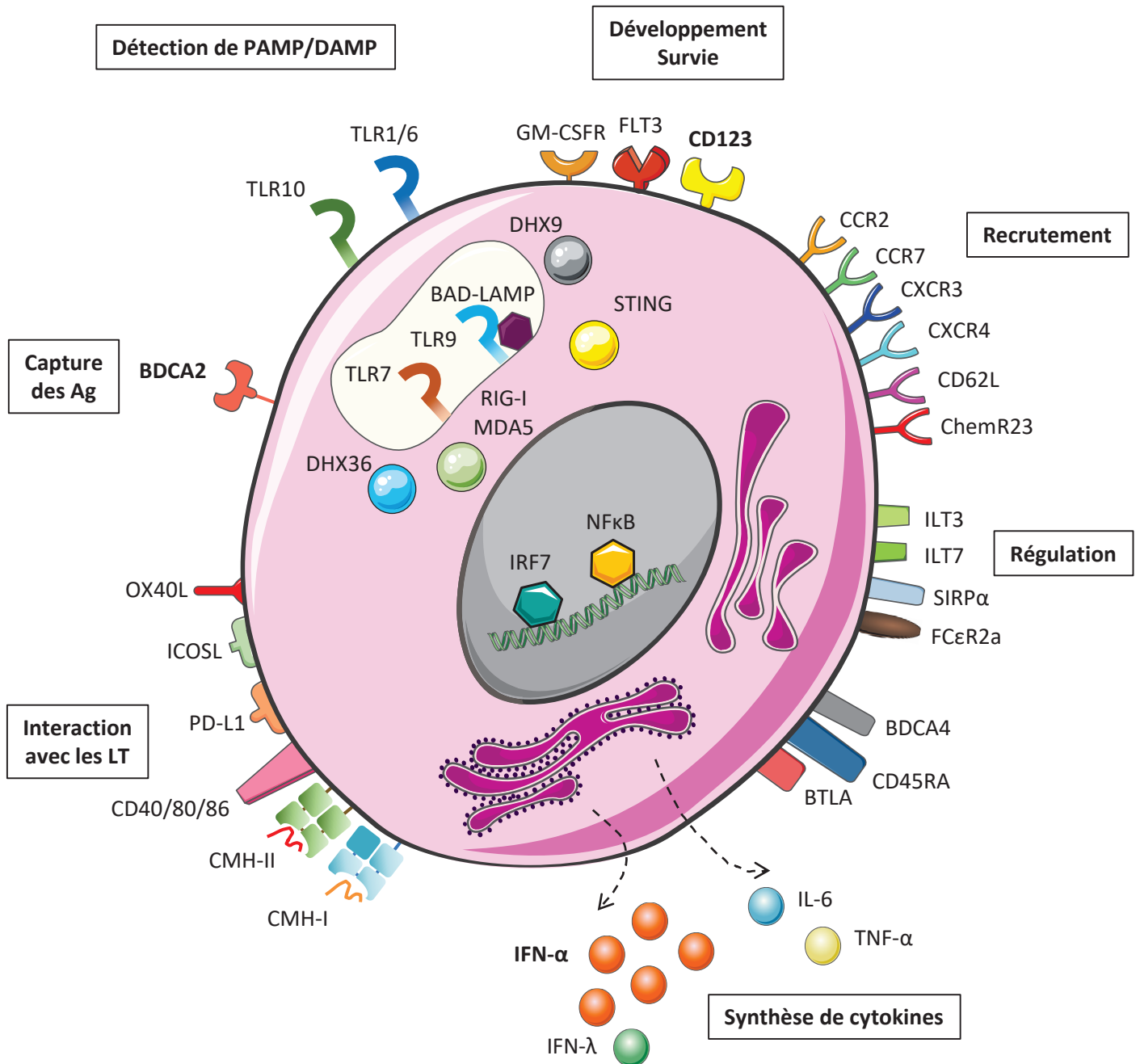


Figure 3 – Principales caractéristiques des pDC humaines

Les pDC expriment tout un panel de récepteurs membranaires et intracellulaires permettant leur survie, leur migration, l'endocytose d'Ag, la reconnaissance de toute une diversité de PAMP/DAMP, ainsi que la synthèse de cytokines dont l'IFN-α. Elles expriment également des récepteurs membranaires permettant leur interaction avec des effecteurs de l'immunité adaptative et notamment impliqués dans la régulation de l'activation des LT.

II. Diversité des cellules dendritiques

1. Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Cette population a porté différentes appellations, comme les LT plasmacytoïdes, les monocytes plasmacytoïdes ou encore les cellules productrices d'IFN de type I. Il fallut une quarantaine d'années avant que les pDC ne soient considérées comme une population de DC à part entière (Cella et al., 1999; Grouard et al., 1997; Siegal et al., 1999).

1.1 Développement des pDC

Les pDC ont une morphologie particulière si on les compare aux autres types de DC. Elles sont en effet naturellement rondes, avec un noyau excentré et un réticulum endoplasmique ainsi qu'un appareil de Golgi très développés. L'expression du facteur de transcription clé **E2-2** (autrement connu sous le nom de TCF4) permet l'orientation de la différenciation des progéniteurs vers le lignage plasmacytoïde (Cisse et al., 2008). E2-2 permet aussi l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le développement, l'homéostasie et la fonction des pDC, telles que SPIB, BCL-11A, IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*), IRF8, ILT7, TLR7 et TLR9. Par ailleurs, le récepteur FLT3 (CD135) et son ligand **FLT3-L** sont impliqués dans le développement des pDC et des DC conventionnelles (Waskow et al., 2008). D'autres cytokines telles que la TPO (thrombopoïétine) et l'IL-7 favorisent également la différenciation des pDC (Balan et al., 2018; Shortman et al., 2013). Enfin, l'**IL-3** est quant à elle considérée comme un facteur de croissance des pDC.

1.2 Phénotype et distribution des pDC

Comme toutes les DC chez l'Homme, les pDC expriment CD4 (Jardine et al., 2013). Elles se différencient phénotypiquement des DC conventionnelles (cDC) grâce à l'expression de marqueurs tels que **CD123** (IL-3R) et **CD45RA**. On peut aussi les distinguer des cDC grâce à l'absence d'expression chez l'Homme, et une faible expression chez la souris, de l'intégrine alpha X (CD11c) ou d'autres marqueurs myéloïdes tels que CD33, CD11b et CD13. Elles expriment aussi les molécules du CMH de classe II (CMH-II, HLA-DR) de façon moins importante que les cDC. Les pDC expriment tout un panel de récepteurs présenté en [Figure 3](#) et dont certains sont impliqués dans la régulation de leur principale fonction qu'est la synthèse d'IFN- α qui sera abordée par la suite. Parmi eux, on retrouve **BDCA2** (CD303, CLEC4C), **BDCA4** (CD304, neuropiline), **ILT3** (CD85k) et **ILT7** (CD85g) (Bao and cell, 2013). A l'état physiologique, les pDC sont présentes dans le sang et les OLS. Leur forte expression de **CCR7** et **CD62L** favorise leur migration dans les OLS (Cella et al., 1999; Seth et al., 2011). Cependant, dans des contextes infectieux, auto-immuns ou même tumoraux, les pDC peuvent également être recrutées dans les tissus périphériques (Swiecki and Colonna, 2010).

Encadré 1 : Activation des LT par les DC

Les DC jouent un rôle central dans l'initiation des réponses immunes adaptatives. Elles possèdent deux propriétés fonctionnelles permettant l'activation de réponses T adaptées et spécifiques :

- La capture des Ag suivie de leur présentation aux lymphocytes T naïfs
- L'intégration des signaux du microenvironnement permettant la polarisation des LT vers un état de différenciation adapté : Th1, Th2, Treg...

L'activation des LT naïfs par les DC matures passent par trois signaux simultanés :

- 1.** Les molécules de CMH chargées en peptide antigénique engagent le récepteur TCR (T cell receptor) des LT couplé aux chaînes CD3 permettant la transduction intracellulaire des signaux d'activation.
- 2.** Les molécules de costimulation exprimées par les DC, telles que CD80 (B7-H1) ou CD86 (B7-H2) interagissent avec CD28 à la surface des LT.
- 3.** En fonction des signaux captés en périphérie, les DC secrètent différentes cytokines qui orientent les LT vers un profil de différenciation spécifique.

1.3 Propriétés fonctionnelles des pDC

a. Détection de PAMP et production de cytokines

L'expression des **TLR7** et **TLR9** dans leurs compartiments endosomaux permet aux pDC de reconnaître efficacement les acides nucléiques (respectivement les ARN simple-brins et les ADN double-brins), en particulier d'origine virale (Ito et al., 2005). L'engagement de ces récepteurs active d'une part la voie MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) / IRF7, induisant alors la production de fortes quantités d'**IFN de type I** (IFN-I) (Honda et al., 2005). D'autre part, l'activation du facteur de transcription NF-κB permet la synthèse d'autres cytokines telles que le TNF-α et l'IL-6. L'induction de la production d'IFN ou de cytokines pro-inflammatoires peut dépendre du type de compartiments (endosomes ou endolysosomes) dans lesquels sont situés les TLR engagés par les acides nucléiques (Guiducci et al., 2006). En plus des TLR7 et 9 aujourd'hui bien documentés, les pDC circulantes expriment aussi les **TLR1, 6 et 10** (Hémont et al., 2013). En utilisant une lignée de pDC (Gen2.2), les travaux de Kim *et al.* ont également démontré que les oligonucléotides CpG-A pouvaient être reconnus par l'hélicase DHX36 (DExD/H), induisant alors la production d'IFN-I. Les oligonucléotides de type CpG-B seraient quant à eux reconnus par l'hélicase DHX9 et induisent plutôt une synthèse de cytokines inflammatoires (Kim et al., 2010). Les senseurs RIG-I et MDA-5 permettent quant à eux de reconnaître l'ARN double-brin (Szabo et al., 2014). Le rôle du senseur à ADN cytosolique appelé STING exprimé par les pDC a aussi été décrit récemment (Bode et al., 2016).

La production d'IFN-I induite par l'engagement de ces récepteurs représente la fonction principale des pDC. Elles sont effectivement la source principale d'IFN-α en cas d'infections virales, par exemple en réponse aux virus HSV (*herpes simplex virus*) et influenza (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999). L'étude d'Alcumbre *et al.* a cependant démontré que les pDC ne représentent pas une population homogène. En effet, le virus influenza semble induire l'apparition de 3 sous-types de pDC et seule la population PD-L1⁺ CD80⁻ semble capable de produire de l'IFN-α (Alcumbre et al., 2018). Les pDC peuvent également produire de l'IFN-β, mais en quantité beaucoup moins importante que pour l'IFN-α, ainsi que d'autres sous-types d'IFN-I comme les IFN-κ et IFN-ω (Ito et al., 2006b). La production d'IFN de type III induite par l'engagement de TLR7 et TLR9 a aussi été démontrée et sera détaillée par la suite.

b. Présentation des Ag

Tout comme les autres types de DC, les pDC sont des APC **[Encadré 1]**. Elles expriment donc les molécules du CMH-II et des molécules de costimulation telles que CD80, CD86 et CD40. Elles sont alors capables de présenter des Ag aux LT CD4⁺ afin d'activer des réponses immunitaires adaptatives, bien que moins efficacement que les cDC (Villadangos and Young, 2008). Ce rôle d'APC peut aussi leur conférer une fonction régulatrice. En effet, les pDC peuvent induire l'expansion de LTreg en exprimant certaines molécules telles que IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase), ICOSL, OX40L et PDL1, participant ainsi à la tolérance des allo-antigènes (Goubier et al., 2008). Elles peuvent aussi devenir tolérogéniques dans certains contextes infectieux (Boasso et al., 2007; Diana et al., 2009) ou tumoraux comme nous le verrons par la suite (Faget et al., 2012; Jahrsdörfer et al., 2010).

Un certain nombre de données de la littérature chez l'Homme tendent aujourd'hui à démontrer que les pDC sont aussi capables de réaliser la présentation croisée d'Ag provenant d'exosomes ou de corps apoptotiques afin d'initier des réponses T CD8 cytotoxiques spécifiques, par

exemple dans des contextes d'infections virales (Di Pucchio et al., 2008; Hoeffel et al., 2007; Patricia et al., 2012). Cette capacité ne semble pas impliquer la production d'IFN-I mais est augmentée après une activation dépendante des TLR (Hoeffel et al., 2007). Plusieurs équipes ont aussi démontré la capacité des pDC à prendre en charge des Ag tumoraux et à activer des réponses T CD4 et CD8 spécifiques (Segura et al., 2013a).

Malgré tous ces éléments, la capacité des pDC à présenter des Ag et donc à activer les LT a toujours été controversée. Une récente étude basée sur des données de cytométrie de masse (CyTOF) et de *single-cell* RNAseq a récemment alimenté ce débat (See et al., 2017). Les auteurs ont en effet démontré l'expression de marqueurs de pDC (CD303, CD304, et CD123) par les précurseurs de cDC appelés pré-cDC, émettant alors l'hypothèse de la contamination des pDC étudiées dans les précédents travaux utilisant ces marqueurs pour leur identification. De plus, ils proposent grâce à des études fonctionnelles comparatives des deux types cellulaires, que les propriétés de synthèse d'IL-12 et de stimulation des LT jusque-là attribuées aux pDC, sont en fait spécifiquement médiées par les pré-cDC contaminantes, laissant aux « véritables » pDC la fonction de synthèse d'IFN- α .

2. Cellules dendritiques conventionnelles

2.1 Sous-populations de cDC

Les DC conventionnelles (cDC), aussi appelées DC classiques ou myéloïdes (mDC) se distinguent des pDC, notamment par l'expression du marqueur membranaire **CD11c** (intégrine α X), ainsi qu'une plus forte expression des molécules du **CMH-II** (HLA-DR). Il existe deux sous-populations bien distinctes de cDC, historiquement appelées **DC BDCA3/CD141^{hi}** et **DC BDCA1/CD1c⁺** (Dzionek et al., 2000) représentant respectivement environ 5 à 10% et 50% des DC totales du sang (MacDonald et al., 2002). Des études de RNAseq ont permis de mettre en évidence leurs similarités avec des DC murines et d'identifier des populations équivalentes chez la souris appelées DC CD8 α ⁺ (ou DC DC103⁺) et DC CD4⁺ (ou DC CD11b⁺) (Robbins et al., 2008). Dans un souci d'uniformisation de la nomenclature utilisée pour citer les deux populations, elles sont aujourd'hui communément appelées cDC1 (DC BDCA3/CD141^{hi} humaines et DC CD8 α ⁺ murines) et cDC2 (DC BDCA1/CD1c⁺ humaines et DC CD11b⁺ murines) (Guilliams et al., 2014). Les caractéristiques et fonctions des cDC1 seront détaillées dans la partie III du chapitre I.

2.2 Cellules dendritiques cDC2

a. Développement des cDC2

De multiples facteurs de transcription sont impliqués dans le développement des cDC2 chez la souris : GATA2, PU.1, GF11, ID2, ZEB2, RELB, IRF4, NOTCH2 et KLF4 (Murphy et al., 2016), reflétant ainsi l'hétérogénéité des sous-populations de cDC2 murines. Chez l'Homme, l'identification de l'absence de cDC2 ou d'un défaut de cette population cellulaire chez des patients a permis d'apporter quelques éléments concernant les facteurs impliqués dans leur développement. C'est par exemple le cas pour le gène GATA2 dont la déficience homozygote induit une absence totale des cDC2 (Collin et al., 2015). La mutation hétérozygote T80A du gène IRF8 conduit quant à elle à l'apparition d'une population anormale de cellules CD11c⁺ CD1c⁻ à la place des cDC2 CD11c⁺ CD1c⁺ (Hambleton et al., 2011). Enfin,

comme chez la souris, IRF4 a été identifié comme étant impliqué dans la différenciation des cDC2 des muqueuses et de l'intestin (Schlitzer et al., 2013; Watchmaker et al., 2014).

b. Phénotype et distribution des cDC2

Les cDC2 représentent la population majeure de DC myéloïdes humaines dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus non-lymphoïdes. Elles sont caractérisées par l'expression de **BDCA1** (CD1c), CD2, FcεR1, **SIRPα** (*Signal regulatory protein α*, CD172a), ainsi que des marqueurs de cellules myéloïdes au sens large tels que **CD11b**, CD11c, CD13 et CD33 [Figure 4]. Une récente analyse du profil transcriptomique de DC humaines provenant de différents organes lymphoïdes a permis de mettre en évidence l'expression spécifique des marqueurs CLEC10A (CD301a), VEGFA et FCGR2A (CD32A) par les cDC2 (Heidkamp et al., 2016). Une inflammation peut par ailleurs stimuler l'expression d'autres marqueurs de surface tels que CD11b, CD14, CD16 ou BDCA3 (Boltjes and van Wijk, 2014). Ces modifications phénotypiques peuvent alors induire des erreurs d'identification de populations, en confondant les cDC2 avec des DC dérivées de monocytes ou des cDC1. Cette problématique révèle l'intérêt d'identifier des marqueurs spécifiques de chaque population. Mais cette tâche semble bien complexe pour les cDC2 qui présentent plus d'hétérogénéité que les autres populations de DC.

c. Propriétés fonctionnelles des cDC2

Les cDC2 peuvent reconnaître de nombreux signaux de danger grâce à un large panel de PRR. Tout comme pour les monocytes, elles expriment par exemple les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 8 (Hémont et al., 2013). On peut aussi retrouver les CLR CLEC4A (DCIR/CD367), CLEC7A (Dectin-1), CLEC6A (Dectine-2), CLEC10A (CD301) et CLEC12A (CD371) à la surface des cDC2 (Collin and Bigley, 2018), participant notamment à l'internalisation des Ag. Après la reconnaissance d'un signal de danger, en particulier *via* l'engagement de leurs TLR, les cDC2 humaines peuvent produire de nombreuses cytokines telles que le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-6 et l'IL-8 (Jin et al., 2014). Les cDC2 sécrètent aussi de larges quantités d'IL-12p70 (Jin et al., 2014; Nizzoli et al., 2013; Sittig et al., 2016) et semblent être les principales DC productrices d'IL-10 et d'IL-23 (Dillon et al., 2010; Haniffa et al., 2012; Kassianos et al., 2012; Nizzoli et al., 2016; Sittig et al., 2016).

Les cDC2 sont également douées de la capacité de présentation croisée d'Ag, leur permettant ainsi d'activer efficacement les LT CD8⁺ (Cohn et al., 2013; Jin et al., 2014; Mittag et al., 2011; Segura et al., 2013a). Ces DC sont aussi capables d'activer les LT CD4⁺. En effet, il a été démontré *in vitro* que les cDC2 peuvent induire la différenciation de LT naïfs en LT Th1, Th2 et Th17, témoignant de leur capacité à induire une large variété de réponses immunitaires (Di Blasio et al., 2016; Nizzoli et al., 2016; Sittig et al., 2016). Une récente étude a permis de mettre en évidence l'existence de deux sous-populations de cDC2 chez l'Homme, notamment définie par l'expression du marqueur CD5 (Yin et al., 2017). Les deux sous-types CD5^{high} et CD5^{low} semblent être fonctionnellement différents. En effet, les DC CD5^{high} répondent plutôt au PolyI:C en synthétisant de fortes quantités de TNF-α, IL-6, IL-23, IFN-β et IL-12, alors que les DC CD5^{low} produisent les mêmes cytokines mais plutôt en réponse au R848. De plus, alors que les cDC2 CD5^{high} (dites « DC-like ») activent préférentiellement des LT Th2, Th17 et Th22, les cDC2 CD5^{low} (dites « monocyte-like ») induisent plutôt une polarisation de type Th1.

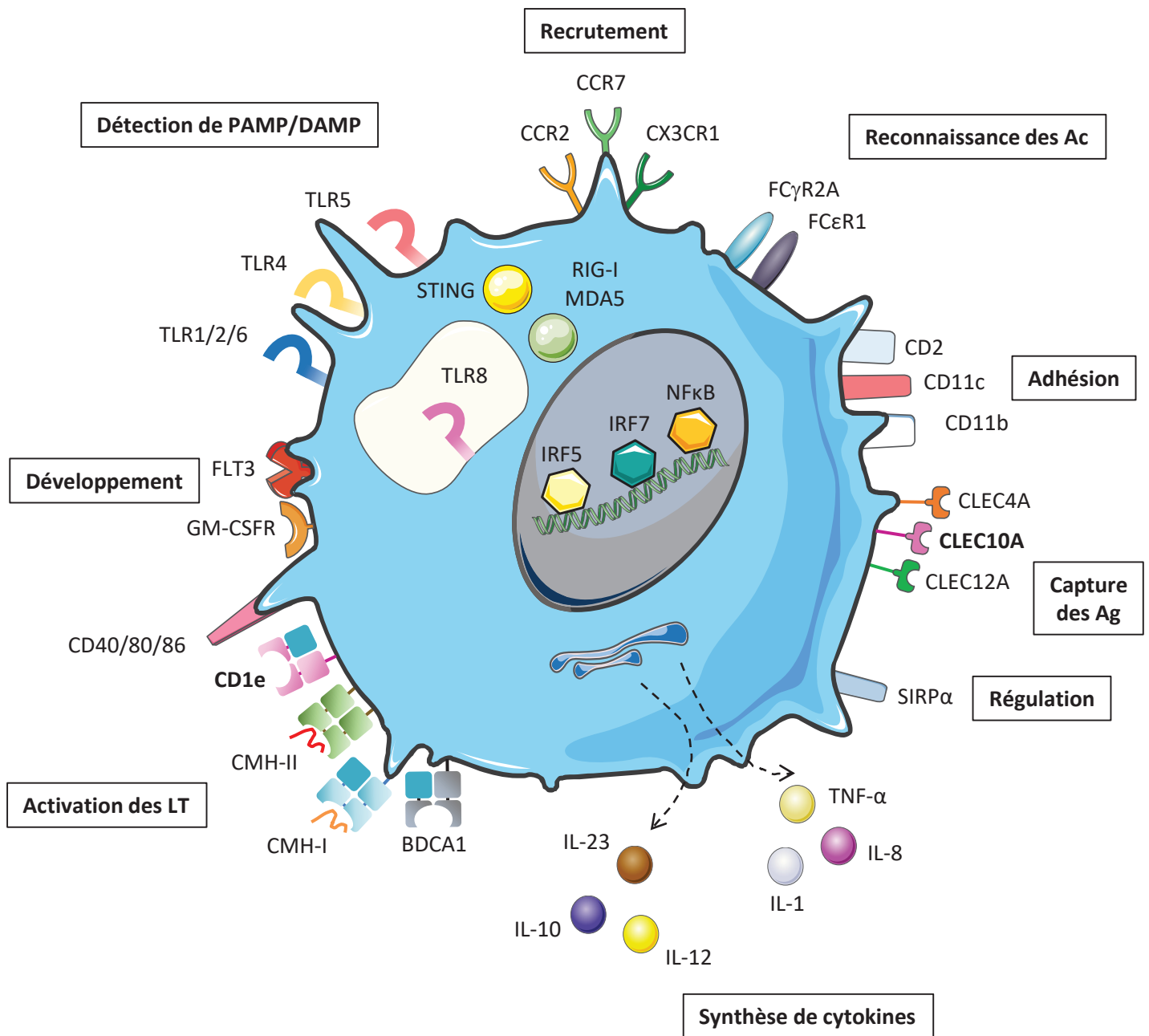


Figure 4 – Principales caractéristiques des cDC2 humaines

Les cDC2 expriment tout un panel de récepteurs membranaires et intracellulaires permettant leur adhésion, leur migration, l'endocytose d'Ag, la reconnaissance de toute une diversité de PAMP/DAMP, ainsi que la synthèse de cytokines. Elles expriment également des récepteurs membranaires permettant leur interaction avec des effecteurs de l'immunité adaptative et notamment impliqués dans la régulation de l'activation des LT.

3. Autres populations de cellules dendritiques

En plus des pDC et cDC, d'autres populations de DC peuvent être retrouvées dans les tissus périphériques. Nous aborderons ici les différents types de DC de la peau ainsi que les DC dérivées de monocytes.

3.1 Cellules de Langerhans (LC)

a. Développement des LC

L'origine des LC est assez controversée. De par leur origine embryonnaire commune ainsi que leur dépendance au **M-CSF** ainsi qu'à l'IL-34 pour leur différenciation (Ginhoux et al., 2006; Greter et al., 2012), on retrouve les LC dans le groupe des macrophages dans la classification couramment utilisée aujourd'hui (Guilliams et al., 2014). Le développement des LC dépend aussi du **TGF- β** (Caux et al., 1999). Si on s'intéresse cependant à la fonction des LC plutôt qu'à leur ontogénie, ces cellules sont plutôt considérées comme des DC. Elles sont en effet douées d'importantes capacités de capture et d'apprêtement des Ag, ainsi que de migration jusqu'aux OLS dans lesquels elles peuvent présenter ces Ag afin d'activer des réponses T (Romani et al., 2012). Une récente étude chez la souris a permis de mettre en évidence leur expression des facteurs de transcription ZBTB46 et MAFB, démontrant ainsi la double appartenance des LC murines aux lignages des DC et des macrophages (Wu et al., 2016). Parmi les DC, les LC présentent l'unique caractéristique d'autorenouvellement (Czernielewski and Demarchez, 1987). D'autres études chez la souris ont aussi démontré qu'une inflammation sévère induit le recrutement de précurseurs myéloïdes se différenciant notamment en LC (Seré et al., 2012). Enfin, plusieurs données générées *ex vivo* et *in vivo* ont par ailleurs démontré la capacité des monocytes et des cDC2 à se différencier en LC grâce à certains cocktails de cytokines (Hoshino et al., 2005; Martínez-Cingolani and Grandclaudon, 2014; Milne et al., 2015).

b. Phénotype et distribution des LC

Les cellules de Langerhans (LC) représentent les DC des **épithéliums** squameux stratifiés tels que l'épiderme ou les muqueuses. Elles expriment spécifiquement la lectine de type C **CD207** (langerine) (Valladeau et al., 2000) et sont les seules cellules exprimant **CD1a** de manière constitutive [Figure 5]. Elles possèdent dans leur cytoplasme un type d'organite particulier appelé **granules de Birbeck** dont le rôle est toujours inconnu (Wolff, 1967). On retrouve aussi à la surface des LC une forte expression des molécules du CMH-I (Carpentier et al., 2016) ainsi que de plusieurs molécules permettant de fortes interactions avec les couches épithéliales, telles que E-cadhérine, EpCAM et TROP2 (Hieronymus et al., 2015). Tout comme les cDC2, les LC expriment fortement les marqueurs Fc ϵ R1 et CD39 (ATPase). Bien que les cDC2 puissent spontanément exprimer faiblement CD207 dans certains tissus, la forte expression de cette molécule combinée à celle d'EpCAM et à une plus faible expression des marqueurs CD11c, CD11b et CD13 permet d'identifier clairement les LC (Bigley et al., 2015; De Monte et al., 2016).

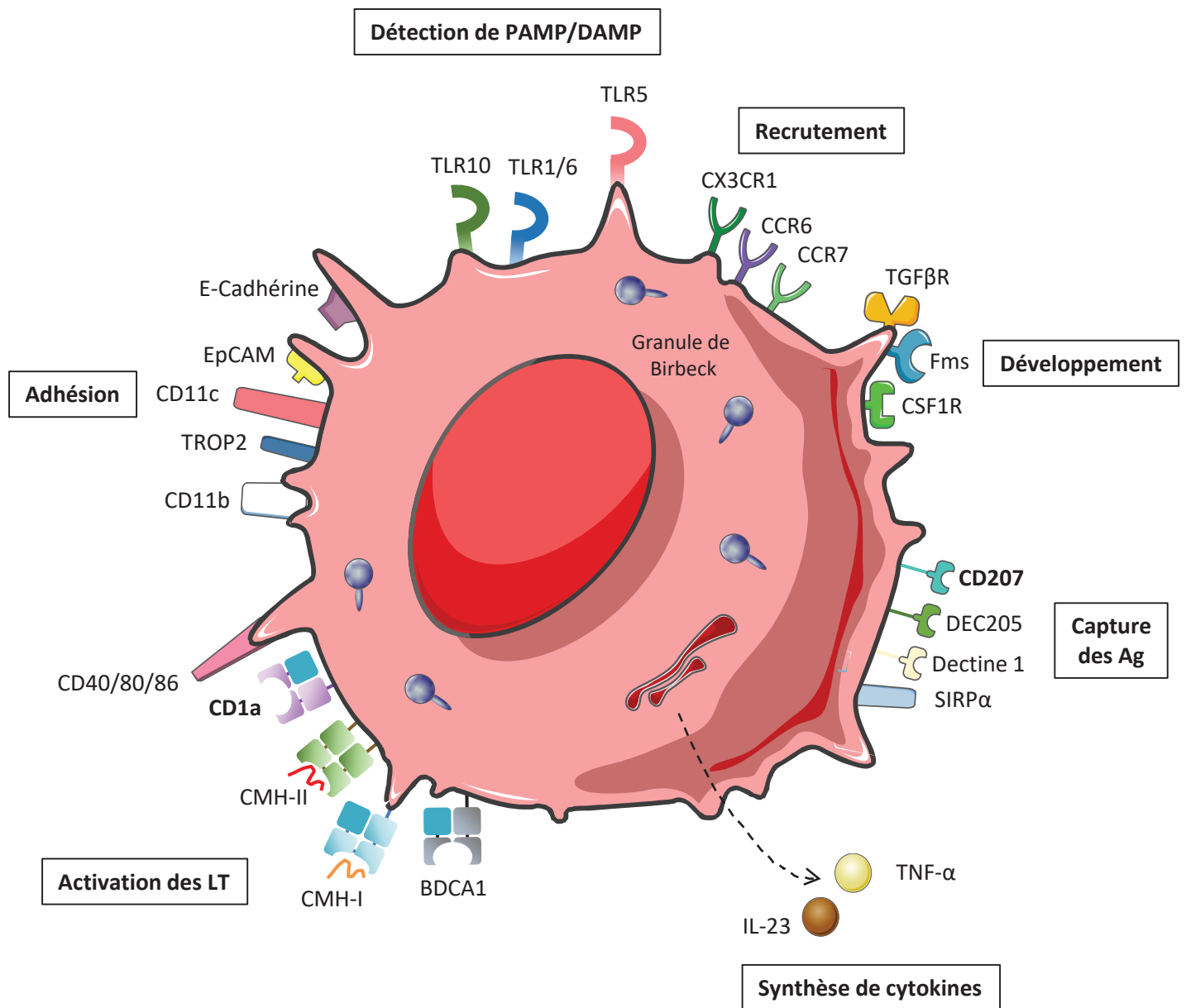


Figure 5 – Principales caractéristiques des LC humaines

Les LC expriment tout un panel de récepteurs membranaires et intracellulaires permettant leur adhésion, leur migration, l'endocytose d'Ag, la reconnaissance de toute une diversité de PAMP/DAMP, ainsi que la synthèse de cytokines. Elles expriment également des récepteurs membranaires permettant leur interaction avec des effecteurs de l'immunité adaptative et notamment impliqués dans la régulation de l'activation des LT. Les LC possèdent également un type d'organite particulier appelé granules de Birbeck dont la formation implique CD207 mais dont la fonction est toujours inconnue.

c. Propriétés fonctionnelles des LC

Lors d'une inflammation de la peau, la libération locale de TNF- α et d'IL-1 β stimule les LC. Leurs interactions avec les cellules épithéliales sont alors fortement diminuées, permettant ainsi leur migration vers les vaisseaux lymphatiques afférents. On les retrouve alors dans les zones T des OLS, avec une expression de marqueurs épithéliaux tels qu'EpCAM et E-cadhérine considérablement réduite. Elles conservent cependant l'expression de CD207, CD1a et CD1c (Geissmann et al., 2002). Des études chez l'Homme ont pu démontrer *ex vivo* qu'après migration dans les ganglions, les LC sont capables d'activer les LT CD8⁺ et d'orienter les LT CD4⁺ vers une polarisation de type Th2 (Artyomov et al., 2015; Klechevsky et al., 2008). En effet, bien que les LC soient complètement différentes des cDC1, elles ont en commun la forte expression des gènes impliqués dans les fonctions d'apprêtement et de présentation croisée d'Ag (Artyomov et al., 2015) pour lesquelles elles semblent efficaces (Banchereau et al., 2012; Romano et al., 2012). *Via* l'expression de la chaîne humaine CD1a dans des LC murines transgéniques, une étude a démontré leur capacité à présenter des Ag lipidiques aux cellules Th17 et Th22, induisant alors une inflammation de la peau des souris (Kim et al., 2016). Les LC humaines semblent aussi pouvoir induire l'activation de LTreg accompagnée de la production d'IL-22 de manière dépendante de CD1a (Seneschal et al., 2012). Par ailleurs, la découverte de l'expression spécifique de CD207 par les LC a permis le développement de modèles murins déficients pour cette protéine. Plusieurs études ont alors mis en évidence le rôle de ces cellules dans l'induction d'hypersensibilité retardée de contact (Kaplan et al., 2005).

3.2 Cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC)

Dans des contextes inflammatoires, les monocytes sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires dont les DC inflammatoires, aussi appelées DC dérivées de monocytes ou MoDC (León et al., 2007). Bien que la capacité des monocytes à se différencier en MoDC *in vitro* en présence de **GM-CSF** et d'**IL-4** a été démontrée depuis longtemps (Sallusto and Lanzavecchia, 1994), la mise en évidence de l'existence de ce type de cellules *in vivo* n'a pas été facile. La présence de cellules myéloïdes inflammatoires *in vivo* chez l'Homme a été reportée dans divers contextes tels que l'eczéma (Wollenberg et al., 1996), le psoriasis (Wollenberg et al., 2002) ou la rhinite allergique (Ibon et al., 2016). On observe cependant une certaine hétérogénéité au sein des populations identifiées dans ces différentes études, sans réel consensus concernant le terme utilisé pour les décrire : monocytes, macrophages, DC... Bien qu'elles proviennent de monocytes, l'expression des marqueurs CD1c, CD1a et Fc ϵ R1 par ces cellules inflammatoires indiquerait qu'elles appartiennent bien à la famille des DC. Des MoDC CD16⁻ BDCA1⁺ CD14⁺ ont aussi été récemment identifiées dans deux autres types d'échantillons inflammatoires : du liquide synovial provenant d'articulations arthritiques et de l'ascite de patientes atteintes d'un cancer du sein ou de l'ovaire (Segura et al., 2013b). L'expression du FC ϵ R1 les différencie des macrophages et une analyse transcriptomique de ces cellules les définit comme une population intermédiaire entre des DC et des macrophages. Dans cette dernière étude, les MoDC identifiées semblent capables de promouvoir l'expression du facteur de transcription ROR γ t ainsi que la synthèse d'IL-17A par les LT mémoires autologues *via* leur production de TGF- β , IL-1 β , IL-6 et IL-23.

4. Technologies haut-débit et transcriptome des populations de cellules dendritiques

4.1 Limites des technologies classiques et émergence de technologies à haut débit

L'identification précise des sous-populations de DC reste difficile avec les technologies habituellement utilisées qui permettent de caractériser phénotypiquement ou fonctionnellement les cellules avec relativement peu de profondeur. L'environnement tissulaire et l'état de maturation des DC peuvent aussi largement influencer leurs phénotype et propriétés fonctionnelles, d'où l'existence de diverses nomenclatures utilisées au fil des années entre les espèces ou les tissus pour désigner une même population cellulaire. Ces techniques sont toujours utilisées mais le développement parallèle de technologies à plus haut débit, telles que la cytométrie de masse (CyTOF) ou le séquençage complet du transcriptome (RNAseq), a permis d'obtenir plus de précisions sur les populations déjà identifiées, de découvrir des populations jusque-là inconnues, et enfin d'uniformiser la classification des DC entre les tissus et les espèces (Guilliams et al., 2014).

Les propriétés fonctionnelles des cellules étant grandement dictées par leur transcriptome, l'utilisation des empreintes moléculaires des cellules et plus particulièrement de leurs spécificités transcriptomiques, permet d'établir leur identité. De nombreuses études ont effectué des analyses de RNAseq sur des populations isolées par cytométrie en flux sur la base de l'expression de marqueurs spécifiques à chacune d'elles. Cette technique nécessite néanmoins une grande rigueur lors de la mise en place de la stratégie d'identification des populations, car une contamination par d'autres cellules peut biaiser de façon dramatique le profil transcriptomique obtenu (Vu Manh and Dalod, 2016). De nouvelles avancées techniques ont permis le développement d'analyse de RNAseq à l'échelle d'une cellule unique (« single cell RNAseq », scRNAseq), technologie récemment utilisée par Villani *et al.* pour caractériser les DC humaines du sang de donneurs sains (Villani et al., 2017). Cette technologie permet d'éviter l'étape de tri préalable et donc des potentielles contaminations, ainsi qu'une identification non biaisée des cellules établie *a posteriori* à partir du profil transcriptomique obtenu pour chaque cellule.

4.2 Impact de l'activation sur le transcriptome des cellules

Des analyses comparatives de RNAseq ont pu démontrer l'induction d'un remodelage du profil transcriptomique des DC par différentes activations *in vitro* et *in vivo*, avec par exemple l'induction des gènes des voies NF- κ B et IFN de type I. Ces études ont permis de mettre en évidence l'ensemble des gènes réellement associés à l'identité cellulaire des populations de DC étudiées et dont l'expression n'est pas modifiée par leur activation ou maturation (Balan et al., 2014; Vu Manh et al., 2013). Contrairement à ce qui avait été suggéré auparavant (Meredith et al., 2002; Soumelis and Liu, 2006), l'analyse des pDC a par exemple démontré que leur activation n'induit pas leur conversion en un nouveau sous-type de cDC mais que leur identité transcriptomique est maintenue (Vu Manh et al., 2013). Le RNAseq a aussi permis aussi de réfuter l'hypothèse de l'existence d'une population appelée « DC tueuses et productrices d'IFN » (IKDC) chez la souris (Chan et al., 2006) en démontrant que leur profil transcriptomique est semblable à celui des cellules NK, dans un état d'activation particulier, et bien différent de celui des diverses populations de DC (Robbins et al., 2008).

4.3 Similarités inter-tissus et inter-espèces

Ce sont également des études de RNAseq qui ont permis de repérer les homologues entre les populations de DC identifiées dans différents tissus (Crozat et al., 2010a; Williams et al., 2010; Miller et al., 2012; Watchmaker et al., 2014) et entre différentes espèces (Contreras et al., 2010; Crozat et al., 2010b; Haniffa et al., 2012; Marquet et al., 2014; Robbins et al., 2008; Vu Manh et al., 2014). La démonstration des homologues entre les sous-types de DC humaines et murines (Crozat et al., 2010a; Dutertre et al., 2014; Robbins et al., 2008) a représenté une avancée majeure dans le domaine et a facilité l'analyse de la spécialisation fonctionnelle des populations de DC. Par ailleurs, la technologie CyTOF a également été récemment utilisée pour identifier et comparer les différentes populations entre tissus et espèces (Homme, souris, macaque), en conditions normales ou inflammatoires (Williams et al., 2016). Williams *et al.* ont ainsi proposé une stratégie universelle d'identification des DC indépendamment de l'espèce ou du tissu desquels elles proviennent.

Le RNAseq a aussi été utile pour mettre en évidence les similarités ou différences pouvant exister entre les DC dérivées de progéniteurs *in vitro* et celles que l'on retrouve *in vivo*. Une étude chez la souris a par exemple démontré que les DC dérivées de monocytes (en présence de GM-CSF) ont un profil transcriptomique plus proche de celui des monocytes et macrophages plutôt que des DC isolées de ganglions lymphatiques (Robbins et al., 2008). Chez l'Homme, les DC CD11b⁺ obtenues *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC) CD34⁺ semblent être équivalentes aux MoDC plutôt qu'aux cDC2. Ce même type de culture permet cependant d'obtenir un grand nombre de cDC1 avec un profil transcriptomique très proche de celles isolées du sang de donneurs sains (Balan et al., 2014). Un protocole de différenciation des HSC CD34⁺ permet aujourd'hui d'obtenir les deux lignages de DC, plasmacytoïdes et myéloïdes (incluant les sous-types cDC1 et cDC2), avec des transcriptomes rigoureusement proches de ces mêmes types de cellules isolées du sang (Lee et al., 2015).

4.4 Identification de nouvelles populations de DC humaines

Comme expliqué précédemment, l'analyse par scRNAseq permet une identification non-biaisée des différentes populations cellulaires. Les travaux de Villani *et al.* basés sur du scRNAseq de PBMC ont permis de révéler l'existence de deux nouvelles populations de cellules (Villani et al., 2017). La première est constituée de cellules progénitrices très précoces caractérisées par l'expression des marqueurs CD34⁺ CD100⁺ CD123^{low}. Elles possèdent une grande capacité de prolifération et de différenciation en cDC1 et cDC2. La deuxième population est quant à elle caractérisée par l'expression des marqueurs AXL ainsi que SIGLEC6, et appelée AS-DC (aussi appelée DC5 dans leur classification). Cette population exprime des molécules communes avec les pDC, notamment certaines classiquement utilisées pour l'identification de ces dernières et était donc jusqu'à présent isolée avec les pDC dans les processus de tri cellulaire, biaisant ainsi l'analyse fonctionnelle de ces cellules. Des analyses fonctionnelles des cellules identifiées grâce à la stratégie de scRNAseq permirent notamment de mettre en évidence que, contrairement aux pDC, les AS-DC ne sont pas capables de produire de l'IFN- γ après engagement de TLR9 mais synthétisent de l'IL-8 ou de l'IL-12p70. Elles possèdent aussi des capacités d'activation des LT et de différenciation en cDC2, soulevant ainsi l'hypothèse qu'elles puissent représenter une population de pré-DC. C'est d'ailleurs ainsi que sont caractérisées les DC AXL⁺ SIGLEC6⁺ identifiées par scRNAseq dans l'étude de See *et al.* : un type de précurseurs précoces possédant la capacité de se différencier en cDC (ici cDC1 et cDC2) (See et al., 2017).

4.5 RNAseq et définition de signatures de DC

Plusieurs stratégies sont aujourd'hui utilisées pour identifier des listes de gènes « signatures » d'un type cellulaire. L'analyse du transcriptome d'un sous-type particulier de DC permet l'identification des transcrits les plus exprimés dans cette population. La comparaison du transcriptome des différentes populations de DC permet l'identification des gènes spécifiques ou enrichis dans une population comparée aux autres. Ces signatures peuvent alors être utilisées afin d'établir un score ou un pourcentage d'infiltration par les différents types de DC dans un tissu ou un contexte immunitaire précis. De par l'accessibilité à des bases de données publiques de résultats d'analyses transcriptomiques de tumeurs telles que le TCGA, l'infiltration de nombreuses tumeurs humaines par les DC a été évalué grâce à ces signatures. Nous détaillerons les résultats dans le chapitre II de ce manuscrit.

III. Focus sur les cDC1

Nous allons maintenant aborder une partie entièrement dédiée à la sous-population de cellules dendritiques myéloïdes appelée cDC1 autour de laquelle se sont articulés mes travaux de thèse. Cette population représente moins de 0,05% des PBMC chez l'Homme (Dzionek et al., 2000). Etant données les ressemblances que l'on trouve entre les cDC1 et cDC2, il a d'abord été suggéré que ces deux sous-types de DC représentaient différents états de maturation d'une même population (Dzionek et al., 2000; Lindstedt et al., 2005). Mais des analyses transcriptomiques comparatives ont ensuite identifié les caractéristiques particulières des cDC1, communes avec les DC CD8 α^+ murines, les décrivant donc comme une population à part entière (Crozat et al., 2010a; Robbins et al., 2008). Les travaux de Robbins *et al.* ont en effet confirmé l'expression partagée de certains gènes reportés quelques années plus tôt tels que TLR3 (Lindstedt et al., 2005) ou Necl2 (Galibert et al., 2005). La très faible proportion des cDC1 a longtemps freiné et freine encore aujourd'hui leur étude, en particulier concernant leur ontogénie. Néanmoins, les analyses de leur transcriptome (Balan et al., 2014; Crozat et al., 2010a) ainsi que le développement de protocoles permettant leur différenciation *in vitro* à partir de HSC CD34 $^+$ (Balan et al., 2014, 2018; Poulin et al., 2010; Proietto et al., 2012) ont permis l'accumulation de nombreuses nouvelles données.

1. Origine et distribution des cDC1

1.1 Développement des cDC1

Chez la souris, la différenciation des DC CD8 α^+ et CD103 $^+$ est régulée par les facteurs de transcription tels que Batf3, Irf8, Id2 et Nfil3 (Belz and Nutt, 2012; Miller et al., 2012). Certains d'entre eux sont aussi impliqués chez l'Homme. La génération de cDC1 à partir d'HSC isolées de sang de cordon ombilical est par exemple dépendante de **BATF3** (Basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3) (Poulin et al., 2012). Cependant, le rôle essentiel de ce facteur de transcription n'a pour l'instant pas été démontré *in vivo*, le blocage de son expression dans des souris humanisées n'ayant pas d'impact sur la proportion des cDC1. **IRF8** semble aussi être impliqué car sa déficience entraîne chez l'Homme une absence complète de cDC1 dans le sang (Hambleton et al., 2011), accompagnée d'une absence de

monocytes, pDC et cDC2, soulevant l'hypothèse de l'implication d'IRF8 dans le développement d'un progéniteur commun à l'origine de ces populations immunitaires. Enfin, il a également été démontré que le facteur de transcription **GATA2** intervient aussi dans la différenciation des cDC1 (Collin et al., 2015; Onodera et al., 2016). Il est important de noter que l'identification de ces facteurs impliqués dans la différenciation des DC a permis le développement de modèles murins déficients en cDC1, comme les souris *Batf3*^{-/-}.

Flt3-L (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand) est un facteur de croissance soluble ou membranaire impliqué dans la génération de cDC1 *in vivo* et *in vitro* chez l'Homme et la souris (Merad and Manz, 2009). Pour preuve, il a par exemple été reporté une importante augmentation spécifique de la proportion de cDC1, chez les patients atteints de malaria sévère accompagnée d'un très fort taux de Flt3-L plasmatique (Guermonprez et al., 2013). La même observation a été faite dans le sang de volontaires sains traités au Flt3-L (Galibert et al., 2005; Guermonprez et al., 2013). Cependant, des souris humanisées traitées de la même façon ne présentent pas seulement une augmentation de la proportion des cDC1, mais aussi des pDC et cDC2 (Ding et al., 2014b), remettant en cause le rôle supposé de cette cytokine dans le développement sélectif des cDC1. En parallèle des modèles murins, les méthodes de différenciation de DC *in vitro* ont permis d'obtenir des informations quant à l'implication d'autres cytokines et facteurs de croissance dans la génération de cDC1. Dans le protocole développé par Poulin *et al.*, les HSC de sang de cordon sont amplifiées lors d'une première culture en présence de SCF (Stem cell factor), Flt3-L, IL-3 et IL-6, puis différenciées grâce au remplacement des interleukines 3 et 6 par du GM-CSF et de l'IL-4 (Poulin et al., 2010). Ces cocktails de cytokines permettent la génération de plusieurs populations de DC dont les cDC1, avec un profil transcriptomique particulièrement proche de celui des cDC1 retrouvées *in vivo* (Balan et al., 2014). D'autres protocoles de différenciation *in vitro* ont ensuite été développés et permettent désormais d'obtenir en parallèle des cDC1, cDC2 et pDC grâce à d'autres cocktails de cytokines (Balan et al., 2018; Lee et al., 2015; Thordardottir et al., 2014). Notons que le Flt3-L fait toujours partie de ces cultures *in vitro*.

1.2 Distribution tissulaire des cDC1

Plusieurs études supportent l'hypothèse que les cDC1 du sang sont à l'origine des cDC1 présentes dans les organes lymphoïdes secondaires ou les autres tissus périphériques. Il a par exemple été démontré que les cDC1 circulantes expriment le marqueur de prolifération Ki67, expression perdue dans les tissus (Nizzoli et al., 2013; Segura et al., 2012), sans qu'une véritable démonstration de leur capacité de prolifération des DC ait été faite pour autant. De plus, la plasticité phénotypique des cDC1 a été mise en évidence par une étude montrant que la culture de DC, isolées du sang de donneurs sains, en présence de tissu cutané permet de réguler positivement l'expression des marqueurs CD1a et BDCA1 à la surface des cDC1. Ces cellules acquièrent alors un phénotype équivalent aux DC BDCA3^{hi} de la peau humaine (Haniffa et al., 2012).

On retrouve les cDC1 dans de multiples tissus lymphoïdes (thymus, ganglions, rate, amygdales) et autres tissus périphériques avec généralement une proportion supérieure et un phénotype plus activé que les cDC1 du sang (Haniffa et al., 2012; Nizzoli et al., 2013; Yoshio et al., 2013). En effet, elles expriment plus fortement les marqueurs d'activation CD40, CD80, CD83, CD86 et PD-L1. De façon remarquable, le foie et les poumons sont particulièrement riches en cDC1 (Demedts et al., 2005; Kelly et al., 2014; Lavin et al., 2017; Tsoumakidou et al., 2006), suggérant un rôle particulier de ce sous-type

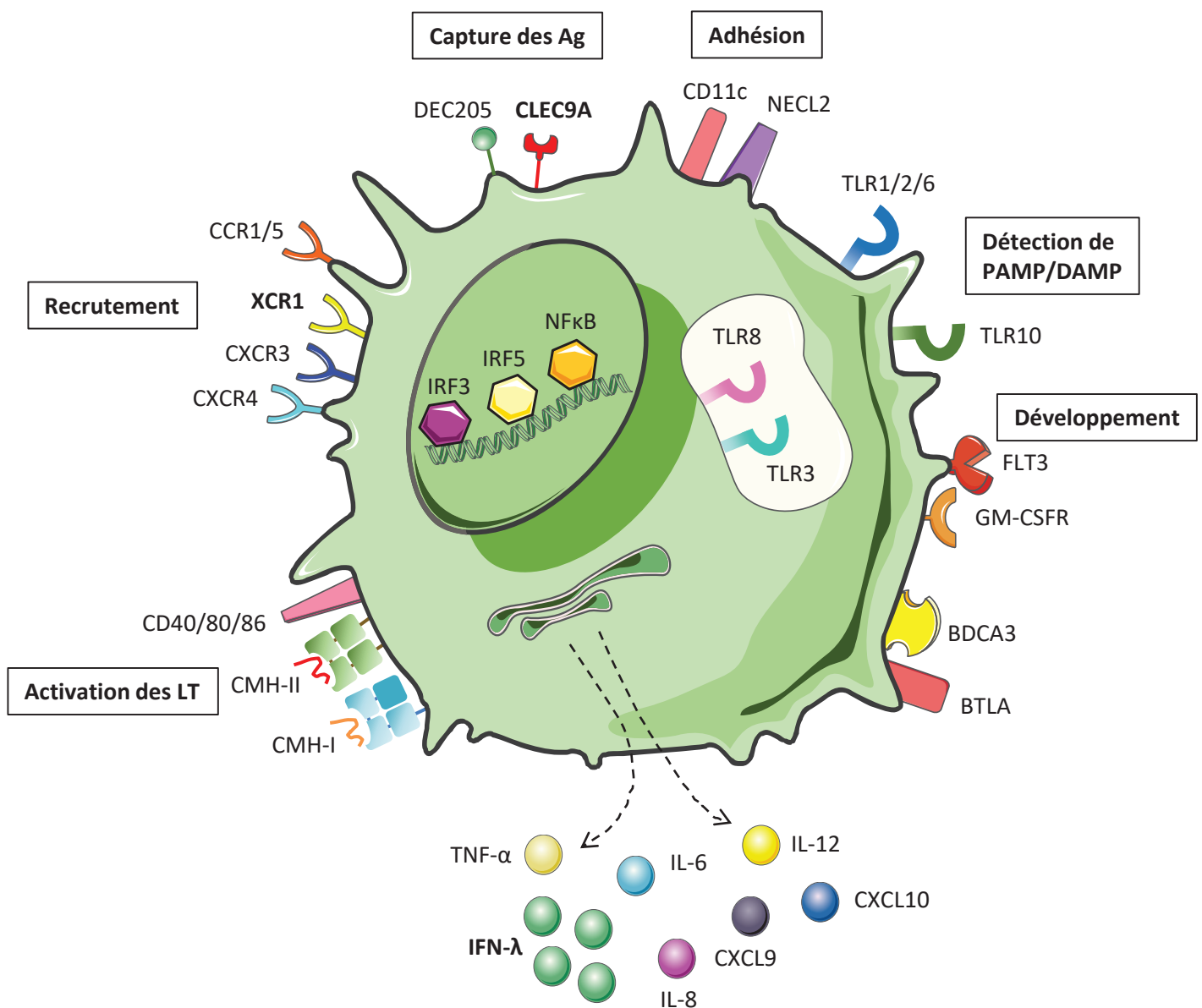


Figure 6 – Principales caractéristiques des cDC1 humaines

Les cDC1 expriment tout un panel de récepteurs membranaires et intracellulaires leur adhésion, leur migration, l'endocytose d'Ag, la reconnaissance de toute une diversité de PAMP/DAMP, ainsi que la synthèse de cytokines dont l'IFN-λ. Elles expriment également des récepteurs membranaires permettant leur interaction avec des effecteurs de l'immunité adaptative et notamment impliqués dans la régulation de l'activation des LT.

cellulaire dans l'immunité de ces organes. Une étude à laquelle j'ai pu participer a également mis en évidence la modulation de la distribution et des fonctions des cDC1 humaines induites en réponse à une infection virale. En effet, le sang des patients infectés par HBV présente une proportion de cDC1 significativement réduite par rapport à des donneurs sains bien que ce virus ne semble pas affecter leur fréquence au sein de biopsies hépatiques. Néanmoins, les cDC1 présentes dans le foie de ces mêmes patients présentent une sous-expression de CD40, suggérant une altération de leur activation.

Cf : Annexe 1 _ Circulating and hepatic BDCA1⁺, BDCA2⁺ and BDCA3⁺ dendritic cells are subverted in patients with chronic HBV infection. *Ouaguia et al.*, Soumis

2. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cDC1

2.1 Phénotype des cDC1

Les cDC1 expriment des marqueurs communs avec les cDC2, tels que CD13 et CD33, mais en diffèrent par une plus faible expression de **CD11c** et l'absence totale d'expression de CD11b et de SIRPα (CD172a) [Figure 6]. Les cDC1 ont tout d'abord été décrites comme un type de DC du sang exprimant fortement la glycoprotéine transmembranaire **BDCA3** (thrombomoduline, CD141, Blood dendritic cell antigen 3) (Dzionek et al., 2000; MacDonald et al., 2002) qui peut aussi être exprimée de façon modérée par d'autres cellules comme les cDC2, les pDC, les LC et les monocytes (Chu et al., 2012; Demedts et al., 2005; Dzionek et al., 2002; Haniffa et al., 2012; Segura et al., 2012; Van Pottelberge et al., 2010). De plus, son expression peut être induite lors de la maturation de DC *ex vivo*, notamment à la surface des cDC2 et des pDC (Dzionek et al., 2000). BDCA3 est également exprimé par les cellules endothéliales et possède des propriétés anticoagulantes en séquestrant la thrombine, ainsi qu'une activité anti-inflammatoire en bloquant le LPS et la protéine HMGB1 (high mobility group box 1) relarguée par les cellules nécrotiques. La molécule BDCA3 peut également activer directement d'autres molécules anti-inflammatoires telles que l'aPC (activated protein C), le TAFI (Activated thrombin-activatable fibrinolysis) et des inhibiteurs du complément (Li et al., 2012). Son expression par les DC peut suggérer l'existence d'une autre propriété fonctionnelle qui reste encore aujourd'hui à démontrer.

Dans la mesure où l'expression de BDCA3 est partagée avec d'autres cellules, l'identification des cDC1 ne peut reposer uniquement sur son expression et nécessite l'analyse de marqueurs spécifiques complémentaires. Cependant, pour analyser les caractéristiques fonctionnelles des cDC1, beaucoup d'études ont isolé ces cellules grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-BDCA3. Bien que les cDC1 représentent la population immunitaire qui exprime ce marqueur le plus fortement, ce genre de technique ne permet qu'un enrichissement en cDC1 plutôt qu'une purification à proprement parler. Les résultats de ces études reflètent alors les capacités fonctionnelles d'une population hétérogène. Plusieurs molécules comme CLEC9A/DNGR-1 et XCR1 sont aujourd'hui connues pour être spécifiquement exprimées par les cDC1, qu'elles soient humaines ou murines. Leur implication dans la fonctionnalité des DC sera détaillée ci-dessous.

2.2 Reconnaissance et internalisation des Ag

CLEC9A est une lectine de type C exprimée spécifiquement par les cDC1 humaines et murines. Cette molécule est communément utilisée en combinaison avec BDCA3 pour identifier ce sous-type de DC. Elle est impliquée dans la reconnaissance des filaments d'actine F exposés à la surface des cellules nécrotiques et considérés comme des DAMP (Danger associated molecular pattern) (Ahrens et al., 2012; Sancho et al., 2009; Zhang et al., 2012). L'engagement de CLEC9A induit son internalisation (Schreibelt et al., 2012), l'activation de la tyrosine kinase Syk et la régulation positive de la présentation croisée d'Ag associés aux cellules nécrotiques aboutissant à l'induction de réponses cytotoxiques spécifiques (Ahrens et al., 2012; Hanč et al., 2015; Sancho et al., 2009; Schreibelt et al., 2012; Tullett et al., 2016; Zelenay et al., 2012). L'expression de CLEC9A par les cDC1 pourrait être cruciale dans un contexte de cancer, l'environnement tumoral étant connu pour être riche en cellules nécrotiques. Il a d'ailleurs été prouvé chez la souris que le ciblage de cette molécule grâce à des peptides ou des anticorps spécifiques induit la mise en place d'une réponse cytotoxique efficace médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et le contrôle du développement tumoral (Picco et al., 2014; Sancho et al., 2008; Schreibelt et al., 2012; Yan et al., 2016). L'utilisation d'anticorps dirigés contre CLEC9A permet aussi la formation transitoire de centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires, associée à la génération d'une importante réponse humorale chez la souris et le macaque (Li et al., 2015; Park et al., 2013).

L'absence d'expression de **SIRPα** (Signal-regulatory protein α) est une autre particularité intéressante des cDC1 en comparaison avec les autres sous-populations de DC. L'interaction de ce récepteur avec son ligand CD47 constitue un « *don't eat me signal* » qui inhibe la phagocytose des cellules CD47⁺ par les macrophages ou les DC SIRPα⁺ (Barclay and Van den Berg, 2014; Jaiswal et al., 2009). Cette propriété des cDC1 est particulièrement intéressante pour leur fonction dans l'immunité antitumorale car l'expression de CD47 a été rapportée dans une grande variété de cancers et est associée à un mauvais pronostic des patients (Majeti et al., 2009; Murata et al., 2014; Willingham et al., 2012). Ces données laissent donc suggérer que les cDC1 ne sont pas sensibles à l'immunosuppression induite par les cellules tumorales *via* l'axe CD47-SIRPα.

2.3 Détection de PAMP et synthèse de cytokines/chimiokines

a. TLR3

Les cDC1 expriment fortement **TLR3** (Toll-like receptor 3), un PRR localisé dans les endosomes et spécialisé dans la reconnaissance des molécules d'ARN double brin. Il est donc particulièrement important pour l'immunité antivirale lors de la phagocytose de débris de cellules infectées (O'Neill et al., 2013). Il peut être exprimé par de nombreuses cellules chez l'Homme (Zarembek and Godowski, 2002), notamment par les cellules tumorales (Shi et al., 2016) et endothéliales (Kleinman et al., 2008), mais aussi par les cellules hématopoïétiques dont les cDC1 (Colletti et al., 2016; Hémond et al., 2013; Jongbloed et al., 2010). L'engagement de TLR3 par une molécule d'ARN double brin induit la phosphorylation de sa queue cytoplasmique, étape indispensable au recrutement de l'adaptateur TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β) et à l'activation subséquente de plusieurs voies de transcriptions, telles que IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3), NF-κB et AP-1 (Gauzzi et al., 2010), menant ainsi à l'activation des DC et leur production d'IFN et d'autres cytokines/chimiokines inflammatoires (Matsumoto and Selye, 2008). Le **poly(I:C)** (polyinosine-polycytidylic acid), un analogue

synthétique d'ARN double brin, est régulièrement utilisé pour induire l'activation des cDC1 *in vitro*. Il induit alors la régulation positive de l'expression des molécules de stimulation CD80, CD86 et CD40 (Colletti et al., 2016), ainsi que leur synthèse d'**IFN de type III**, IFN- β , CXCL9/10, IL-6, TNF- α et CCL5 (van der Aa et al., 2015; Balan et al., 2014; Lauterbach et al., 2010). La capacité des cDC1 à produire de l'IFN-III sera détaillée par la suite. Par ailleurs, les cDC1 expriment d'autres types de PRR tels que les **TLR 1, 2, 6, 8 et 10** (Hémont et al., 2013).

Comme démontré en **Annexe 1**, l'expression de TLR3 par les cDC1 du sang ne semble pas être impactée par l'infection par HBV, mais ces cellules semblent cependant fonctionnellement altérées. Leur activation par du poly(I:C) induit en effet une synthèse d'IFN-III significativement réduite comparée à celle des cDC1 isolées du sang de donneur sain. Dans une autre étude, l'analyse comparative des cDC1 du sang et du foie a montré des phénotypes équivalents, excepté pour l'expression de TLR3 nettement inférieure dans les cDC1 hépatiques (Mittag et al., 2011).

b. Synthèse de cytokines et chimiokines inflammatoires

Les cDC1 murines sont connues pour être les principales cellules productrices d'**IL-12p70**, mais les données chez l'Homme permettant de l'affirmer ne rencontrent pas un fort consensus. Une des premières études consacrées aux cDC1 du sang chez l'Homme a mis en évidence leur capacité à synthétiser de l'IL-12p70 en réponse à un cocktail de stimulation composé de poly(I:C), IFN- γ , TNF- α , IFN- α et IL-1 β (Jongbloed et al., 2010). Les cDC1 de la rate et du sang de cordon produisent cette même cytokine après activation par les TLR 1 à 9 combinée à de l'IL-4 et de l'IFN- γ (Poulin et al., 2010). La synthèse d'IL-12p70 a alors été considérée comme une spécificité des cDC1. Une étude plus récente contredit cependant ces données, identifiant les cDC2 et non cDC1 comme les principales cellules productrices d'IL-12p70, cette fois-ci en réponse à poly(I:C) seul (Nizzoli et al., 2013). Cette supériorité des cDC2 à produire de l'IL-12p70 est aussi retrouvée lorsqu'elles sont isolées des PBMC et stimulées avec un cocktail activateur composé de CD40L, IFN- γ , IL-4 et GM-CSF (Mittag et al., 2011). De leur côté, Hannifa *et al.* ont comparé toutes les populations de DC de la peau et démontré dans le même temps la supériorité des MoDC ainsi que l'incapacité des cDC1 à produire de l'IL-12p70 en réponse à divers stimuli (Haniffa et al., 2012). L'ensemble de ces résultats suggèrent de conclure que, tout comme d'autres populations de DC, les cDC1 sont bien capables de produire de l'IL-12p70 mais que leur réponse semble fortement dépendre du tissu duquel elles ont été isolées et du signal d'activation qu'elles ont reçu.

Les cDC1 du sang activées par poly(I:C) sont aussi capables de produire de l'IL-6, IL-8, IFN- β , TNF- α et CXCL10 (Jongbloed et al., 2010). Les cDC1 isolées de la peau humaine synthétisent quant à elles de l'IL-8, TNF- α et CXCL10 après activation par poly(I:C) (Haniffa et al., 2012). Cette même stimulation permet aux cDC1 dérivées de HSC *in vitro* de produire de l'IFN- β , IL-6, TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CCL5 (Balan et al., 2014). La capacité des cDC1 à produire de larges quantités de **CXCL10** ainsi que leur expression de XCR1 sont deux propriétés pouvant permettre un dialogue croisé entre les lymphocytes impliqués dans une réponse cytotoxique et les cDC1. En effet, la chimiokine CXCL10 est impliquée dans le recrutement des cellules NK, LT CD8⁺ et LT CD4⁺ Th1 exprimant très largement CXCR3 (le récepteur de CXCL9/10/11). Ces mêmes cellules sont d'importantes productrices de XCL1, qui favorise en retour le recrutement des cDC1 XCR1⁺.

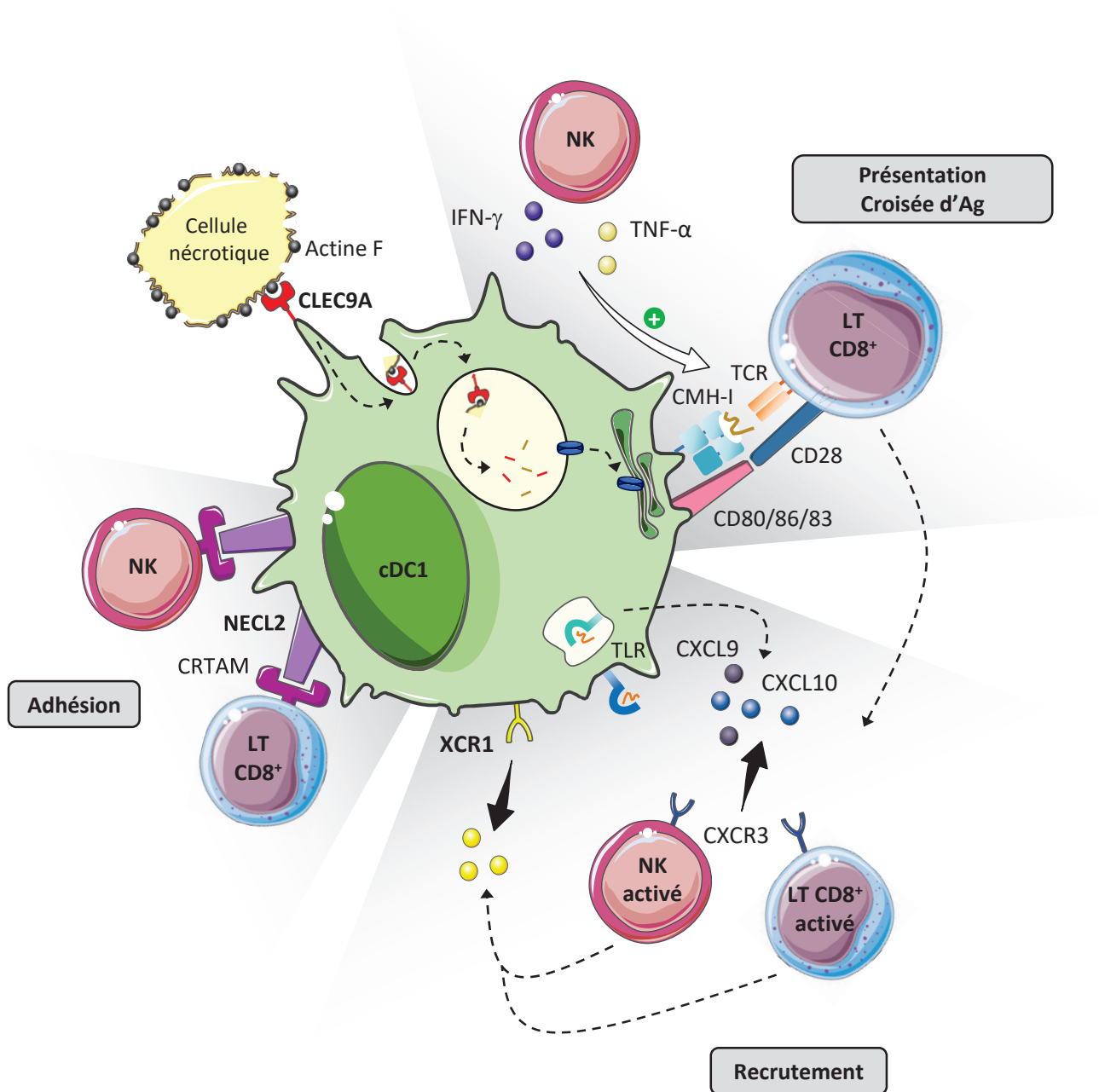


Figure 7 – Dialogue croisé entre cDC1 et effecteurs immunitaires cytotoxiques

De nombreuses données de la littérature mettent en évidence les liens étroits qui existent entre les cDC1 et les lymphocytes cytotoxiques. En effet, alors que les cDC1 produisent les chimiokines nécessaires au recrutement des LT et NK (CXCL9 et CXCL10), ces derniers synthétisent de fortes quantités de XCL1, chimiokine spécifiquement impliquée dans le recrutement des cDC1. L'interaction entre les molécules d'adhésion NECL2 et CRTAM permet la formation de contacts étroits entre ces types cellulaires. Enfin, la supériorité des cDC1 à cross-présenter des Ag, en particulier grâce à la lectine CLEC9A permettant l'internalisation de fragments cellulaires, induit l'activation efficace des LT CD8⁺. Via leur synthèse d'IFN-γ et de TNF-α, les cellules NK favorisent une régulation positive de ce processus.

2.4 Induction de réponses Th1 et Th2

La production de cytokines et chimiokines telles que le CXCL10, les IFN-I/III et l'IL-12p70 par les cDC1 suggère un rôle important de ces cellules dans l'induction de réponses lymphocytaires de type **Th1**. *In vitro*, les cDC1 humaines isolées du sang ou de ganglions lymphatiques induisent la prolifération de LT CD4⁺ allogéniques et leur synthèse d'IFN- γ , IL-5 et IL-13, de manière aussi efficace que les cDC2. Cette production de cytokines reflète bien une polarisation Th1, mais aussi Th2 (Segura et al., 2012). De leur côté, Jongbloed *et al.* ont plutôt démontré une supériorité des cDC1 du sang par rapport aux cDC2 dans l'induction de la production d'IFN- γ et d'IL-2 par les LT CD4⁺, reflet d'un profil Th1. L'activation préalable des cDC1 avec du poly(I:C) permet de doubler l'intensité de la synthèse de ces cytokines par les LT. De plus, ils ont aussi observé la capacité similaire des cDC1 et cDC2 à induire la production d'IL-13. Cependant, aucune n'est capable d'activer la synthèse d'IL-5 par les LT (Jongbloed et al., 2010). Dans une étude comparative des cDC1, cDC2 et pDC, Segura *et al.* ont démontré que, bien que les profils de cytokines induits soient équivalents pour ces trois populations, les cDC1 stimulent le plus efficacement la prolifération de LT CD4⁺, en particulier en coculture avec des cellules nécrotiques (Segura et al., 2013a).

D'autres ont suggéré le potentiel tolérogénique des DC BDCA3⁺, en particulier *via* leur capacité à synthétiser de l'IL-10 et à induire l'expansion des LTreg (Chu et al., 2012; Takagi et al., 2011; Velten et al., 2004). Cependant, aucune de ces études n'a établi un phénotype suffisamment complet pour confirmer la nature des cellules étudiées. Comme expliqué précédemment, d'autres DC que les cDC1 peuvent en effet exprimer le marqueur BDCA3. Ceci reflète une nouvelle fois la nécessité d'étudier l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques afin d'identifier de façon certaine les différents sous-types en amont de toute analyse fonctionnelle. Bien qu'il manque aujourd'hui des arguments solides pour certifier que les cDC1 sont capables d'activer des LTreg, elles semblent tout de même présenter une certaine plasticité, leur permettant d'induire des réponses Th1 et Th2. Ces cellules pourraient donc s'adapter aux facteurs environnementaux et de danger reconnus afin d'induire des réponses immunitaires adaptées.

2.5 Migration et interactions croisées avec les effecteurs cytotoxiques

a. XCR1

XCR1 est un récepteur de chimiokines spécifiquement exprimé par les cDC1 humaines et murines (DC CD8 α ⁺ et CD103⁺). Ses ligands, **XCL1** et **XCL2** chez l'Homme et XCL1 chez la souris, sont produits par les cellules NK activées, les LT CD4⁺ Th1 et les LT CD8⁺ [Figure 7] (Contreras et al., 2010; Crozat et al., 2010b; Haniffa et al., 2012; Marquet et al., 2014; Robbins et al., 2008; Vu Manh et al., 2014) et permettent la migration spécifique des cDC1 (Bachem et al., 2010; Dorner et al., 2009; Yamazaki et al., 2010). Chez la souris, l'interaction des LT CD8⁺ avec les cDC1 permet la régulation positive de leur production de XCL1 et une augmentation de leur survie ainsi que de leurs fonctions effectrices (cytotoxicité et synthèse d'IFN- γ) (Dorner et al., 2009). Toujours chez la souris, il a aussi été démontré que XCL1 peut être produit par les cellules épithéliales médullaires du thymus, favorisant ainsi l'accumulation de cDC1 contribuant à l'expansion des LTreg (Lei et al., 2011).

Tout comme CLEC9A, XCR1 fait partie des molécules candidates pour le ciblage spécifique des cDC1 en immunothérapies. Il a par exemple été démontré que l'injection d'anticorps anti-XCR1 ou de XCL1 recombinant permet la polarisation des LT CD4⁺ vers un profil Th1 et l'induction d'une réponse

CTL efficace contre des cellules tumorales de thymome dans un modèle de souris transgéniques exprimant le récepteur XCR1 humain à la surface des cDC1 (Hartung et al., 2015).

b. NECL2/CADM1

NECL2 (Nectin-like protein 2) est une molécule d'adhésion de type nectine exprimée par de multiples types cellulaires. Parmi les cellules hématopoïétiques humaines et murines, son expression est restreinte aux cDC1 (Galibert et al., 2005; Robbins et al., 2008). Elle permet l'adhérence intercellulaire grâce à des interactions homotypiques, mais aussi la reconnaissance de types cellulaires différents *via* à des interactions hétérotypiques avec d'autres protéines d'adhésion. NECL2 interagit par exemple avec **CRTAM** (Class I-restricted T cell-associated molecule), une molécule dont l'expression est transitoirement induite à la surface des cellules NK, NKT et LT $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ lors de leur activation [Figure 7] (Arase et al., 2005; Boles et al., 2005; Galibert et al., 2005; Kennedy et al., 2000). L'expression de NECL2 par les cDC1 pourrait donc être primordiale dans leur dialogue croisé avec les différents effecteurs cytotoxiques de l'immunité.

NECL2 semble jouer un rôle double lorsqu'elle est exprimée par les cellules tumorales. Cette molécule peut en effet avoir une fonction antitumorale en participant au maintien des structures épithéliales pour empêcher leur propagation. La perte de son expression par hyperméthylation a aussi été observée notamment dans le cancer du poumon (NSCLC), associée à des modifications morphologiques des cellules tumorales et leur échappement aux cellules immunitaires cytotoxiques (Fukami et al., 2003; Murakami, 2005). A l'inverse, l'interaction entre CRTAM et NECL2 a une action protumorale en induisant la mort des LT $\gamma\delta$ *in vitro* (Dessarthe et al., 2013).

2.6 Présentation croisée d'Ag et activation de réponses CTL efficaces

De façon générale, il est aujourd'hui bien admis que les mDC ont un rôle dans la capture des Ag et leur présentation aux LT. En exprimant les molécules du CMH de classe I et II, elles sont en effet capables d'activer à la fois les LT CD4⁺ et CD8⁺ (Mantegazza et al., 2013). Les molécules du CMH de classe II sont spécifiquement exprimées par les APC et permettent la présentation aux LT CD4⁺ d'Ag exogènes provenant par exemple de pathogènes, de cellules infectées ou de cellules tumorales phagocytées. A l'inverse, le CMH-I est ubiquitairement exprimé et permet classiquement de présenter des Ag dérivés de protéines endogènes. Les DC ont cependant la capacité d'apprêter des Ag exogènes sur les molécules du **CMH-I** afin d'activer des réponses CTL efficaces. Ce processus est appelé **présentation croisée** ou cross-présentation (Segura and Amigorena, 2015).

a. cDC1 murines et présentation croisée d'Ag

Plusieurs travaux menés dans des modèles murins ont mis en évidence la supériorité des cDC1 à cross-présenter des Ag solubles ou cellulaires, comparativement aux autres populations de DC des OLS (Allan et al., 2003; Belz et al., 2004, 2005; den Haan et al., 2000; Pooley et al., 2001; Schulz et al., 2005). En effet, les cDC1 isolées de la rate de souris immunisées contre l'Ag OVA (Ovalbumine) sont capables d'induire une forte prolifération de LT CD8⁺ spécifiques (OT-I), donc par présentation croisée d'un Ag à la surface des molécules du CMH-I, alors que les cDC2 induisent plutôt la prolifération de LT CD4⁺ (OT-II) (Dudziak et al., 2007; Hildner et al., 2008). De façon cohérente, les souris *Batf3*^{-/-} déficientes pour la population cDC1 sont incapables de développer des réponses Th1 en contexte

infectieux ou tumoral. Dans ce contexte, le transfert adoptif de cDC1 permet de rétablir une immunité efficace (Hildner et al., 2008).

b. Une réelle supériorité fonctionnelle pour la présentation croisée d'Ag chez l'Homme ?

Les cDC1 ont tout d'abord été décrites comme possédant une capacité de présentation croisée d'Ag par les molécules de CMH-I aux LT CD8⁺ supérieure par rapport aux cDC2, pDC ou MoDC (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010b; Haniffa et al., 2012; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010). Notre équipe a récemment confirmé ces données et par ailleurs démontré l'existence d'un dialogue croisé entre les cellules NK et les cDC1 dérivées de HSC *in vitro*. En effet, les cytokines TNF- α et IFN- γ produites par les NK permettent d'augmenter significativement la capacité des cDC1 à cross-présenter un Ag tumoral aux LT CD8⁺ spécifiques (Deauvieau et al., 2015). L'ensemble de ces résultats reflète une spécialisation fonctionnelle de ces cellules pour la présentation croisée d'Ag, comme précédemment démontré pour les cDC1 murines CD8 α ⁺ (Dudziak et al., 2007; Hildner et al., 2008; Shortman and Heath, 2010). Certaines études ont cependant nuancé ces données en démontrant que les Ag solubles peuvent être cross-présentés tout aussi efficacement par différents sous-types de DC, remettant donc en question la supériorité fonctionnelle des cDC1 (Mittag et al., 2011; Nizzoli et al., 2013; Segura et al., 2012). De plus, l'équipe de Segura *et al.* a démontré que les cDC1 et les cDC2 du sang et des amygdales partageaient des caractéristiques communes indispensables à la présentation croisée d'Ag, telles qu'un pH adéquat dans les phagosomes, une production de ROS (Reactive oxygen species) dans les compartiments endosomaux ainsi qu'un transfert efficace des Ag depuis les vésicules d'endocytose vers le cytosol permettant leur chargement sur les molécules du CMH-I (Segura et al., 2013a). En lien avec ces dernières données, une étude a aussi montré la capacité similaire des cDC1 et cDC2 à cross-présenter des Ag délivrés dans les endosomes précoces, mais une capacité de présentation croisée accrue des cDC1 si les Ag sont préférentiellement délivrés dans les endosomes tardifs ou les lysosomes (Cohn et al., 2013). Les cDC1 pourraient donc posséder toutes les caractéristiques nécessaires à un meilleur transfert des Ag depuis ces compartiments vers le cytosol. Les capacités de présentation croisée de chaque sous-population de DC semblent dépendre en grande partie de la nature de l'Ag utilisé pour ces expériences.

c. Rôle de CLEC9A et XCR1 dans la présentation croisée d'Ag

La supériorité fonctionnelle des cDC1 semble plus claire lorsqu'il s'agit d'Ag associés à des cellules nécrotiques (Crozat et al., 2010b; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010; Segura et al., 2013a). La lectine CLEC9A, spécifiquement exprimée par les cDC1, pourrait être impliquée dans ce processus, car comme décrit précédemment, elle permet la reconnaissance d'actine F exposée à la surface des cellules nécrotiques [Figure 7] (Ahrens et al., 2012; Sancho et al., 2009; Zhang et al., 2012). Il a justement été démontré chez la souris que l'expression de CLEC9A par les cDC1 était indispensable à la présentation croisée d'Ag provenant de cellules nécrotiques, alors que ce n'est pas le cas pour la présentation directe par les molécules du CMH-II (Sancho et al., 2009; Zelenay et al., 2012). De plus, l'injection d'Ag couplés à des anticorps anti-CLEC9A induit leur présentation sur les CMH-I et CMH-II, permettant l'activation efficace des LT CD8⁺ et CD4⁺ (Caminschi et al., 2008; Idoyaga et al., 2011; Joffre et al., 2010; Lahoud et al., 2011; Sancho et al., 2008). Chez l'Homme, le ciblage des cDC1 par un anticorps anti-CLEC9A couplé à un Ag conduit aussi à l'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques ex

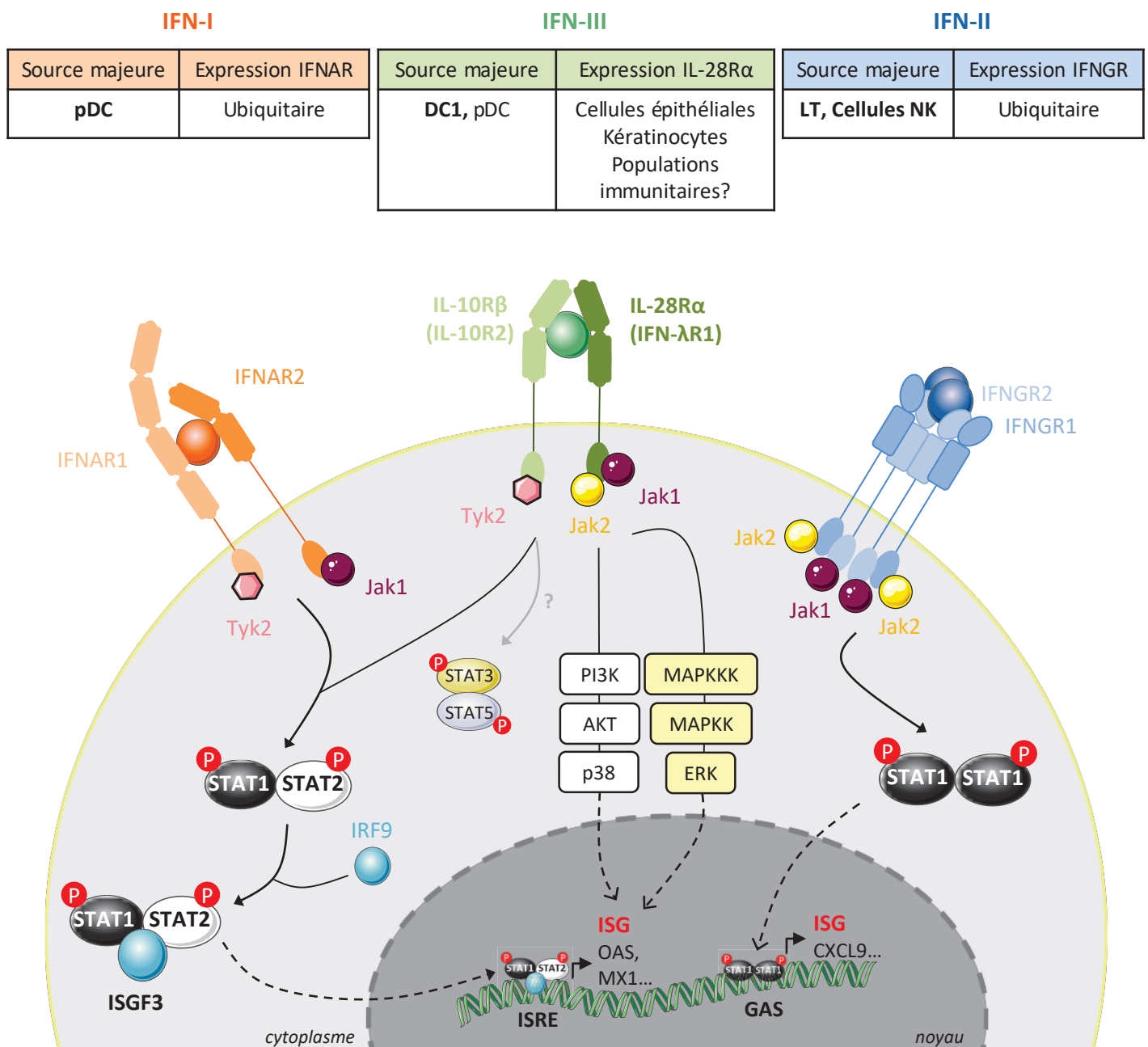


Figure 8 – Signalisation des interférons de type I, II et III

La liaison des IFN-III avec leur récepteur, composé des chaînes IL-10Rβ et IL-28Rα, induit la même voie de signalisation que l'engagement des IFNAR par les IFN-I. Elle passe notamment par le recrutement de JAK1 et TYK2, puis l'activation du complexe ISGF3 et sa fixation sur des sites ISRE de la chromatine, induisant alors la transcription de nombreux ISG. La phosphorylation de l'hétérodimère STAT3/5 a également été évoquée. En plus de la voie JAK-STAT commune avec les IFN-I, les voies des MAPK et de la PI3K jouent également un rôle important dans l'expression des ISG suite à une stimulation par les IFN-III.

De leur côté, les IFN-II induisent l'activation de JAK1 et JAK2, la dimérisation et la phosphorylation de STAT1, la fixation du dimère sur des éléments GAS de la chromatine, aboutissant également à la transcription d'ISG.

vivo (Schreibelt et al., 2012). Cependant, il reste encore à déterminer comment l'engagement de CLEC9A permet de faciliter la présentation croisée. Il pourrait notamment faciliter l'endocytose des Ag alors reconnus par des senseurs intracellulaires. Une étude chez la souris a aussi démontré que la voie de signalisation passant par Syk, la tyrosine kinase située en aval de CLEC9A, est impliquée dans la capacité de présentation croisée des cDC1. En effet, les DC de souris déficientes pour Syk (CD11c-Cre^{Syk^{f/f}}) ont des capacités réduites de présentation croisée d'Ag en réponse à l'infection par le virus VACV (Vaccinia virus) (Iborra et al., 2012). Cet élément est important pour la compréhension de la biologie des cDC1, mais aussi et surtout pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant CLEC9A et visant à induire des réponses CTL efficaces par présentation croisée d'Ag.

XCR1 pourrait aussi jouer un rôle dans la capacité des cDC1 à cross-présenter efficacement des Ag. Par rapport à CLEC9A, son rôle de récepteur de chimiokines est plus difficile à relier avec les fonctions de présentation antigénique. Même s'il n'a pas de lien direct avec le processus de présentation croisée, XCR1 intervient dans l'établissement d'interactions fortes entre les cDC1 et les LT CD8⁺ (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010b).

3. cDC1 et IFN de type III

La synthèse d'IFN de type III par les cDC1 est une de leurs principales caractéristiques reconnues aujourd'hui et documentée par plusieurs études qui seront présentées ici. Nous aborderons aussi dans cette partie les caractéristiques de ce type particulier d'IFN, bien que de nombreuses données soient déconnectées des cDC1.

3.1 Identification et diversité des IFN de type III

a. Découverte des familles d'IFN

La mise en évidence des interférons résulte de travaux menés dans les années 1950 par A. Isaacs et J. Lindenmann qui ont identifié une molécule « interférente » capable, suite à une infection par le virus influenza, de limiter la multiplication d'autres virus au sein des cellules infectées et des cellules saines. Ils l'ont donc appelée interféron (Isaacs et al., 1957). Trois interférons aux propriétés antivirales complémentaires ont par la suite été caractérisés : les IFN- α , β et γ (Müller et al., 1994).

Les IFN de type I représentent la plus large famille d'IFN comprenant en particulier les 13 sous-types d'IFN- α ainsi que l'IFN- β . Ils interagissent avec un récepteur membranaire composé des chaînes IFNAR1 et IFNAR2 (IFN-alpha receptor) (Domanski and Colamonici, 1996) associées au niveau de leur queue cytoplasmique avec les kinases JAK1 (Janus kinase 1) et TYK2 (Tyrosine kinase 2). Une fois activées, ces kinases induisent la formation du complexe de transcription ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3) composé des molécules STAT1/2 phosphorylées et d'IRF9. Sa fixation sur des domaines ISRE (Interferon-stimulated response element) présents dans les séquences régulatrices des promoteurs permet l'activation de la transcription de nombreux ISG (Interferon stimulated genes) [Figure 8]. L'IFN- γ , unique membre de la famille des IFN de type II, interagit également avec un récepteur membranaire composé de deux chaînes : IFNGR1 et IFNGR2 (IFN-gamma receptor). Cette interaction induit l'activation de JAK1 et JAK2, puis la dimérisation de STAT1, la fixation du dimère sur les éléments GAS (Interferon-gamma activated sequence) de la chromatine et l'induction de la transcription d'ISG [Figure 8]. Contrairement aux IFN-I, l'IFN- γ a une faible activité antivirale directe

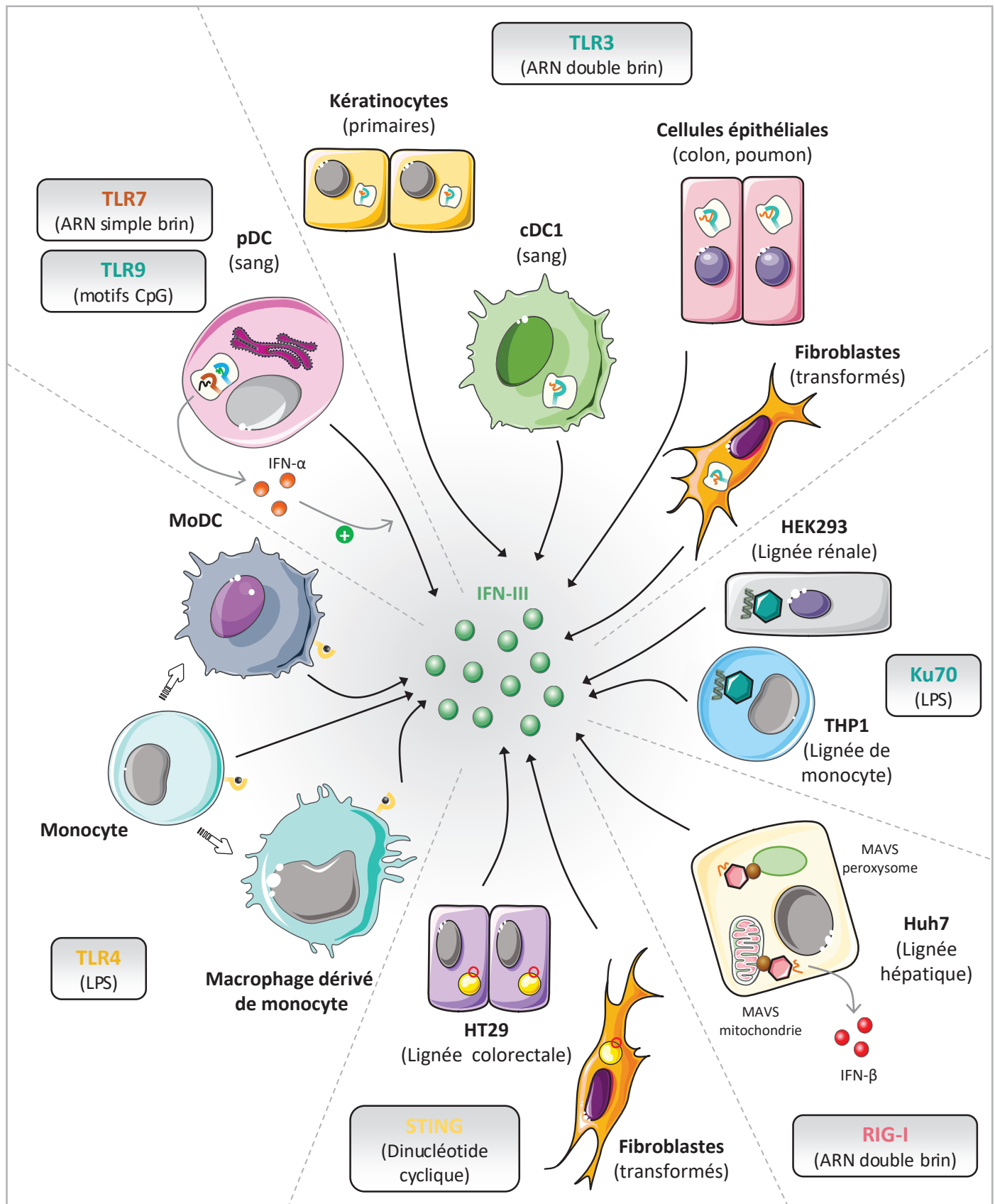


Figure 9 – Production d’IFN de type III

L’engagement de divers PRR intracellulaires ou membranaires peut induire la synthèse d’IFN-III. Parmi eux on retrouve TLR3, notamment exprimé par les cDC1, TLR4, TLR7, TLR9, STING et Ku70. L’activation du senseur RIG-I peut également induire la production d’IFN-III lorsque il est couplé à la protéine MAVS associée à la membrane des peroxysomes. Si celle-ci est plutôt associée à la membrane des mitochondrie, alors l’engagement de RIG-I induit la synthèse d’IFN-I.

mais permet une forte activation de l'immunité menant à l'élimination des infections (Pestka et al., 2004).

b. La nouvelle famille des IFN de type III / IFN- λ

De façon surprenante, un groupe de protéines aux propriétés similaires à celles des IFN-I a été caractérisé de façon concomitante dans deux laboratoires au début des années 2000 (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2002). Cette découverte a ouvert un nouveau chapitre de l'histoire des IFN. Ces protéines, dont la famille porte aujourd'hui le nom d'IFN de type III, ont tout d'abord été appelées **IFN- λ 1**, **IFN- λ 2**, et **IFN- λ 3** (Kotenko et al., 2003) et respectivement **IL-29**, **IL-28A** et **IL-28B** (Sheppard et al., 2002). Elles sont codées par les gènes *IFNL1*, *IFNL2* et *IFNL3*. Un quatrième membre de la famille, l'**IFN- λ 4**, a été identifié une dizaine d'années plus tard (Ludmila et al., 2013). Cette protéine présente moins de 30% d'homologie avec les autres membres de la famille et son expression est dépendante d'un polymorphisme situé dans l'intron 1 du gène *IFNL4* (O'Brien et al., 2014). Chez la souris, seulement deux IFN-III sont retrouvés au niveau protéique, IFN- λ 2 et IFN- λ 3. La séquence codant pour l'IFN- λ 1 est un pseudogène (Lasfar et al., 2006) et aucun gène orthologue codant pour l'IFN- λ 4 n'a été identifié dans le génome murin. Alors que toutes les séquences des IFN- λ 1 à 3 humains présentent de fortes homologies entre elles, on ne retrouve approximativement que 10 à 15% de similarité avec les IFN-I (Gad et al., 2009). Leur structure est plutôt similaire à celles des cytokines de la famille de l'IL-10 mais ils sont néanmoins fonctionnellement proches des IFN de type I.

3.2 Production d'IFN de type III

a. PRR et cellules productrices d'IFN-III

A l'instar des IFN de type I, les IFN-III sont connus pour leurs propriétés antivirales et sont induits en réponse à un large éventail de virus. La reconnaissance des PAMP (par exemple en cas d'infection virale) ou DAMP par les PRR permet en effet d'induire la synthèse des IFN-I et III (Iversen and Paludan, 2010; Levy et al., 2011). De nombreux types cellulaires ont été identifiés comme des sources de cet IFN, mais ces résultats sont à prendre avec précaution car reposant principalement sur des quantifications de l'expression ARNm qui peut différer de la synthèse protéique réelle [Figure 9].

Les TLR sont les PRR les plus étudiés dans la caractérisation de la synthèse d'IFN- λ . L'engagement du **TLR3** permet d'induire l'expression des IFN de type III dans les cDC1 (Balan et al., 2014; Lauterbach et al., 2010; Murata et al., 2014a; Yoshio et al., 2013), les cellules épithéliales pulmonaires et colorectales (Ioannidis et al., 2013; Swider et al., 2014), les fibroblastes transformés (Casrouge et al., 2006) ainsi que dans les hépatocytes primaires (Lee et al., 2014). Le TLR3, tout comme le **TLR4**, semble être également impliqué dans la production des IFN- λ par les monocytes, les macrophages dérivés de monocytes (MDM) et les MoDC matures (Coccia et al., 2004; Sirén et al., 2005). Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'un prétraitement des MDM par de l'IFN- α augmente l'expression du TLR4 et induit celle du TLR3, permettant alors une potentialisation de leur production d'IFN-III en réponse à des ligands de ces TLR (Sirén et al., 2005). De leur côté, les pDC sont d'importantes cellules productrices d'IFN- α mais aussi d'IFN- λ en réponse à l'engagement des **TLR7** et **TLR9** (Megjugorac et al., 2009; Murata et al., 2014a; Yin et al., 2012). Tout comme pour les MDM, la synthèse d'IFN-III par les pDC est amplifiée lorsqu'elles sont au préalable activées avec de l'IFN- α (Yin et al., 2012). Ces résultats soulignent donc l'existence d'une boucle d'amplification entre les IFN-I et III.

D'autres PRR peuvent aussi induire la synthèse d'IFN-III. C'est le cas du RLR (Rig-I-like receptor) **RIG-I**. Ce récepteur reconnaît les extrémités 5' triphosphate des molécules d'ARN double-brin et déclenche une cascade de signalisation passant par le recrutement de la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial antiviral signaling protein) associée à la membrane des peroxysomes et aboutissant à la synthèse des IFN-III. Lorsque MAVS est plutôt associée à la membrane des mitochondries, l'engagement de RIG-I aboutit en revanche à la production d'IFN-I (Odendall et al., 2014). Alors que presque tous les PRR cités jusqu'à présent permettent la synthèse simultanée d'IFN de type I et III (Donnelly and Kolenko, 2010), la reconnaissance d'ADN cytosolique par le senseur **Ku70** représente une exception car elle n'induit que la production d'IFN- λ dans des cellules HEK293 et THP-1 (Zhang et al., 2011b). Les ADN cytoplasmiques peuvent aussi être reconnus par **STING** et induire l'expression d'IFN- λ 1 au niveau ARNm dans différents types cellulaires, notamment des fibroblastes humains transformés et une lignée de cellules épithéliales colorectales (HT29) (Chen et al., 2018; Sali et al., 2015).

b. Voies de signalisation menant à la production d'IFN-III

Les premières équipes qui ont caractérisé les voies de signalisation en aval des PRR permettant la production d'IFN-III chez l'Homme et la souris ont ouvert la voie à des études comparatives entre ces derniers et les IFN-I (Onoguchi et al., 2007; Osterlund et al., 2007). Ces voies sont effectivement mieux connues pour induire la synthèse des IFN- α et β . On sait par exemple que l'expression d'IFN- β requiert une activation coordonnée de plusieurs facteurs de transcription tels que NF- κ B, IRF3 et IRF7. Comme le démontre une étude chez la souris, **IRF3** est aussi impliqué dans la régulation de la transcription des gènes codant pour les IFN- λ (Onoguchi et al., 2007). Les auteurs ont de plus montré l'existence de sites de fixation des IRF et de **NF- κ B** dans le promoteur proximal des différents gènes *Ifnl*, suggérant une régulation commune des IFN- λ et β . Chez l'Homme, l'analyse des régions proximales et distales des promoteurs des gènes codant pour les IFN-III a aussi révélé la présence de plusieurs sites de fixation potentiels de ces facteurs de transcription (Lee et al., 2014; Siegel et al., 2011). Une autre étude a cependant mis en évidence une différence de régulation transcriptionnelle des IFN-I et III : alors que l'expression des IFN- α et β requiert une activité coordonnée des multiples facteurs de transcription cités ici, l'expression des IFN- λ peut être induite seulement grâce à NF- κ B ou aux IRF. Un site de fixation de NF- κ B dans le promoteur distal du gène IFNL1 permet en effet de réguler sa transcription, indépendamment des IRF3/7 (Thomson et al., 2009). Cette dernière donnée laisse supposer que les mécanismes d'inhibition des IFN mis en place par les virus ou les tumeurs pourraient être moins efficaces sur les IFN-III que sur les IFN-I, car ils devraient cibler simultanément les voies NF- κ B et IRF.

L'inhibition des IFN-III n'a pas été étudiée en détail jusque-là, mais il semblerait qu'elle soit soumise aux mêmes mécanismes que les IFN de type I. On retrouve par exemple des sites de fixation de BLIMP-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) dans les promoteurs des gènes IFNL. Cette protéine, qui réprime notamment l'expression de l'IFN- β , permet l'inhibition de la production d'IFN- λ 1 (Siegel et al., 2011; Swider et al., 2014). La sous-unité p50 de NF- κ B, contrairement à la sous-unité p65, réprime également la transcription des IFN-III (Siegel et al., 2011). De son côté, IRF8 se lie de manière compétitive aux sites de fixation d'IRF3 et 7, empêchant ainsi l'expression des IFN- λ (Osterlund et al., 2007). Par ailleurs, Pin-1 (Peptidyl-propyl cis-trans isomerase NIMA-interacting) diminue l'induction des IFN-I et III en interagissant avec la forme phosphorylée d'IRF3 pour induire son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Osterlund et al., 2007).

3.3 Récepteur et signalisation des IFN-III

a. Nature et profil d'expression du récepteur des IFN-III

Les différents IFN-III interagissent avec un récepteur membranaire hétérodimérique composé des chaînes **IL-28R α /IFN- λ R1** et **IL-10R β /IL-10R2** (Hamming et al., 2013; Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2002). Cette dernière entre aussi dans la constitution des récepteurs de différentes cytokines de la famille de l'IL-10 telles que l'IL-22, l'IL-26 et l'IL-10 elle-même (Kotenko and Langer, 2004; Ouyang et al., 2011), ce qui vaut aux IFN-III d'être considérés comme des membres de la famille de l'IL-10 (Gad et al., 2009). L'interaction entre l'IFN- λ 1 et la sous-unité IFN- λ R1 est aujourd'hui bien caractérisée. On sait notamment qu'elle repose principalement sur des forces de van der Waals ainsi que des contacts hydrophobes (Miknis et al., 2010) et qu'elle peut induire plusieurs voies de signalisation.

Alors que la chaîne IL-10R2 est ubiquitairement exprimée chez l'Homme (Yoon et al., 2010), l'expression d'IL-28R α est restreinte à certains types cellulaires. Cette expression a notamment été observée dans les cellules épithéliales de poumon, d'intestin et de foie (Brand et al., 2005; Doyle et al., 2006; Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2002; Sommereyns et al., 2008), les kératinocytes (Maher et al., 2008; Witte et al., 2009), ainsi que dans différentes populations de l'immunité telles que les lymphocytes B (LB), les neutrophiles, les macrophages et les pDC (Blazek et al., 2015; Finotti et al., 2016; de Groen et al., 2015a; Witte et al., 2009; Yin et al., 2012). De leur côté, les cellules NK ne semblent pas exprimer le récepteur aux IFN-III (de Groen et al., 2015a). Dans ces études, l'expression d'IL-28R α a été montrée seulement au niveau transcriptionnel mais aucune ne démontre l'expression de la protéine IL-28R α , et donc la capacité réelle des cellules à vraiment répondre à l'IFN- λ . Cela provient en partie des limitations techniques actuelles. En effet, les quelques anticorps aujourd'hui disponibles pour détecter la chaîne IL-28R α par cytométrie en flux ne permettent pas d'obtenir des résultats vraiment concluants. On peut par exemple citer l'étude de Kelly *et al.* mettant en évidence par cytométrie en flux l'expression du récepteur aux IFN-III à la surface d'une fraction des LB, des monocytes CD14⁺ et des pDC. Cependant, les marquages permettant d'analyser la phosphorylation de STAT1 en cytométrie, ne témoignent de l'induction de la signalisation induite par l'IFN- λ que dans les pDC (Kelly et al., 2016). Les anticorps anti-IL-28R α restent très peu utilisés, que ce soit en FACS ou en western blot, car leurs résultats sont encore peu concluants menant à de nombreuses discordances entre les différentes études, notamment concernant l'expression du récepteur aux IFN-III par les LT (Dai et al., 2009; Jordan et al., 2007; Witte et al., 2009). Les études se tournent donc vers des analyses fonctionnelles de cellules traitées par les IFN-III ou des marquages de phospho-STAT1 beaucoup plus convaincants.

De plus, l'expression d'IL-28R α semble être finement régulée. Bien que les hépatocytes ne répondent que faiblement à l'IFN- λ 1 à l'état basal, un prétraitement par de l'IFN- α permet de fortement augmenter l'expression de la chaîne IL-28R α (ARNm) et la phosphorylation induite par l'IFN- λ 1 (Duong et al., 2014). Par ailleurs, une étude s'est récemment intéressée aux mécanismes épigénétiques permettant de réguler l'expression du récepteur aux IFN-III (Ding et al., 2014a). Ils ont pour cela comparé des lignées dérivées d'hépatocytes IL-28R α ⁺, telles que Huh-7, à des lignées dérivées de gliomes comme U87 connues pour ne pas exprimer ce récepteur. Les auteurs ont ainsi démontré l'hyperméthylation d'îlots CpG présents dans le promoteur du gène IFNLR1 dans les cellules U87, ainsi que l'existence de nombreux domaines chromatinien fermés et transcriptionnellement inactifs. De façon intéressante, l'utilisation d'un agent déméthylant combiné à un inhibiteur d'histone désacétylase permet d'augmenter fortement l'expression d'IL-28R α à la surface des cellules U87, ainsi que dans de nombreux autres types cellulaires.

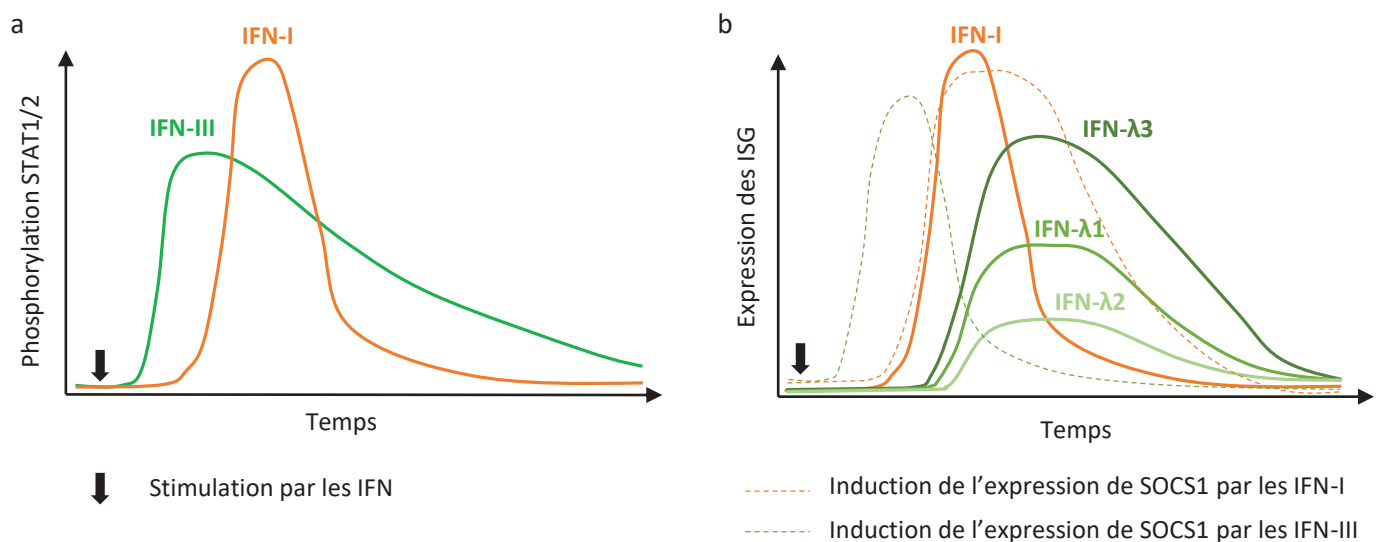


Figure 10 – Modélisation de la cinétique d'induction de la signalisation et des ISG par les IFN de type I et III

Bien que les IFN-III induisent la même voie de signalisation que les IFN-I, passant notamment par la phosphorylation de STAT1/2 et aboutissant à l'expression d'ISG, il existe plusieurs différences de cinétique.

(a) En effet, les IFN-III induisent une phosphorylation de STAT1/2 plus précoce, moins intense et plus prolongée que les IFN-I.

(b) L'expression des ISG subséquente est quant à elle induite plus rapidement, plus intensément et de façon moins prolongée avec les IFN-I qu'avec les IFN-III. Cette différence peut potentiellement être expliquée par les différences de cinétique également observées pour l'induction des protéines SOCS, en parallèle des ISG, qui permettent de réguler négativement la signalisation intracellulaire activée par les IFN-I et III. En effet, l'expression de la protéine SOCS1 est induite plus précocement et plus transitoirement par les IFN-III que par les IFN-I.

b. Voie JAK-STAT

La liaison des IFN-III avec leur récepteur induit la même voie de signalisation que l'engagement des IFNAR par les IFN-I [Figure 8], passant notamment par le recrutement de **JAK1** et **TYK2** puis l'activation du complexe **ISGF3** composé de **STAT1**, **STAT2** ainsi que d'**IRF9** (Nancy et al., 2013). L'inhibition de la phosphorylation de STAT1 abolit d'ailleurs complètement le rôle antiviral des IFN-III dans des cellules infectées par différents virus tels que HCV (Hepatitis C virus) (Zhang et al., 2011a), VSV (Vesicular stomatitis virus) et MRV (Mammalian orthoreovirus) (Pervolaraki et al., 2017). Des travaux récents ont également évoqué la phosphorylation de STAT3 et STAT5 induite par les IFN-λ (Dumoutier et al., 2004), mais cette voie de signalisation a été beaucoup moins étudiée que celle passant par l'activation de STAT1 et STAT2. Enfin, il a été suggéré que, contrairement aux IFNAR, la kinase **JAK2** interagit avec la chaîne IL-28Rα, participant ainsi à la transduction du signal induite par les IFN-III (Odendall and Kagan, 2015).

L'activation de la voie JAK-STAT ne semble en revanche pas induire l'expression de gènes spécifiques aux IFN-III comparés aux IFN-I dans une lignée de lymphome de Burkitt (Raji) (Zhou et al., 2007). Cependant, les auteurs ont observé l'induction de l'expression de moins de 40 gènes par l'IFN-λ dans cette lignée, contre plus de 130 avec l'IFN-α, laissant penser que ce modèle ne serait pas adéquat pour étudier les ISG spécifiquement induits par les différents types d'IFN. On retrouve aussi des différences résidant dans la cinétique et l'intensité des signalisations induites par l'IFN-I et l'IFN-III [Figure 10]. Il a en effet été démontré dans une lignée d'hépatocarcinome que les IFN-III induisent une phosphorylation de STAT1 et STAT2 plus précoce que l'IFN-α (Marcello et al., 2006). Cependant, il existe aussi une différence dans la cinétique d'induction des ISG qui, à l'inverse de ce qui a été démontré pour STAT1 et STAT2, démarre plus tardivement mais est maintenue au cours du temps en présence d'IFN-III comparativement aux IFN de type I (Marcello et al., 2006). En effet, l'expression des ISG dans des kératinocytes semble être prolongée par rapport aux IFN-I (Maher et al., 2008). De façon cohérente, les IFN-III activent la transcription d'ISG pendant plus de 24h dans des hépatocytes primaire et dans la lignée Huh-7, comparativement à l'IFN-α qui agit seulement pendant 6h (Bolen et al., 2014). La dernière différence entre les IFN-I et III réside dans l'intensité d'induction d'ISG. L'IFN-α permet en effet une expression plus forte des ISG (Marcello et al., 2006), et ces différences d'intensité ont été confirmées par Bolen *et al.* qui retrouvent l'ordre suivant : IFN-β > IFN-α > IFN-λ3 > IFN-λ1 > IFN-λ2 (Bolen et al., 2014). Notons que l'activité supérieure de l'IFN-λ3 par rapport aux deux autres types d'IFN-III a été retrouvée dans l'étude de Dellgren *et al.* qui démontre une induction d'ISG 2 fois supérieure à l'IFN-λ1 et 16 fois supérieure à l'IFN-λ2 (Dellgren et al., 2009).

c. Voies des MAPK et de la PI3K

Les voies des **MAPK** (Mitogen-associated protein kinase) et de la **PI3K** (Phosphoinositide 3 kinase) jouent également un rôle important dans l'expression des ISG suite à une stimulation par les IFN-III [Figure 8] (Alase et al., 2015; Brand et al., 2005; Zhou et al., 2007). Suite à l'engagement de leur récepteur exprimé à la surface de la lignée de cellules épithéliales colorectales HT-29, les IFN-III induisent en effet une phosphorylation transitoire d'ERK-1 et 2 (Extracellular signal-regulated kinase) de manière MEK-1-dépendante (Meiosis-specific serine/threonine protein kinase). Les protéines de la voie PI3K telles que AKT et p38 sont également rapidement phosphorylées (Zhou et al., 2007). Le rôle de la voie des MAPK avait préalablement été identifié pour l'induction d'ISG par les IFN-I (Platanias, 2005). Une étude récente a par ailleurs démontré que le traitement de cellules épithéliales intestinales humaines (hIEC) par les IFN-III ou l'IFN-β induit les mêmes cinétiques et intensités de phosphorylation

des différentes MAPK. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette voie semble altérer l'activité antivirale des IFN-III uniquement, mais pas de l'IFN- β (Pervolaraki et al., 2017).

d. Régulation de la signalisation des IFN-III

La protéine **SOCS1** (Suppressor of cytokine signaling 1) permet la régulation négative de la signalisation intracellulaire induite par les IFN-I et III (Blumer et al., 2017; Liu et al., 2015; Piganis et al., 2011). En parallèle de la transcription d'ISG, l'expression de SOCS1, induite plus précocement mais de manière plus prolongée par les IFN- λ que l'IFN- α , permettrait l'action retardée mais efficace sur plus long terme des IFN-III comparés aux IFN-I [Figure 10] (Liu et al., 2015). De plus, *Mendoza et al.* ont récemment développé un IFN- λ 3 ayant une forte affinité pour son récepteur (Mendoza et al., 2017). Cet IFN particulier possède de meilleures activités antivirales *in vitro*. Ce modèle supporte donc l'idée que la force de l'affinité qui relie les IFN-III et leur récepteur peut faire varier l'intensité des signalisations intracellulaires qu'ils induisent et donc leurs fonctions. Il serait donc intéressant d'évaluer les effets que peut engendrer la modulation de l'affinité des IFN-III sur d'autres fonctions de l'immunité. Enfin, une autre étude a mis en évidence un dernier mécanisme de régulation de l'activité des IFN-III en démontrant l'existence d'une forme soluble de la chaîne IL-28R α qui permettrait de séquestrer les IFN- λ (Witte et al., 2009).

3.4 Fonctions des IFN de type III

Comme discuté jusqu'à présent, les IFN de type III induisent une signalisation similaire à celle des IFN-I et possèdent donc des propriétés antivirales et antitumorales. Ils peuvent aussi réguler les fonctions de certaines populations de l'immunité. Leur spectre d'action est cependant plus limité de par l'expression restreinte d'IL-28R α . Les effets antitumoraux des IFN- λ seront présentés dans le chapitre II de ce manuscrit.

a. Propriétés antivirales

Comme pour les IFN-I, l'activité antivirale fut la première caractérisée pour les IFN-III. En accord avec les données présentées précédemment concernant le profil d'expression de leur récepteur et l'intensité des signaux induits, les IFN-I ont une action antivirale à plus faible dose et avec un spectre d'action plus large que les IFN- λ (Meager et al., 2005). La plupart des études se sont focalisées sur le rôle protecteur des IFN-III contre les virus qui infectent le foie, les voies respiratoires et les muqueuses gastro-intestinales. Ils semblent être efficaces *in vitro* et *in vivo* (modèles murins) dans le cas d'infection par de nombreux virus tels que HCV, HBV (Hépatite B virus), influenza, RSV (Respiratory syncytial virus), LCMV (Lymphocytic choriomeningitis virus), WNV (West Nile virus), les rhinovirus, rotavirus, reovirus et norovirus (Odendall and Kagan, 2015). Ils présentent généralement les mêmes effets antiviraux directs que l'IFN- α à quelques différences près. Par exemple, dans un modèle de souris infectées par influenza, le traitement par IFN- λ joue un rôle protecteur alors que l'IFN- α exacerbe l'inflammation pulmonaire et induit la mortalité prématurée des souris (Davidson et al., 2016; Kim et al., 2017). Une grande partie des recherches s'est focalisée sur le rôle des IFN-III dans les infections par HCV. L'année 2009 a marqué la découverte de l'association entre des polymorphismes (SNP) du gène *IFNL4* et la réponse au traitement reçu par les patients infectés par HCV, combinant IFN- α pegylé (couplé à du polyéthylène glycol, Peg-IFN- α) et Ribavirine (Ge et al., 2009;

Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Thomas et al., 2009). Ces mêmes SNP sont aussi associés à une meilleure élimination du virus (Thomas et al., 2009). D'autres polymorphismes associés à l'expression de l'IFN- λ sont quant à eux associés à la persistance du virus et donc à un mauvais pronostic (Ludmila et al., 2013).

b. Modulations des différents acteurs de l'immunité

L'expression de leur récepteur étant restreinte à certains types cellulaires, les IFN-III sont généralement considérés comme étant moins inflammatoires que les IFN-I. Mais ils possèdent cependant des propriétés de modulation de certaines populations de l'immunité. De récentes études, principalement dans des contextes d'infections virales, ont commencé à caractériser la contribution des IFN- λ sur la régulation de l'immunité innée et adaptative. Les mécanismes identifiés sont résumés et comparés à ceux induits par les IFN-I dans la [Figure 11](#).

- Effets des IFN-III sur l'immunité innée

Des modèles murins d'infection par MCMV (Mouse cytomegalovirus) ou VV (Vaccinia virus) ont mis en évidence un effet positif des IFN-III sur l'activation, la survie et les fonctions cytotoxiques des cellules NK (Madera et al., 2016; Martinez et al., 2008; Paolini et al., 2015). Néanmoins, chez l'Homme, l'expression du récepteur aux IFN-III ainsi que leur effet sur ces cellules restent aujourd'hui très incertains. Alors que l'expression d'IL-28R α semble être requise pour l'activité des **NK murins**, le récepteur ne semble pas être exprimé à la surface des NK humains (Fernando et al., 2015; Krämer et al., 2011).

Concernant les populations myéloïdes, les IFN-I influencent la polarisation des macrophages plutôt vers un phénotype M1 (pro-inflammatoire) et activent leur production d'oxyde nitrique (Liu et al., 2012; Vadiveloo et al., 2000; Wang et al., 2014; Xie et al., 2016). Ils permettent aussi d'augmenter le potentiel de différenciation des monocytes en DC et la régulation positive de l'expression des molécules du CMH et de costimulation ainsi que de la production d'IL-12 par ces dernières (Chen et al., 2017; Montoya et al., 2002). L'effet des IFN-III sur les macrophages a été décrit dans plusieurs études chez l'Homme. L'IFN- λ semble notamment activer la voie JAK/STAT dans les **monocytes** et **macrophages**, permettant l'induction d'ISG accompagnée d'une inhibition de la réplication du virus HCV (Dickensheets et al., 2013; Liu et al., 2012). Liu *et al.* ont de leur côté démontré que cette activation permet de potentialiser leur production d'IL-12 et de TNF- α induite par l'IFN- γ ou des ligands de TLR, en partie grâce à la régulation positive de l'expression de l'IFNGR à la surface des macrophages (Liu et al., 2011). La production d'IL-12 par des macrophages dérivés de monocytes activés par TLR4-L est elle aussi augmentée par l'IFN-III. L'IL-12 ainsi produit permettrait l'induction de la production d'IFN- γ par les cellules NK (de Groen et al., 2015a). une étude est cependant en désaccord avec cet effet indirect des IFN- λ sur les NK et montre que l'activation de PBMC par des IFN-III, même à forte dose, n'induit pas la synthèse d'IFN- γ par les cellules NK (Krämer et al., 2011).

Les **DC humaines** semblent avoir une capacité de migration *ex vivo* augmentée par l'IFN-III dans un contexte d'infection par le virus de la Dengue grâce à la régulation positive du récepteur CCR7 (C-C motif chemokine receptor 7) (Hsu et al., 2016). Chez la souris, une activation des **DC CD11c⁺** par l'IFN- λ 2 permet d'augmenter leur production d'IL-12 et de diminuer leur expression de molécules de costimulation telles que OX40L (Koltsida et al., 2011). Grâce à ces effets, l'IFN-III pourrait avoir un rôle à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les **pDC** semblent aussi être sensibles aux IFN-III chez l'Homme. En effet, leur activation par de l'IFN- λ induit leur production de CXCL10 et

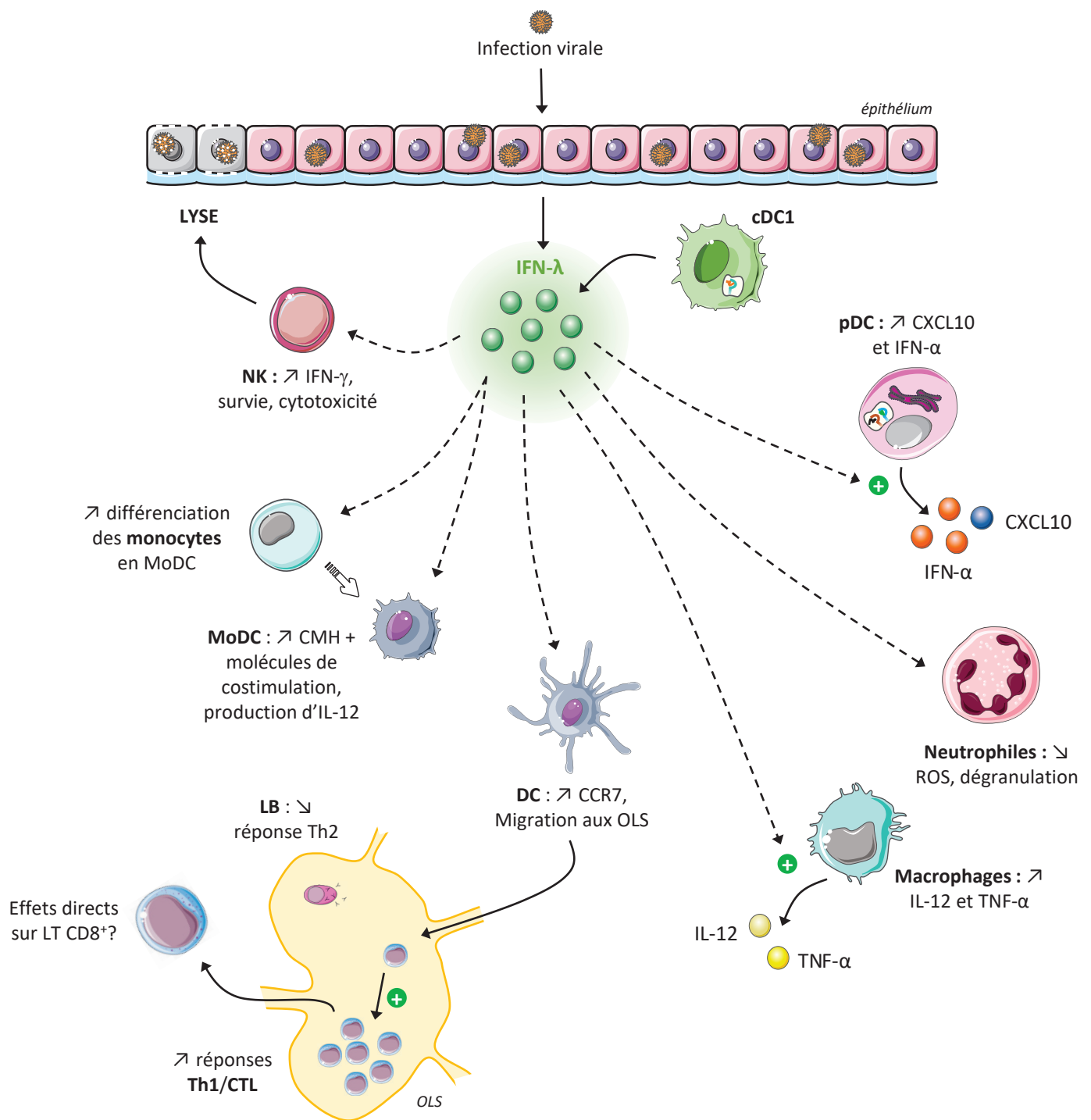


Figure 11 – Effets des IFN-III sur les différents acteurs de l'immunité

Tout comme les IFN-I, les IFN de type III possèdent différentes activités immunomodulatrices permettant par exemple de contrôler les infections virales. Les effets décrits ici ont été démontré *in vitro* sur des cellules immunitaires humaines, à part concernant les cellules NK et les neutrophiles pour lesquels les seules démonstrations existent dans des modèles murins.

potentialise leur production d'IFN- α en réponse aux virus HSV ou HCV (Finotti et al., 2016; Yin et al., 2012; Zhang et al., 2013). Plusieurs études ont aussi démontré la capacité des IFN- λ à induire la voie JAK/STAT dans les pDC, aboutissant à l'expression de multiples ISG et de marqueurs de maturation, ainsi qu'un effet positif sur leur survie et leurs propriétés de présentation antigénique (Finotti et al., 2016; Kelly et al., 2016; Megjugorac et al., 2009; Yin et al., 2012). On ne peut également pas exclure une action de l'IFN-III dans d'autres types de DC. La base de données ImmGen indique que, parmi toutes les populations de DC murines, les cDC1 possèdent la plus forte expression du gène *Il28ra* (Heng et al., 2008). Trois études ont également suggéré l'induction de DC tolérogéniques par les IFN-III. En effet, le prétraitement de DC humaines et bovines par de l'IFN- λ induit l'acquisition d'un phénotype et d'une fonction immunosuppressive caractérisés par la forte expression de PD-L1 et l'expansion de LTreg (Dolganiuc et al., 2012; Mennechet and Uzé, 2006; Reid et al., 2016).

L'outil ImmGen indique aussi que les **neutrophiles** sont les principales cellules exprimant le récepteur aux IFN-III. Ces cellules sont de plus connues pour être sensibles aux IFN-I (Kasimir et al., 1991). Les travaux de Broggi *et al.* ont confirmé l'expression d'IL-28R α par les neutrophiles murins et ont démontré qu'un traitement de ces cellules par l'IFN- λ permet d'induire l'expression de nombreux ISG et la diminution de la production de ROS ainsi que de leur capacité de dégranulation (Broggi et al., 2017). Dans un modèle murin d'arthrite induite par injection de collagène (CIA), le traitement des souris par de l'IFN- λ 2 permet de stopper l'inflammation en inhibant le recrutement des neutrophiles dans les articulations arthritiques (Blazek et al., 2015).

- **Effets des IFN-III sur l'immunité adaptative : régulation de la balance Th1/Th2**

Chez l'Homme, l'IFN- λ semble activer indirectement les fonctions des LB médiées par les TLR (Blazek et al., 2015; Finotti et al., 2016; de Groen et al., 2015b; Witte et al., 2009). A l'inverse, le traitement de PBMC par l'IFN- λ 3 inhibe l'activation des LB induite par le virus influenza *in vitro* et augmente la production d'IFN- γ par les LT. De plus, il a été montré qu'un polymorphisme présent dans le gène IFNL3 corrèle avec un fort taux d'IFN- λ 3 dans le sérum de donneurs vaccinés contre influenza. Ce polymorphisme est également associé à une importante induction de LT CD4⁺ Th1 ainsi qu'à une faible séroconversion après vaccination (Egli et al., 2014). Il est difficile d'établir si ces effets sur les LB et LT passent par une action directe des IFN-III. Cependant, ce type d'interféron est clairement capable de réguler la balance Th1/Th2. En effet, l'ajout d'IFN- λ 3 dans des PBMC cultivées en présence du virus influenza augmente la production de cytokines de type Th1 (IFN- γ). Cette induction est accompagnée d'une diminution de la synthèse de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13), de la prolifération des LB ainsi que de leur production d'IgG (Immunoglobulines G) (Egli et al., 2014). L'effet de l'IFN- λ sur la balance Th1/Th2 a d'ailleurs été décrit dans plusieurs autres études (Dai et al., 2009; Jordan et al., 2007; Srinivas et al., 2008) renforçant les connaissances actuelles de l'effet des IFN-III sur les LT. Les travaux de Koltsida *et al.* ont aussi mis en évidence le rôle des IFN-III dans la polarisation des réponses immunitaires médiées par les LT dans un modèle murin d'asthme allergique. Le traitement des souris par de l'IFN-III induit la suppression des réponses Th2 et Th17, alors qu'il favorise la production d'IFN- γ témoignant d'une réponse Th1 (Koltsida et al., 2011). De nombreuses études suggèrent en effet un rôle immunoprotecteur des IFN-III contre l'asthme allergique exacerbé par les réponses Th2 (Bullens et al., 2008; Contoli et al., 2006; Koch and Finotto, 2015). Enfin, l'injection d'IFN- λ 3 chez des macaques infectés par HIV-1 induit l'importante génération de LT CD8⁺ cytotoxiques coexprimant fortement le marqueur d'activation CD107a et la granzyme B. Comparé à l'IL-12, l'IFN- λ 3 semble induire une

réponse CTL à plus long terme, soulevant ainsi l'hypothèse de la génération d'une réponse T mémoire (Morrow et al., 2010).

c. Applications cliniques

L'utilisation de modèles animaux a permis de mettre en évidence le rôle crucial des IFN de type III en virologie, oncologie et auto-immunité (Lasfar et al., 2016; Rönnblom and opinion in rheumatology, 2013; Syedbasha and Egli, 2017). Plusieurs études cliniques sont aujourd'hui menées pour déterminer l'efficacité antivirale et la tolérance de l'IFN- λ pegylé (Peg-IFN- λ), un candidat sérieusement pressenti pour le remplacement du Peg-IFN- α qui présente de nombreux effets secondaires sévères (Kirkwood et al., 2002). Ce nouvel outil thérapeutique n'a pas encore reçu d'autorisation de mise sur le marché, mais les résultats semblent prometteurs. Une étude de phase 2b chez des patients atteints d'hépatite C chronique a par exemple été menée afin de comparer le Peg-IFN- λ au Peg-IFN- α (Muir et al., 2014). L'IFN de type III induit une inhibition de la réplication virale plus rapide que l'IFN- α dans les 12 premières semaines du traitement. Cependant, les effets antiviraux de ces deux types d'IFN semblent similaires après 24 semaines de traitement. Néanmoins, le Peg-IFN- λ induit nettement moins d'effets secondaires tels que la thrombopénie et la neutropénie sévères observées chez les patients traités par IFN- α . La balance bénéfice/risque de l'IFN- λ semble donc être bien meilleure. Un immunomonitoring longitudinal de 13 patients atteints d'hépatite B chronique inclus dans une étude clinique de phase 2b a pour la première fois mis en évidence les effets immunomodulateurs de l'IFN- λ *in vivo* chez l'Homme (Phillips et al., 2017). Combiné à une thérapie antivirale (Entécavir), l'IFN-III permet en effet d'augmenter le taux sérique d'IL-18, la fonctionnalité des NK ainsi que la production d'IFN- γ par les LT CD4⁺ spécifiques du virus HBV. La diminution durable des antigènes viraux montre alors l'intérêt thérapeutique du Peg-IFN- λ . Des études sont désormais en cours pour évaluer les effets de ce traitement contre d'autres virus tels que HDV (Hepatitis delta virus) ou contre la co-infection par HCV et HIV.

CHAPITRE II

Contribution des cellules dendritiques et des IFN-I et III dans l'immunité antitumorale

L'importance du système immunitaire dans la lutte contre les cellules tumorales a été évoquée en 1957 par M. Burnet qui a émit l'hypothèse suivante : l'accumulation de mutations au sein des cellules malignes conduirait à l'apparition de nouveaux Ag et permettrait l'activation d'une réponse immunitaire efficace pour l'élimination des tumeurs (Burnet, 1957, 1970). Cette hypothèse a introduit le concept d'immunosurveillance des cancers mais par manque de démonstrations concrètes, les immunothérapies antitumorales ont mis du temps à émerger comme une alternative thérapeutique crédible. De nombreux résultats déterminants ont été obtenus grâce à l'amélioration des outils techniques et des nouveaux modèles murins. Ceux-ci ont permis de faire émerger la théorie des 3E reposant sur le concept d' « immunoediting » selon lequel le développement tumoral peut se décomposer en trois phases (Dunn et al., 2004) . Tout d'abord la phase d'**élimination** durant laquelle les cellules tumorales sont reconnues et détruites par le système immunitaire, suivie d'une phase d'**équilibre** au cours de laquelle les altérations oncogéniques offrant aux cellules tumorales des avantages sélectifs leur permettent de proliférer de façon incontrôlée en surpassant les défenses immunitaires de l'organisme et de former une tumeur pendant la phase d'**échappement**. Ce n'est qu'en 2011 que la communauté scientifique a rajouté les notions d'inflammation et d'échappement au système immunitaire aux caractéristiques principales du cancer précédemment définies par D. Hanahan et R. Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011; Weinberg and Hanahan, 2000) .

Suite aux avancées de la recherche et des résultats cliniques l'immunothérapie antitumorale a finalement été déclarée « percée scientifique de l'année 2013 » par le journal Science et permit à J. Allison et T. Honjo de remporter le Prix Nobel de médecine de 2018 pour leur découverte de molécules impliquées dans l'inhibition des réponses immunitaires et leur ciblage thérapeutique. En effet, des travaux menés chez la souris ont démontré la possibilité d'induire une régression tumorale en inhibant la molécule CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), un récepteur inhibiteur des LT faisant partie de la famille des ICP (immune checkpoint) (Leach et al., 1996). Ces premiers résultats ont permis la mise en place d'un essai clinique visant à déterminer l'effet du blocage de CTLA-4 par un anticorps monoclonal (Ipilimumab) chez des patients atteints de mélanome métastatique. Cet anticorps a augmenté significativement et durablement la survie d'une partie des patients, apportant ainsi un nouvel espoir de traitement pour cette pathologie de très mauvais pronostic et jusqu'alors sans option thérapeutique efficace. De la même manière, le blocage de l'ICP PD-1 (programmed cell death-1), un autre récepteur exprimé par les LT et dont l'engagement par son ligand PD-L1 a un puissant effet immunosuppresseur, a permis de prolonger de façon majeure la durée de vie des patients atteints de mélanome métastatique (Wolchok et al., 2013). L'efficacité de ces anticorps dirigé contre les ICP ou leurs ligands, en particulier l'anti-PD-1 et l'anti PD-L1, a désormais été prouvée dans de multiples types de cancers solides ou hématologiques (Zou et al., 2016). Ils permettent d'améliorer grandement la durée de vie des individus répondeurs. Cependant, une proportion des patients traités ne répond pas à ces traitements. Il apparaît donc indispensable d'identifier les mécanismes

Table 1 _ Visualisation *in situ* de TA-DC

Type de tumeur	Marqueurs utilisés	Type de DC	Localisation	Etat de maturation	Référence
Tumeurs de sein	CD1a, CD207, CD83	cDC, LC	Intratumorale	Immature	<i>Bell et al. J Exp Med 1999</i>
	DC-LAMP, CD11c	cDC	Péritumorale	Mature	
	S-100	cDC	NA	NA	<i>Lespagnard et al. Int J Cancer 1999</i>
	CD1a, S-100	cDC, LC	Intratumorale	NA	<i>Hillenbrand et al. Br J Cancer 1999</i>
	CD1a	LC	Intratumorale	NA	
	S-100	cDC	Péritumorale	NA	<i>Tsuge et al. Br Cancer Res Treat 2000</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	NA	<i>Lewko et al. Med Sci Monit 2000</i>
	CD1a, CMRF-44, CMFR-56, CD83	cDC, LC	Intra et péritumorale	Immature	<i>Coventry et al. Br J Cancer 2002</i>
	CD1a, S-100, CD83	cDC, LC	Intratumorale	Mature	<i>Iwamoto et al. Int J Cancer 2003</i>
	CD1a	cDC, LC	Intratumorale	NA	<i>Covert and Morton Br J Cancer 2003</i>
	CD1a, CD207	LC	Intratumorale	Immature	
	DC-LAMP	cDC	Péritumorale	Mature	<i>Treilleux et al. Clin Cancer Res 2004</i>
	CD123	pDC	Intratumorale	Immature	
	BDCA-2	pDC	Intratumorale	NA	<i>Sisirak et al. Cancer Res 2012</i>
	DC-LAMP	cDC	Intratumorale	Mature	<i>Martinet et al., J Immunol 2013</i>
Tumeurs colorectales	S-100	cDC, LC	Intra et péritumorale	NA	<i>Ambe et al. Cancer 1989</i>
	CD1a	LC	Intratumorale	Immature	
	CD83	cDC	Péritumorale	Mature	<i>Suzuki et al. J Pathol 2002</i>
	S-100	cDC	Péritumorale	NA	<i>Nakayama et al. Anticancer Res 2003</i>
	S-100	cDC	Intra et péritumorale	NA	<i>Dadabayev et al. Cancer Immunol Immunother 2004</i>
	CD1a, S-100	cDC, LC	Péritumorale	Immature	
	DC-LAMP	cDC	Intratumorale	Mature	<i>Sandel et al. Clin Cancer Res 2005</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	Na	
Tumeurs pulmonaires	CD1a, CD207, CD123, DC-LAMP	cDC, LC, pDC	Intratumorale	NA ou mature	<i>Nagorsen et al. J transl Med 2007</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	NA	<i>Nakajima et al. Virchows 1985</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	NA	<i>Zeid and Muller Pathology 1993</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	NA	<i>Inoshima et al. Clin Cancer Res 2002</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	NA	<i>Kurabayashi et al. Pathol Int 2004</i>
	CD11c, BDCA-2, CD83, Lin-DC-LAMP	cDC, pDC	Intratumorale	Immature	<i>Perrot et al. J Immunol 2007</i>
		cDC	TLS	Mature	<i>Dieu-Nosjean, J Clin Oncol 2008</i>
Mélanomes	CD1a, CD207, DC-SIGN, CD206	cDC, LC	NA	NA	<i>Vermi et al. J Pathol 2003</i>
	BDCA-2	pDC	NA	NA	
	CD207, CD1a	LC	NA	NA	<i>Movassagh et al. Cancer Res 2004</i>
	CD1a, DC-LAMP	cDC, LC	Intratumorale	Immature	<i>Ladanyi et al. Cancer Immunol Immunother 2007</i>
	CD1a, DC-LAMP	cDC, LC	Péritumorale	Mature	
	CD11c, BDCA3	cDC1	NA	NA	
	BDCA1	cDC2	NA	NA	<i>Salmon et al. Immunity 2016</i>
Tumeurs de l'ovaire	S-100	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Bethwaite et al. Pathology 1996</i>
	BDCA2	pDC	NA	NA	<i>Labidi-Galy et al., Oncoimmunol 2014</i>
Tumeurs de rein	CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CMH-I, CD54	cDC	NA	Mature	<i>Thurnher et al. Int J Cancer 1996</i>
	CD1a, S-100, CD80, CD86, CD83, CMRF-44	cDC, LC	Intratumorale	Immature	<i>Troy et al. Clin Cancer Res 1998</i>
	CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR	cDC	Intratumorale	Mature et Immature	<i>Schwaab et al. J Urol 1999</i>
	CD83	cDC	Péritumorale	Mature	<i>Aso et al. 2004</i>
	CD1a	LC	Intratumorale	Immature	
	CD83	cDC	Péritumorale	Mature	<i>Feng et al. Chin J Cancer Res 2005</i>
	S-100, HLA-DR	cDC	Intratumorale	Immature	
	CD83	cDC	Intratumorale	Mature	<i>Kobayashi et al. Anticancer Res 2007</i>
Tumeurs tête et cou	CD1a, S-100, HLA-DR	cDC	Intratumorale	Mature	<i>Kerrebijn et al. Cancer Immunol Immunother 1994</i>
		cDC	Péritumorale	Immature	
	CD1a, S-100	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Goldman et al. Arch Otolaryngo 1998</i>
		cDC	Péritumorale	Immature	
	S-100	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Reichert et al. Cancer 2001</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Ishigami et al. Oncol Rep 2003</i>
	BDCA-2, CD123, HLA-DR	pDC	Intratumorale	Immature	<i>Hartmann et al. Cancer Res 2003</i>
	CD1a, S-100	cDC, LC	Intratumorale	Immature	
Tumeurs de vessie	DC-LAMP	cDC	Péritumorale	Mature	<i>Liu et al. Pathol Res Pract 2010</i>
	S-100, HLA-DR	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Inoue et al. Virchows 1993</i>
Tumeurs gastriques	CD83	cDC	Intratumorale	Mature	<i>Ayari et al. Eur Urol 2009</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Tsujitani et al. Cancer 1990</i>
	S-100, HLA-DR	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Ishigami et al. Clin Cancer Res 2000</i>
	S-100	cDC	Intratumorale	Immature	<i>Takahashi et al. Oncology 2002</i>
	S-100, DC-LAMP	cDC	Intra et péritumorale	Mature	<i>Ishigami et al. Cancer Immunol Immunother 2010</i>

Données de l'équipe

responsables de cette résistance, depuis la caractérisation de l'infiltrat immunitaire jusqu'à la compréhension des mécanismes d'immunosuppression mis en place par les tumeurs, afin d'augmenter la proportion de patients pouvant répondre à ces nouvelles thérapies. D. Chen et I. Mellman ont récemment schématisé les étapes nécessaires à l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire sous la forme d'un cycle (Chen and Mellman, 2017). Les capacités de capture et de présentation des Ag par les DC conventionnelles sont au cœur des deux premières étapes de ce cycle, menant à l'activation des LT nécessaires à l'élimination des tumeurs. En raison de leur rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire, la présence des DC associées aux tumeurs (TA-DC) est évaluée depuis de nombreuses années chez l'Homme. Nous détaillerons ici les études qui ont mis en évidence l'infiltration de tumeurs solides par les DC, leur rôle dans l'immunité antitumorale, ainsi que les stratégies thérapeutiques utilisant ou ciblant les DC afin de réactiver une réponse immunitaire antitumorale efficace.

I. Présence et impact pronostique des DC dans les tumeurs solides

1. Mise en évidence de DC dans les tumeurs solides

1.1 Visualisation *in situ* des DC associées aux tumeurs

Les études ayant identifié des DC, principalement par immunohistochimie (IHC) *in situ*, sont résumées dans la [Table 1](#). Les premières études se sont basées sur l'analyse de la protéine **S-100** pour détecter les cellules myéloïdes *in situ* sans toutefois pouvoir en distinguer les différentes sous-populations. Ce marqueur est donc à prendre avec précaution car toutes les DC ne l'expriment pas et a contrario d'autres cellules myéloïdes comme les macrophages CD163⁺ l'expriment aussi (Nagorsen et al., 2007). Le marqueur S-100 a tout de même permis de valider la présence des DC dans les tumeurs gastriques, du sein, de l'ovaire, du colon, du poumon, du rein, de la vessie, ainsi que dans le mélanome. Par la suite, l'utilisation de marqueurs complémentaires tels que **DC-LAMP**, **CD83** ou **CD86** a permis d'étudier l'état de maturation des TA-DC. Il apparaît sur la [Table 1](#) que les TA-DC avec une localisation intratumorale sont généralement immatures, à l'inverse des TA-DC situées dans la zone péri tumorale ou dans la marge invasive. De plus, les TA-DC matures semblent notamment interagir étroitement avec les LT dans les zones péri tumorales (Bell et al., 1999).

Comme détaillé dans le premier chapitre de ce manuscrit, les sous-populations de DC présentent de nombreuses spécificités. Il est donc apparu essentiel d'identifier ces différents sous-types parmi l'infiltrat immunitaire, nécessitant de fait l'utilisation d'anticorps ciblant les marqueurs spécifiques de chaque population. Ainsi, à l'aide des marqueurs **CD123** ou **BDCA2**, la présence des pDC a par exemple été mise en évidence dans de multiples tumeurs, en particulier par notre équipe dans les tumeurs de sein et de l'ovaire (Labidi-Galy et al., 2014; Sisirak et al., 2012) [\[Encadrés 2 & 3\]](#). Cependant, parmi les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, l'expression de CD123 n'est pas exclusivement restreinte aux pDC. Par ailleurs, le marqueur BDCA2 est quant à lui soumis à une régulation négative de son expression lors de la maturation des pDC. L'usage d'un anticorps dirigé contre cette molécule peut donc rendre délicate la visualisation de pDC matures. Le double marquage CD123/ BDCA2 ou CD123/BDCA4 rendrait donc l'identification des pDC *in situ* plus fiable. La présence des LC a également été mise en évidence grâce au marqueur **CD207** dans les tumeurs de sein, de colon

Encadré 2 : Cancer du sein

Le cancer du sein en France en quelques chiffres :

- Plus de 54 000 nouveaux cas par an
- 1^{er} rang des cancers en terme de fréquence (33,5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer)
- 11 900 décès annuels
- 75% se déclarent après 50 ans
- 61 ans d'âge moyen au diagnostic

Source : « La situation du cancer en France en 2015 », INCa avril 2016

La majorité des cancers du sein se développent au niveau des canaux galactophores (cancer canalaire) ou des lobules (cancer lobulaire) et se classent en deux grandes catégories : non invasifs et invasifs.

Les cancers du sein non invasifs ou *in situ* (DCIS, 25%)

Dans les carcinomes *in situ* les cellules tumorales prolifèrent dans les canaux ou les lobules sans franchir la membrane basale. Le traitement se limite à une intervention chirurgicale suivie ou non de radiothérapie.

Les cancers du sein invasifs ou infiltrants (75%)

Lorsque les cellules tumorales ont franchi la membrane basale et envahit les tissus entourant les canaux ou les lobules, on parle de carcinome infiltrant. S'ils ne sont pas traités à temps, les cancers du sein invasifs peuvent se propager par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et s'accumuler dans les ganglions ou dans d'autres organes, générant ainsi des métastases.

Classification histologique :

C'est l'examen anatomopathologique d'un échantillon de tumeur qui permet d'évaluer le type exact de cancer et de définir son grade. La classification histologique de Scarff Bloom et Richardson est la plus souvent employée pour les carcinomes mammaires infiltrants et se base sur la formation de tubules, le pléomorphisme nucléaire ainsi que la fréquence des mitoses pour attribuer un grade SBR de 1 à 3.

Classification génomique :

Elles ont été établies à partir de l'index mitotique (Ki67) et de l'expression par les cellules tumorales du récepteur aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR), à l'EGF (Her2).

Sous-type	Fréquence	ER	PR	Her2	Index Ki67	Grade	Autre
Luminal A	50-60%	>1 positif	-	-	Faible	Faible	Stabilité génomique
Luminal B	10-20%	>1 positif	+/-	+	Elevé	Elevé	Moins stable que luminal A
Her2 amplifié	15-20%	-	-	++	Elevé	Elevé	Amplification gène ERBB2 (Her2)
TNBC (triple neg)	10-20%	-	-	-	Elevé	Elevé	Forte instabilité génomique

Traitements :

Les traitements du cancer du sein s'organisent autour de quatre approches complémentaires et souvent associées : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Une nouvelle génération de traitements est en plein essor : les thérapies ciblées. Le traitement du cancer du sein a notamment vécu une révolution avec le trastuzumab, dont le mode d'action consiste à s'attaquer aux tumeurs présentant à leur surface une quantité très importante de protéines HER2.

Encadré 3 : Cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire en France en quelques chiffres :

- Plus de 4 000 nouveaux cas par an
- 7^{ème} cancer féminin en terme de fréquence (33,5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer)
- 90% se déclarent à partir des cellules épithéliales de l'enveloppe externe des ovaires
- 65 ans d'âge moyen au diagnostic

Source : « La situation du cancer en France en 2015 », INCa avril 2016

Le cancer de l'ovaire provoque peu de symptômes. De ce fait, il est souvent diagnostiqué de façon tardive, lorsque des cellules cancéreuses ont atteint d'autres organes du bassin.

Les stades du cancer de l'ovaire :

- Stade I : le cancer est limité aux ovaires
- Stade II : la tumeur s'est étendue localement aux organes du bassin (utérus, trompes de Fallope, vessie...)
- Stade III : la tumeur s'est étendue au péritoine ou aux ganglions lymphatiques pelviens, on parle alors de métastases régionales
- Stade IV : le cancer s'est propagé vers des organes éloignés tels que la plèvre (enveloppe des poumons) ou le foie, on parle alors de métastases à distance

Traitements :

- La chirurgie est le traitement principal du cancer de l'ovaire en supprimant la totalité de la tumeur. Elle peut être le seul traitement nécessaire si le cancer est détecté à un stade précoce et qu'il paraît peu agressif
- Une chimiothérapie est souvent administrée après la chirurgie, pour éliminer d'éventuelles cellules cancéreuses restantes et réduire le risque de récurrence.
- Dans certains cas, la chimiothérapie peut être réalisée avant la chirurgie pour réduire la taille de la tumeur et faciliter l'opération.

et dans les mélanomes (Bell et al., 1999; Movassagh et al., 2004; Nagorsen et al., 2007; Treilleux et al., 2004; Vermi et al., 2003). Les travaux de Salmon *et al.* ont quant à eux démontré par IHC la présence de cDC dans des mélanomes primaires. Cependant, les résultats de cette étude sont discutables. En effet, les cDC1 sont définies par le phénotype CD11c⁺ BDCA3⁺, or le marqueur BDCA3 peut être surexprimé à la surface de nombreux types cellulaires, tels que les cDC2 définies en parallèle par le phénotype BDCA1⁺ CD20⁻ (Salmon et al., 2016).

1.2 Identification des sous-populations de TA-DC par cytométrie

Les panels de cytométrie en flux qui permettent l'identification simultanée de plusieurs populations de DC ont donc été développés en parallèle des marquages *in situ* [Table 2]. Cependant, cette technique nécessite la dissociation des tissus afin d'obtenir une suspension cellulaire, rendant alors impossible la localisation tissulaire des cellules étudiées. Les études de Sisirak *et al.* et Labidi-Galy *et al.* ont ainsi mis en évidence la présence de pDC et mDC respectivement dans les tumeurs de sein et d'ovaire (Labidi-Galy et al., 2011; Sisirak et al., 2012). Dans le sein, la proportion de pDC (Lin⁻ CD4⁺ CD11c⁻ CD123⁺ BDCA2⁺) est augmentée dans les tumeurs agressives telles que les TNBC (Triple negative breast cancer) ou avec un index mitotique élevé (Sisirak et al., 2012). L'association d'une forte infiltration par les pDC avec l'agressivité des tumeurs est aussi retrouvée dans l'ovaire, car leur proportion est augmentée dans les tumeurs de patients en progression par rapport aux patients en rémission complète (Labidi-Galy et al., 2011).

Plus récemment, l'ajout de marqueurs complémentaires a permis l'identification par cytométrie en flux de plusieurs sous-types de cDC. Les cDC1 BDCA3⁺ et les cDC2 BDCA1⁺ ont par exemple été identifiées dans la population de cellules CD16⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD14⁻ infiltrant les mélanomes métastatiques (Broz et al., 2014). Comme démontré de multiples fois dans le sang, la proportion des cDC1 associées aux tumeurs est inférieure à celle des cDC2 au sein de l'infiltrat immunitaire. De leur côté, Laoui *et al.* ont identifié les pDC (BDCA2⁺) ainsi que trois autres types de DC parmi la population HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD16⁻ infiltrant des tumeurs pulmonaires et colorectales (Laoui et al., 2016). On y retrouve les cDC1 (BDCA2⁻ BDCA1⁻ IRF8⁺ CD14⁻ CD11b^{low}), les cDC2 (BDCA2⁻ BDCA1⁺ IRF8⁻) et les MoDC (BDCA2⁻ BDCA1⁺ IRF8⁻ CD14⁺ CD11b⁺). Les proportions de cDC dans le cancer colorectal semblent équivalentes à celles dans le mélanome, alors que l'on retrouve un plus grand pourcentage de cDC1 que de cDC2 dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) (Laoui et al., 2016). Bien que ces études marquent un progrès considérable dans la mise en évidence de la diversité des populations de DC associées aux tumeurs humaines, on peut regretter l'absence d'utilisation d'anticorps ciblant des marqueurs suffisamment spécifiques de certaines populations. En effet, un marquage anti-CLEC9A et/ou XCR1 permettrait de s'assurer de la nature des cDC1 identifiées. Le développement de la cytométrie de masse (CyTOF) représente également une avancée considérable permettant à la fois l'identification des différentes populations de DC et une analyse extensive de leur phénotype. Dans leur étude, Lavin *et al.* ont utilisé le CyTOF en parallèle d'une analyse de scRNAseq pour caractériser de façon non-supervisée l'infiltrat immunitaire de tumeurs NSCLC en comparaison à des zones saines prélevées à distance de la tumeur ainsi qu'aux PBMC de ces mêmes patients (Lavin et al., 2017). Cette méthode a ainsi révélé la présence de cDC1 et cDC2 dans les tumeurs et mis en évidence la sous-représentation des cDC1 dans les zones tumorales par rapport au

Table 2 _ Identification des sous-populations de TA-DC par cytométrie

Type de tumeur	Marqueurs utilisés	Type de DC	Etat de maturation	Référence
Tumeur de sein	Lin- CD4+ CD11c- CD123+ BDCA2+	pDC	Mature	<i>Sisirak et al. Cancer Res 2012</i>
	Lin- CD4+ CD11c+ BDCA1+	cDC2	NA	
Tumeurs colorectales	HLA-DR+ CD11c+ IRF8+	cDC1	NA	<i>Laoui et al., Nat Comm 2016</i>
	HLA-DR+ CD11c+ BDCA1+	cDC2	NA	
	HLA-DR+ CD11c+, CD14+	MoDC	NA	
Tumeurs pulmonaires	CD1c+	cDC	NA	<i>Tabarkiewicz et al. Oncol Rep 2008</i>
	CD123+ BDCA2+	pDC	NA	
	HLA-DR+ CD11c+ IRF8+	cDC1	NA	<i>Laoui et al., Nat Comm 2016</i>
	HLA-DR+ CD11c+ BDCA1+	cDC2	NA	
	HLA-DR+ CD11c+ CD14+	MoDC	NA	
Mélanomes	HLA-DR+ BDCA2+	pDC	NA	<i>Aspord et al. Cancer Immunol Res 2013</i>
	HLA-DR+ CD11c+ BDCA3+	cDC1	NA	<i>Broz et al. Cancer Cell 2014</i>
	HLA-DR+ CD11c+ BDCA1+	cDC2	NA	
Tumeurs de l'ovaire	Lin- CD4+ CD11c-	pDC	Immature	<i>Zou et al. Nat Med 2001</i>
	HLA-DR+ CD4+ CD123+ CD11c-	pDC	Immature	<i>Wei et al. Cancer Res 2005</i>
	Lin- CD4+ CD11c- CD123+ BDCA2+	pDC	Mature	<i>Labidi-Galy et al. Cancer Res 2011</i>
	Lin- CD4+ CD11c+	mDC	NA	

Données de l'équipe

tissu pulmonaire sain, les cDC1 et cDC2 étant par ailleurs plus fréquentes dans les tissus pulmonaires (sains ou tumoraux) que dans les PBMC de ces patients.

2. TA- DC et impact pronostique

La présence des DC dans les tumeurs a été largement évaluée en particulier pour évaluer leur impact pronostique [Table 3]. En effet, certaines populations présentes dans les tumeurs peuvent être indicatives d'une réponse immunitaire des patients, mais aussi prédictives de leur survie ou de leur réponse à certains traitements tels que les immunothérapies (Barnes and Amir, 2017; Gnjatic et al., 2017). Une forte expression du marqueur **S-100** *in situ*, révélant une infiltration importante des tumeurs par les DC, est ainsi associée à une meilleure survie des patients dans de nombreux cancers [Table 3]. Cependant, comme discuté précédemment, cette stratégie d'identification des TA-DC manque de spécificité. Nous développerons ici les études qui se sont intéressées à l'impact pronostique des DC matures ou des différentes sous-populations de DC.

2.1 Maturité des DC et pronostic des patients

L'impact pronostique des DC dépend de différents facteurs dont leur état de maturation [Table 3]. En effet, un fort infiltrat en DC matures **DC-LAMP⁺** ou **CD83⁺** est associé à une meilleure survie des patients atteints de mélanome ainsi qu'à une dissémination métastatique réduite (Ladányi et al., 2007). Notons que cette association se vérifie également dans les cancers du sein et du poumon (Dieu-Nosjean et al., 2008; Iwamoto et al., 2003; Martinet et al., 2013). Ce résultat ne peut cependant pas être généralisé à tous les cancers. En effet, un fort infiltrat en DC matures DC-LAMP⁺ est plutôt associé à un mauvais pronostic dans les cancers gastriques et colorectaux (Ishigami et al., 2010; Sandel et al., 2005). Dans le cancer du rein. Suivant les études, le marqueur CD83 est quant à lui alternativement associé à un bon ou à un mauvais pronostic. La localisation des DC matures au sein de la tumeur pourrait expliquer les discordances observées entre les différents types de cancers. En effet, certaines tumeurs comportent des zones d'infiltrat organisées de la même façon que les organes lymphoïdes secondaires. Elles portent le nom de structures lymphoïdes tertiaires (TLS), sont riches en LT, LB ainsi qu'en DC matures et ont été observées dans de multiples cancers (poumon, sein, rein, colon) dans lesquels leur présence est associée à une forte réponse Th1/cytotoxique ainsi qu'à une meilleure survie des patients (Dieu-Nosjean et al., 2014; Goc et al., 2013). Cependant, dans les tumeurs du rein, la localisation des DC matures semble influencer sur la survie des patientes : la présence de DC DC-LAMP⁺ est associée à un bon pronostic lorsqu'elles sont présentes dans les TLS alors qu'elles sont plutôt associées à un mauvais pronostic lorsqu'elles sont localisées en dehors de ces structures (Giraldo et al., 2015).

2.2 Sous-populations de DC et impact pronostique

Grâce à la possibilité de détecter les pDC dans de larges cohortes de patients, plusieurs études ont pu démontrer l'association entre une forte infiltration des tumeurs par cette population et un mauvais pronostic des patients. Cette corrélation a été démontrée par notre équipe dans les tumeurs de sein et d'ovaire (Labidi-Galy et al., 2011, 2011, 2014) ainsi que par d'autres groupes dans le mélanome (Aspord et al., 2013). D'autres études se sont plutôt intéressées aux pDC circulantes. En

Table 3 _ Impact pronostique des DC (évalué *in situ* ou par FACS)

Marqueur / Population	Impact pronostique	Type de tumeur	Référence
S-100	Positif	Sein	Iwamoto et al. Int J Cancer 2003
		Colon	Ambe et al. Cancer 1989
			Nakayama et al. Anticancer Res 2003
			Nagorsen et al. J transl Med 2007
		Poumon	Zeid and Muller Pathology 1993
			Inoshima et al. Clin Cancer Res 2002
		Ovaire	Bethwaite et al. Pathology 1996
		Rein	Kobayashi et al. Anticancer Res 2007
		Tête et cou	Goldman et al. Arch Otolaryngo 1998
			Reichert et al. Cancer 2001
	Ishigami et al. Oncol Rep 2003		
	Vessie	Inoue et al. Virchows 1993	
	Estomac	Tsujitani et al. Cancer 1990	
		Takahashi et al. Oncology 2002	
	Négatif	Colon	Sandel et al. Clin Cancer Res 2005
		Estomac	Ishigami et al. Cancer Immunol Immunother 2010
Aucun	Sein	Lespagnard et al. Int J Cancer 1999	
		Lewko et al. Med Sci Monit 2000	
		Colon	Dadabayev et al. Cancer Immunol Immunother 2004
		Poumon	Nakajima et al. Virchows 1985
			Kurabayashi et al. Pathol Int 2004
Estomac	Ishigami et al. Clin Cancer Res 2000		
CD1a	Positif	Sein	Hillenbrand et al. Br J Cancer 1999
			Iwamoto et al. Int J Cancer 2003
			Coverty and Morton Br J Cancer 2003
	Mélanome	Ladanyi et al. Cancer Immunol Immunother 2007	
		Négatif	Colon
	Aucun	Sein	Treilleux et al. Clin Cancer Res 2004
		Rein	Schwaab et al. J Urol 1999
Feng et al. Chin J Cancer Res 2005			
Tête et cou			Goldman et al. Arch Otolaryngo 1998
DC-LAMP	Positif	Mélanome	Ladanyi et al. Cancer Immunol Immunother 2007
			Movassagh et al. Cancer Res 2004
		Poumon	Dieu-Nosjean et al., J Clin Oncol 2008
		Sein	Martinet et al., J Immunol 2013
	Négatif	Colon	Sandel et al. Clin Cancer Res 2005
		Estomac	Ishigami et al. Clin Cancer Res 2000
	Aucun	Sein	Treilleux et al. Clin Cancer Res 2004
CD83	Positif	Sein	Iwamoto et al. Int J Cancer 2003
		Rein	Kobayashi et al. Anticancer Res 2007
	Négatif	Rein	Feng et al. Chin J Cancer Res 2005
	Aucun	Rein	Schwaab et al. J Urol 1999
Aso et al. 2004			
cDC2 (BDCA1)	Négatif	Poumon	Tabarkiewicz et al. Oncol Rep 2008
pDC (BDCA2, CD123)	Négatif	Sein	Treilleux et al. Clin Cancer Res 2004
			Sisirak et al. Cancer Res 2012
		Ovaire	Labidi-Galy et al., Oncoimmunol 2014
	Labidi-Galy et al. Cancer Res 2011		
	Mélanome	Aspard et al. Cancer Immunol Res 2013	
Aucun	Mélanome	Vermi et al. J Pathol 2003	

Données de l'équipe

effet, dans les mélanomes et les cancers du sein, une forte proportion de ce type de DC dans le sang des patients est associée à une meilleure survie (Chevolet et al., 2015; Kini Bailur et al., 2016). De leur côté, les cDC2 seulement définies sur la base de l'expression de BDCA1 semblent être de mauvais pronostic dans les cancers du poumon (Tabarkiewicz et al., 2008). Il est important de noter qu'aucune étude n'a jusqu'à présent étudié l'impact pronostique des cDC2 dans le cancer du sein ou de l'ovaire.

De plus en plus d'études utilisent maintenant des données issues d'analyses transcriptomiques pour établir des scores d'infiltration de DC et évaluer leur potentiel impact pronostique, en particulier sur la survie des patients. Les résultats ainsi déterminés pour les cDC1 sont résumés dans la [Table 4](#). L'équipe de Broz *et al.* a été la première à s'y intéresser en utilisant des données transcriptomiques générées à partir de DC murines pour en extraire une signature cDC1 et une signature « autres cellules myéloïdes ». L'expression des gènes inclus dans ces signatures a ensuite été évaluée dans les données publiques d'expression du TCGA (The cancer genome atlas). Un fort ratio « signature cDC1/signature autres cellules myéloïdes » a ainsi été significativement associé à une meilleure survie dans 12 cancers, en particulier dans le sein, le poumon et les cancers de la tête et du cou (Broz et al., 2014). Ce même ratio a également été récemment associé à un bon pronostic dans une autre base de données de transcriptomique de tumeurs de sein (Metabric), soutenant là encore l'idée d'un impact positif de la présence des cDC1 sur la survie des patientes (Michea et al., 2018). Cependant, l'utilisation des orthologues humains aux gènes murins identifiés par transcriptomique est une stratégie assez contestable. En effet, l'étude ne démontre en aucun cas que les DC humaines présentent la même signature ou expriment ces molécules au niveau protéique. Barry *et al.* ont tout de même réutilisé cette signature cDC1 très récemment en interrogeant une base de données différente du TCGA et démontrant l'association entre une forte signature cDC1 et une meilleure survie de patients atteints de mélanome métastatique (Barry et al., 2018). Ils ont aussi mis en évidence une corrélation entre le score de quantification des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) et la signature cDC1 (Barry et al., 2018), rappelant la corrélation entre les scores d'infiltration des mélanomes par les cDC1 et les LT CD8⁺ démontrée par Spranger *et al.* (Spranger et al., 2017).

De leur côté, Böttcher *et al.* se sont également intéressés à l'impact pronostique des cDC1 dans les tumeurs humaines (Böttcher et al., 2018). Afin de générer une signature cDC1, ils ont tout d'abord utilisé une base de données transcriptomiques obtenue à partir de PBMC humaines pour analyser l'expression de 10 gènes connus pour être fortement exprimés par les cDC1. Seuls les gènes *CLEC9A*, *XCR1*, *CLNK* et *BATF3* ont été sélectionnés pour former la signature cDC1 car leur expression semble restreinte à cette population cellulaire. Le score d'expression de cette signature a ensuite été analysé dans les données du TCGA. Ils ont ainsi démontré qu'une forte signature cDC1 est associée à une meilleure survie des patients atteints de cancer de la tête et du cou, du sein, du poumon ou de mélanome métastatique. Concernant le cancer du sein, l'impact pronostique de la signature cDC1 est d'autant plus significatif pour les patients atteints de cancer TNBC n'exprimant pas les récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et le récepteur Her2. Cette information semble cruciale étant donné l'absence de traitement efficace pour ce type de cancer du sein très agressif [\[Encadré 2\]](#).

De façon intéressante, les récents travaux de Michea *et al.* ont pour la première fois apporté une comparaison de l'impact pronostique des différentes sous-populations de DC. Ils ont en effet généré des données de RNAseq des pDC, des cDC2 ainsi que d'une population de cellules enrichie en cDC1 (cDC1e) isolées de tumeurs de sein luminales et identifié les gènes différentiellement exprimés

Table 4 _ Impact pronostique des cDC1 en cancérologie

Référence	Signature	Type de cancer	Base de données	Impact pronostique
<i>Broz et al. Cancer Cell 2014</i>	Signature cDC1 (KIT, CCR7, CD103, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A) / Signature "autres DC myéloïdes"	12 cancers	TCGA	Positif : survie
<i>Barry et al. Nature Med 2018</i>	KIT, CCR7, CD103, BATF3, FLT3, ZBTB46, IRF8, BTLA, MYCL1, CLEC9A	Mélanome métastatique	TCGA et <i>Bogunovic et al. 2009</i>	Positif : survie et réponse anti-PD1
<i>Böttcher et al. Cell 2018</i>	CLEC9A, XCR1, CLNK, BATF3	Mélanome métastatique, Sein, Tête et cou, Poumon	TCGA	Positif : survie
<i>Michea et al. Nature Imm 2018</i>	z-score ratio (gènes surexprimés/gènes sous-exprimés)	Cancer du sein (luminal VS TNBC)	Metabric	Positif : survie

(DEG) entre chaque population et spécifique de chaque sous-population. L'analyse de la base de données de transcriptomique de tumeurs de sein Metabric a démontré l'association entre une forte signature d'infiltration des tumeurs par les pDC, cDC2 et cDC1e et une meilleure survie (Michea et al., 2018). Dans les cancers du sein TNBC spécifiquement, seules les cDC1e semblent être associées à un pronostic favorable. Ces résultats sont cependant à prendre avec précaution du fait de l'absence de marqueurs spécifiques utilisés lors de l'isolation des cDC1 et cDC2 par tri cellulaire.

II. DC et IFN : implications dans la surveillance et l'échappement des tumeurs

Les cancers sont généralement diagnostiqués lorsque les tumeurs atteignent une taille détectable lors d'un examen clinique, c'est-à-dire un stade où les tumeurs semblent avoir déjà échappé à la réponse immunitaire. Ainsi, la plupart des résultats concernant l'immunosurveillance présentés par la suite sont issus de travaux effectués chez la souris. Nous nous intéresserons ici à la contribution des DC et des IFN qu'elles sécrètent dans l'immunosurveillance.

1. Rôle des DC dans l'immunosurveillance

Chez la souris, l'élimination de tumeurs du rein suite à un traitement par le ligand de TLR CpG combiné à un adénovirus codant la protéine TRAIL nécessite la présence des pDC et des cDC1 (DC CD8 α ⁺). Leur absence entraîne en effet une moindre production d'IFN-I et une altération du recrutement des LT CD8⁺ (James et al., 2014). Dans le modèle de thymome murin EG-7, l'injection intratumorale de CpG-B permet d'activer les cDC nécessaires à l'activation des LT dans les ganglions lymphatiques, conduisant alors à l'infiltration de la tumeur par les LT et la régression tumorale (Humbert et al., 2018). Par ailleurs, des tumeurs de fibrosarcome, normalement rejetées car très immunogéniques, ont une croissance largement accélérée avec une infiltration par les LT CD8⁺ réduite lorsqu'elles sont implantées dans des souris *Batf3*^{-/-} spécifiquement dépourvues de cDC1 (CD8 α ⁺ et CD103⁺). Un autre modèle de sarcome a permis d'établir un lien entre les IFN-I et les DC. Bien que les auteurs ne se soient pas intéressés aux pDC, il apparaît que les IFN-I induisent la présentation croisée d'Ag par les cDC1 (Diamond et al., 2011). Enfin, un modèle de mélanome a mis en évidence la contribution de l'IFN- β dans le recrutement des DC CD8 α ⁺, dont le rôle est encore une fois essentiel à l'élimination des tumeurs (Fuertes et al., 2011). De nombreuses autres données permettent d'appuyer le rôle antitumoral des cDC1 dans des modèles murins mais elles seront détaillées par la suite dans la partie III (cDC1 et immunité antitumorale).

2. Rôle des IFN-I et III dans l'immunosurveillance

Le rôle des DC dans l'immunosurveillance est en partie médié par leur capacité à produire de l'IFN de type I ou III. Nous aborderons dans un premier temps les données ayant permis de mettre en avant la place des IFN de type I dans l'immunosurveillance, puis nous détaillerons les travaux plus récents concernant les IFN-III et l'immunité antitumorale.

2.1 IFN-I et immunosurveillance

Les premiers éléments illustrant un rôle potentiel des IFN-I dans le contrôle de la croissance tumorale proviennent de travaux dans lesquels leur inhibition à l'aide d'anticorps neutralisants favorise le développement de tumeurs implantées chez des souris immunocompétentes (Gresser et al., 1983). De façon cohérente, les souris *Ifnar1*^{-/-} et *Ifnar2*^{-/-}, déficientes pour l'expression du récepteur aux IFN-I, sont plus sensibles à l'induction de tumeurs par l'agent chimique carcinogène MCA (3-méthylcholanthrene) (Dunn et al., 2005). L'absence d'expression des récepteurs IFNAR spécifiquement dans les cellules intestinales conduit également au développement de tumeurs chez des souris traitées par des agents inducteurs de colite (Tschurtschenthaler et al., 2014). Par ailleurs, l'implantation de cellules tumorales pulmonaires conduit à des carcinomes plus agressifs dans des souris *Ifnb*^{-/-} que dans des souris WT (Deonarain et al., 2003). Chez l'Homme, la régulation négative d'IFNAR1 observée dans les cellules tumorales ou le stroma est associée à une survie réduite des patients atteints d'un carcinome colorectal. A l'inverse, une forte signature de réponse aux IFN-I est associée à un bon pronostic (Katlinski et al., 2017). De nombreuses démonstrations attestent donc du rôle antitumoral essentiel des IFN-I (Zitvogel et al., 2015). Notons toutefois que la source de ces IFN n'a pas été identifiée dans ces études.

De plus, le rôle antitumoral des IFN-I semble principalement passer par une action pléiotropique sur les cellules hématopoïétiques des souris plutôt que par un effet direct sur les cellules tumorales (Deonarain et al., 2003; Dunn et al., 2005; Gresser et al., 1983). Dans le modèle de carcinome mammaire MMTV-PyMT, les IFN-I permettent en effet d'activer la lyse des cellules tumorales par les NK, induisant alors une réduction du nombre de métastases osseuses, mais n'ont pas d'effet direct sur la croissance de la tumeur primaire (Rautela et al., 2015). Dans un autre modèle de lignée tumorale mammaire (4T1), l'expression constitutive de la voie de signalisation des IFN-I par surexpression d'IRF7 permet une réduction de la dissémination métastatique *via* les NK et LT CD8⁺ (Bidwell et al., 2012). Les IFN-I permettent également l'initiation des réponses CTL antitumorales en agissant sur les APC. Ils peuvent en effet favoriser la survie et la capacité de cross-présentation des Ag par les cDC1 murines (DC CD8α⁺) (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011; Lorenzi et al., 2011; Schiavoni et al., 2013). Par ailleurs, des effets positifs des IFN-I sur la différenciation, la maturation et la migration des DC ont également été démontrés (Fuertes et al., 2013), ainsi que sur leur production d'IL-15 (Mattei et al., 2001), cytokine favorisant la survie des cellules NK et des LT cytotoxiques (Huntington, 2014). Les IFN de type I possèdent également des propriétés antitumorales en activant directement les fonctions effectrices des LT cytotoxiques et des cellules NK (Curtsinger and Mescher, 2010; Fuertes et al., 2011; Müller et al., 2017) et en agissant sur d'autres acteurs de l'immunité tels que les neutrophiles (Andzinski et al., 2015; Jablonska et al., 2010, 2014; Wu et al., 2015). Enfin, les IFN-I inhibent les LTreg (Bacher et al., 2013; Hashimoto et al., 2014; Pace et al., 2010; Sisirak et al., 2012) et les MDSC (Myeloid derived suppressor cells) (Yu et al., 2013; Zoglmeier et al., 2011), considérés comme des cellules immunitaires immunosuppressives.

2.2 IFN et thérapies antitumorales

Les caractéristiques antitumorales des IFN de type I ont été évaluées dans de multiples études allouant aux IFN-α des propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques. Cet IFN a d'ailleurs été utilisé en clinique pour le traitement de nombreux types de cancers, tels que le mélanome, le carcinome du

Table 5 _ Activités antitumorales des IFN de type III

Activités directes		
Mécanisme identifié	Type de cancer	Référence
Anti-angiogénique	Mélanome	Lasfar et al., Cancer Res 2006
Anti-prolifératif	Mélanome	Lasfar et al., Cancer Res 2006
	Lymphome T	Dumoutier et al., JBC 2000
	Cancer colorectal	Hui et al., Cancer Letters 2011
	Adénocarcinome pulmonaire	Tezuka et al., Lung Cancer 2012
	Cancer neuroendocrine	Zitzmann et al., BBRC 2006
	Hépatome	Tian et al., FASEB J 2014
Arrêt du cycle cellulaire	Mélanome	Sato et al., JI 2006
	Carcinome oesophagien	Li et al., EJC 2010
Apoptose	Mélanome	Sato et al., JI 2006
		Guenterberg et al., Mol Cancer Ther 2010
	Cancer colorectal	Hui et al., Cancer Letters 2011
		Li et al., Cell Prolif 2008
	Adénocarcinome pulmonaire	Tezuka et al., Lung Cancer 2012
		Yan et al., Cancer Biother. Radiopharm. 2013
	Carcinome oesophagien	Li et al., EJC 2010
CMH-I	Mélanome	Lasfar et al., Cancer Res 2006
	Cancer colorectal	Lasfar et al., Cancer Res 2006
		Li et al., Cell Prolif 2008
	Hépatome	Tian et al., FASEB J 2014
Activités indirectes médiées par divers acteurs de l'immunité		
Mécanisme identifié	Type de cancer	Référence
Cellules NK	Mélanome	Sato et al., JI 2006
		Souza-Fonseca-Guimares et al., Proc Natl Acad Sci 2015
	Fibrosarcome	Numasaki et al., JI 2007
	Hépatome	Abushahba et al., Cancer Immunol Immunother 2010
	Adénocarcinome pulmonaire	Yan et al., Cancer Biother. Radiopharm. 2013
LT	Fibrosarcome	Numasaki et al., JI 2007
	Adénocarcinome pulmonaire	Yan et al., Cancer Biother. Radiopharm. 2013
	Cancer du sein	Burkart et al., EMBO Mol Med 2013
Neutrophiles	Fibrosarcome	Numasaki et al., JI 2007

Etudes comportant des données chez l'Homme (lignées)

rein, la leucémie myéloïde chronique et le sarcome de Kaposi (Pasquali and Mocellin, 2010). L'utilisation d'IFN- α 2b en adjuvant dans le mélanome a par exemple conduit à une amélioration de la survie des patients dans de larges études randomisées (Kirkwood et al., 2001). Cependant, ces effets bénéfiques n'ont été observés que lorsque que l'IFN- α est administré à fortes doses classiquement associées à d'importants effets secondaires tels que des états grippaux, une neurotoxicité, des atteintes articulaires ainsi que des troubles psychiques conduisant souvent à un arrêt forcé et anticipé du traitement (Kirkwood et al., 2002). L'expression ubiquitaire du récepteur des IFN-I conduit en effet à une action systémique de cette cytokine induisant ces nombreuses complications. Le récepteur des IFN de type III possède quant à lui un profil d'expression beaucoup plus restreint, soulevant alors de nouveaux espoirs pour le développement de thérapies moins toxiques que les IFN-I.

2.3 IFN-III et immunosurveillance

Comme décrit précédemment, les cDC1 produisent d'importantes quantités d'IFN de type III, notamment en réponse à des ligands de TLR3. Après la découverte de cette famille de cytokines et de leur voie de signalisation similaire à celle des IFN-I, les propriétés antitumorales des IFN-III ont été rapidement évaluées, principalement dans des modèles murins transgéniques *in vivo*.

a. Démonstration des propriétés antitumorales des IFN-III dans des modèles murins

L'IFN- α ayant été inclus dans l'arsenal thérapeutique des mélanomes, plusieurs équipes se sont intéressées aux propriétés antitumorales des IFN-III sont répertoriées dans la [Table 5](#). Les premières études cherchant à caractériser les propriétés antitumorales des IFN-III ont été conduites dans des modèles de mélanomes murins transfectés avec un plasmide permettant l'expression de l'IFN- λ de manière constitutive (Abushahba et al., 2010; Lasfar et al., 2006; Numasaki et al., 2007; Sato et al., 2006; Tezuka et al., 2012; Yan et al., 2013). Lasfar *et al.* ont tout d'abord démontré que les cellules tumorales B16 répondent *in vitro* à l'IFN- λ par la phosphorylation de STAT1, la formation du complexe de transcription ISGF3 ainsi qu'une augmentation de l'expression membranaire des molécules du CMH-I (Lasfar et al., 2006). En comparaison avec des cellules B16 WT, les cellules tumorales produisant constitutivement de l'IFN- λ (B16-IFN- λ) ont une prise tumorale largement retardée, voire complètement inhibée dans un tiers des souris. L'utilisation de cellules B16-IFN- λ déficientes pour le récepteur aux IFN-III génère les mêmes résultats, démontrant alors l'existence de mécanismes indirects induits par l'IFN- λ et permettant la diminution de la tumorigénicité. La même année, le groupe de Sato *et al.* a utilisé un modèle similaire de cellules B16 produisant de l'IFN- λ (B16F0-IFN- λ) (Sato et al., 2006) et ont observé *in vitro* une capacité réduite de ces cellules à proliférer et à former des colonies en soft-agar, un arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'activation des caspases 3 et 7, indiquant une induction de l'apoptose. Ces données suggèrent cette fois-ci un effet antiprolifératif et pro-apoptotique direct de l'IFN- λ sur les cellules tumorales. De plus, ces cellules forment beaucoup moins de métastases pulmonaires lorsqu'elles sont injectées dans la circulation sanguine. Cette réduction de la capacité de dissémination métastatique est associée à une augmentation de l'infiltration des poumons par des cellules immunitaires. Contrairement aux LT CD4⁺ et CD8⁺, une déplétion des NK chez ces souris annule les effets antitumoraux, suggérant un rôle clé de cette population lymphocytaire dans l'effet protecteur induit par l'IFN-III. L'implication des NK dans l'immunité antitumorale induite par l'IFN- λ a aussi été mise en évidence dans des modèles murins d'hépatocarcinome et d'adénocarcinome pulmonaire (Abushahba et al., 2010; Yan et al., 2013). Des

travaux menés dans un modèle murin de fibrosarcome ont également confirmé le rôle antitumoral indirect de l'IFN- λ avec une contribution des NK, des LT CD8⁺ et des neutrophiles (Numasaki et al., 2007).

Les IFN-III semblent aussi être impliqués dans l'action oncolytique du virus VSV contre les cellules de mélanome B16 cultivées *in vitro* en présence de cellules de moelle osseuse de souris. En effet, le VSV induit une régulation positive de l'expression du récepteur IFNLR1 à la surface des cellules B16 ainsi qu'une production d'IFN- λ par les macrophages et cellules immunitaires Gr-1⁺. L'interaction entre l'IFN- λ et son récepteur à la surface des cellules tumorales déclenche l'expression de plusieurs ligands activateurs des fonctions cytotoxiques et de la production d'IFN- γ par les cellules NK (Wongthida et al., 2010). De façon intéressante, le rôle antitumoral des IFN-III a aussi été décrit dans le modèle murin de carcinome mammaire MMTV-PyVmT dans lequel une déficience des cellules tumorales pour le facteur Usp18 semble induire une surexpression du récepteur IFNLR1. Le traitement de ces souris par de l'IFN- λ recombinant conduit à une forte production de CXCL10 dans les tumeurs, aboutissant à la mise en place d'une réponse Th1 efficace et à la diminution de la croissance tumorale (Burkart et al., 2013).

b. IFN-III et lignées tumorales humaines

Bien que de nombreuses études chez la souris aient démontré que les IFN-III permettent de ralentir le développement des tumeurs, par des mécanismes directs ou indirects, les résultats ne sont pas nombreux et pas si clairs chez l'Homme [Table 5]. Les études citées ici se sont en effet focalisées sur l'effet de l'IFN- λ sur des lignées tumorales humaines. L'expression du récepteur IFNLR1 a été démontrée par RT-PCR ou par l'analyse de la phosphorylation de STAT1 après activation des lignées par de l'IFN- λ recombinant. Tout comme chez la souris, cette cytokine permet d'inhiber la prolifération cellulaire, d'induire l'apoptose ainsi que de réguler positivement l'expression membranaire des molécules du CMH-I (Guenterberg et al., 2010; Hui et al., 2011; Lasfar et al., 2006; Li et al., 2008; Tezuka et al., 2012; Tian et al., 2014; Zitzmann et al., 2006). A l'inverse des modèles murins, l'IFN- λ ne semblent pas modifier les fonctions cytotoxiques des cellules NK face à différentes lignées de mélanome (Guenterberg et al., 2010). Cependant dans cette étude, les NK ont été cultivées *in vitro* en présence de cellules tumorales seulement. L'absence d'autres populations de l'immunité pourrait impacter l'effet des IFN-III sur les NK *in vivo*. De façon intéressante, Guenterberg *et al.* ont aussi validé l'expression du récepteur IFNLR1 au niveau transcriptionnel (par hybridation *in situ*) par les cellules tumorales humaines de mélanomes primaires (6 patients sur 9). Aucune autre étude n'a en revanche démontré un véritable effet antitumoral des IFN-III chez l'Homme à ce jour.

3. Mécanismes d'échappement aux cellules dendritiques

La mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale efficace par les DC dépend de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs qu'elles reçoivent dans le microenvironnement tumoral. En effet, de par leur rôle central dans l'initiation des réponses immunitaires antitumorales, il n'est pas étonnant de voir qu'il existe de nombreux mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour inhiber leur développement, leur recrutement ou leur fonction. Nous détaillerons ici certains d'entre eux, en particulier les altérations de la synthèse d'IFN par les DC.

3.1 Altération du développement et de la survie des DC

Que ce soit chez l'Homme ou chez la souris, les cellules tumorales peuvent induire l'apoptose des DC, un phénomène mis en évidence pour la première fois *in situ* sur des coupes de mélanome et de tumeurs d'ovaires et *in vitro* dans des co-cultures de DC avec des cellules tumorales (Esche et al., 1999). Cette étude a révélé l'implication à la fois de facteurs solubles et d'interactions cellulaires directes. Par la suite, des gangliosides dérivés de mélanome ont été décrits comme induisant l'apoptose des DC *via* l'action de caspases et de ROS (Bennaceur et al., 2006; Péguet-Navarro et al., 2003). D'autres facteurs tels que la mucine 2 et le TGF- β 1 peuvent également induire l'apoptose des DC (Ishida et al., 2008; Ito et al., 2006a).

En plus d'induire l'apoptose des DC, les tumeurs peuvent aussi bloquer leur différenciation et leur maturation afin de limiter l'activation de LT suite à la présentation d'Ag. Il a en effet été démontré que le nombre de DC circulantes est réduit dans le sang de patients atteint d'un cancer de la tête et du cou ou du pancréas, et que la résection des tumeurs permet de rétablir une fréquence de DC équivalente à celle du sang de donneurs sains, soulevant l'hypothèse de l'inhibition du développement de ce type cellulaire (Hoffmann et al., 2002; Tjomsland et al., 2010). Dans le cancer du sein, les patientes présentent également une proportion de DC circulantes réduite mais seulement pour des tumeurs de stade avancé (IV) (Pinzon-Charry et al., 2007). Toujours dans le cas du cancer du sein, les monocytes circulants se différencient en DC immunosuppressives en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Ramos et al., 2012). Enfin, *in vitro* les cellules de mélanome inhibent la différenciation de LC à partir d'HSC CD34⁺ (Berthier-Vergnes et al., 2001).

3.2 Inhibition de la maturation des DC et de la présentation antigénique

Les DC circulantes de patients atteints de tumeur du sein, du rein ou de l'ovaire sous-expriment les molécules du CMH-II, indiquant un défaut de maturation et de présentation antigénique. L'altération peut également être fonctionnelle. En effet, les DC issues du sang de patientes atteintes d'un cancer du sein sécrètent de faibles quantités d'IL-12p40 après activation par du LPS (Bella et al., 2003). Chez la souris, le surnageant de tumeurs pulmonaires induit une inhibition de la mobilité des protéines membranaires de DC, impactant alors leurs capacités de présentation d'Ag et de synthèse de cytokines inflammatoires telles que les IFN-I (Caronni et al., 2018).

De nombreux médiateurs solubles sécrétés dans le microenvironnement par les cellules tumorales ou stromales sont aujourd'hui connus pour inhiber les DC, participant ainsi à l'immunosuppression des cancers. C'est par exemple le cas du **VEGF** (Vascular endothelial growth factor), une protéine sécrétée dans la majorité des cancers, impliquée dans la régulation de l'angiogenèse des tumeurs et très fortement associée à un mauvais pronostic (Toi et al., 2001). En se liant aux récepteurs EGFR1 et EGFR2, le VEGF inhibe le développement et la maturation des DC *in vivo* et *in vitro* (Gabrilovich et al., 1998). La présence de VEGF est par ailleurs inversement corrélée à la quantité de DC matures présentes dans les tumeurs de sein chez l'Homme (Iwamoto et al., 2003). Différents membres de la famille du **TGF- β** (Transforming growth factor) peuvent aussi impacter la différenciation et l'activation des DC (Seeger et al., 2015). Chez la souris, le TGF- β 1 inhibe l'expression de marqueurs d'activation (CD80, CD83, CD86, CMH-II) et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-12 et l'IFN- α (Lievens et al., 2013). De plus, *in vitro* le TGF- β 1 induit l'expression de récepteurs inhibiteurs des réponses T, tels que PD-L1, et favorise la génération de LTreg par ces DC

devenues alors immunosuppressives (Song et al., 2014). L'**IL-10** a également été identifiée comme une cytokine jouant un rôle majeur dans l'inhibition de la présentation antigénique par les DC. Elle agit sur la signalisation des TLR en bloquant leur expression et leur transduction de signaux, ou en induisant leur dégradation. L'IL-10 permet aussi la dégradation des molécules du CMH-II et de la molécule de costimulation CD86 (Mittal and Roche, 2015). Dans plusieurs modèles murins d'hépatocarcinome, la production de TGF- β 1, VEGF et APF (α -Fetoprotéine) *in vivo* par les cellules tumorales induit la conversion des cDC1 (DC CD11c⁺ DEC205⁺) en DC tolérogéniques exprimant peu de molécules de costimulation et une capacité réduite de présentation croisée d'Ag (Harimoto et al., 2013). Dans le cancer de l'ovaire chez la souris, l'acquisition de l'expression de PD-1 par les cDC2 (DC CD11c⁺ CD11b⁺) induit l'inhibition de la voie NF- κ B, aboutissant à la réduction de l'expression de molécules de costimulation et de cytokines (Krempski et al., 2011). Toujours chez la souris, le lactate libéré par les cellules tumorales pulmonaires inhibe la fonction des DC (Caronni et al., 2018). Dans tous ces modèles murins, l'immunosuppression des DC se traduit par une diminution de l'activation de réponses CTL ainsi que par la réduction de l'infiltration des LT dans les tumeurs, favorisant alors le développement tumoral.

3.3 Altération de la synthèse d'IFN- α par les pDC

Etant donnés les effets positifs des IFN de type I sur l'activation du système immunitaire (Belardelli et al., 2002), l'inhibition de leur production par les pDC représente un mécanisme efficace d'immunosuppression mis en place par les cellules tumorales leur permettant d'échapper aux réponses immunitaires. L'altération des pDC et de leur synthèse d'IFN-I a été notamment décrite par notre équipe dans les cancers du sein et de l'ovaire (Labidi-Galy et al., 2011; Le Mercier et al., 2013; Sisirak et al., 2012), mais aussi par d'autres groupes dans les cancers du poumons, de la tête et du cou ainsi que dans les mélanomes (Bekeredjian-Ding et al., 2009; Gerlini et al., 2007; Perrot et al., 2007). Plusieurs médiateurs solubles sont impliqués dans cette inhibition, tels que le **TGF- β** et le **TNF- α** dans le cancer du sein (Sisirak et al., 2013) ou la combinaison de **TGF- β** , **PGE2** et **IL8** dans les cancers de la tête et du cou (Bekeredjian-Ding et al., 2009). Des interactions entre cellules tumorales et pDC peuvent aussi être impliquées. Le ligand d'ILT7 est par exemple exprimé par de nombreuses lignées de cellules tumorales. Son interaction avec ILT7 induit la conversion des pDC exprimant spécifiquement ce récepteur (Tsukamoto et al., 2009) en APC tolérogéniques permettant l'expansion de cellules immunosuppressives telles que les LTreg (Sisirak et al., 2012). Les pDC inhibées dans les tumeurs expriment en effet fortement la molécule régulatrice ICOS-L (Inducible costimulator ligand) qui interagit avec son récepteur ICOS exprimé par les LTreg, induisant alors leur prolifération et activation ainsi que la synthèse d'IL-10 par les LT CD4⁺ conventionnels (Conrad et al., 2012; Faget et al., 2012; Ito et al., 2007). Les pDC des ascites de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire peuvent également induire la génération de LT CD8⁺ immunosuppressifs capables d'inhiber les réponses T spécifiques d'Ag *via* leur synthèse d'IL-10 (Wei et al., 2005). L'altération de la production d'IFN- α par les pDC représente donc un exemple concret de l'immunosuppression des DC et de ses conséquences sur le développement tumoral. A ce jour il n'existe aucune démonstration de l'inhibition de la production d'IFN de type III par les pDC ou les cDC1 dans le microenvironnement tumoral.

III. cDC1 et immunité antitumorale

Bien que la caractérisation des cDC1 dans l'immunité antitumorale chez l'Homme s'arrête bien souvent à la seule démonstration de leur présence dans les tumeurs, de nombreuses données ont été accumulées chez la souris, permettant notamment d'expliquer leur recrutement et la place cruciale qu'elles tiennent dans les réponses immunitaires ainsi que dans la réponse aux immunothérapies. Nous verrons au fil de la description de ces études qu'il semble exister un lien particulier entre les TA-cDC1 et les effecteurs immunitaires cytotoxiques tels que les LT CD8⁺ ou les cellules NK.

1. Recrutement des cDC1 dans les tumeurs solides

1.1 Chimioquinas et cytokines impliquées dans le recrutement intratumoral des cDC1

Plusieurs modèles murins ont permis d'identifier diverses molécules impliquées dans le recrutement des cDC1 [Figure 12], comme cité précédemment pour les IFN-I. En effet, alors qu'elles représentent environ 20% des DC totales dans des tumeurs de mélanome (modèle B16) implantées chez des souris sauvages (WT), les cDC1 sont complètement absentes de l'infiltrat des tumeurs portées par des souris *Stat1*^{-/-} et *Ifnar*^{-/-}. La signalisation médiée par l'IFN- β dans les cDC1 permet également l'activation des LT aboutissant au rejet des tumeurs (Fuertes et al., 2011). Le rôle de CCL4 a également été mis en évidence pour le recrutement dans des tumeurs de mélanome des cDC1 exprimant le récepteur CCR5 (Spranger et al., 2015). Par ailleurs, les cellules NK ont très récemment été identifiées comme indispensables au recrutement des cDC1 dans des modèles murins de mélanome et de carcinome mammaire spontanés. Böttcher *et al.* ont en effet observé des clusters NK-cDC1 dans ces tumeurs, suggérant alors l'existence d'un dialogue entre ces deux types cellulaires. Dans leur modèle, une déplétion des NK et l'inhibition des chimiokines XCL1 et CCL5 produites par les NK aboutissent à l'absence de cDC1 parmi l'infiltrat immunitaire des tumeurs (Böttcher et al., 2018). Il semble donc que plusieurs chimiokines favorisent le recrutement des cDC1 dans les tumeurs murines. Bien que rien ne soit aussi clair chez l'Homme, cette dernière étude a tout de même soulevé l'hypothèse de l'implication des chimiokines XCL1, XCL2 et CCL5 en démontrant la corrélation entre les scores cDC1 ou NK et le « score chimiokines » basé sur l'expression des gènes *XCL1*, *XCL2* et *CCL5*.

1.2 Altérations oncogéniques et exclusion des cDC1

Bien qu'aucune altération fonctionnelle des TA-cDC1 n'ait été décrite à ce jour, nous aborderons dans cette section les études ayant mis en évidence l'acquisition d'altérations oncogéniques par les cellules tumorales conduisant à l'exclusion des cDC1 et *in fine* au développement tumoral (Spranger and Gajewski, 2018) [Figure 12]. La voie de production des prostaglandines est par exemple un des mécanismes utilisés par les cellules tumorales de mélanome pour échapper au système immunitaire. Zelenay *et al.* ont en effet démontré l'absence de cDC1 dans un modèle murin de tumeur spontanée (*Braf*^{V600E}) et la restauration de leur recrutement ainsi que de leur production d'IL-12p40 par l'inhibition des enzymes PTGS1 et 2 (Prostaglandine synthase). L'inactivation de gènes codant ces deux enzymes a d'ailleurs pour conséquence de restaurer un contrôle immunitaire efficace du développement tumoral par le système immunitaire (Zelenay et al., 2015). La même équipe a plus

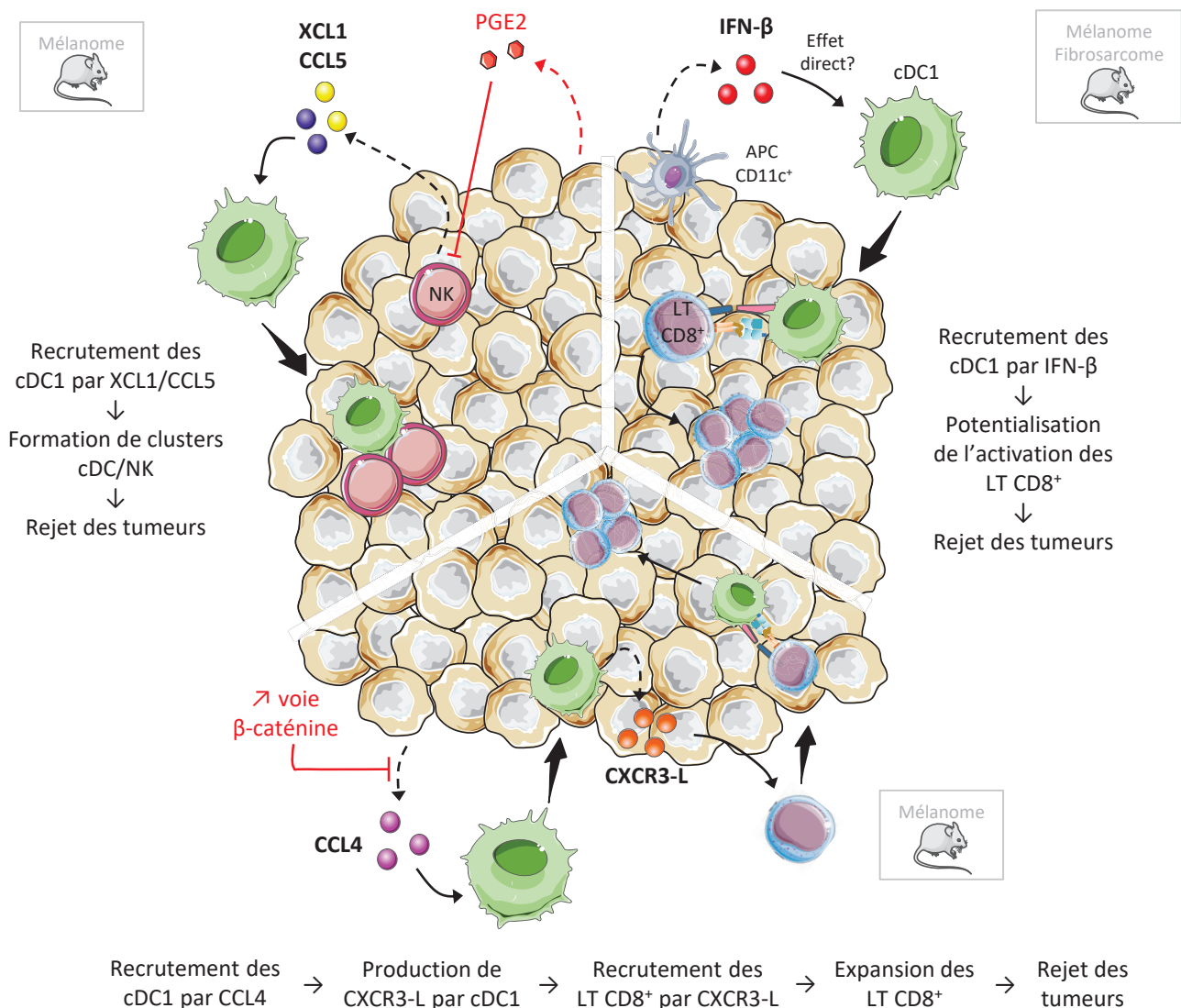


Figure 12 – Mécanismes induisant le recrutement des cDC1 dans les tumeurs chez la souris

Différentes cytokines et chimiokines peuvent être impliquées dans le recrutement des cDC1 dans les tumeurs murines. On peut par exemple citer l'IFN-β et la chimiokine CCL4. En induisant la migration des cDC1 jusque dans les tumeurs, elles permettent l'induction d'une réponse CTL efficace aboutissant au rejet des tumeurs. Le rôle des chimiokines XCL1 et CCL5 produites par les NK a également été mis en évidence et démontre une nouvelle fois l'existence d'une coopération entre cDC1 et NK dans l'immunité antitumorale.

On peut également noter que des altérations oncogéniques, telles que l'activation de la voie β-caténine, ou la synthèse de molécules immunosuppressives comme les prostaglandines, conduisant à l'exclusion des cDC1 et *in fine* à l'inhibition de la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale.

récemment mis en évidence que les prostaglandines ont un effet inhibiteur sur les cellules NK, elles-mêmes responsables du recrutement des cDC1 dans ce modèle comme détaillé précédemment (Böttcher et al., 2018).

En se basant sur les données transcriptomiques de mélanome métastatique issues du TCGA, l'équipe de T. Gajewski a quant à elle identifié chez l'Homme l'activation de la voie de la β -caténine dans des tumeurs particulièrement peu infiltrées par les LT et les cDC1 (score cDC1 basé sur la signature : *THBD*, *BATF3*, *IRF8*) (Spranger et al., 2015). Ils ont alors utilisé un modèle murin de mélanome induit présentant une activation constitutionnelle de cette voie dans les cellules tumorales et observé l'absence d'infiltrat T et cDC1. En effet, la voie β -caténine permet l'inhibition de la production de CCL4 et entraîne ainsi un défaut de recrutement des cDC1 dans la tumeur. L'injection intratumorale de cDC1 générées *in vitro* permet de restaurer l'infiltration des tumeurs par les LT et de retarder significativement la croissance tumorale. Une deuxième étude plus récente a mis en évidence le rôle des chimiokines CXCL9 et CXCL10 produites par les cDC1 dans le recrutement des LT cytotoxiques exprimant fortement le récepteur CXCR3 (Spranger et al., 2017).

2. Rôle des cDC1 dans l'activation d'effecteurs cytotoxiques et le rejet des tumeurs

Etant donné leur capacité à cross-présenter efficacement des Ag aux LT CD8⁺, le rôle des cDC1 dans l'immunité antitumorale est investigué depuis quelques années [Figure 13]. L'utilisation de modèles murins tels que les *Batf3*^{-/-} (souris déficientes en cDC1) a permis de démontrer leur implication cruciale dans l'initiation des réponses CTL indispensables au rejet des tumeurs (Hildner et al., 2008). Après avoir montré le rôle de l'IFN- β dans le recrutement des cDC1 dans les tumeurs B16 chez la souris, Fuertes *et al.* ont aussi démontré que la signalisation IFN-I dans les cDC1 est indispensable à l'activation des LT CD8⁺, aboutissant à leur action cytotoxique et au rejet des tumeurs (Fuertes et al., 2011). Ces résultats ont aussi été observés dans un modèle de fibrosarcome (Diamond et al., 2011). En plus de leur analyse d'impact pronostique des cDC1 chez l'Homme, Broz *et al.* ont quant à eux trié des DC infiltrant des mélanomes murins (B78) et démontré que, parmi l'ensemble des TA-DC, les cDC1 (DC CD103⁺) ont le profil transcriptomique qui reflète le plus l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'apprêtement et la présentation des Ag. Ils ont aussi mis en évidence leur supériorité par rapport aux autres cellules myéloïdes à phagocyter des Ag tumoraux et à les cross-présenter aux LT CD8⁺, initiant ainsi une réponse CTL efficace nécessaire au rejet des tumeurs (Broz et al., 2014). Plusieurs autres études ont par ailleurs démontré la capacité des cDC1 murines à migrer efficacement jusqu'aux ganglions lymphatiques drainant les mélanomes (modèles B16 et B78) ainsi que les carcinomes pulmonaires (modèle LLC) où leur interaction avec les LT CD8⁺ permet alors la mise en place d'une réponse adaptative cytotoxique (Headley et al., 2016; Laoui et al., 2016; Roberts et al., 2016). En utilisant un modèle de mélanome exprimant une molécule rapportrice fluorescente (mCherryB78ChOVA), Roberts *et al.* ont visualisé la phagocytose de cellules tumorales par les TA-cDC1, leur migration CCR7-dépendante vers les ganglions lymphatiques drainant la tumeur et leur interaction avec les LT. De plus, les TA-cDC1 triées sont capables d'induire l'activation de LT CD8⁺ *ex vivo* sans nouvel ajout d'Ag tumoral dans la culture, démontrant bien leur capacité de présentation d'Ag tumoraux pris en charge *in vivo* (Roberts et al., 2016). Dans cette même étude, l'analyse des populations de DC infiltrant les mélanomes humains a mis en évidence l'expression spécifique de CCR7 par les TA-cDC1, ainsi que la corrélation entre l'expression du gène *CCR7* et l'infiltration en LT de ces mêmes tumeurs (déterminée histologiquement). En se basant sur un modèle murin de tumeur B16, les travaux de Salmon *et al.* ont confirmé l'implication de CCR7 dans la migration des cDC1 jusqu'aux

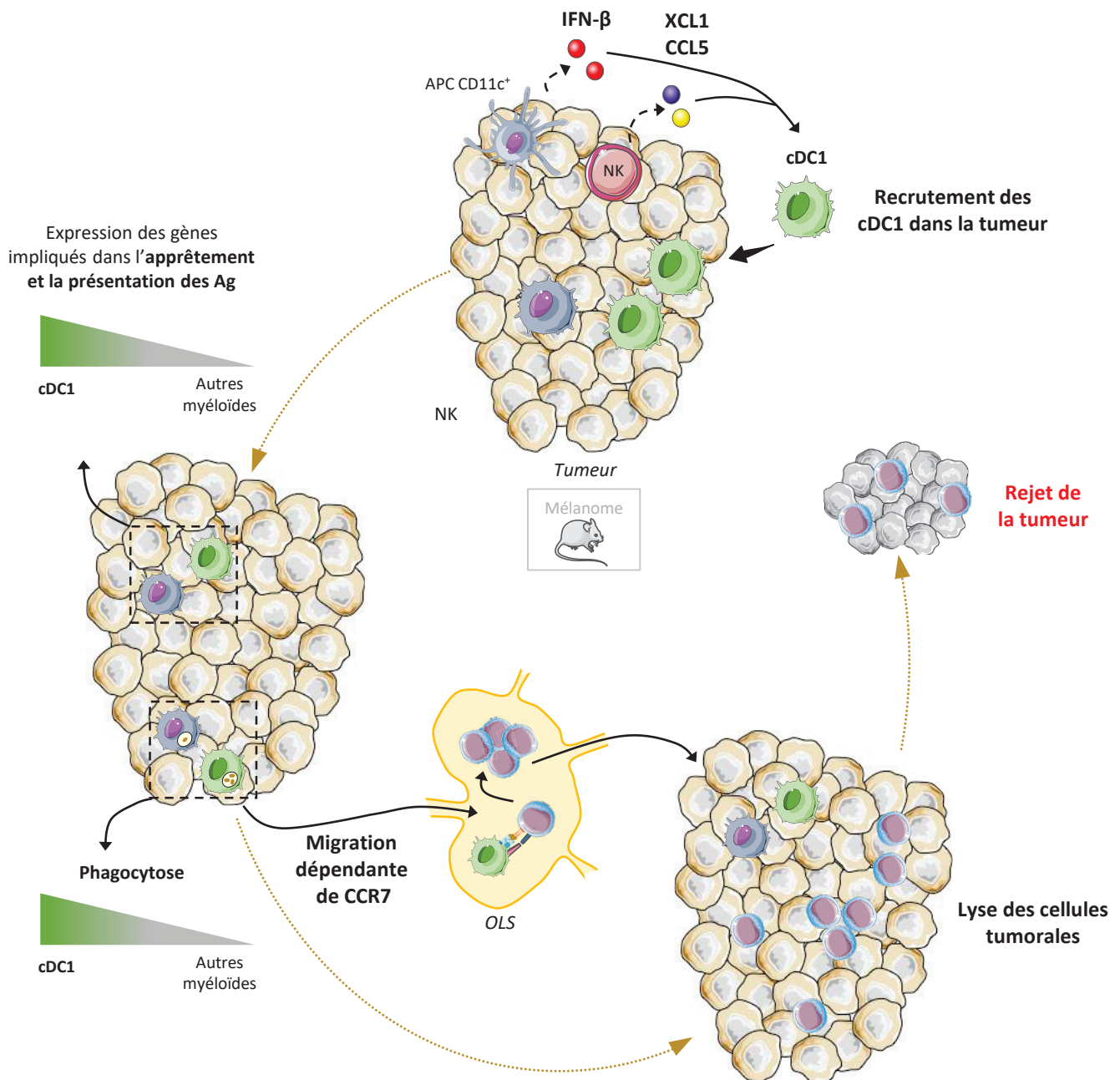


Figure 13 – Induction d’une réponse immunitaire antitumorale par les cDC1 chez la souris

Plusieurs études effectuées dans des modèles murins de mélanome ont décrit les mécanismes impliqués dans l’induction des réponses immunitaires antitumorales par les cDC1. Après avoir été recrutées dans les tumeurs, les cDC1 représentent la population de TA-DC qui phagocyte le plus efficacement les cellules tumorales et qui exprime le plus fortement les molécules nécessaires à la présentation des Ag. Ces cellules migrent ensuite efficacement jusqu’aux ganglions lymphatiques drainant la tumeur. Il est important de noter que plusieurs équipes ont décrit l’implication de l’expression de CCR7 par les cDC1 dans cette migration. De par leur capacité de présentation croisée des Ag, les cDC1 activent alors une importante réponse CTL. Les LT CD8⁺ activés migrent à leur tour vers la tumeur dans laquelle ils exercent leur action cytotoxique, aboutissant ainsi au rejet tumoral.

ganglions pour l'activation d'une réponse cytotoxique et le rejet de mélanomes implantés (B16) ou spontanés (modèle *Braf* muté, *Pten* délété et voie β -caténine constitutivement active) (Salmon et al., 2016).

Par ailleurs, les chimiothérapies combinées à un anti-IL-10 semblent induire la production d'IL-12 par les cDC1 dans des souris porteuses de tumeurs mammaires (MMTV-PyMT), aboutissant à l'induction de réponses CTL efficaces (Ruffell et al., 2014).

3. cDC1 et immunothérapies antitumorales

L'immunosuppression médiée par les tumeurs peut en partie expliquer l'échec thérapeutique observé des vaccins antitumoraux basés sur l'utilisation de DC [Encadré 4]. Effectivement, les mécanismes inhibiteurs mis en place contre les DC endogènes peuvent aussi altérer les DC injectées. De plus, même si les DC ne sont pas directement inhibées, elles ne peuvent pas réactiver les LT dont l'activité est bloquée par l'engagement d'ICP inhibiteurs. La nature des DC injectées conditionne également les réponses cliniques observées chez les patients. De par leur rareté, aucune étude n'a aujourd'hui été menée avec les cDC1. Cependant, nous détaillerons ici les données qui permettent d'appuyer leur rôle central dans la réponse à d'autres immunothérapies.

3.1 cDC1 et anti-ICP

Des données accumulées grâce à l'utilisation de modèles murins permettent aujourd'hui d'affirmer que les cDC1 jouent aussi un rôle crucial dans la réponse aux immunothérapies. Alors que le traitement de souris WT par une combinaison d'anticorps anti-ICP (anti-CD137 + anti-PD-L1) permet le rejet des mélanomes B16, les souris *Batf3*^{-/-} présentant une déficience en cDC1 ne répondent pas à ces immunothérapies (Sánchez-Paulete et al., 2016). Dans le même modèle tumoral, les cDC1 sont aussi indispensables à la réponse au traitement par un anti-PD-L1 combiné à un inhibiteur de BRAF (Salmon et al., 2016). Plusieurs facteurs sont aujourd'hui connus comme étant prédictifs de la réponse aux ICP-L, comme l'infiltration des tumeurs par les LT avant traitement, signe de l'existence d'une réponse immunitaire préétablie. De façon intéressante, ces études ont mis en évidence l'impact prédictif des cDC1 dans la réponse à ces immunothérapies chez la souris, mais sans pour autant identifier le mécanisme impliqué. Quelques éléments de réponse ont été apportés dans le modèle de mélanome exprimant de manière constitutive la voie β -caténine, insensible à la combinaison anti-CTLA4 + anti-PD-L1. L'injection intratumorale de cDC1 en combinaison avec ces anti-ICP induit l'infiltration des tumeurs par les LT ainsi que l'activation de réponses CTL efficaces, menant ainsi à l'inhibition totale de la croissance tumorale (Spranger et al., 2015). Les travaux de Barry *et al.* ont récemment démontré dans deux études cliniques que la proportion de TA-cDC1 (déterminée par FACS) est supérieure chez les patients atteints d'un mélanome métastatique et répondants aux anti-PD-1 par rapport aux non-répondeurs (Barry et al., 2018). Cette donnée ne permet pas d'affirmer que les cDC1 sont nécessaires à la réponse aux ICP-L chez l'Homme mais apporte une première piste soulevant l'intérêt d'analyser les propriétés fonctionnelles de cette population et leurs implications dans le développement de nouvelles immunothérapies.

Deux autres études chez la souris ont démontré l'intérêt d'expandre et d'activer les cDC1 pour améliorer les effets des anti-ICP grâce à une injection intraveineuse de FLT3L combinée à une injection intratumorale de poly(I:C). Cette combinaison permet en effet d'augmenter la différenciation de cDC1

Encadré 4 : Immunothérapies antitumorales ciblant les DC chez l'Homme

Plusieurs études cliniques ont été mises en place en utilisant la stratégie de vaccination thérapeutique visant les DC (Palucka and Banchereau, 2013). Les vaccins peuvent être de nature variable.

Vaccins peptidiques :

Ces vaccins composés de peptides tumoraux (principalement des peptides dérivés de protéines oncogéniques telles que p53). Le traitement de patients atteints de cancer de l'ovaire, du colon ou de mélanome métastatique induit la mise en place d'une importante réponse T CD8⁺. Cependant, ces vaccins n'ont pas permis de nette amélioration de la santé des patients inclus dans ces études (Leffers et al., 2009; Rosenberg et al., 1998; Speetjens et al., 2009). La polarisation majoritairement Th2 des LT CD4⁺ combinée à une absence d'induction d'une réponse T mémoire pourrait expliquer ces résultats décevants (Rosenberg et al., 2005). Afin d'augmenter l'efficacité de ces vaccins peptidiques, l'intérêt d'ajouter divers adjuvants a été évalué (Dubensky and Reed, 2010). L'IFN- α permet par exemple l'expansion de LT CD4⁺ Th1 producteurs d'IFN- γ (Zeestraten et al., 2013).

Vaccins constitués de DC générées *in vitro* :

Les vaccins peuvent aussi être directement constitués de DC générés *in vitro* à partir de progéniteurs autologues, chargées avec des peptides tumoraux et activées. De nombreuses études ont comparé la nature des DC utilisées, le type d'activateur ou de peptides utilisés ainsi que les voies d'injection. Là encore, l'ajout d'adjuvant en injection systémique, tels que le poly(I:C), a rapidement été évalué pour améliorer l'efficacité de ce genre de vaccination. Bien que ces vaccins induisent des réponses T CD4⁺ et CD8⁺ considérables (évaluées dans le sang des patients), ils n'ont pas mené à un important taux de réponse clinique. La plupart des études ont cependant été menées dans des cohortes de patients atteints de cancer à un stade très avancé et chez qui l'immunosuppression est très importante. Les mécanismes inhibiteurs des réponses immunitaires sont donc probablement aussi impliqués dans cet échec thérapeutique. De plus, les progéniteurs utilisés pour générer des DC sont bien souvent des monocytes, or il apparaît clairement que les MoDC ne représentent pas la population la plus appropriée pour initier des réponses antitumorales efficaces.

Emergence des vaccins personnalisés

Il est aujourd'hui clair que la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique des Ag tumoraux des patients est une condition *sine qua non* au bénéfice thérapeutique de ces vaccins. Il est aujourd'hui possible d'identifier les néoépitopes acquis par les cellules tumorales en séquençant le transcriptome des tumeurs, afin de développer des vaccins peptidiques complètement personnalisés car adaptés au « mutanome » des patients (Kreiter et al., 2012). Une première étude démontra une réponse objective de 2 patients sur 5 atteints de mélanome métastatique. De plus, le patient ayant reçu ce type de vaccin en combinaison avec un inhibiteur de PD-L1 présenta une réponse complète à long terme (Sahin et al., 2017).

à partir de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse des souris et de réguler positivement leur expression de molécule de costimulation, signe d'une activation efficace (Salmon et al., 2016; Sánchez-Paulete et al., 2016). Dans les deux modèles de mélanome étudiés par Salmon *et al.*, on observe alors une augmentation de la proportion des LT spécifiques des Ag tumoraux dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, du nombre de LT IFN- γ^+ TNF- α^+ dans la tumeur, ainsi que du ratio LT CD8 $^+$ /LTreg (Salmon et al., 2016). La « trithérapie » composée de cette double injection et d'un anti-PD-L1 permet alors de potentialiser ces effets et d'inhiber tout développement tumoral. Sanchez-Paulete *et al.* ont quant à eux étudié le modèle de tumeur de colon (MC38) insensible aux anti-ICP et démontré que l'injection d'un plasmide codant pour le FLT3L associée à une administration intratumorale de poly(I:C) permet l'expansion de LT CD137 $^+$. La combinaison du FLT3L et du poly(I:C) avec des anti-CD137 et anti-PD-L1 permet alors de retarder significativement le développement tumoral et d'améliorer la survie des souris (Sánchez-Paulete et al., 2016). Ces études démontrent donc bien que le ciblage des cDC1 chez la souris permet de potentialiser les effets des anti-ICP et de traiter certaines tumeurs jusqu'à considérées comme insensibles à ce genre d'immunothérapies.

3.2 cDC1 et transfert adoptif de LT

Lorsqu'elles sont implantées à des souris, les cellules EG7.1 forment un thymome très agressif à l'inverse du clone cellulaire EG7.2 qui forme des tumeurs spontanément rejetées. Broz *et al.* ont démontré la forte infiltration de ces dernières tumeurs par les cDC1, soulevant un potentiel rôle de ces DC dans l'initiation des réponses immunitaires nécessaires au rejet des tumeurs (Broz et al., 2014). Le transfert adoptif de LT spécifiques d'Ag tumoraux préalablement activés permet d'induire le rejet des tumeurs EG7.1. En outre, l'injection de toxine diphtérique permettant l'ablation des cDC1 dans le modèle murin Zbtb46-DTR est associé à une altération du recrutement des LT dans les tumeurs EG7.1 préalablement établies et annule complètement l'effet thérapeutique du transfert adoptif de LT. Dans d'autres modèles tels que celui de mélanome utilisé par Spranger *et al.*, le transfert adoptif de LT spécifiques des Ag tumoraux n'a aucun effet bénéfique car ces LT présentent un défaut de motilité les empêchant d'infiltrer les tumeurs. Cependant, l'injection intratumorale de cDC1 générées *in vitro* favorise le recrutement de ces LT spécifiques, leur action cytotoxique et le contrôle de la croissance tumorale (Spranger et al., 2017). Cette information importante est à prendre en compte pour le développement d'immunothérapies innovantes telles que les *CAR-T cells* (Chimeric antigen receptor T cell). Les *CAR-T cells* sont des lymphocytes T issus des patients, transduits *in vitro* par un vecteur lentiviral leur permettant d'exprimer un TCR chimérique capable de reconnaître les cellules tumorales avant d'être réinjectés aux patients. Bien qu'ayant soulevé de nombreux espoirs grâce à des résultats plus qu'encourageants dans les cancers hématologiques chez l'Homme, les *CAR-T cells* ne semblent pas aussi efficaces pour lutter contre les tumeurs solides. En effet, leur capacité de migration dans les tumeurs ainsi que leur survie semblent fortement impactées. Ces récentes données chez la souris soulèvent donc l'intérêt de cibler les cDC1 pour potentialiser les effets des *CAR-T cells*.

3.3 Ciblage des cDC1

Des études chez la souris ont testé l'efficacité antitumorale du ciblage direct des cDC1 grâce à des anticorps anti-CLEC9A couplé à des peptides tumoraux. L'immunisation des souris avec ce complexe associé à un adjuvant (anti-CD40 +/- poly(I:C)) avant ou après l'implantation de cellules

tumorales colorectales (MC38) ou de mélanome (B16) permet de retarder le développement des tumeurs, d'induire des réponses CTL mémoires et de diminuer le nombre de métastases (Picco et al., 2014; Sancho et al., 2008). D'autres études ont plutôt utilisé des nanoparticules recouvertes d'anti-CLEC9A et contenant des Ag tumoraux. Dans un modèle murin de cancer du sein (MMTV-PyMT), la présence dans les tumeurs et les métastases pulmonaires de cDC1 ayant endocyté ces nanoparticules est associée à une diminution de la croissance tumorale et une forte infiltration des tumeurs par les LT CD4⁺ et CD8⁺ (Zeng et al., 2018). Par ailleurs, l'immunisation de souris avec ce genre de nanoparticules avant ou après l'implantation de cellules de lymphomes (EL4) permet de retarder considérablement le développement tumoral, suggérant des effets à la fois prophylactiques et thérapeutiques du ciblage des cDC1 (Ghinnagow et al., 2017). Cette étude a également démontré que des nanoparticules anti-CLEC9A encapsulant l'Ag Melan-A (fréquemment exprimé par les cellules de mélanome chez l'Homme) sont efficacement endocytées par les cDC1 des PBMC humaines qui sont alors capables d'activer et d'induire la prolifération d'un clone de LT CD8⁺ spécifique de cet Ag tumoral.

Enfin, une étude ayant analysé l'effet de différents adjuvants a mis en évidence l'importance du choix de l'activateur co-administré avec les anti-CLEC9A sur la polarisation des LT CD4⁺. En effet, si ces anticorps sont injectés seuls, les Ag couplés sont alors principalement présentés par les molécules de CMH-II et induisent une différenciation des LT CD4⁺ en LTreg FoxP3⁺. L'injection de poly(I:C) en adjuvant des anti-CLEC9A permet cependant d'initier une production importante d'IL-12 par les DC et d'induire une forte réponse Th1 (Joffre et al., 2010).

Objectifs de la thèse

Au vu de l'ensemble des éléments présentés en introduction, il apparaît clairement que les cDC1 tiennent une place centrale dans les réponses immunitaires antitumorales. Leur rôle de présentation croisée d'Ag a été largement décrit *in vivo* chez la souris et *in vitro* chez l'Homme. C'est en particulier grâce à cette propriété d'activation de réponses cytotoxiques que les cDC1 suscitent de plus en plus d'intérêt dans le domaine de l'immunologie antitumorale. Au cours de ma thèse, je me suis plutôt intéressée à leur capacité à produire de larges quantités d'IFN de type III. Le rôle antiviral de cette famille de cytokine a été et est toujours largement décrit. Cependant, relativement peu de données permettent de documenter son implication dans l'immunité antitumorale et aucune étude n'a par ailleurs fait le lien entre les cDC1 et les IFN-III dans un contexte tumoral. De plus, il est important de constater que les études démontrant un rôle de ces cellules dans l'immunité antitumorale et la réponse aux immunothérapies sont centrées sur les cDC1, sans pour autant ouvrir l'analyse aux autres sous-populations de DC qui peuvent présenter des fonctions similaires.

Mon projet de thèse a donc été centré sur la **caractérisation des cDC1 humaines et de leur synthèse d'IFN de type III dans l'immunité antitumorale des cancers du sein et de l'ovaire**, afin de répondre à plusieurs questions restées jusqu'à présent sans réponse [Figure 14] :

- Quelles populations de DC infiltrent les tumeurs primaires de sein et d'ovaire ?
- Les cDC1 sont-elles les seules TA-DC à être associées à un bon pronostic ?
- Les TA-cDC1 sont-elles capables de synthétiser de l'IFN- λ dans le microenvironnement tumoral ?
- Quel est le rôle de l'IFN- λ dans l'immunité antitumorale par rapport aux autres types d'IFN ?
- Existe-t-il une possibilité de réactiver les TA-cDC1, en particulier pour stimuler leur production d'IFN- λ ?

Afin de répondre à ces questions, j'ai analysé des prélèvements de patientes (sang et tumeurs primaires) en utilisant plusieurs techniques complémentaires, dont la cytométrie en flux, l'immunohistochimie, les dosages multiplex et des outils de bio-informatique. Les résultats résumés dans la publication **"IFN-III is selectively produced by cDC1 and predicts good clinical outcome in human breast cancer "**, actuellement en révision dans le journal *Science Immunology*, permettent d'apporter des éléments de réponse qui nous semblent cruciaux quant à la compréhension de l'implication des cDC1 et des IFN de type III dans l'immunité antitumorale chez l'Homme.

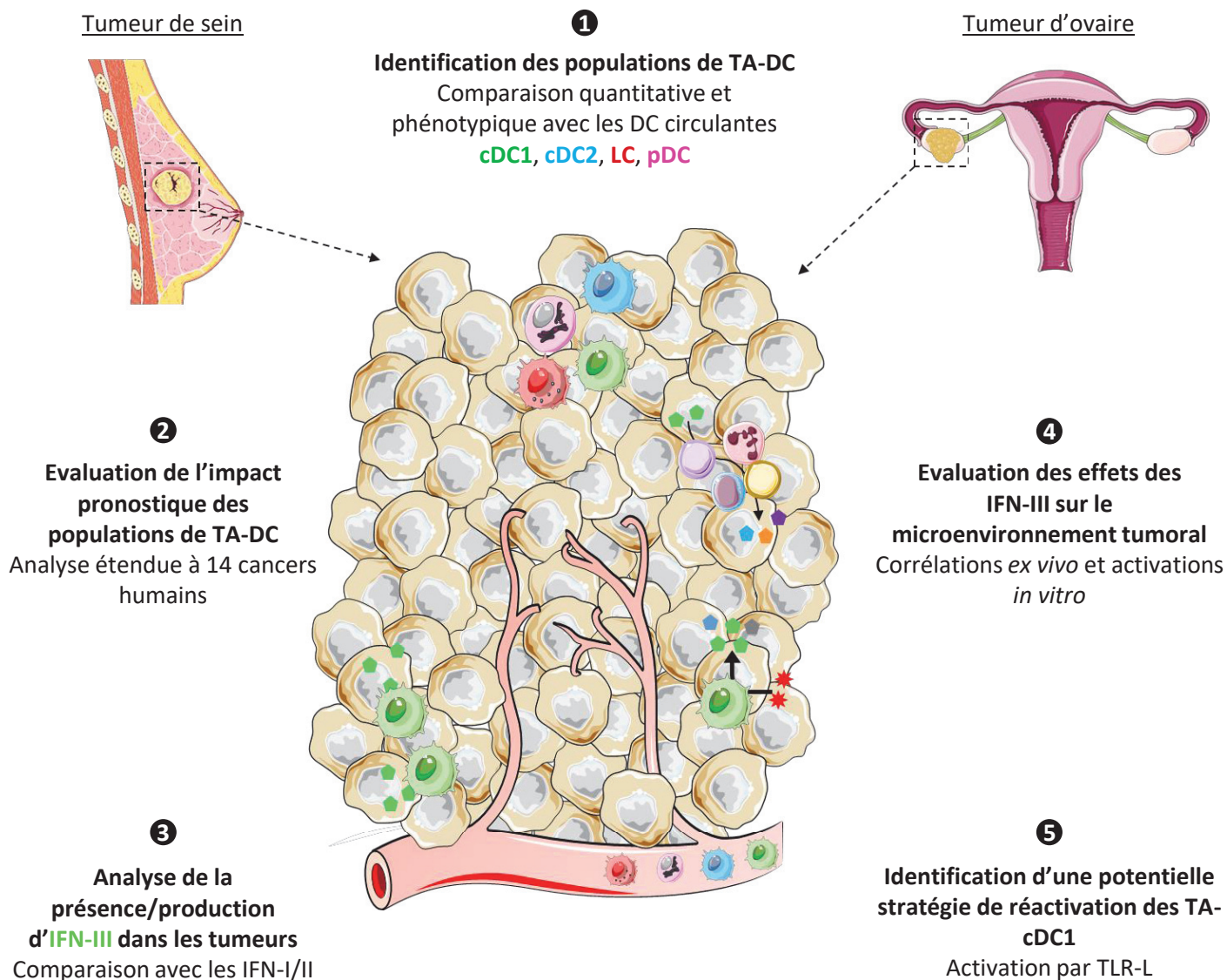


Figure 14 – Objectifs du projet de thèse

RESULTATS

Résultats

Afin d'étudier l'impact des cDC1 et de leur synthèse d'IFN-III dans l'immunité antitumorale, nous avons centré notre étude exclusivement sur des prélèvements humains provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein ou de l'ovaire, grâce à notre collaboration avec le service d'anatomopathologie du Centre Léon Bérard. La **Figure 15** présente la méthodologie utilisée pour répondre aux questions soulevées par le projet de thèse. Afin de visualiser les cDC1 dans les tumeurs, certaines tumeurs ont été congelées ou fixées et incluses en paraffine afin de mettre en place des marquages d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* (RNAscope). Des prélèvements frais tumoraux ainsi que les PBMC des patientes ont été utilisés afin d'estimer la présence des sous-populations de DC, leur proportion ainsi que leur phénotype par analyse multiparamétrique de cytométrie en flux. Ces mêmes prélèvements ont également été analysés en cytométrie pour évaluer la production de cytokines par les sous-populations de DC, avec ou sans activation *ex vivo* par des ligands de TLR. Un dosage multiplex par technique ECLIA (Eletrochemiluminescence immuno assay) des surnageants provenant de la dilacération mécanique des fragments de tumeurs fraîches nous a ensuite permis de caractériser la nature du microenvironnement tumoral soluble ainsi que la production de cytokines et chimiokines induites par du poly(I:C), le ligand de TLR3 ciblant les cDC1, ou par les IFN-I/III eux-mêmes.

En parallèle, nous avons exploité les données publiques d'analyses transcriptomiques du TCGA afin d'évaluer l'impact pronostique des cDC1 et de le comparer aux autres sous-populations de DC dans de multiples cancers chez l'Homme, dont les cancers du sein et de l'ovaire. Pour cela nous avons utilisé l'outil *MCP-counter* (Microenvironment cell populations counter) (Becht et al., 2016). Cette outil a initialement été développé pour estimer des scores d'abondance reflétant la présence dans les tumeurs de 8 populations immunitaires et de 2 populations stromales, chaque score étant calculé en fonction de l'expression de gènes spécifiques du sous-type cellulaire d'intérêt. Nous avons implémenté les signatures afin de calculer un score d'infiltration des tumeurs par les 4 sous-populations de DC identifiées par cytométrie dans les tumeurs fraîches. Cette stratégie permet alors d'évaluer si un fort score d'infiltration des tumeurs par un sous-type particulier de DC est associé à une meilleure ou moins bonne survie globale des patients.

Nous avons également utilisé les données de séquençage des tumeurs du TCGA pour identifier les voies (sets de gènes) associées à la présence des sous-populations de DC. Pour cela, nous avons dans un premier temps stratifié les tumeurs en fonction de leurs scores cDC1, cDC2, LC et pDC, puis sélectionné celles possédant un score élevé pour seulement une sous-population de DC. Une analyse d'enrichissement de set de gènes (GSEA) a ensuite été réalisée grâce à l'outil *Bubble GUM* (GSEA unlimited map) qui permet les multiples comparaisons (tumeurs cDC1^{high} VS cDC2^{high}, cDC1^{high} VS pDC^{high}...) et la représentation graphique des résultats sous forme de *bubble map*.

L'utilisation de prélèvements tumoraux frais ainsi que de données publiques de séquençage de tumeurs associées à des données cliniques nous a permis de générer les résultats résumés dans la publication suivante.

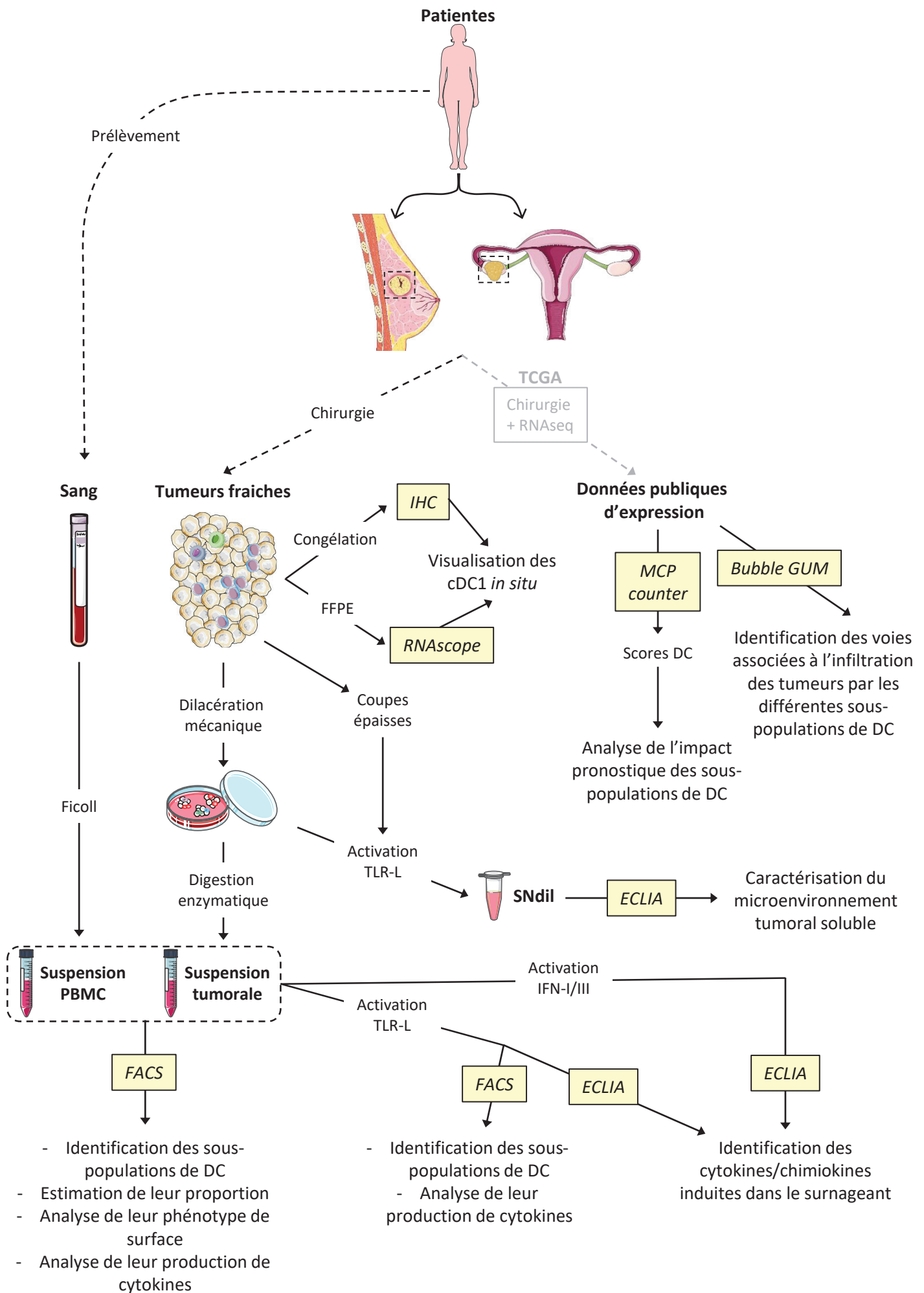


Figure 15 – Prélèvements et techniques utilisées pour répondre aux questions soulevées dans le projet de thèse

Caractérisation des cellules dendritiques cDC1 et de leur synthèse d'interféron de type III dans l'immunité antitumorale

Résumé :

Les cellules dendritiques (DC) tiennent une place centrale dans l'initiation des réponses immunitaires et dans le contrôle du développement des tumeurs. La sous-population cDC1 suscite aujourd'hui un grand intérêt de par ses fonctions d'activation de réponses cytotoxiques par présentation croisée d'Ag aux lymphocytes T (LT) CD8⁺ ainsi que son implication dans l'immunité antitumorale et la réponse aux immunothérapies chez la souris. Le rôle des cDC1 chez l'Homme est cependant peu décrit. Les cDC1 murines et humaines sont aussi connues pour produire de larges quantités d'interféron (IFN) de type III (IFN-III), aussi appelés IFN-λ. Tout comme les IFN-I avec lesquels ils partagent la même voie de signalisation, les IFN-III ont un rôle antiviral bien décrit. Des modèles murins ont également suggéré un rôle antitumoral, mais ces IFN n'ont jamais été étudiés dans un contexte de cancer chez l'Homme. Il est donc crucial de comprendre les mécanismes expliquant l'impact pronostique positif des cDC1 ainsi que le rôle des IFN-III dans l'immunité antitumorale, en particulier pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Nous avons démontré pour la première fois l'infiltration des tumeurs humaines de sein et d'ovaire par diverses sous-populations de DC. Les cDC1 sont particulièrement enrichies par rapport au sang des patientes et forment de nombreuses interactions avec les LT CD8⁺ dans les tumeurs. Une approche de bio-informatique a permis de révéler que les cDC1 représentent l'unique population de DC associée à une meilleure survie des patients dans la majorité des cancers du TCGA. De façon intéressante, la signature de réponses aux IFN-I et III est enrichie dans les tumeurs de sein fortement infiltrées par les cDC1 mais pas par les autres sous-populations. L'expression des gènes codant pour l'IFN-λ1 ou le récepteur aux IFN-III est également associée à une meilleure survie sans rechute dans le cancer du sein. De plus, nous avons démontré la capacité des cDC1 à produire de l'IFN-III sans aucune réactivation *ex vivo*. Ce résultat indique clairement que dans un contexte de réponse immunitaire antitumorale chez l'Homme, la synthèse d'IFN-III est une spécificité des cDC1 comparées aux autres sous-populations. La présence d'IFN-III dans les surnageants tumoraux a été confirmée au niveau protéique et démontrée comme étant fortement corrélée avec l'IL-12p40, les CXCR3-L, le CX3CL1 et le TNF-α. Ces données soulèvent alors l'hypothèse de l'association entre l'IFN-III, produit dans le microenvironnement tumoral par les cDC1, et la présence de cytokines et chimiokines impliquées dans le recrutement et l'activation de lymphocytes cytotoxiques tels que les LT CD8⁺ ou cellules NK.

Notre étude apporte des informations détaillées quant à la nature des différentes sous-populations de DC infiltrant les tumeurs humaines de sein et d'ovaire et démontrent pour la première fois la production d'IFN-III par les cDC1. L'association de ces cellules et des IFN qu'elles produisent avec une meilleure survie des patientes confirme l'intérêt de développer de nouvelles immunothérapies ciblant les cDC1, en particulier dans le cancer du sein.

Mots clés : immunité antitumorale, cellules dendritiques, cDC1, interféron, IFN-III

Dendritic cells (DCs) represent a promising target for the development of new immunotherapies because of their central role in the initiation and the control of immunity. The rare cDC1 population is under considerable scrutiny because their murine counterparts called CD8 α ⁺ DCs are essential for cross-presentation to CD8⁺ T cells, antitumor immunity and response to immunotherapies. In contrast, the role of human cDC1 in cancer has not been investigated as extensively as in mice. They were identified in several tumors and transcriptomic analyses revealed their association with a favorable patient outcome. They also represent a major source of type III interferon (IFN-III), also called IFN- λ , playing a crucial role in viral infections, similarly to IFN-I that share the same signaling pathway. Its antitumor activity was also reported in mouse models, therefore raising questions regarding the use of IFN-III in clinical oncology. We believe that understanding the underlying mechanisms of cDC1 favorable prognostic impact and the role of IFN-III in antitumor immunity will be central to design new therapeutic approaches.

Here, we demonstrated the infiltration of human primary breast and ovarian tumors by several DC populations and the enrichment of cDC1 compared with patient blood. We also showed for the first time close contacts between cDC1 and T cells in breast tumors. An *in silico* approach using MCPcounter on the TCGA data sets revealed that cDC1 represented the only DC subset associated with a prolonged overall survival in the majority of solid tumors. Interestingly, type I/III signature was strongly enriched in tumors highly infiltrated only with cDC1. Furthermore, we observed by feature intracytoplasmic flow cytometry analysis a spontaneous production of IFN- λ 1 that is restricted to cDC1 in the absence of any *ex vivo* stimulation in one third of tumors. This result clearly indicates that IFN- λ 1 production is a distinct of cDC1 compared with other DC subsets, even in a human tumor context. Notably, a high expression level of genes coding for IFN-III or its receptor was correlated with an increased relapse-free survival in breast cancer. We confirmed the presence of the IFN- λ 1 protein in more than 50% of tumors and observed its abundance compared with other IFN subtypes. IFN- λ 1 was strongly correlated with IL-12p40, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CX3CL1 and TNF- α . These results raised the hypothesis that IFN- λ 1, produced by cDC1 in the TME, could be associated with the production of cytokines and chemokines involved in the recruitment and activation of cytotoxic lymphocytes (NK cells and CD8⁺ T cells).

Our study provides detailed information about the DC compartment infiltrating human breast and ovarian tumors, revealing their potential implication in the antitumor immunity. By focusing on the pathways associated with each DC subset, our findings shed new light on the link between DC population called cDC1 and IFN-I/III signature in tumors. Our clear demonstration of IFN-III production by cDC1 and of its positive impact on the prognosis of cancer patients provides valuable evidences to support the development of new therapeutic strategies targeting cDC1 to amplify the response to immunotherapies, especially in breast cancer.

Key words: antitumor immunity, dendritic cells, cDC1, interferon, IFN-III

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38

3
4
5
6

8
9

10

11

12

13

14

15

17

18
19
20
21
22
23

25

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

Introduction

Novel antitumor immunotherapies such as monoclonal antibodies targeting immune checkpoints (ICPs) has led to promising results in several cancers. However, despite the favorable outcome of responding patients, the response rate remains relatively low. Thus, a major ongoing challenge is therefore the identification of new immunotherapy targets. Dendritic cells (DCs) represent a promising one because of their central role in the initiation and the control of immunity. Their functions encompass a wide range of mechanisms and responses mediated by different subsets namely: the Langerhans cells (LC), the plasmacytoid DCs (pDCs) and the two subsets of classical/conventional DCs (cDCs), the CD141/BDCA3^{high} cDC1 and the CD1c/BDCA1⁺ cDC2.

Although the role of cDC2 in tumor immunity has not been specifically explored, the rare cDC1 population is under considerable scrutiny because their murine counterparts called CD8 α ⁺ DCs are essential for cross-presentation to CD8⁺ T cells, antitumor immunity¹⁻⁴ and response to immunotherapies⁵⁻⁸. In contrast, the role of human cDC1 has not been investigated as extensively as in mice. They were identified in several tumors^{2,9,10} and transcriptomic analyses revealed that a high cDC1 infiltration score is associated with a favorable cancer prognosis^{2,4,11,12} as well as the response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma¹¹. However, the underlying mechanisms of positive impact of human cDC1 in patient outcome are not elucidated and the respective role of each DC subset in human antitumor immunity still remains elusive.

We previously contributed to show that, in addition to their role in Ag cross-presentation¹³, human cDC1 represent a major source of type III interferon (IFN-III), also called IFN- λ 1/2/3 (IL-29/28A/28B), in response to TLR3 engagement^{14,15}. IFN-III share the same signaling pathway as IFN-I, leading to the transcription of multiple interferon-stimulated genes (ISGs). Similar to IFN-I, IFN-III was shown to play a crucial role in autoimmune diseases¹⁶ and viral infections¹⁷. Its antitumor activity was also reported in mouse models¹⁸⁻²¹, therefore raising questions regarding the use of IFN-III in clinical oncology. In human, its anti-proliferative^{22,23} and pro-apoptotic^{24,25} activities have so far only been demonstrated *in vitro*. Owing to its specificity of action on a narrow range of cell types, targeting IFN-III may pave the way for novel IFN therapies with potentially limited toxicity compared to IFN-I treatments.

We believe that understanding the respective functions of each DC population will be central to design new therapeutic approaches. Therefore, we investigated here breast and ovarian tumor infiltration by the different DC subsets. We identify a key role for intratumoral cDC1 in producing IFN-III and inducing an IFN response that is associated to CXCR3 and CX3CR1 ligands and IL-12, promoting effector T cell recruitment and activation. More importantly, we also revealed a positive impact of IFN-III on clinical outcome in many human cancers. Finally, we highlighted TLR3 activation of intratumoral cDC1 as a therapeutic strategy leading to IFN-III, as well as type 1-related cytokines

and chemokines production. These data support the development of therapies targeting cDC1 to trigger their IFN-III production associated to a cytokine microenvironment favorable to cytotoxic immune cells.

Results

Unlike other DC subsets, breast and ovarian tumors are enriched in cDC1 compared with patient' blood.

To evaluate the infiltration of primary breast and ovarian tumors by DC populations, we first performed a multiparametric flow cytometry analysis on fresh dilacerated and digested tissues. Among HLA-DR⁺ lineage⁻ cells, four discrete TA-DC populations were clearly distinguishable in almost all tumors (Fig. 1a) namely: pDCs (CD11c⁻ CD123⁺), cDC1 (CD11c⁺ BDCA1⁻ BDCA3^{hi}), cDC2 (CD11c⁺ BDCA1⁺ CD207⁻) and LCs (CD11c⁺ BDCA1⁺ CD207^{hi}). These DC phenotypes were similar to DCs present in several non-cancerous tissues²⁶ and lung tumors¹⁰. Except for LCs that are very poorly represented in blood, the same DC populations were observed in patient' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Supplementary Fig. 1a). We further assessed more precisely the phenotype of TA-DCs and blood DCs (Fig. 1b, Supplementary Fig. 1b). As expected, classical markers such as BDCA2/CLEC4C and CD11b were respectively expressed by pDCs and cDC2. As in blood, SIRP- α , which is one receptor of the "don't' eat me signal" used by CD47-expressing tumor cells to inhibit phagocytosis by APCs, was expressed by all TA-DCs except cDC1. Contrariwise, expression of CLEC9A and XCR1 was strikingly restricted to TA-cDC1, reinforcing our choice for using these two molecules as cDC1 specific markers. Among all TA-DCs, cDC1 also expressed the highest level of BTLA. An unsupervised viSNE analysis then revealed the homogeneity of the CLEC9A⁺ cluster, representing cDC1 in tumor and blood (Fig. 1c, Supplementary Fig. 1c). In contrast, this result also demonstrated a more heterogeneous cDC2 and LC populations. Consistent with flow cytometry analysis, clusters of CLEC9A⁺ cDC1 were found *in situ* in infiltrated zones of breast and ovarian tumors by immunohistochemistry (Fig. 1d-e). Compared with cDC2 and LCs, cDC1 expressed lower levels of DC-LAMP/CD208, suggesting a moderate maturation stage (Fig. 1b, Supplementary Fig. 2a).

Interestingly, while cDC1 was the rarest cell population among all DC subsets in patient blood, their proportion was equivalent to pDCs in tumors (Fig. 2a). More importantly, the ratio of cDC1 to all TA-DCs largely increased in tumors compared with blood (3.5 fold increase), as opposed to other DC subsets (Fig. 2b). By focusing on breast tumor subtypes, we demonstrated the preferential infiltration by cDC1 of triple negative breast cancers (TNBCs), which are known to be the most aggressive and infiltrated ones (Supplementary Fig. 2b). Conversely, the SBR (Scarff-Bloom and Richardson) grade did not appear to influence the proportion of TA-cDC1 (Supplementary Fig. 2b).

Gene signature of TA-cDC1 positively correlates with cancer patients survival.

We aimed to extend previous analyses of the prognostic impact of cDC1 to all DC subsets and other tumor types. We therefore estimated the abundance of each DC population in 14 tumor gene expression data sets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) with the MCP-counter algorithm developed by Becht *et al*²⁷. We derived human DC signatures composed of *CLEC9A* and *XCR1* for cDC1, *CLEC10A* and *CD1E* for cDC2, *CD1A* and *CD207* for LCs, *CLEC4C* and *LILRA4* for pDCs, and we assessed the overall survival of patients stratified according to the median of each expression score. This approach revealed the strong association between cDC1 infiltration and a good prognosis in breast cancer (Fig. 3a). Interestingly, cDC2 and LCs, but not pDCs, were also positively correlated with patients' survival although to a much lower significance. Regarding ovarian tumors, none of the DC populations seemed to influence prognosis (Fig. 3a). We extended our analysis to human cancers and revealed that cDC1 represented the only DC subset associated with a prolonged overall survival in the majority of solid tumors (8/14) (Fig. 3b, Supplementary Fig. 3).

The type I / III interferon response is enriched in tumors with a high cDC1 score.

As cDC1 are the key DC population responsible for effector CD8⁺ T cell activation, we analyzed the proximity of these two cell types in tumors. Based on an *in situ* hybridization of *CLEC9A* and *CD3* probes, we showed for the first time close contacts between cDC1 and T cells in breast tumors (Fig. 4a). We also demonstrated the positive correlation between cDC1 and CD8⁺ T cell infiltration scores using TCGA transcriptomic data of breast cancer (Fig. 4b), as previously reported in melanoma⁶. However, this was clearly not a specific feature of cDC1, since this correlation was shared with cDC2 and pDCs. In contrast, LCs and CD8⁺ T cell infiltration scores were not correlated in tumors (Fig. 4b). In order to get insights in the functional specificity of TA-cDC1 associated to their high positive prognostic impact, we used the DC infiltration scores (defined by MCP-counter) to design groups of tumors enriched only in one DC subset. We analyzed their association with signature pathways using BubbleGUM²⁸ for high-throughput gene set enrichment analysis (GSEA) of homemade gene sets or of the MSigDB Hallmark collection. Of note, as IFN-III share the same signaling pathway and induces similar ISGs than IFN-I, we renamed the type I IFN Hallmark signature into type I/III IFN signature. No pathway were specifically enriched in cDC2^{high} tumors. However, these tumors seem to have the lowest IFN signatures (Fig. 4c). The signatures related to G2M checkpoint and hypoxia were enriched in LC^{high} tumors compared to other groups (Fig. 4c). On the other hand, while TNF- α signaling *via* NF κ B was predominantly associated with cDC1, cDC2 or LCs compared with pDCs, oxidative phosphorylation and immunosuppression pathways were characteristics of pDC^{high} tumors (Fig. 4c). This result is in agreement with the high correlation between pDCs and regulatory T cells (Tregs) in breast tumors compared with other DC subsets (r=0.6042) (Supplementary Fig. 4a). Interestingly, type I/III and type II IFN signatures were strongly enriched in tumors highly infiltrated with cDC1 compared to other groups (Fig. 4c, Supplementary Fig. 4b). Conversely, the epithelial to

mesenchymal transition (EMT) signature had the opposite enrichment profile. Hence, cDC1^{high} tumors compared with other groups have the highest IFN signatures and the lowest EMT signature. Hierarchical clustering of type I/III IFN signature genes specifically enriched in cDC1^{high} tumors compared with all other tumor types revealed two groups of genes. The first one is shared with pDCs and mostly composed of ISGs, and a second one containing independent genes such as *LPAR6*, *UBA7* or *CSF1* (Fig. 4d). In type II IFN signature, many genes involved in Ag processing and presentation were highly expressed in cDC1^{high} tumors (*B2M*, *PSMB8*, *HLA-A*, *HLA-B*, *TAPBP*, *PSMB9*, *PSME1*), in addition to genes involved in the crosstalk between NK cells and DCs such as *HLA-A* and *-B*, *IL-15R* and *IL-15*. Interestingly, *CD274/PD-L1* was also found particularly enriched in cDC1^{high} tumors (Fig. 4e). Moreover, tumors highly infiltrated by pDC/LC/cDC2 present a more mesenchymal phenotype as demonstrated by the enriched EMT signature in comparison to cDC1 high tumors. Thus, this *in silico* analysis allowed us to highlight the positive and strong link between the infiltration of breast tumors by cDC1 and an enriched IFN signature.

IFN- λ 1 selectively produced by cDC1 in breast tumors is associated with increased relapse-free survival.

IFN-III production is a well-known feature of cDC1¹⁴, essentially described in viral contexts, but the role of this cytokine has never been studied in human tumors. The enrichment of the type I/III IFN signature in cDC1 exclusive tumors prompted us to analyze the link between IFN-III and TA-cDC1. First, using TCGA transcriptomic data sets of multiple cancers, we demonstrated the upregulation of *IFNL1* gene expression in tumor compared with normal adjacent tissue (NAT) (Fig. 5a), confirming the presence of IFN-III in tumors. Interestingly, the differential expression between tumor and NAT is highly significant in breast, head and neck and lung cancers in which cDC1 are strongly associated with a favorable patient prognosis (Fig. 3b). Very interestingly, we observed by intracytoplasmic flow cytometry analysis a spontaneous production of IFN- λ 1 that is restricted to cDC1 in the absence of any *ex vivo* stimulation in one third of tumors (4/12) (Fig. 5b). Of note, we also detected TNF- α production, mostly by TA-cDC2 but no IFN- α (Supplementary Fig. 5a). This result clearly indicates that IFN- λ 1 production is a distinct feature of cDC1 compared with other DC subsets, even in a human tumor context. Then, we explored the prognostic impact of *IFNL1* and the specific chain of its heterodimeric receptor, *IFNLR1*, using public transcriptomic data sets. Notably, a high expression level of these two genes was correlated with an increased relapse-free survival (RFS) (Fig. 5c). As IFN-III share many biological features with IFN-I, it is of utmost importance to decipher their respective role and impact within tumor microenvironment. For that purpose, we used the same strategy as for DC subsets and designed groups of tumors enriched in only one IFN: IFN- λ 1 (*IFNL1*) or IFN- β (*IFNB1*). We did not investigate IFN- α (*IFNA2*) since it was expressed in very few breast tumors (0,7%) (Supplementary Fig. 5b). We identified by BubbleMap multiple gene sets enriched in tumors with a high expression at least for one of these IFN subtypes compared with double negative

tumors (*IFNL1*^{neg} *IFNB1*^{neg}), including type I/III response signature as expected, as well as type II response signatures from the MSigD Hallmark collection (Fig. 5d). Interestingly, previously published pDC and cDC1 signatures^{15,29} were enriched in *IFNL1*^{pos} but not in *IFNB*^{pos} tumors compared with double negative tumors (black box). Furthermore, *IFNL1*^{pos} tumors were preferentially enriched in all of the gene sets identified in this analysis compared to *IFNB1*^{pos} tumors (blue box), reinforcing our interest in the role of IFN-III in human antitumor immunity.

IFN-λ1 is the predominant IFN subtype in human breast tumors and is correlated with a Th1-related chemokine/cytokine microenvironment.

We further dissected the soluble tumor microenvironment (TME) by quantifying multiple cytokines and chemokines in the supernatant of more than 100 dilacerated breast tumors. We confirmed the presence of the IFN-λ1 protein with a concentration between 10 to 800 pg/ml in 57% of tumors, and observed its abundancy compared with other IFN subtypes (Fig. 6a). Indeed, IFN-β was detected only in 30% of tumors and with a concentration inferior to 50 pg/ml. IFN-α was completely absent from these tumor supernatants, consistently with transcriptomic data (Supplementary Fig. 5a) and with the previous demonstration of TA-pDC inability to produce this last kind of IFN in breast tumors³⁰. Interestingly, we found no correlation between IFN-λ1 and IFN-β (Fig. 6b), though they were associated with different cytokine/chemokine microenvironments. Indeed, while IFN-β was highly correlated with the presence of an inflammatory environment composed of IFN-γ / IL-1β / IL-17A, IFN-λ1 was strongly correlated with IL-12p40 / CXCL9 / CX3CL1. CXCL10, CXCL11 and TNF-α were correlated to both IFN-β and IFN-λ1. These results raised the hypothesis that IFN-λ1, produced by cDC1 in the TME, could be associated with the production of cytokines and chemokines involved in the recruitment of cytotoxic lymphocytes (NK cells and CD8⁺ T cells), such as CXCR3-L and CX3CL1. Finally, we assessed the impact of IFN-λ1 in the tumor microenvironment. We treated human breast tumor suspensions with IFN-λ1 or IFN-β and showed a similar increase of CXCL11 and IFN-γ (Fig. 6c). We also demonstrated the induction of IFN-β production by IFN-λ1 treatment at higher levels than the induction of IFN-λ1 by IFN-β. Unexpectedly, CXCL9 was not induced by IFN-λ1 and IFN-β. Of utmost importance, IFN-λ1 activation alone induced a strong IL-12p70 production, a cytokine crucial for the differentiation and activation of Th1 lymphocytes and effector CD8⁺ T cells, while exclusively IFN-β treatment led to an increased production of CXCL10 and CX3CL1. This last result demonstrates that, while IFN-λ1 strongly correlated to CXCL9, CXCL10 and CX3CL1 in tumors, it cannot directly induce these chemokines. On the opposite, treatment of tumor cell suspensions by IFN-λ1 efficiently induces IFN-β, IFN-γ and IL-12p70.

Stimulation by TLR3-L strongly induces IFN-λ1 production by TA-cDC1.

Given the positive prognostic impact of IFN-λ1 in breast cancer and its putative role in the recruitment and activation of cytotoxic immune cells, we speculated that the induction of IFN-III could be a

potential therapeutic strategy in combination with other immunotherapies. Several studies reported the involvement of TLR3 signaling in the activation of IFN- λ production by cDC1¹⁴. Thus, we activated patient PBMC or breast tumor cell suspensions using polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C), dsRNA), a TLR3 agonist to target cDC1, in addition to resiquimod (R848, ssRNA) to also stimulate other DC subsets through TLR7/8. As expected, this combined activation led to TNF- α production by all patient blood DC subsets, IFN- α by pDCs and IFN- λ 1 both by pDCs and cDC1 (Fig. 7a, Supplementary Fig. 6a). In tumor cell suspensions, we confirmed the impairment of TA-pDC to produce IFN- α ³⁰ and demonstrated for the first time their inability to produce IFN- λ 1 as well (Fig. 7b), in contrast to patients' blood pDCs. Very interestingly, unlike TA-pDCs, TA-cDC1 were still responsive to TLR stimulation and could efficiently produce IFN- λ 1 (Fig. 7b). This activation also led to TNF- α production by all TA-DCs (Supplementary Fig. 6b). Finally, we evaluated the global impact of such TLR3 stimulation on the tumor microenvironment. To do so, we quantified multiple cytokines and chemokines in the supernatant of *ex vivo* PolyI:C-activated fresh breast tumors thick sections, instead of tumor cell suspensions, to conserve the tissue architecture. Of importance, we observed an high induction of IFN- λ 1 by this TLR3 triggering in contrast to IFN- β which is not significantly increased. The production of IFN- γ , CXCL9, CXCL10 and CX3CL1 was also significantly increased. This last result unveils the great potential of breast tumor stimulation by cDC1 triggering using TLR3-L to induce a cytokine/chemokine microenvironment reflecting recruitment and activation of cytotoxic effector cells.

Discussion

Owing of their functions of IL-12p70 secretion³¹ and Ag cross-presentation to activate CD8⁺ T cells, the abundance of intratumoral cDC1 has previously been suggested to be correlated with immune-mediated tumor control and favorable outcome in mice^{2,5-7}. Nevertheless, no clear demonstration of cDC1 infiltration in human breast or ovarian tumors had previously been shown, nor their precise role in promoting antitumor immunity. Furthermore, many studies in mice have demonstrated the important role of the IFN response in the development of the antitumor immunity, but the potential implication of the more recently described type III IFN had so far not been evaluated. Here we demonstrate the strong positive prognostic impact of cDC1 compared to other DC subsets and their association with a type I/III IFN signature in breast tumors. We also uncover a key role for type III IFN, selectively produced by cDC1, in the induction of type I/II IFNs and chemokines recruiting and activating effector cells such as NK and T cells, as well as its correlation with favorable patient outcome in breast cancer.

Both human and mouse cDC1 are characterized by their unique expression of the endocytic receptor CLEC9A³² and the chemokine receptor XCR1³³, molecules that have been shown to play a

major role in higher efficiency of cDC1 for CD8⁺ T cell activation^{4,32–34}. The markers used in recent papers to characterize TA-cDC1 are imperfect and an exhaustive phenotype of these cells is still missing. Indeed, cDC1 have been characterized in NSCLC, colorectal cancer and melanoma using IRF8 or CD141/BDCA3^{9,10}, two markers also respectively expressed by pDCs and cDC2⁴. Here, in addition to a high CD141/BDCA3 expression, we used CLEC9A, XCR1 and the absence of SIRP- α to unambiguously demonstrate the infiltration of breast and ovarian tumors by cDC1. Furthermore, we systematically analyzed the concomitant infiltration of other DCs such as pDCs, cDC2 and LCs. We noticed that XCR1 is not expressed by all cDC1, suggesting a downregulation of this receptor after maturation as previously described^{4,35,36}. We confirmed the phenotype of each DC subset in patient PBMCs, demonstrating the conserved expression of all markers analyzed. So far, the *in situ* identification of cDC1 was hampered by the lack of specific mAb against CLEC9A or XCR1. Here, we visualized for the first time CLEC9A⁺ cDC1 *in situ* in human tumors and observed that cDC1 are localized in lymphoid aggregates where they establish direct interactions with T cells. Finally, the selective enrichment in cDC1 compared to other DCs in tumors versus patient PBMCs provide an additional rationale for studying cDC1 and their role in the context of human cancers.

Recent evidence has emerged showing that TILs present in breast cancer prior to treatment can predict response to therapy and improved prognosis³⁷. DCs were first thought to be of no prognostic value in breast cancer compared with other human malignancies, based on the *in situ* visualization of all DCs using the S100 protein^{38,39}. Given our more advanced knowledge of DC subsets and their functional specialization, this strategy using one marker for the global identification of DCs including monocyte-derived ones appears inadequate. Indeed, it is important to assess the differential immune infiltration at the tumor site by distinct types of DCs to examine whether it is correlated with host adaptive immune responses and clinical outcome. We show that among all DC subsets, cDC1 clearly display the highest positive prognostic impact in breast cancer. This observation extends results from two recent studies suggesting the association between breast tumor infiltration by cDC1 and a favorable prognosis^{2,4}. We further demonstrated that cDC1 signature has positive prognostic impact in several other tumor types (8 out of 14), in particular in lung, head and neck and metastatic melanoma, all responding to T cell immune checkpoint therapies. Interestingly, no prognostic impact was found in aggressive cancers, such as ovarian or pancreatic tumors, so far not sensitive to current immunotherapies. Regarding other DC subsets, a high infiltration of breast tumors by cDC2 and LCs is associated with an increased overall survival, although with a lower significance compared to cDC1. In contrast, pDC signature has no impact on breast patient outcome. Furthermore, in GSEA analyses, immunosuppression and oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathways were found enriched in pDC^{high} tumors, which is relevant to our previous demonstration of the role of pDCs in breast cancer progression by promoting Tregs accumulation⁴⁰, and with another recent study supporting the implication of OXPHOS in the survival of Tregs⁴¹. We also observed the

292 EMT signature enrichment in cDC2/LC/pDC^{high} compared to cDC1^{high} tumors, an observation relevant
293 with recent data highlighting the EMT as an immune evasion mechanism contributing to metastatic
294 dissemination⁴².

295 Then, we observed intra-tumoral cDC1 colocalization with CD8⁺ T cells and correlation
296 between cDC1 and CD8⁺ T cell scores, as previously reported in melanoma⁶. However, the strength
297 of this association was comparable to the other DC subsets. Interestingly, type I/III gene signature
298 was found enriched in tumors highly infiltrated with cDC1 compared with other DC types. We observed
299 that no or very few IFN-I is present in human breast and ovarian tumors whereas IFN-III is produced
300 in more than 50% of patients. Of utmost importance, we demonstrated that cDC1 are the only source
301 of IFN-III and that the expression of IFNL1 and IFNLR1 genes is associated with better patient
302 outcome. By inducing same cores of genes than IFN-I⁴³, IFN-III may play a key role in the antitumor
303 immune response. Indeed, besides being an inducer of cDC maturation⁴⁴, IFN-I strongly enhances
304 cross-presentation, which is critical for the induction of CD8⁺ T cell responses against cancer⁴⁵.
305 Overall, these data suggest that cDC1 may have a positive impact on patient survival through their
306 type III IFN production, likely induced after TLR3-mediated recognition of endogenous double-
307 stranded RNA⁴⁶ released during tumor environment remodeling.

308 Our results prompted us to understand the precise role of IFN-III in the tumor context. We
309 highlighted the strong correlation between IFN- λ 1 and CXCL9/10/11, the three ligands of CXCR3, a
310 chemokine receptor strongly expressed by Th1, CTL, NK and NKT cells. In this context, molecules
311 increasing paracrine expression of these CXCR3-L have been shown to initiate antitumor immunity
312 in many models⁴⁷. IFN- λ 1 is also correlated in the TME with CX3CL1, a chemokine involved in the
313 recruitment of effector T cells endowed with a particularly high cytotoxic activity⁴⁸. These last results
314 raise the hypothesis of IFN-III involvement in cytotoxic immune cell recruitment in the tumor. In
315 addition to its correlation with CXCL10/11, but not with CXCL9 and CX3CL1, IFN- β is strongly
316 associated with a pro-inflammatory TME composed of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8. This is in
317 agreement with a recent study showing in a mouse influenza infection model that IFN-III are the first
318 IFNs produced and act at the epithelial barrier to suppress initial viral spread without activating
319 inflammation. In this model, type I IFNs are subsequently released to enhance viral resistance and
320 induce pro-inflammatory responses⁴⁹. Finally, our data show that CXCL9 and CX3CL1, two
321 chemokines involved in cytotoxic effector cells recruitment, are strongly associated to IFN- λ 1 in
322 tumors, and not directly induced by IFN- λ 1 but in response to TLR3-L selectively targeting cDC1.
323 Indeed, cDC1 directly produce CXCL9 in response to PolyI:C¹⁵ and CX3CL1 is upregulated during
324 DC maturation⁵⁰. Thus, cDC1 activation may lead to secretion of both IFN and cytotoxic recruiting
325 chemokines creating a favorable environment to boost antitumor immunity.

Furthermore, we observed through *in silico* analyses that cDC1-enriched tumors are associated with type II IFN signature and that *IFNL1* only positive tumors correlated with cytotoxic immune cell signature (compared with *IFNB1* positive tumors). In line with these observations, we show that treatment of tumor cell suspensions with recombinant IFN- λ 1 induces a strong production of IFN- β and IFN- γ , revealing an amplification loop between these different IFN subtypes, as previously reported in IFN- λ -pretreated pDCs⁵¹. The capacity of IFN-III to induce IFN- γ and IL-12p70 suggests a direct or indirect effect on T or NK effector cell, leading to their activation. Thus, these data suggest that the endogenous activation of cDC1 will not only favor cytotoxic effector recruitment through CXCL9 or CX3CL1, but will also induce their activation⁵². In accordance, we have previously demonstrated that IL-12p70 production induced by TLR activation of human DC were altered by neutralizing anti-IFNAR2 antibodies⁵³. Thus, an autocrine loop of type III IFN may be necessary in tumors for bioactive IL-12p70 secretion by conventional DC. Finally, even though IFN-I and IFN-III induce the same signaling pathway, they clearly induce different responses in tumors, likely as the consequence of a different expression pattern of their receptors.

Finally, in contrast to TA-pDC impairment for their IFN-III production in response to TLR7/8 ligand, as we previously demonstrated for IFN- α ^{30,54}, we highlighted the potency of a TLR3 agonist to induce IFN- λ 1 production by TA-cDC1. We also demonstrated the induction of CX3CL1 and CXCL9/10 production. Thus, TLR3 triggering presents promising results for the development of new combined therapies, including with T cell ICP blockers. In melanoma-engrafted mice, the intra-tumoral administration of PolyI:C, combined to the cDC growth factor FLT3-L, significantly potentiates the immunotherapeutic response of ICP inhibiting treatments. Although, the beneficial effect of TLR3 engagement was suggested to be IFN-I-dependent⁷, IFN-III was certainly involved in this process as well.

Overall, our study provides detailed information about the DC compartment infiltrating human breast and ovarian tumors and their association with patient clinical outcome, revealing their potential implication in the antitumor immunity. By focusing on the pathways associated with each DC subset, our findings shed new light on the link between DC population called cDC1 and IFN-I/III signature in tumors. Our clear demonstration of IFN-III production by cDC1 and of its positive impact on the prognosis of cancer patients provides valuable evidences to support the development of new therapeutic strategies targeting cDC1 to amplify the response to immunotherapies, especially in breast cancer.

Materials & Methods

Breast and ovarian cancer patients. We enrolled patients diagnosed with primary breast or ovarian carcinoma. Fresh tumors and blood samples (collected in EDTA anticoagulant-containing tubes) were obtained from the Biological Resources Center (BRC) of the Centre Léon Bérard (CLB, BB-0033-00050, Lyon, France) and from the TUMOROTHEQUE (BRC of the Hospices Civils de Lyon) after obtaining the written informed consent of patients. The study was reviewed and approved by the institutional Review Board of CLB.

Healthy human blood (collected in EDTA anticoagulant-containing tubes) was obtained anonymously from the Etablissement Français du Sang (EFS, Lyon, France). Written informed consent was obtained from all study participants in accordance with the Declaration of Helsinki. Tumors were used for single cell suspensions preparation or immunohistochemistry analysis on frozen samples.

PBMC isolation and tumor cell suspensions. Sections of the resected tumor area selected by the pathologists were placed in RPMI 1640 medium (Gibco) with antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, Invitrogen). Tissues were mechanically dilacerated in the same medium. Supernatant of dilacerated tumors were frozen for subsequent cytokine and chemokine quantification. Tissues were then digested for 45 min at 37°C in RPMI 1640 with antibiotics, 1mg/ml of collagenase IA and 20 µg/ml of DNase I (Sigma Aldrich). Digested samples were then filtered on a 70 µm cell strainer and re-suspended in RPMI 1640 with antibiotics and supplemented with 10% FCS (complete RPMI) for further analysis.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood samples of patients or healthy donors through Ficoll density gradient centrifugation (Eurobio).

Ex vivo stimulation. Tumor cell suspensions and PBMC were cultured at 1×10^6 cells/ml for 5 h in complete RPMI with different activators: 5 µg/ml R848 (Invivogen) and 30 µg/ml PolyI:C (Invivogen). GolgiPlug (BD Biosciences) was added after 1 h. At the end of the activation, harvested cells were stained, fixed, permeabilized and stained for intracellular cytokines. Tumor cell suspensions were also activated for 48 h with 100 ng/ml IFN- λ 1 (R&D) or 100 ng/ml IFN- β (R&D) for cytokine quantification by ECLIA.

To preserve the cyto-architecture, 25 µm sections of fresh tumors were also cut using a vibratome. These sections were incubated for 48 h with 100 µg/ml PolyI:C (Invivogen) and supernatants were collected for cytokine quantification by ECLIA.

Cell staining and flow cytometry. Single cell suspensions were stained using antibodies listed in Table S1. Dying cells were excluded by Zombie Violet/Yellow staining (Biolegend) depending on the experiment. Lymphocytes, NK cells, neutrophils and other myeloid cells (monocytes, macrophages and inflammatory monocytes) were also excluded using respectively anti-CD3/56/15/14 antibodies in the lineage. Intracellular cytokine or DC-LAMP staining were performed after fixation and

395 permeabilization (Fix/Perm buffers, eBioscience). All flow cytometry acquisitions were done on a
396 LSRT Fortessa Cell Analyzer (BD Biosciences) and data were processed in FlowJo 10.4 (Tristar). Some
397 flow cytometry data were visualized using viSNE (Cytobank)⁵⁵, a dimensionality reduction method
398 which uses the Barnes-Hut acceleration of the t-SNE algorithm. viSNE plots were generated
399 separately for each patient.

400 **Cytokine and chemokine quantification by MSD assay.** The following cytokines and chemokines
401 were quantified in supernatants of dilacerated tumors (SNDil) or supernatants of activated thick tumor
402 sections, using ECLIA (electrochemiluminescence assay) and MSD technology according to the U-
403 plex protocol (MSD): IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12/IL-23p40, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23p19, IL-33,
404 IFN- α 2a, IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , CX3CL1, TNF- α , CXCL9, CXCL10, CXCL11, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF-
405 β 3.

406 **Immunohistochemistry on frozen tumors.** After reception, tumors were embedded in Tissue-Tek
407 O.C.T. compound (Sakura) and frozen at -80°C. 6 μ m thick sections were cut. After fixation for 20 min
408 in acetone (VWR), tissues were incubated for 15 min with peroxidase blocking reagent (Dako) and
409 stained with an anti-CLEC9A antibody (sheep polyclonal, R&D Systems) followed by the Vectastain
410 ABC Elite kit (Vector). Ab visualization was performed with a DAB detection kit (Dako) and the slides
411 were finally counterstained with Mayer's hematoxylin (Dako). An isotype-matched control IgG was
412 used at the same concentration as a negative control. Slides were analyzed on an upright Eclipse Ni-
413 E microscope (Nikon).

414 **Chromogenic *in situ* hybridization (CISH) on tumor FFPE sections.** 4 μ m FFPE tumor tissue
415 sections were cut, re-hydrated and deparaffinized. Fixation, protease pretreatment, probe
416 hybridization (Hs-CLEC9A-C2 probe/511551-C2 in combination with Hs-CD8A-C1 probe, pre-
417 amplification and detection steps were then carried out according to the RNAscope 2.5 HD duplex
418 detection kit user manual (ACD).

419 **Survival analysis.** The clinical outcome data and RSEM normalized expression datasets from The
420 Cancer Genome Atlas (TCGA) were downloaded from the cBioPortal for breast cancer patients
421 (provisional data, February 2018, http://www.cbioportal.org/data_sets.jsp). MCPcounter²⁷ was used
422 to estimate the relative abundance of several population of immune cells. This algorithm originally
423 allows the quantification of the absolute abundance of eight immune populations and two stromal cell
424 populations in heterogeneous tissues from transcriptomic data. Here, in addition to the original cell
425 population signatures defined by Becht *et al*, the following gene signatures were used to run
426 MCPcounter: cDC1 (*CLEC9A*, *XCR1*), cDC2 (*CLEC10A*, *CD1E*), pDCs (*LILRA4*, *CLEC4C*), LC
427 (*CD207*, *CD1A*). Overall survival analyses and plots were performed with R, using the packages
428 *survival* and *survminer*. For each immune population, we compared patients displaying the top 50%
429 highest level of infiltration by the given immune cell type and those with the 50 % lowest level. The

430 log-rank test was used to determine statistical significance for overall survival between this two groups
431 of patients.

432 Analysis of progression-free survival was performed for the top 50% and bottom 50% *IL29* gene
433 expression ranked values using the Kaplan Meier plotter software (<http://kmplot.com>)⁵⁶.

434 **Gene expression analysis.** RNAseq data for 14 types of solid human cancers and matched normal
435 samples were downloaded using the *TCGABiolinks* R-package (open access data from the TCGA
436 data portal, <https://gdc.cancer.gov>, version March 2018) with the harmonized option (data aligned to
437 hg38). For each cancer type, HT-Seq raw read counts were normalized using the *DESeq2* R-package
438 and log2 transformed. Wilcoxon tests were performed to assess whether *IL29* was differentially
439 expressed between tumor and normal samples.

440 **Heatmaps and hierarchical clusterings.** Heatmaps of Log2-normalized expression values of
441 selected genes were performed using the Morpheus website from the Broad Institute
442 (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). Hierarchical clusterings were performed using the
443 One-Pearson correlation as a metric and the complete linkage as a clustering method for genes.

444 **Gene set enrichment analysis.** High-throughput gene set enrichment analyses were performed
445 using the BubbleMap module of BubbleGUM²⁸. BubbleMap analysis was performed with 1,000 gene
446 set-based permutations, and with “Signal2noise” as a metric for ranking the genes. The results are
447 displayed as a bubble map, where each bubble is a GSEA result and summarizes the information
448 from the corresponding enrichment plot. The color of the Bubble corresponds to the tumors from the
449 pairwise comparison in which the gene set is enriched. The bubble area is proportional to the GSEA
450 normalized enrichment score. The intensity of the color corresponds to the statistical significance of
451 the enrichment, derived by computing the multiple testing-adjusted permutation-based P value using
452 the Benjamini–Yekutieli correction. Enrichments with a statistical significance above 0.25 are
453 represented by empty circles. Public gene sets of the Hallmark collection (v6.1) were downloaded
454 from MSigDB⁵⁷ and homemade gene sets are detailed in Table S2.

455 **Statistics.** Mann-Whitney tests for paired samples and Wilcoxon tests for unpaired samples were
456 performed for the comparison of two groups. To compare more groups, Kruskal-Wallis tests were
457 performed for unpaired samples and Friedman tests for paired samples. All graphs show each sample
458 and the median value. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

459

460

461

462

463 **Acknowledgements**

464 This work was supported by funding from INSERM, INCA (PLBIO INCa_4508), ANRS, ARC, Ligue
465 contre le Cancer (Régionale Auvergne-Rhône-Alpes et Saône-et-Loire, Comité de la Savoie); We
466 would like to thank our financial supports: the Région Auvergne-Rhône-Alpes and the ARC
467 Foundation for M. Hubert, SIRIC project (LYRIC, grant no. INCa_4664) and the FP7 European
468 TumAdoR project (grant no. 602200) for C. Rodriguez and C. Caux, the LABEX DEVweCAN (ANR-
469 10-LABX-0061) of the University of Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” organized by
470 the French National Research Agency (ANR), for V. Ollion, A.C. Doffin, N. Bendriss-Vermare, C. Caux
471 and J. Valladeau-Guilemond.

472 We also wish to thank the staff of the core facilities at the Cancer Research Center of Lyon (CRCL)
473 for their technical assistance and the BRC (Biological Resources Centre) of the CLB (Centre Léon
474 Bérard) for providing human samples. We are very grateful to J. Berthet for her help in *in situ* analysis.
475 We thank S. Leon and the *Ex Vivo* platform (Department of Translational Research and Innovation
476 of the CLB, Lyon, France) for their precious help on thick tumor slice analysis. We are grateful to I.
477 Durand for her assistance for flow cytometry and T. Andrieu for viSNE analyses. We would also like
478 to thank Dr. B. Manship for critical reading of the manuscript.

479

480 **Author contributions**

481 M.H. designed and performed experiments, analyzed results and wrote the manuscript. C.Co., V.O.,
482 H.L.M., N.R., C.R., C.S., B.D. and A.C.D. performed experiments and analyzed results. T.P.V.M. and
483 J.K. performed bioinformatics and wrote the manuscript; I.T. and O.T. contributed to clinical project
484 management, pathology review and provided clinical samples. M.D., N.B.V. and C.Ca. provided
485 strategic advice and revised the manuscript. J.V.G. designed experiments, supervised the research
486 and wrote the manuscript.

487

488 **Competing interests**

489 The authors declare no competing interests.

490

491

492

493

References

1. Hildner, K. *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* **322**, 1097–100 (2008).
2. Broz, M. *et al.* Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* **26**, 638–652 (2014).
3. Fuertes, M. B., Woo, S.-R. R., Burnett, B., Fu, Y.-X. X. & Gajewski, T. F. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* **34**, 67–73 (2013).
4. Böttcher, JP, Bonavita, E, Chakravarty, P & Cell, B.-H. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* (2018). at <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867418300394>>
5. Spranger, S., Bao, R. & Gajewski, T. F. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **523**, 231–5 (2015).
6. Spranger, S., Dai, D., Horton, B. & Gajewski, T. F. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* **31**, 711–723.e4 (2017).
7. Salmon, H. *et al.* Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* **44**, 924–38 (2016).
8. Sánchez-Paulete, A. *et al.* Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells. *Cancer Discov* **6**, 71–79 (2016).
9. Laoui, D. *et al.* The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun* **7**, 13720 (2016).
10. Lavin, Y. *et al.* Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* **169**, 750–765.e17 (2017).
11. Barry, K. C. *et al.* A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* (2018). doi:10.1038/s41591-018-0085-8
12. Michea, P. *et al.* Adjustment of dendritic cells to the breast-cancer microenvironment is subset specific. *Nat. Immunol.* **19**, 885–897 (2018).
13. Deauvieu, F. *et al.* Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *Int. J. Cancer* **136**, 1085–94 (2015).
14. Lauterbach, H. *et al.* Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J. Exp. Med.* **207**, 2703–17 (2010).
15. Balan, S. *et al.* Human XCR1+ dendritic cells derived in vitro from CD34+ progenitors closely resemble blood dendritic cells, including their adjuvant responsiveness, contrary to monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **193**, 1622–35 (2014).
16. Rönnblom, L & opinion in rheumatology, E.-M. The interferon signature in autoimmune diseases. *Current opinion in rheumatology* (2013). at <https://journals.lww.com/co-rheumatology/Abstract/2013/03000/The_interferon_signature_in_autoimmune_diseases.16.aspx>
17. Hermant, P & of innate immunity, M.-T. Interferon- λ in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *Journal of innate immunity* (2014). at <<https://www.karger.com/Article/Fulltext/360084>>
18. Lasfar, A. *et al.* Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer research* **66**, 4468–77 (2006).
19. Sato, A., Ohtsuki, M., Hata, M., Kobayashi, E. & Murakami, T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, 7686–94 (2006).
20. Numasaki, M. *et al.* IL-28 elicits antitumor responses against murine fibrosarcoma. *J Immunol Baltim Md 1950* **178**, 5086–98 (2007).

- 543 21. Abushahba, W. *et al.* Antitumor activity of type I and type III interferons in BNL hepatoma
544 model. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **59**, 1059–71 (2010).
- 545 22. Dumoutier, L. *et al.* Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and
546 antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling.
547 *The Journal of biological chemistry* **279**, 32269–74 (2004).
- 548 23. Meager, A., Visvalingam, K., Dilger, P., Bryan, D. & Wadhwa, M. Biological activity of
549 interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* **31**, 109–18 (2005).
- 550 24. Li, W., Lewis-Antes, A., Huang, J., Balan, M. & Kotenko, S. V. Regulation of apoptosis by
551 type III interferons. *Cell Prolif.* **41**, 960–979 (2008).
- 552 25. Li, Q. *et al.* Interferon-lambda induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma
553 cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents. *Eur. J. Cancer* **46**,
554 180–90 (2010).
- 555 26. Guillems, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature
556 based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 571–8 (2014).
- 557 27. Becht, E. *et al.* Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and
558 stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* **17**, 218 (2016).
- 559 28. Spinelli, L., Carpentier, S., Montañana Sanchis, F., Dalod, M. & Vu Manh, T.-P. P.
560 BubbleGUM: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive
561 visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Genomics* **16**, 814 (2015).
- 562 29. Vu Manh, T.-P. P. *et al.* Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several
563 Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics. *Front Immunol* **6**, 299
564 (2015).
- 565 30. Sisirak, V. *et al.* Impaired IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Favors
566 Regulatory T-cell Expansion That May Contribute to Breast Cancer Progression. *Cancer Res* **72**,
567 5188–5197 (2012).
- 568 31. Jongbloed, S. *et al.* Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique
569 myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of experimental medicine*
570 **207**, 1247–60 (2010).
- 571 32. Sancho, D. *et al.* Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to
572 immunity. *Nature* **458**, 899–903 (2009).
- 573 33. Crozat, K. *et al.* The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian
574 cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207**, 1283–92 (2010).
- 575 34. Dorner, B. *et al.* Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting
576 dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* **31**, 823–33 (2009).
- 577 35. Bachem, A. *et al.* Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human
578 CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *The Journal of experimental*
579 *medicine* **207**, 1273–81 (2010).
- 580 36. Ardouin, L. *et al.* Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize
581 Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity* **45**,
582 305–18 (2016).
- 583 37. Stanton, SE, Adams, S & oncology, D.-M. Variation in the incidence and magnitude of
584 tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA oncology*
585 (2016). at <<https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2529697>>
- 586 38. Lewko, B., Zóltowska, A., Stepiński, J., Roszkiewicz, A. & Moszkowska, G. Dendritic and
587 cancer cells in the breast tumors--an immunohistochemical study: short communication. *Med. Sci.*
588 *Monit.* **6**, 892–5 (2000).
- 589 39. Lespagnard, L. *et al.* Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a
590 study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int. J.*
591 *Cancer* **84**, 309–14 (1999).

40. Faget, J. *et al.* ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4⁺ T cells. *Cancer research* **72**, 6130–41 (2012).
41. Howie, D. *et al.* Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI Insight* **2**, e89160 (2017).
42. Terry, S. *et al.* New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol Oncol* **11**, 824–846 (2017).
43. Zhou, Z. *et al.* Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.* **81**, 7749–58 (2007).
44. Simmons, D. P. *et al.* Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *J. Immunol.* **188**, 3116–26 (2012).
45. Spadaro, F. *et al.* IFN- α enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood* **119**, 1407–17 (2012).
46. Lauterbach, Bathke & Gilles. Mouse CD8 α ⁺ DCs and human BDCA3⁺ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly IC. (2010).
47. Tokunaga, R. *et al.* CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **63**, 40–47 (2018).
48. Böttcher, J. P. *et al.* Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nat Commun* **6**, 8306 (2015).
49. Galani, I. E. *et al.* Interferon- λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. *Immunity* **46**, 875–890.e6 (2017).
50. Papadopoulos, E. J. *et al.* Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2551–9 (1999).
51. Yin, Z. *et al.* Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **189**, 2735–45 (2012).
52. Perrot, I. *et al.* TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *J. Immunol.* **185**, 2080–8 (2010).
53. Gautier, G. *et al.* A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **201**, 1435–46 (2005).
54. Labidi-Galy, S. *et al.* Quantitative and Functional Alterations of Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Immune Tolerance in Ovarian Cancer. *Cancer Res* **71**, 5423–5434 (2011).
55. Amir, Davis, Tadmor & Nature ..., S. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. (2013).
56. Szász, AM, Lánczky, A, Nagy, Á., Förster, S & Oncotarget, H.-K. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget* (2016). at <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5226511/>>
57. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15545–50 (2005).

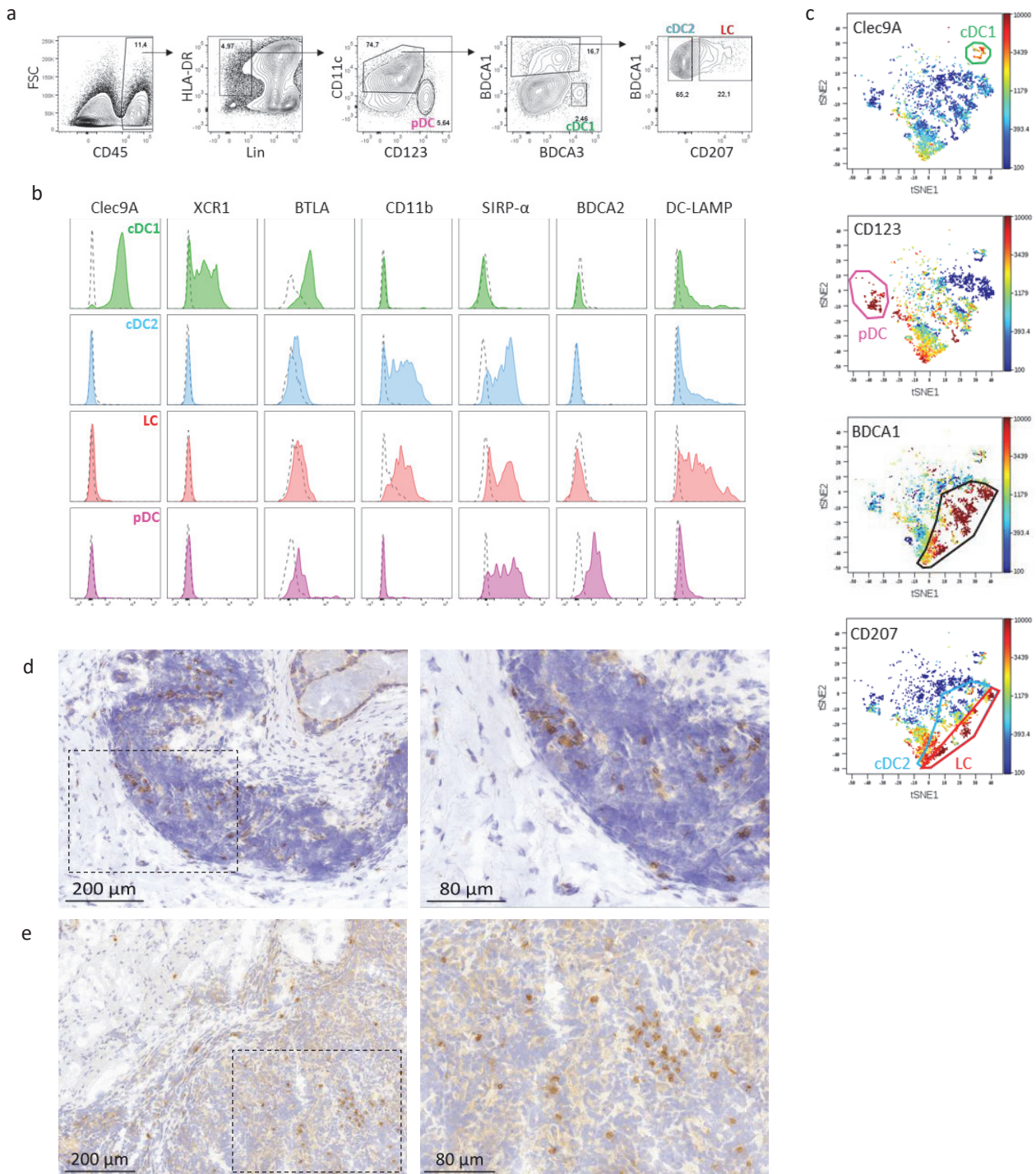


Figure 1 | Four distinct DC subsets including cDC1 infiltrate human breast and ovarian tumors. (a) FACS gating strategy allowing the identification of four TA-DC subsets among viable CD45⁺ HLA-DR⁺ Lin⁻ (CD3/14/15/19/56) populations, namely: pDC (CD11c⁻ CD123⁺), cDC1 (CD11c⁺ BDCA1⁻ BDCA3^{hi}), cDC2 (CD11c⁺ BDCA1⁺ BDCA3^{-/low} CD207⁻) and LC (CD11c⁺ BDCA1⁺ BDCA3^{-/low} CD207^{hi}). Representative results of n=20 breast and ovarian tumors. **(b)** Phenotypic characterization of TA-DC subsets for indicated markers by FACS. Color histogram = indicated marker, dotted line = isotype control. Representative results of n $\geq$ 4 breast and ovarian tumors. **(c)** viSNE analysis of viable CD45⁺ HLA-DR⁺ Lin⁻ for the expression of CD11c, CD123, BDCA1, BDCA3, CD207, CLEC9A, CD11b, SIRP- α and BTLA markers, colored according to the relative expression of markers (top), with populations indicated. Representative results of n=4 breast and ovarian tumors. **(d,e)** Immunohistological analysis of CLEC9A-expressing cDC1 in frozen section of breast **(d)** and ovarian **(e)** tumors.

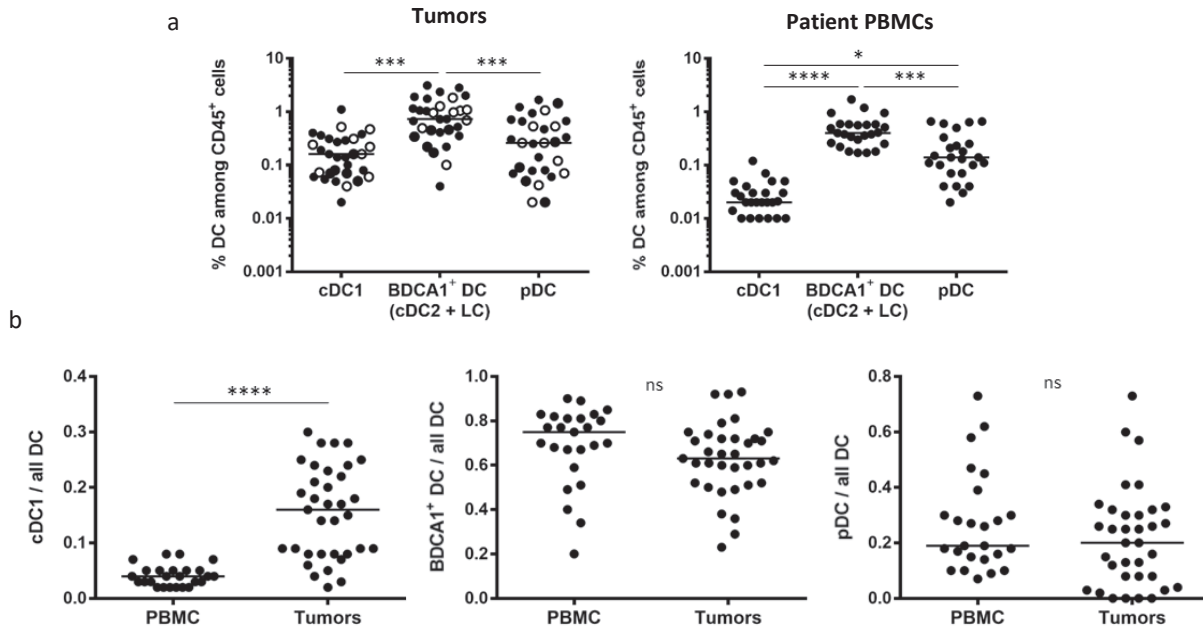


Figure 2 | cDC1 are the only DC subset enriched in breast tumors compared with patient PBMCs. (a) Proportion of each TA-DC subset among viable CD45⁺ cells in n=24 breast tumors (black circle, left panel) and n=9 ovarian tumors (white circle, left panel) and in n=25 patient PBMCs (right panel). Statistical analysis by Friedman test. **(b)** Ratio of one DC subset percentage on of all DCs among viable CD45⁺ cells. Statistical analysis: Mann-Whitney test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

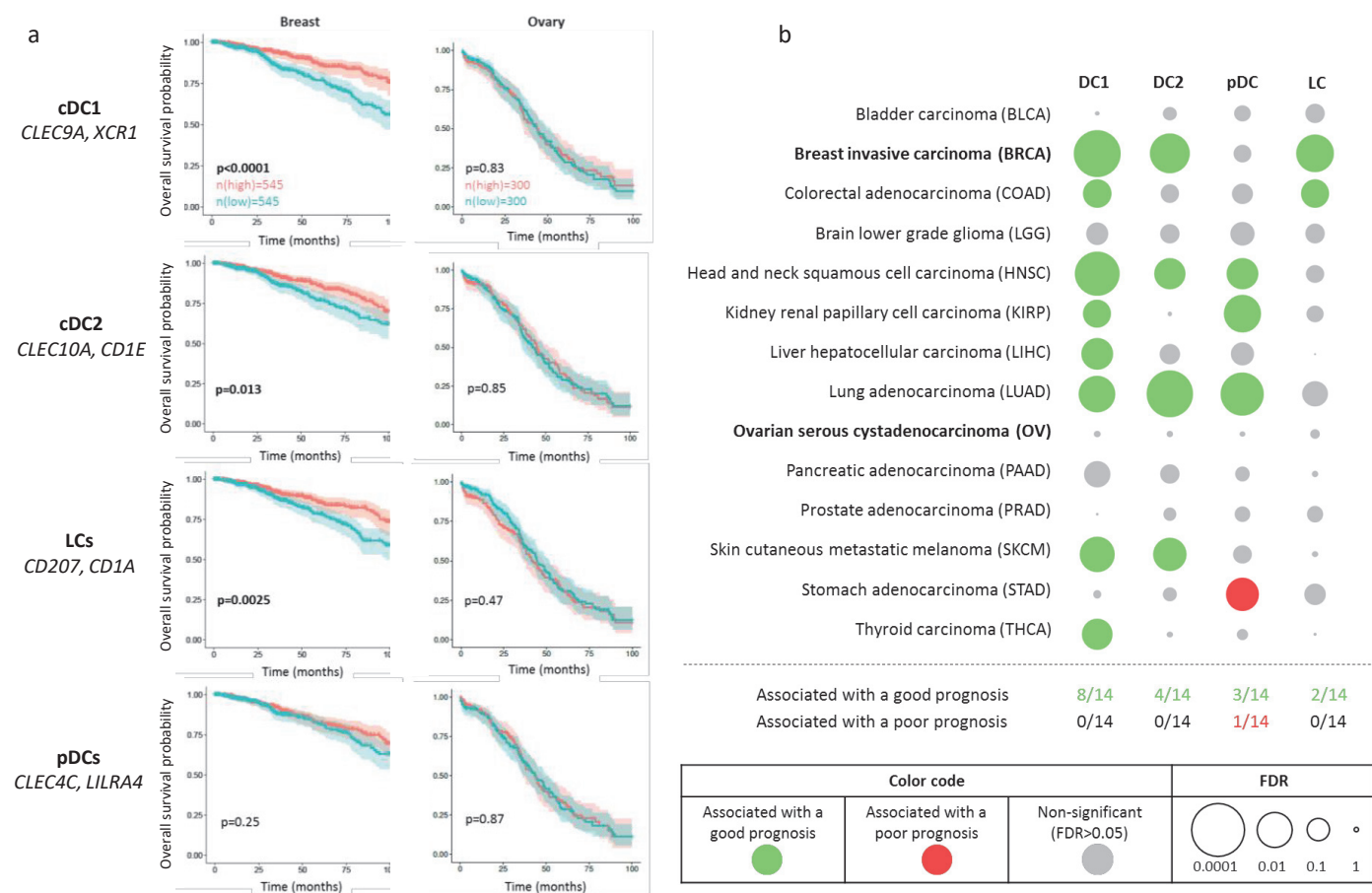


Figure 3 | TA-cDC1 are strongly associated with an increased overall survival in many human cancers. (a) Kaplan-Meier analysis of the overall survival of patients stratified to the median for the expression score of each DC subset infiltrating breast and ovarian tumors (calculated with the MCP-counter algorithm) using TCGA data sets. Statistical analysis: log rank test. **(b)** Summary of the p value associated with the log rank test to evaluate the prognostic impact of each DC subset in 14 human TCGA cancer data sets.

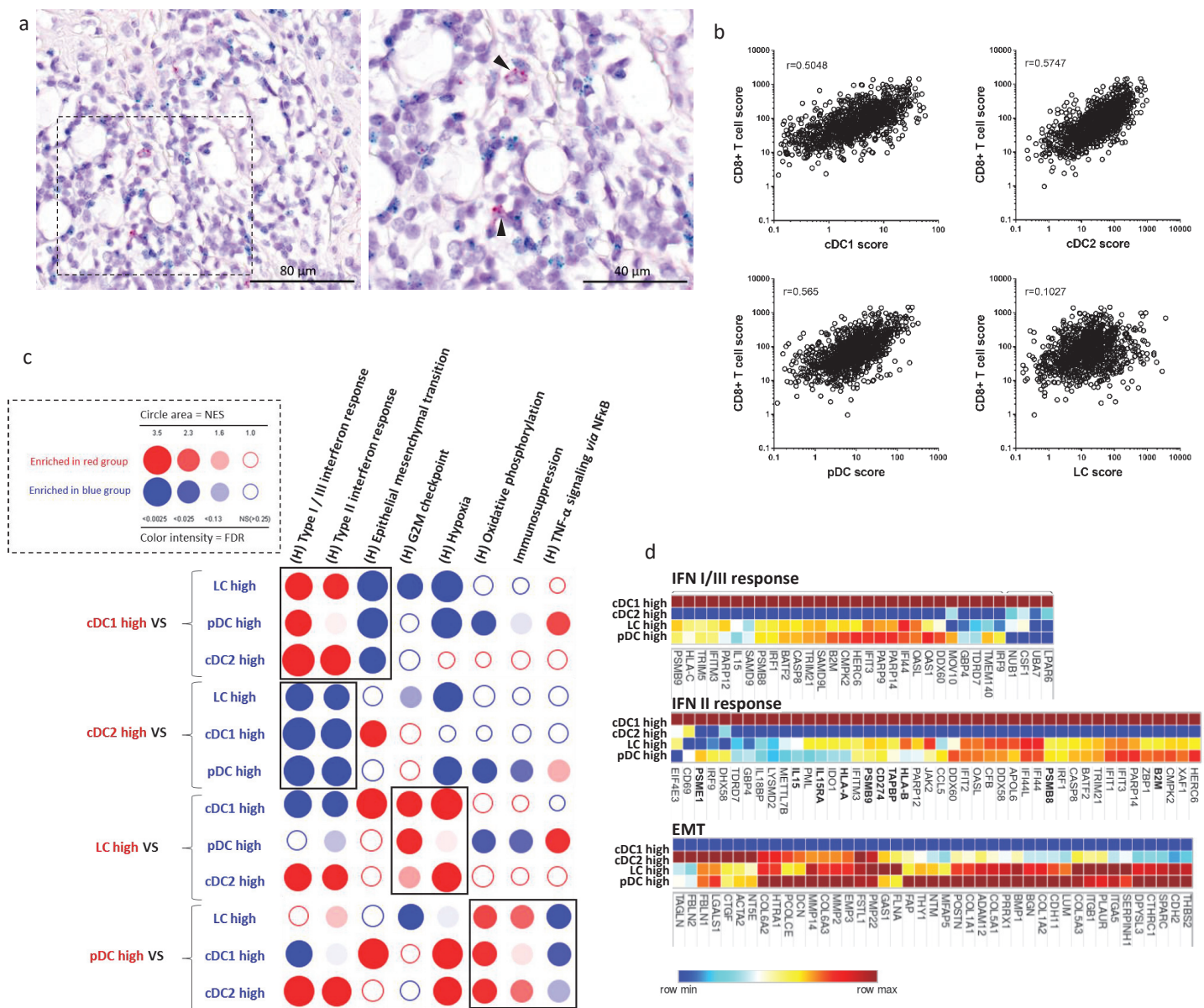


Figure 4 | IFN-I/III signature enrichment is a specific feature of cDC1-infiltrated tumors. (a) Double detection of *CLEC9A* (pink) and *CD8A* (blue) RNA by colorimetric *in situ* hybridization (RNAscope) in FFPE sections of breast tumors. Black arrows = close contacts between *CLEC9A* mRNA positive cDC1 and *CD8A* mRNA positive T cells. **(b)** Scatterplots showing the Spearman correlation between CD8⁺ T cell and each TA-DC subset scores (calculated with the MCP-counter algorithm) in n=1100 breast tumors (TCGA data sets). **(c)** High-throughput GSEA analysis by BubbleGUM in breast tumors enriched in only one DC subsets (TCGA data set, n=48 for cDC1, n=18 for cDC2, n=95 for LCs and n=67 for pDCs). Bubble enrichment patterns (black boxes) highlighted by the selection of gene sets (from Hallmark collection (H) or homemade gene sets) and pairwise comparisons of interest. **(d)** Heatmaps illustrating genes extracted from the overlap of the GSEA leading edges identified by each pairwise comparison between breast tumors enriched only in cDC1 and those enriched only in one of the 3 other DC subsets. Gene expression values were averaged across tumors enriched in only one DC subset and then log₂-transformed.

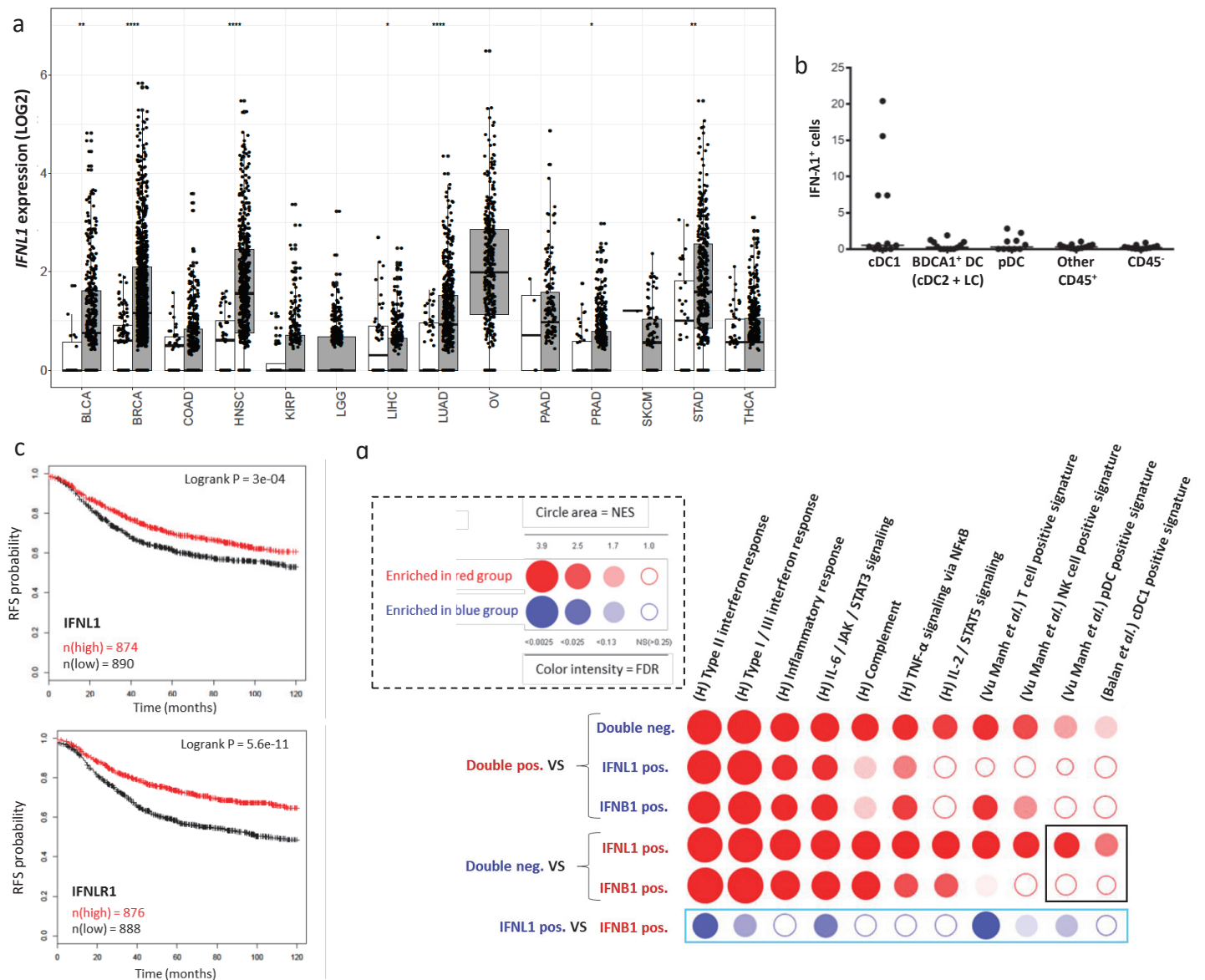


Figure 5 | IFN-λ1 is specifically produced by cDC1 in breast tumors and has a favorable prognostic impact on the relapse-free survival. (a) Differential expression analysis of the *IFNL1* gene in multiple transcriptomic TCGA data sets between the tumor (gray boxes) and the normal adjacent tissue (white boxes). Statistical analysis: Wilcoxon test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 **(b)** Ex vivo intracellular IFN-λ1 FACS staining in n=12 fresh breast tumor suspensions without any stimulation. **(c)** Kaplan-Meier analysis of the relapse-free survival of patients stratified to the median for the expression of *IFNL1* and *IFNL1R1* genes (KMplot transcriptomic data sets). Statistical analysis by log rank test. **(d)** High-throughput GSEA analysis by BubbleGUM in breast tumor groups classified according to their *IFNL1* and *IFNB1* expression (TCGA data set). Double pos. = *IFNL1/IFNB1* positive tumors. Double neg. = *IFNL1/IFNB1* negative tumors. Bubble enrichment patterns (black boxes) revealed by the selection of gene sets (from Hallmark collection (H) or homemade gene sets) and pairwise comparisons of interest.

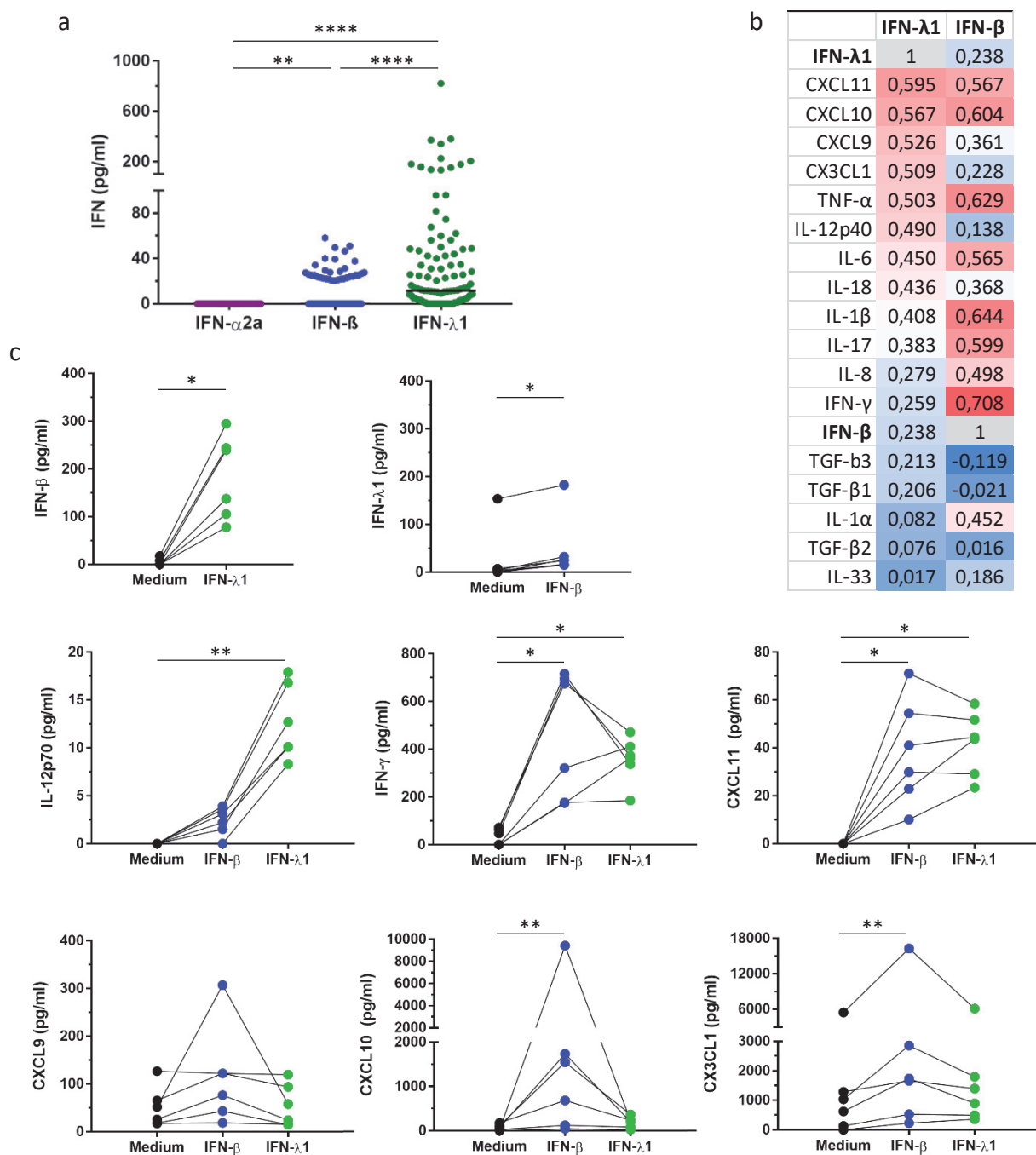


Figure 6 | IFN-λ1 is the predominant IFN subtype in human breast tumors and is correlated with a Th1-related chemokine/cytokine microenvironment. (a) IFN quantification by ECLIA multiplex assay in n=107 supernatants of human fresh dilacerated breast tumors. Statistical analysis by Friedman test. **(b)** Table of Spearman correlation factors between IFN-λ1 or IFN-β and the other cytokines and chemokines quantified in n=107 supernatants of human dilacerated breast tumors by ECLIA multiplex assay. **(c)** Multiplex quantification by ECLIA assay of cytokines and chemokines in the supernatants of n=6 tumor cell suspensions treated or not with IFN-λ1 or IFN-β for 48 h. Statistical analysis: Wilcoxon test for IFN-λ1 and IFN-β, Friedman test for the others, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

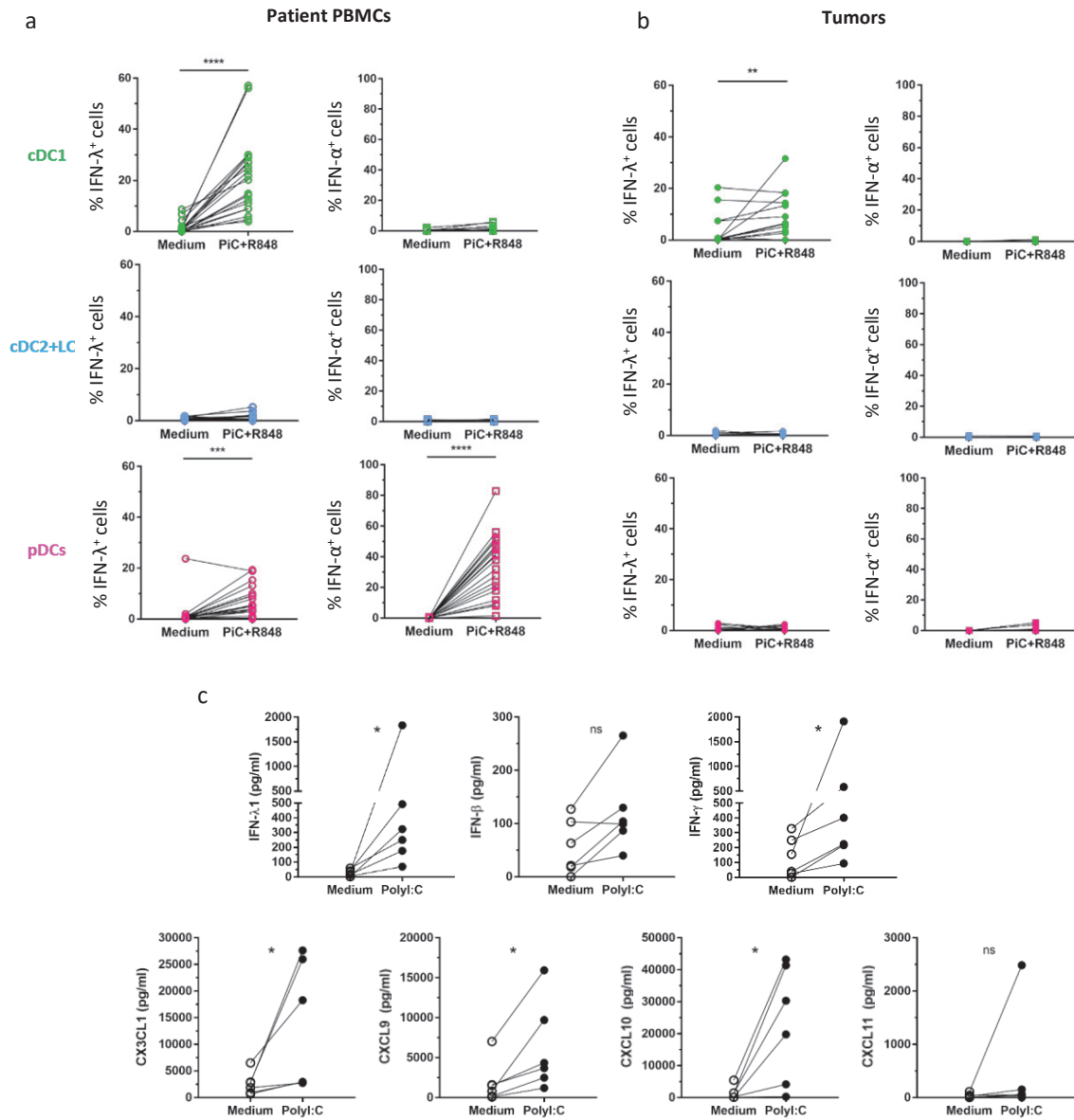
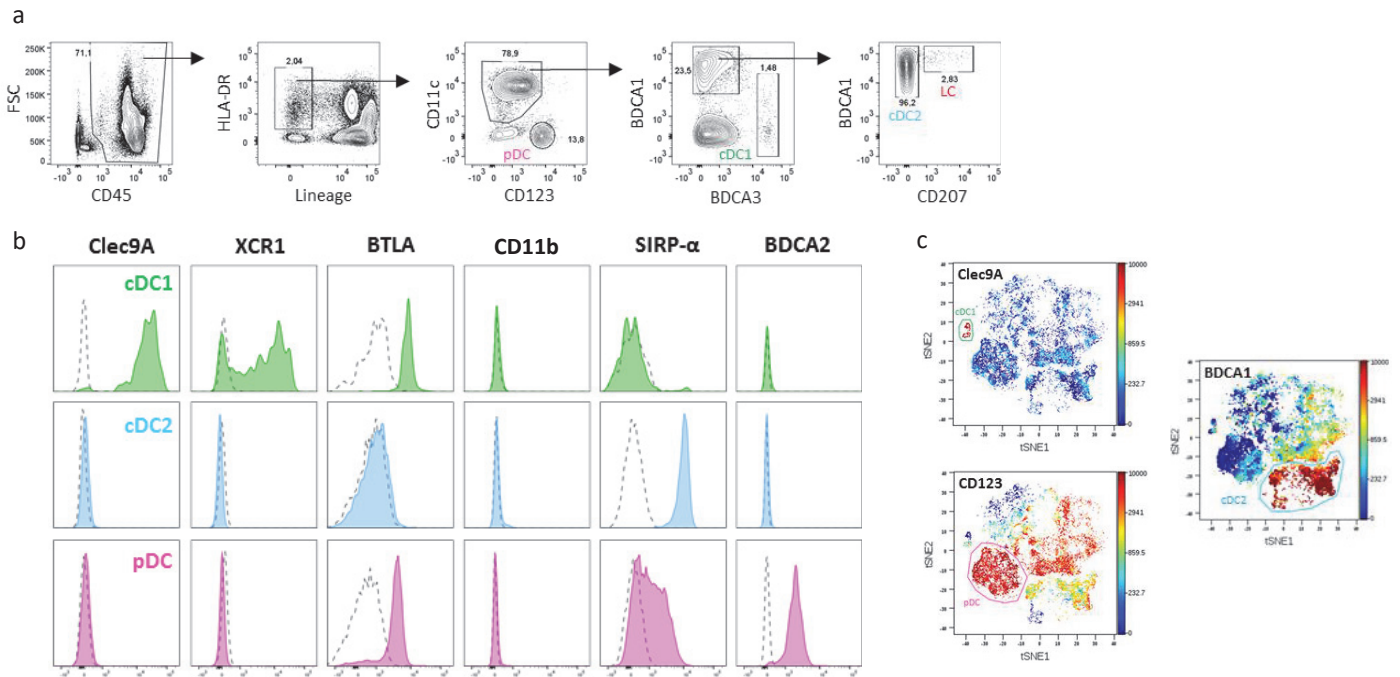
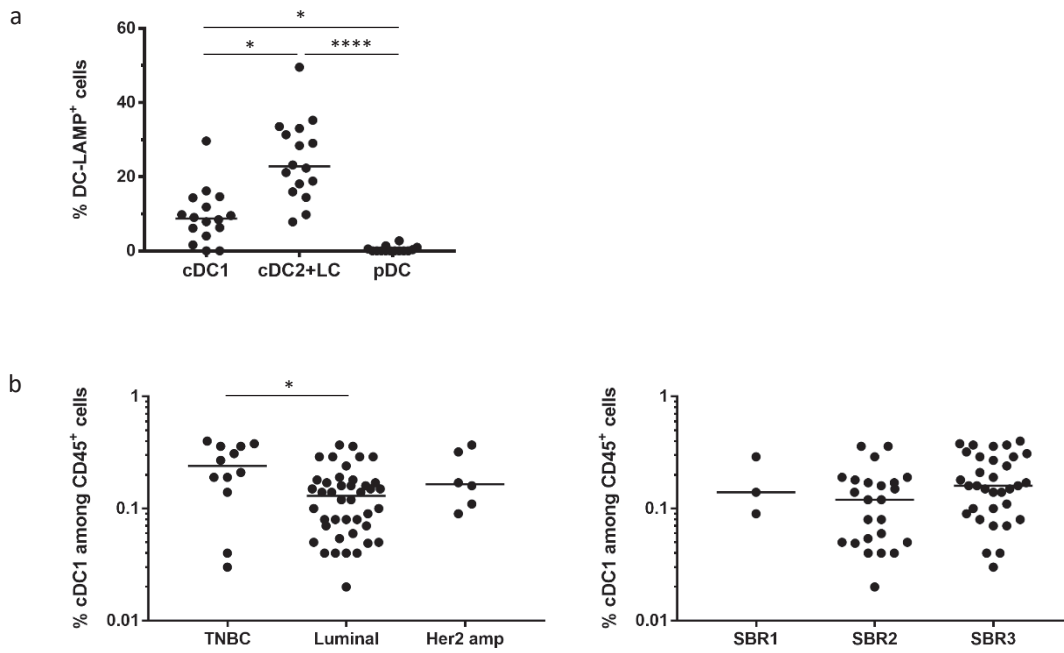


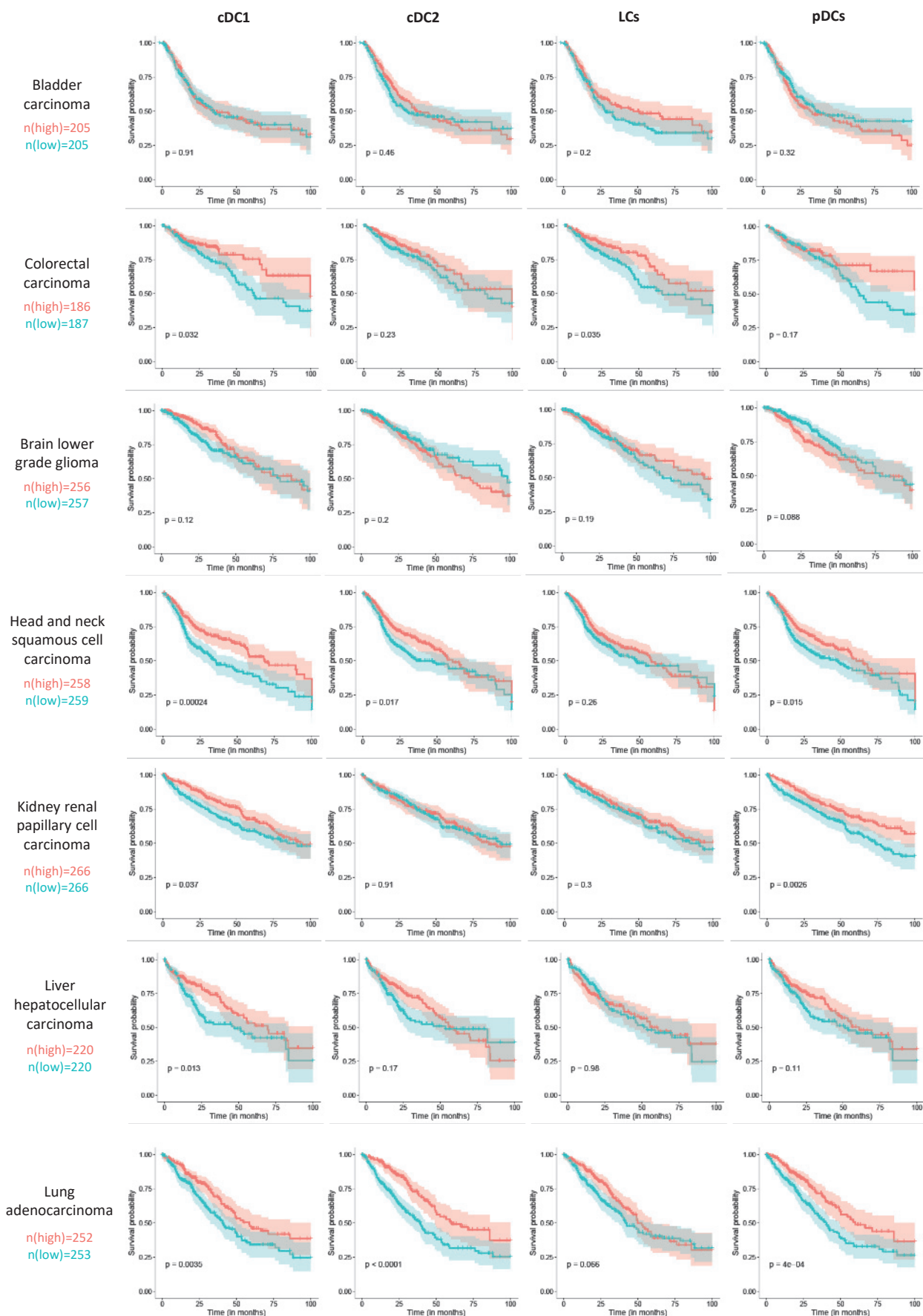
Figure 7 | TLR3-L stimulation induces IFN-λ1 production by TA-cDC1 and cytokines and chemokines reflecting recruitment and activation of cytotoxic cells. *Ex vivo* IFN-λ1 and IFN-α FACS staining in n=20 patients' PBMC (a) and n=12 fresh breast tumor suspensions (b) treated or not with TLR-L (Poly(I:C) + R848) for 5h. Statistical analysis: Wilcoxon test. (c) Multiplex quantification by ECLIA assay of cytokines and chemokines in the supernatants of n=6 fresh tumor thick sections treated or not with TLR3-L (Poly(I:C)) for 48h. Statistical analysis: Wilcoxon test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001



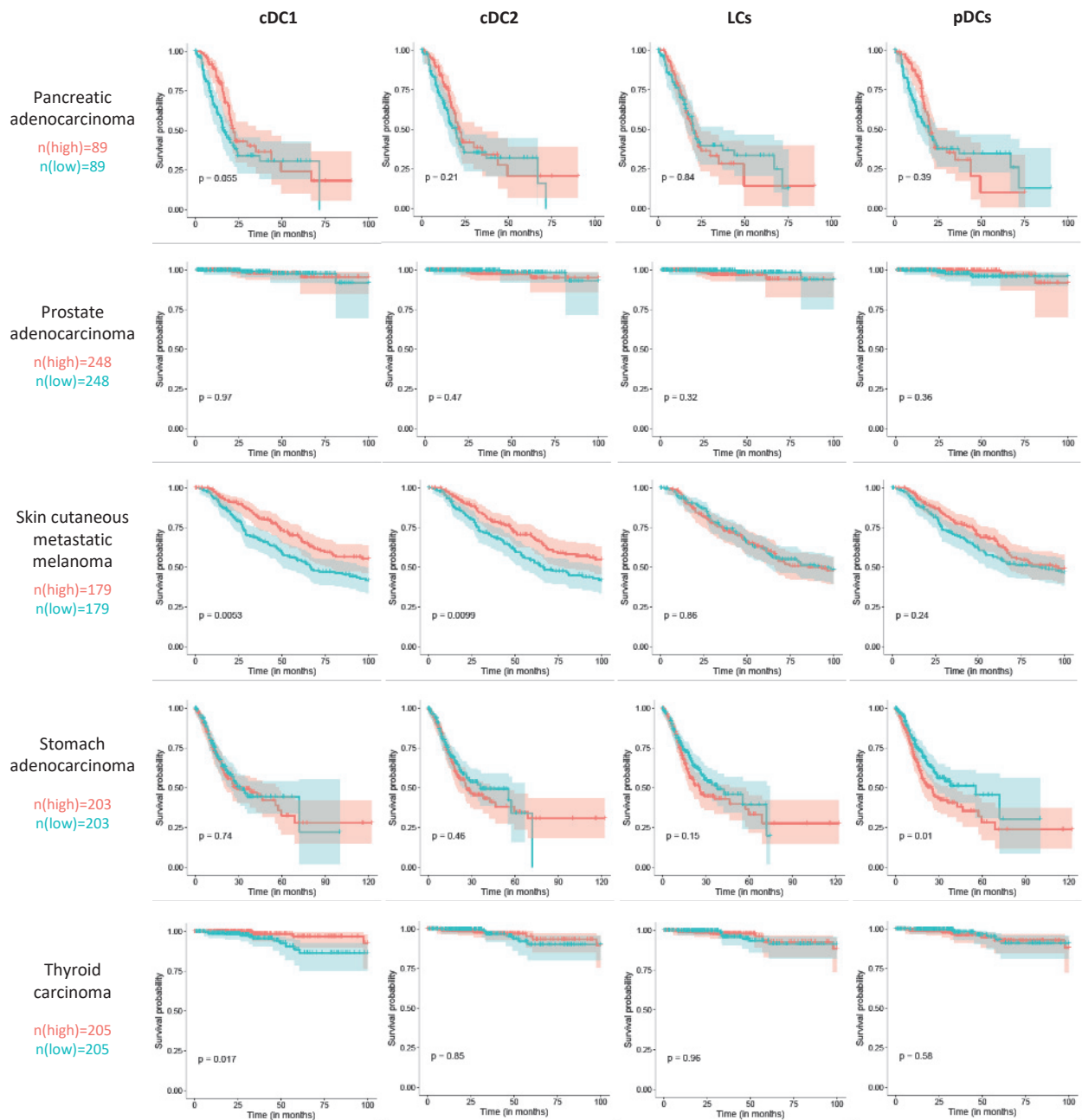
Supplementary Figure 1 _ (a) FACS gating strategy allowing the identification of four DC subsets among viable CD45⁺ HLA-DR⁺ Lin⁻ (CD3/14/15/19/56) populations in patient PBMCs: pDC (CD11c⁺ CD123⁺), cDC1 (CD11c⁺ BDCA1⁺ BDCA3^{hi}), cDC2 (CD11c⁺ BDCA1⁺ BDCA3^{-/low} CD207⁻) and LC (CD11c⁺ BDCA1⁺ BDCA3^{-/low} CD207^{hi}). Representative results of n=10 independent patients. **(b)** Phenotypic characterization of TA-DC subsets for indicated markers by FACS. Color histogram = indicated marker, dotted line = isotype control. Representative results of n≥4 independent experiments. **(c)** viSNE analysis of viable CD45⁺ HLA-DR⁺ Lin⁻ for the expression of CD11c, CD123, BDCA1, BDCA3, CD207, Clec9A, CD11b, SIRP-α and BTLA markers, colored by relative expression of FACS markers, with populations indicated (top). Representative results of n=4 independent experiments.



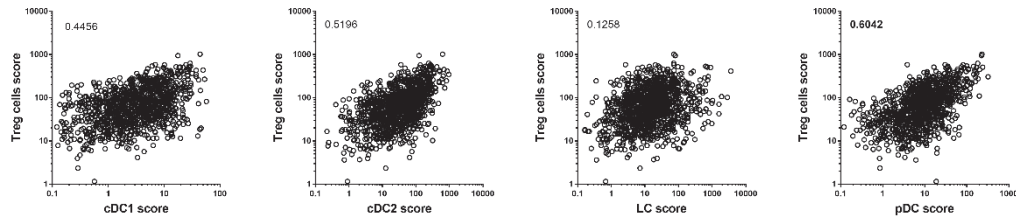
Supplementary Figure 2 _ (a) Proportion of DC-LAMP⁺ cells among all TA-DC subset analyzed by FACS. Statistical analysis: Kruskal-Wallis test. **(b)** Proportion of cDC1 among viable CD45⁺ cells across different types (TNBC, luminal and Her2 amplified) and grade (SBR1, 2 ,3) of n=61 breast tumors. Statistical analysis: Kruskal-Wallis test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001



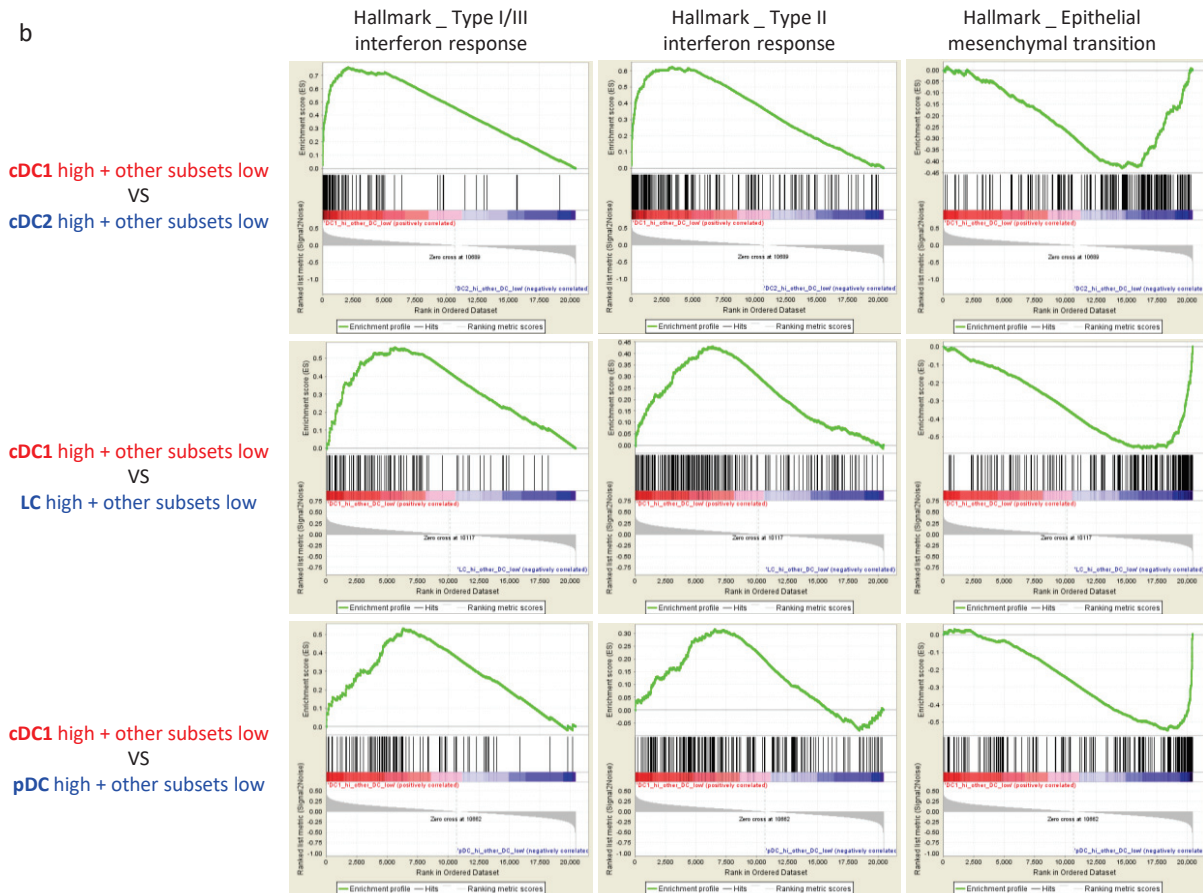
Supplementary Figure 3 _ Kaplan-Meier analysis of the overall survival of patients stratified according to the median expression score of each DC subset infiltrating in 12 human tumors (calculated with MCP-counter algorithm) using TCGA data sets. Statistical analysis: log rank test.



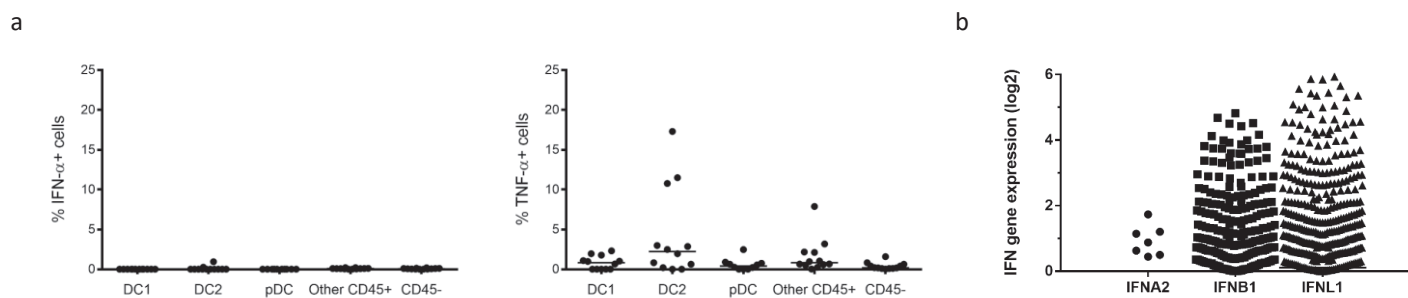
a



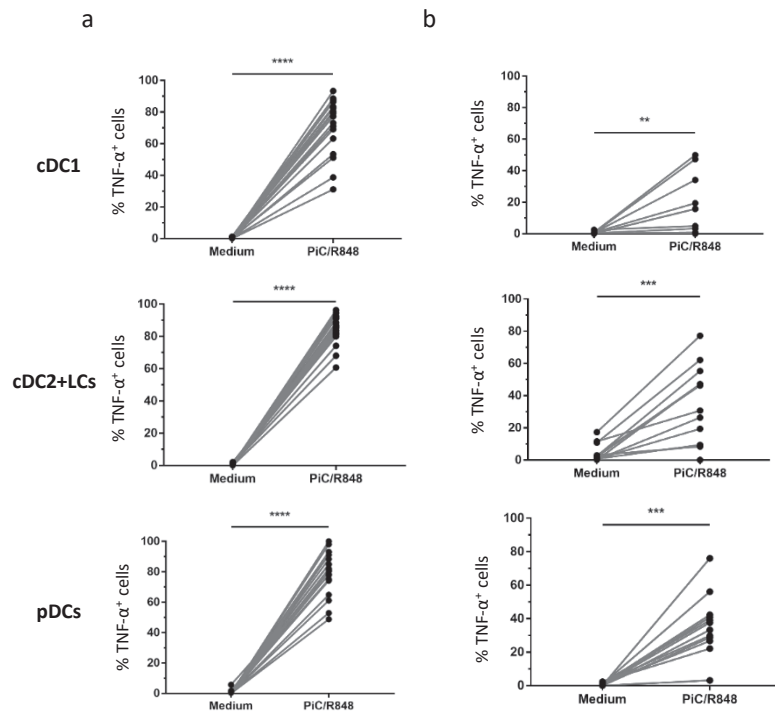
b



Supplementary Figure 4 _ (a) Scatterplots showing the Spearman correlation between Tregs and each TA-DC subset scores (calculated with MCP-counter algorithm) in n=1100 breast tumors (TCGA data sets). **(b)** Enrichment plots of gene set enrichment analysis between “cDC1-enriched” breast tumors compared with “another DC subset-enriched” breast tumors.



Supplementary Figure 5 _ (a) *Ex vivo* intracellular IFN- α and TNF- α FACS staining of n=12 fresh breast tumor suspensions without any stimulation. **(b)** Expression analysis of *IFNA2*, *IFNB1* and *IFNL1* genes in breast tumors (TCGA data set). Only tumors in which the expression of these genes was >0 are plotted here.



Supplementary Figure 6 _ *Ex vivo* intracellular TNF- α FACS staining in n=20 patient PBMCs **(a)** and n=12 fresh breast tumor suspensions **(b)** treated or not with TLR-L (PolyI:C + R848) for 5 h. Statistical analysis: Wilcoxon test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

Table S1 _ FACS antibodies

Marker	Clone	Commercial supplier
CD45	J.33	Beckman Coulter
HLA-DR	L243	Biolegend
CD3	UCHT1	BD
CD14	MφP9	BD
CD15	HI98	BD
CD19	HIB19	BD
CD56	NCAM16.2	BD
CD11c	Bu15	Biolegend
CD123	7G3	BD
BDCA1	L161	Biolegend
BDCA3	AD5-14H12	Miltenyi
CD207	MB22-9F5	Miltenyi
Clec9A	8F9	Miltenyi
XCR1	S15046E	Biolegend
BTLA	J168-540	BD
CD11b	M1/70.15.11.5	Miltenyi
SIRPa	SE5A5	Biolegend
BDCA2	AC144	Miltenyi
DC-LAMP	104.G4	Beckman Coulter
IFN-λ	MAB15981	R&D
IFN-α	7N4-1	BD
TNF-α	MAB11	BD

**Table S2 _ Immunosuppression
gene signature**

ARG1	SIGLEC7
CD200	SIGLEC9
CD200R1	TIGIT
CD33	TNFRSF14
CD47	KIR2DL1
CEACAM1	KIR2DL3
COX2	KIR2DL4
CSF1R	KIR3DL1
ENTPD1	KIR3DL2
HLA-E	KIR3DL3
HLA-G	TGFB1
HMOX1	TGFB1I1
IDO1	TGFB2
IDO2	TGFB3
IL10	TGFBI
IL27	VEGFA
IL4I1	VEGFB
KLRC1	VEGFC
KLRD1	ADA
LAIR1	CAMP
LILRB1	PRKACA
LRRC32	SLC29A1
NT5E	ENPP1
PVR	ADK

DISCUSSION

Discussion & Perspectives

I. Infiltration des tumeurs de sein et d'ovaire par diverses populations de DC

1. Identification des populations de TA-DC

De par leur capacité d'activation des lymphocytes T CD8⁺ *via* la présentation croisée d'Ag et la synthèse d'IL-12p70, la présence de cDC1 a été évaluée dans de multiples modèles tumoraux et démontrée comme étant associée au contrôle du développement des tumeurs chez la souris. L'infiltration de tumeurs humaines par cette population de DC est également évaluée depuis quelques années. Plusieurs équipes ont mis en évidence la présence de cDC1 dans l'infiltrat immunitaire des cancers du poumon, du colon ou du mélanome métastatique (Broz et al., 2014; Laoui et al., 2016). En analysant par cytométrie en flux les suspensions cellulaires de nombreuses tumeurs, nos travaux ont apporté la preuve de l'infiltration des cancers du sein et de l'ovaire par 4 sous-populations de DC : cDC1, cDC2, pDC et LC. Ces TA-DC sont respectivement caractérisées par l'expression des marqueurs BDCA3, BDCA1, CD123 et CD207. De façon étonnante, la proportion de cDC1 parmi les cellules infiltrantes est largement augmentée par rapport au sang des patientes, alors qu'aucune différence significative n'a été notée pour les autres sous-populations. Cette donnée soulève de nombreuses questions quant au rôle des cDC1 dans l'immunité antitumorale. Il est important de noter ici que tous les prélèvements frais analysés par cytométrie proviennent de tumeurs primaires invasives. Il serait donc intéressant d'évaluer l'infiltration des tumeurs *in situ*, non-invasives et moins agressives [Encadré 2]. Cependant, il nous sera matériellement impossible d'utiliser du matériel frais de DCIS. Notre équipe met alors en place une stratégie d'identification des différentes sous-populations immunitaires, comprenant les DC, par immunofluorescence, immunohistochimie et hybridation *in situ* afin de caractériser l'infiltrat global d'une cohorte composée de n=300 tumeurs DCIS avec un recul clinique supérieur à 5 ans.

Notre analyse de cytométrie a volontairement été centrée sur les DC seulement, en incluant CD14 dans notre lignage d'exclusion pour éliminer les autres APC myéloïdes telles que les macrophages, monocytes et MoDC. Comme expliqué dans l'introduction, ces dernières semblent avoir un phénotype et des fonctionnalités mixtes entre les macrophages et les DC et peuvent infiltrer les tumeurs humaines (Bakdash et al., 2016; Laoui et al., 2016). Nous pourrions donc adapter notre panel de marquage pour évaluer l'infiltration des tumeurs de sein et d'ovaire par cette cinquième population caractérisée par les récepteurs BDCA1, CD14 et FcεR1. Nous pourrions également utiliser la cytométrie de masse pour étudier de multiples marqueurs complémentaires permettant de raffiner encore notre caractérisation des autres populations myéloïdes en parallèle des DC, tout comme cela a été fait dans le cancer du poumon (Lavin et al., 2017). La multiplicité des marqueurs analysés, combinée à une approche d'analyse non-supervisée, nous permettrait l'identification d'autres sous-populations infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire ainsi que l'évaluation de l'homogénéité des types cellulaires précédemment décrits. Au vu des résultats de l'analyse ViSNE, on peut en effet se questionner quant

aux TA-cDC2 identifiées dans notre étude par cytométrie en flux, formant un cluster très étendu, synonyme d'une certaine hétérogénéité. Cette observation pourrait être liée à l'absence de véritables marqueurs spécifiques de cette population dans notre panel d'Ac, ou à l'existence de plusieurs sous-populations de cDC2. En parallèle du CyTOF, en suivant le modèle des analyses effectuées dans le sang de donneurs sains (Villani et al., 2017), une analyse de scRNAseq de l'infiltrat des tumeurs de sein et d'ovaire permettrait de mettre en évidence ces différentes sous-populations, encore de façon non-supervisée.

2. Caractérisation phénotypique des TA-DC et importance du choix des marqueurs

Les études citées précédemment ont identifié les TA-cDC1 comme étant IRF8⁺ ou BDCA3⁺ (Broz et al., 2014; Laoui et al., 2016), marqueurs pouvant aussi être exprimés par les pDC ou cDC2. De plus, aucune d'entre elles n'a évalué l'expression du récepteur d'endocytose CLEC9A et du récepteur à chimiokine XCR1, deux molécules spécifiquement exprimées par les cDC1 et impliquées dans leur supériorité à activer des réponses cytotoxiques chez la souris par rapport aux autres sous-populations de DC (Böttcher et al., 2015; Crozat et al., 2010; Dorner et al., 2009; Sancho et al., 2009). De leur côté Lavin *et al.* ont analysé des tumeurs pulmonaires humaines par scRNAseq et révélé l'existence d'un cluster de cellules co-exprimant les ARNm CLEC9A, XCR1 et CD207, correspondant donc aux TA-cDC1 (Lavin et al., 2017). Cependant aucun marquage protéique n'a été effectué pour valider l'expression de ces marqueurs. Il nous a donc semblé primordial d'établir une caractérisation phénotypique des populations de DC infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire pour valider leur identité et les comparer au DC du sang des patientes. Il apparaît clairement que les récepteurs CLEC9A et XCR1 sont spécifiquement exprimés par les cDC1 circulantes ou associées aux tumeurs. Cependant, alors que la totalité des cDC1 expriment CLEC9A, une fraction d'entre elles semble être XCR1⁻, suggérant une internalisation de ce récepteur comme démontré précédemment (Ardouin et al., 2016; Bachem et al., 2010; Böttcher et al., 2015). De plus, le marqueur CD207 semble restreint aux LC, population absente du sang des patientes, et n'est donc pas exprimé par les cDC1 comme suggéré dans le cancer du poumon au niveau ARNm (Lavin et al., 2017). Au vu de cette caractérisation phénotypique des DC infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire établie par cytométrie, CLEC9A ressort comme le marqueur idéal pour identifier les cDC1.

Le marqueur DC-LAMP nous renseigne quant à lui sur le statut de maturation des TA-cDC. Seul une faible proportion des cDC1 identifiées par FACS semblent matures dans les tumeurs, comparativement aux LC exprimant largement DC-LAMP. On peut alors se demander si les cDC1 n'ont pas reçu de signal d'activation dans les tumeurs, ou si ce marqueur classiquement utilisé est réellement adéquat pour évaluer la maturation de toutes les sous-populations de cDC telles que les cDC1. De plus, il serait intéressant de comparer l'expression de DC-LAMP par les cDC1 XCR1⁺ et XCR1⁻. En effet, la maturation de ces cellules dans les tissus pourrait entraîner des modifications phénotypiques caractérisées par la perte de certains récepteurs à chimiokines nécessaires à leur recrutement dans les tissus, tels que XCR1.

3. Recrutement des populations de DC dans les tumeurs

Il nous paraît capital de déterminer les facteurs permettant l'infiltration des tumeurs par les DC. Les cDC1 expriment tout un panel de récepteurs à chimiokines importants pour leur migration, notamment CXCR3 dont les ligands CXCL9/10/11 ont été retrouvés en forte quantité dans les surnageants de tumeurs. Par ailleurs, deux études ont démontré l'implication des cellules NK dans le recrutement des cDC1 dans les tumeurs humaines de la tête et du cou, du sein, du poumon (Böttcher et al., 2015) ainsi que dans le mélanome (Barry et al., 2018; Böttcher et al., 2018). En effet, le score cDC1 des tumeurs référencées dans le TCGA semble significativement corrélé avec le score NK, ainsi qu'avec l'expression de certaines chimiokines produites par ces lymphocytes, dont FLT3L (Barry et al., 2018) ou XCL1 / XCL2 / CCL5 (Böttcher et al., 2018). La synthèse de ces différentes molécules par les NK ainsi que leurs effets chimioattractants sur les cDC1 ont été validés dans des modèles murins de mélanome. Nous aimerions donc évaluer si ces chimiokines pourraient également être impliquées dans le recrutement des autres sous-populations de DC ou s'il existerait bien un axe NK-cDC1 spécifique. Faute d'outils disponibles, nous n'avons pas pu multiplexer le dosage de ces molécules d'intérêt aux autres cytokines/chimiokines quantifiées dans les surnageants de tumeurs. Nous avons cependant dosé l'IFN- β , démontré comme étant nécessaire au recrutement des cDC1 dans un modèle murin de mélanome (Fuertes et al., 2011). Nous évaluerons donc s'il existe une corrélation entre la quantité d'IFN- β et la proportion de cDC1 dans les tumeurs.

En utilisant les données de RNAseq du TCGA nous pourrions également déterminer si des altérations oncogéniques des tumeurs de sein ou de l'ovaire peuvent induire l'inhibition du recrutement des cDC1, empêchant alors la mise en place d'une réponse CTL (Spranger and Gajewski, 2018), comme cela a été récemment démontré dans le mélanome pour la voie de la β -caténine (Spranger et al., 2015). Une activation aberrante de cette voie est d'ailleurs associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein chez l'Homme (Wang et al., 2015).

II. Association entre l'infiltration des tumeurs par les sous-populations de DC et le pronostic des patients

1. Sous-populations de DC et impact sur la survie des patients

Il existe aujourd'hui de nombreuses démonstrations de l'impact pronostique des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, tant sur la survie des patients que sur la réponse à divers traitements (Fridman et al., 2012; Stanton et al., 2016). Malgré un grand nombre d'études ayant visualisé et dénombré les TA-DC, notamment grâce au récepteur S-100, l'impact pronostique des DC n'est pas si clair, en particulier dans le cancer du sein (Iwamoto et al., 2003; Lespagnard et al., 1999; Lewko et al., 2000). Mais l'utilisation d'un tel marqueur non spécifique pour l'identification globale des DC ne paraît aujourd'hui plus appropriée. En effet, les sous-populations de DC possèdent de nombreuses spécialisations fonctionnelles et doivent donc être évaluées indépendamment. Nous avons alors utilisé les données publiques de transcriptomiques du TCGA afin de comparer l'impact pronostique des différentes populations de DC infiltrant 14 cancers humains et identifiées précédemment par cytométrie dans les tumeurs de sein et d'ovaire. Une telle comparaison n'avait à ce jour jamais été menée. Il apparaît clairement qu'un fort score d'infiltration des tumeurs par les cDC1

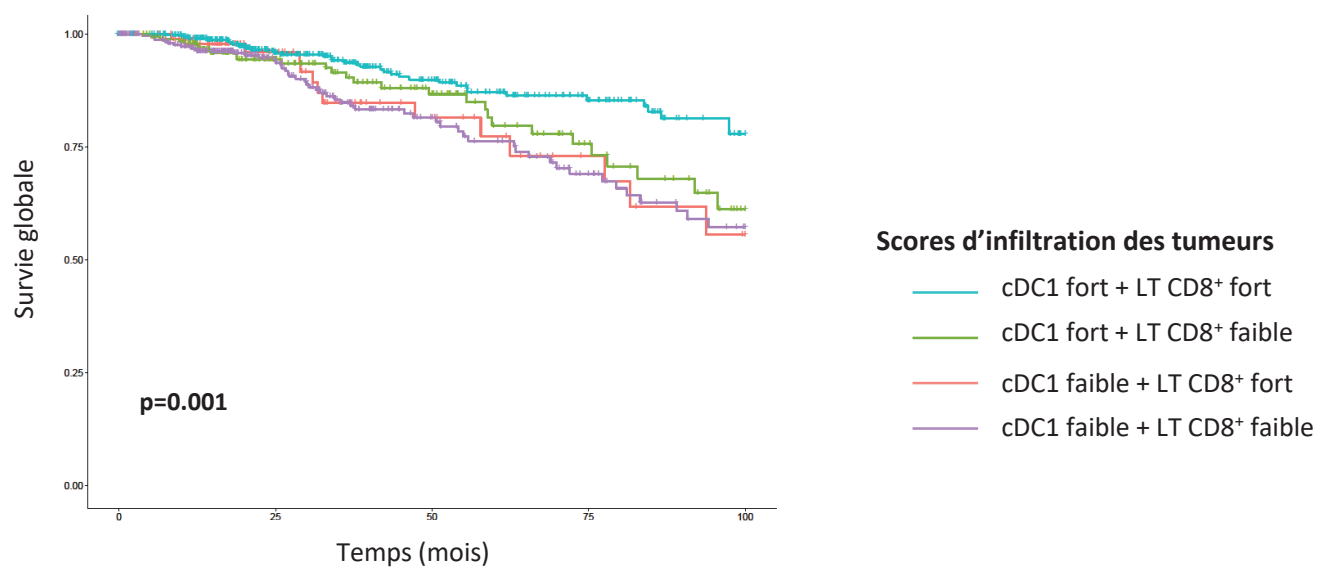


Fig.Discusion 1 – Survie globale des patientes atteintes d’un cancer du sein en fonction du score d’infiltration des tumeurs par les cDC1 et les LT CD8⁺

Analyse Kaplan-Meier de la survie globale des patientes basée sur les données de transcriptomique du TCGA. Les scores d’infiltration des tumeurs par les cDC1 et les LT CD8⁺ ont été calculés grâce à l’outil MCPcounter. Les patients ont été stratifiés à la médiane.

est associé à une meilleure survie des patientes atteintes d'un cancer du sein, comme démontré très récemment par l'équipe de C. Reis e Sousa (Böttcher et al., 2018). L'extension de cette analyse aux autres sous-types nous a permis d'observer que les cDC2 ainsi que les LC semblent également associées à une meilleure survie. Néanmoins, les cDC1 sont les seules DC à être associées à un bon pronostic dans la majorité des cancers analysés (8/14), suggérant un rôle important de ces cellules dans l'immunité antitumorale. Il est également important de noter qu'aucune population de DC ne semble être associée au pronostic des patients atteints d'un cancer agressif tel que celui de l'ovaire ou du pancréas. Cependant, on ne peut exclure que les échantillons ayant été utilisés pour réaliser ces analyses transcriptomiques aient été prélevés sur des tumeurs à un stade trop avancé pour évaluer un potentiel effet des populations immunitaires infiltrantes à partir de leur transcriptome.

Cette approche de bio-informatique permettant d'évaluer l'impact pronostique de cellules immunitaires pourra probablement faire l'objet de certains ajustements. Nous pourrions améliorer le modèle d'étude de la survie des patients en ajoutant des variables correspondant à d'autres populations immunitaires. Nous avons par exemple essayé de stratifier les patients en fonction de leur score cDC1 et LT CD8⁺ [Fig.Discussion 1]. Il apparaît clairement qu'un fort score d'infiltration des tumeurs par ces deux types de cellules est associé à une meilleure survie des patients atteints d'un cancer du sein. A l'inverse, les patients avec un faible score cDC1 et LT CD8⁺ survivent le moins longtemps.

Afin de valider les résultats obtenus *in silico*, il nous paraît indispensable de valider *in situ* nos résultats concernant l'impact pronostique des DC en quantifiant les différentes sous-populations sur coupes histologiques entières de tumeurs provenant d'une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein ou de l'ovaire. Malgré l'existence d'outils ayant permis l'identification des cDC1 par cytométrie, la visualisation *in situ* des TA-cDC1 n'avait jusqu'à présent pas été possible. En effet, l'expression de la molécule BDCA3 étant partagée par de nombreux types cellulaires, y compris plusieurs sous-populations de DC, on ne peut affirmer que l'analyse *in situ* de l'expression du marqueur BDCA3 publiée par Salmon et al. permette d'identifier clairement les TA-cDC1 (Salmon et al., 2016). Nous avons donc validé un anticorps permettant de visualiser ces cellules par immunohistochimie sur coupes de tumeurs congelées. Cette stratégie permet d'obtenir des informations supplémentaires quant à la localisation tissulaire des cDC1. En effet, bien que de rares cellules CLEC9A⁺ soient retrouvées dans les îlots tumoraux, la plupart se situent dans des zones d'infiltrat immunitaire. Cependant, l'absence d'anticorps anti-CLEC9A ou anti-XCR1 fonctionnant sur coupes de tumeurs incluses en paraffine rendait l'évaluation de l'impact pronostique des cDC1 sur de larges cohortes techniquement impossible jusqu'à présent. La mise au point du protocole d'hybridation *in situ* de sondes CLEC9A (RNAscope) nous permettra donc de surmonter cette difficulté technique. Il est également primordial de mettre en place un protocole d'immunofluorescence permettant de visualiser l'ensemble des populations de DC identifiées par cytométrie et de comparer leur localisation pour compléter les données de cytométrie en flux ayant mis en évidence l'enrichissement des tumeurs en cDC1. En effet, en plus de leur proportion, la localisation différentielle des populations de TA-DC pourraient influencer leur fonction. De plus, dans un projet plus global de l'équipe visant à caractériser *in situ* l'infiltrat immunitaire des tumeurs de sein, nous pourrions évaluer les potentielles corrélations ou interactions entre les TA-cDC1 et d'autres acteurs de l'immunité (LT, LB, neutrophiles, NK...). Il sera également possible d'étendre cette analyse à l'évaluation de l'impact pronostique de cDC sur la réponse des patients à certains traitements tels que les immunothérapies.

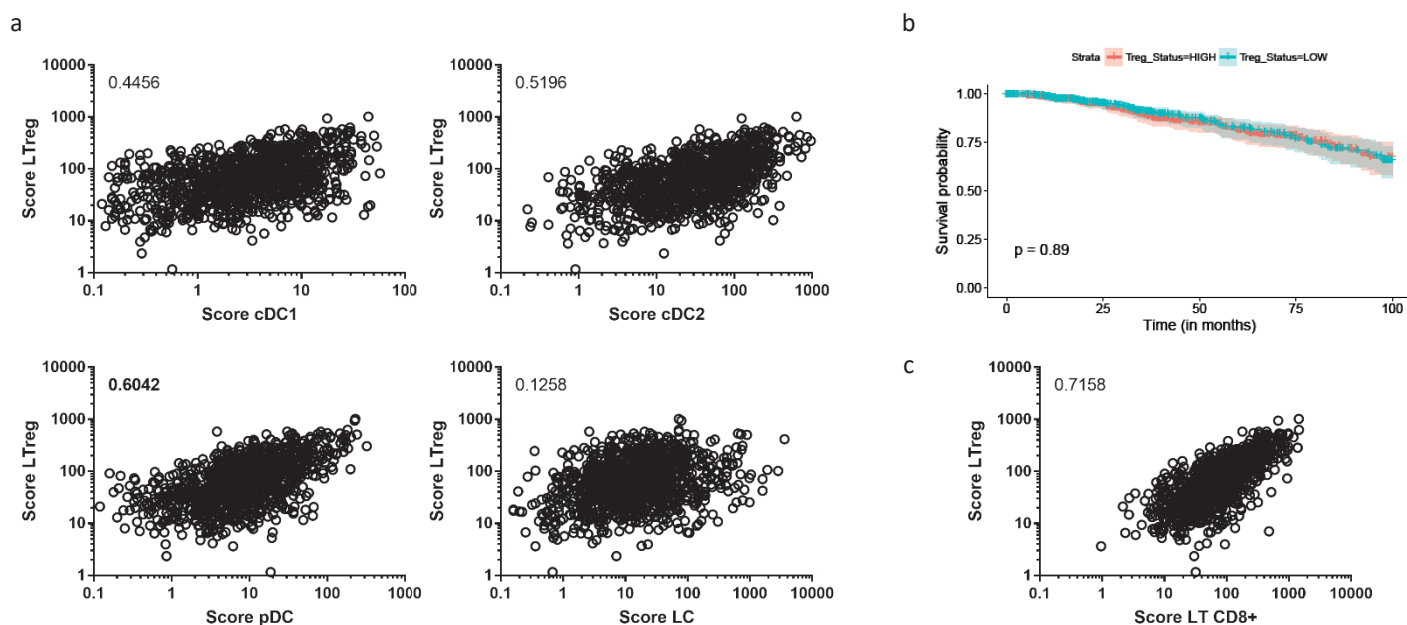


Fig.Discusion 2 – LTreg, sous-populations de DC et pronostic des patientes atteintes d’un cancer du sein

- Scores d’infiltration des tumeurs de sein par les sous-populations de DC et LTreg calculés à partir des données de transcriptomique du TCGA grâce à l’outils MCPcounter.
- Analyse Kaplan-Meier de la survie globale des patientes basées sur le score LTreg, en stratifiants les patientes à la médiane. Analyse statistique : test logrank.
- Scores d’infiltration des tumeurs de sein par les LTreg et les LT CD8⁺ calculés à partir des données de transcriptomique du TCGA grâce à l’outils MCPcounter.

2. pDC et pronostic des patientes : discordances ou évolution des techniques ?

Au vu des données de transcriptomique du TCGA, l'infiltration des tumeurs de sein et d'ovaire par les pDC ne semble pas être associée à un pronostic particulier. Ceci est en désaccord avec les précédents résultats de l'équipe démontrant une association entre les pDC et un mauvais pronostic (Labidi-Galy et al., 2014; Treilleux et al., 2004). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence. En effet, ces précédentes données ont été générées grâce à une technique complètement différente. En effet, elles sont issues du dénombrement des pDC marquées *in situ* par immunohistochimie grâce à des anticorps anti-CD123 ou anti-BDCA2. De plus, ces marquages ont été effectués sur des TMA (Tissue microarray) et non des coupes entières de tumeurs. Il est possible que la zone tumorale prélevée pour constituer les TMA ne soit pas représentative de la tumeur entière, biaisant ainsi la quantification des pDC infiltrant les tumeurs. Enfin, les cohortes analysées dans ces deux études ont été constituées bien avant celle du TCGA. L'évolution de la prise en charge thérapeutique des patientes entre les deux périodes a potentiellement pu impacter l'infiltration des tumeurs par les différents acteurs de l'immunité puisque les échantillons tumoraux utilisés pour constituer les TMA peuvent provenir de tumeurs ayant fait l'objet d'une première ligne de traitement. De façon intéressante, une récente étude a établi une signature de TA-pDC à partir du profil transcriptomique de cette population isolée de tumeurs de sein (Michea et al., 2018). Il apparaît clairement que l'impact pronostique de cette signature varie en fonction des sous-types de cancers du sein. En effet, de manière similaire à nos résultats, les pDC ne semblent pas associées à un pronostic particulier lorsqu'elles infiltrant les tumeurs luminales alors qu'une forte infiltration des tumeurs TNBC par les pDC est associée à une meilleure survie (Michea et al., 2018). On peut également noter que, dans cette étude, les cellules « cDC1-enrichies » sont associées à un bon pronostic indépendamment de leur sous-type moléculaire.

Bien que notre étude ne montre pas d'association entre l'infiltration des tumeurs par les pDC et un mauvais pronostic pour les patientes, l'analyse GSEA nous a permis de mettre en évidence l'enrichissement de la voie « Immunosuppression » dans les tumeurs fortement infiltrées par les pDC seulement. Ceci est en accord avec les précédents travaux de l'équipe démontrant l'influence des pDC sur la progression tumorale en induisant la prolifération des LTreg via l'axe ICOS-ICOSL (Faget et al., 2012). De façon cohérente, les pDC semblent être la sous-population de DC dont la présence corrèle le plus avec celle des LTreg dans les tumeurs de sein du TCGA [Fig.Discussion 2A]. Se pose alors la question de l'utilisation d'un score d'infiltration des tumeurs évalué par analyse bio-informatique pour identifier des populations immunitaires individuelles associées à un pronostic. En effet, malgré leur rôle immunosuppresseur bien démontré, les LTreg ne semblent pas associés à une moins bonne survie des patientes atteintes d'un cancer du sein (score *FOXP3*) [Fig.Discussion 2B], probablement car leur présence est fortement corrélée à celles d'autres populations exerçant une fonction antitumorale telles que les LT CD8⁺ [Fig.Discussion 2C]. Il nous semble alors indispensable d'évaluer l'impact pronostique des pDC et des LTreg, en parallèle de celui des cDC1, sur une cohorte récente constituée de coupes entières de tumeurs de sein, et non à partir de TMA.

III. TA-cDC1 et réponses antitumorales Th1/CTL

Considérant que les cDC1 infiltrant les tumeurs sont clairement associées à un bon pronostic des patientes dans plusieurs études dont la nôtre, il est aujourd'hui primordial d'identifier les fonctions qu'elles exercent au sein des tumeurs. Comme détaillé dans l'introduction, le rôle de ces cellules dans l'initiation des réponses immunitaires antitumorales Th1 et CTL a largement été décrit chez la souris, mais très peu chez l'Homme.

1. Capture et apprêtement des antigènes

Nos travaux n'apportent pas de preuves d'une supériorité des cDC1 ou d'une des autres sous-populations de DC à capturer les Ag tumoraux. Nous pourrions envisager une détection des corps apoptotiques phagocytés par les différentes TA-DC par un marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) *in situ*. Cependant, cette technique ne permettrait pas de mettre en évidence les cellules nécrotiques ayant été phagocytées par les cDC1, en particulier *via* l'engagement de leur récepteur CLEC9A. L'utilisation d'un modèle murin permettrait alors de contourner les difficultés techniques liées à l'Homme. Il serait envisageable d'avoir recours à l'utilisation du modèle de lignée tumorale mammaire NOP23 (issue de tumeur mammaire spontanée générée dans des souris MMTV-Neu Ovalbumine^{OT-I/OT-II} DNP53^{R172H} exprimant l'oncogène Her2/Neu de rat fusionné aux épitopes OT-I/OT-II de l'ovalbumine et un mutant dominant négatif du gène *Tp53*) (Wall et al., 2007) dans lequel nous ferions au préalable exprimer une molécule fluorescente (YFP, GFP...) permettant de suivre la phagocytose des cellules tumorales par les différentes sous-populations de DC.

2. Présentation des Ag

L'étape de présentation des Ag suivant leur apprêtement suscite également beaucoup d'intérêt. De par leur capacité à cross-présenter des Ag aux LT CD8⁺ afin d'activer des réponses CTL, en particulier dans des contextes tumoraux, une attention particulière est portée sur les cDC1 et leur lien avec les LT cytotoxiques dans les tumeurs. Notre étude centrée sur l'analyse *ex vivo* de prélèvements humains ne nous a pas permis d'évaluer les capacités de cross-présentation des TA-cDC1 et de les comparer aux autres sous-populations de DC de par les difficultés techniques liées à leur rareté et leur fragilité après isolation des tissus. La possibilité d'effectuer une double hybridation *in situ* CLEC9A/CD8A nous permettra cependant d'évaluer la distance entre les cDC1 et les LT CD8⁺ dans les tumeurs, comparativement aux autres sous-populations de DC identifiables par immunohistochimie ou immunofluorescence. En effet, la localisation tissulaire des différents sous-types de DC ainsi que leur capacité à interagir étroitement avec les LT CD8⁺, comme démontré pour les cDC1 par RNAscope, pourrait influencer grandement sur leurs fonctions. Nous pourrions également déterminer si le microenvironnement tumoral soluble est capable d'impacter l'activation de LT CD8⁺ par les cDC1. Pour cela nous utiliserons le modèle de cDC1 générées *in vitro* à partir d'HSC (Poulin et al., 2010), activées par poly(I:C) et prétraitées par des surnageants de dilacération de tumeurs. Nous aurons aussi recours au modèle de tumeur mammaire NOP23 implanté dans des souris déficientes pour les cDC1 (XCR1-DTA) pour évaluer le rôle de ce sous-type particulier de DC dans la mise en place d'une réponse

antitumorale Th1/CTL en suivant la génération de LT CD8⁺ spécifiques de l'épitope immunodominant Kb-OVAaa49-57 présent dans l'Ag ovalbumine exprimé par cette lignée tumorale.

Par ailleurs, des travaux ont démontré la supériorité des cDC1 à cross-présenter des Ag provenant de cellules nécrotiques (Bachem et al., 2010), particularité liée à leur expression spécifique de la lectine CLEC9A (Sancho et al., 2009; Zelenay et al., 2012). Notre équipe a également observé cet avantage vis-à-vis des autres sous-populations de DC pour la présentation croisée d'Ag provenant de cellules vivantes (Deauvieu et al., 2015). Ceci pourrait être expliqué par l'absence de l'expression de SIRP- α à la surface des cDC1, comparativement à tous les autres types de DC, ne permettant ainsi pas aux cellules tumorales d'inhiber leur phagocytose. Nous pourrions alors évaluer l'implication de CLEC9A et SIRP- α dans cette supériorité fonctionnelle des cDC1 activées par TLR3-L, en utilisant une approche d'interférence ARN (shRNA) déjà développée dans notre équipe et qui permettrait de réprimer l'expression de CLEC9A dans les cDC1 ainsi que SIRP- α dans les autres populations de DC générées *in vitro* (Balan et al., 2018; Poulin et al., 2010).

Enfin, de façon surprenante et contrairement aux cDC1 et cDC2 du sang des patientes, aucune des DC isolées de tumeurs ne semblent produire d'IL-12 en réponse à une combinaison de molécules stimulatrices (poly(I:C) + R848 + anti-CD40-L) (données non présentées). Notre étude ne nous permet donc pas de conclure quant à la potentielle supériorité fonctionnelle de cDC1 pour la synthèse de cette cytokine nécessaire à l'activation de réponses T de type Th1 comme détaillé dans l'introduction. Il est fort probable que les outils actuellement disponibles ne permettent pas de détecter par cytométrie en flux cette cytokine produite en faible quantité. De plus, il se pourrait que les DC produisent plus d'IL-12 dans les OLS, lieu d'activation de réponses immunitaires adaptatives. Pour évaluer si les cDC1 représentent une source de cette cytokine dans les organes lymphoïdes, et n'ayant pas accès à ce type de prélèvements frais, nous pourrions effectuer une double hybridation *in situ* avec les sondes *CLEC9A/IL12A* sur coupes de ganglions de patientes atteintes d'un cancer du sein.

IV. cDC1, IFN-III : recrutement et activation des effecteurs immunitaires cytotoxiques ?

1. cDC1 et effecteurs cytotoxiques

Les travaux de *Spranger et al.* ont pour la première fois mis en évidence la corrélation entre le score d'infiltration des mélanomes métastatiques humains par les cDC1 et celui de LT CD8⁺ ou de chimiokines permettant leur recrutement, telles que CXCL9/10/11 (Spranger et al., 2017). Nos résultats démontrent que les cDC1 corrélaient aussi avec les LT CD8⁺ dans les tumeurs de sein. Cependant, tout comme pour l'impact pronostique, il ne s'agit pas d'une spécificité des cDC1 puisque la corrélation est également retrouvée pour les cDC2 et les pDC. Nous pourrions donc coupler le marquage RNAscope *CLEC9A* à d'autres marquages d'immunofluorescence afin d'évaluer la proximité des cDC1 avec les LT CD8⁺ ainsi qu'avec d'autres populations immunitaires. Il serait en particulier intéressant d'étudier la présence des cDC1 dans les structures lymphoïdes tertiaires riches en DC matures, LT et LB (Goc et al., 2013). Par ailleurs, au vu de l'implication des NK dans l'activation de la cross-présentation et du recrutement intratumoral des cDC1 (Barry et al., 2018; Böttcher et al., 2018; Deauvieu et al., 2015), une proximité entre ces deux types cellulaires pourrait aussi témoigner d'une possible collaboration.

2. cDC1 et IFN-III : première démonstration d'un lien dans l'immunité antitumorale

Bien qu'aucune piste ne nous permette actuellement de valider ou de réfuter l'hypothèse de l'implication des cDC1 dans l'activation de réponses Th1 antitumorales chez l'Homme, notre étude comporte plusieurs résultats attestant de l'existence d'un lien particulier entre les IFN et les cDC1. En effet, les signatures de réponse aux IFN-I/III et IFN-II sont enrichies dans les tumeurs fortement infiltrées par ce type de DC. En cohérence avec l'augmentation du gène *IFNL1* dans les tumeurs comparées au tissu sain adjacent, le dosage multiplex des surnageants d'une centaine de tumeurs a démontré la présence d'IFN- λ 1 dans la majorité des tumeurs analysées. Par ailleurs, en accord avec les précédentes données de l'équipe témoignant de l'altération de la synthèse d'interféron par les pDC dans les tumeurs de sein et d'ovaire (Labidi-Galy et al., 2011; Sisirak et al., 2012, 2013), l'IFN- α est complètement absent du microenvironnement tumoral. L'IFN- β est quant à lui présent en faible quantité dans quelques tumeurs. De plus, grâce à une analyse par cytométrie en flux, nous avons identifié les cDC1 comme les uniques cellules productrices d'IFN- λ 1 dans les tumeurs, démontrant ici pour la première fois la capacité de production d'IFN de type III par ces cellules dans un contexte tumoral chez l'Homme. L'un de nos premiers objectifs à court terme est donc de mettre au point une double hybridation *CLEC9A/IFNL1 in situ* afin de valider ce résultat. Par ailleurs, nous utiliserons une nouvelle fois le modèle murin de tumeur mammaire NOP23 implanté dans des souris *Ifnl2^{Egfp}* pour évaluer si les cDC1 peuvent être la source d'IFN-III dans l'immunité antitumorale chez la souris (Galani et al., 2017).

Nous aimerions également identifier dans les tumeurs le signal reçu par les cDC1 permettant leur synthèse d'IFN-III. En effet, il est bien démontré que cet IFN peut être induit en réponse à un ligand de TLR3 (Balan et al., 2014; Lauterbach et al., 2010; Murata et al., 2014; Yoshio et al., 2013), mais nous n'avons pour le moment aucune démonstration de la présence d'ARN double-brins dans les tumeurs. Comme détaillé dans l'introduction, d'autres senseurs peuvent également être impliqués, tels que Ku70 et STING (Chen et al., 2018; Sali et al., 2015; Zhang et al., 2011). Nous devons donc évaluer l'expression de ces différents PRR dans les cDC1 ainsi que leur capacité à induire leur production d'IFN- λ , en utilisant par exemple le modèle de DC générées *in vitro* (CD34-DC), mais aussi *ex vivo* à partir de DC isolées de tumeurs. Enfin, nous évaluerons si la réactivation des rétrovirus endogènes (ERV) peut induire la synthèse d'IFN de type III, en particulier par les cDC1, comme cela a été démontré *in vitro* dans des lignées tumorales humaines (Chiappinelli et al., 2015).

3. IFN-III et effecteurs immunitaires cytotoxiques

En plus d'avoir identifié les cDC1 comme étant la source des IFN-III dans les tumeurs, nous avons également démontré une association entre l'expression du gène *IFNL1* ou de son récepteur *IFNLR1* et une meilleure survie sans rechute des patientes atteintes d'un cancer du sein, suggérant une possible implication de cette cytokine dans l'immunité antitumorale. En analysant la composition des surnageants de dilacération de tumeurs, nous avons mis en évidence que la quantité d'IFN- λ 1 corrèle fortement avec les chimiokines CXCL9/10/11, ligands du récepteur CXCR3 largement exprimé par les LT CD8⁺, les LT CD4⁺ Th1 ainsi que par les cellules NK. La présence d'IFN de type III est également associée à celle de CX3CL1, une chimiokine dont le récepteur CX3CR1 est exprimé par de multiples cellules immunitaires, dont une population de LT CD8⁺ particulièrement cytotoxiques (Böttcher et al., 2015). Ces données suggèrent donc un rôle de l'IFN- λ dans le recrutement des effecteurs immunitaires

cytotoxiques. L'activation de suspensions cellulaires tumorales avec de l'IFN- λ 1 permet bien l'induction de la synthèse de CXCL11 mais pas de CXCL9/10 et CX3CL1. La présence d'IFN- λ 1 pourrait donc être associée au recrutement de cellules impliquées dans les réponses de type Th1 mais cet IFN ne semble pas induire directement la production de toutes les chimiokines identifiées dans les surnageants de tumeur et nécessaires au recrutement des effecteurs cytotoxiques, mais seulement CXCL11.

Nos travaux mettent également en évidence l'existence d'une boucle d'amplification entre l'IFN- λ 1 et l'IFN- β , en lien avec la précédente démonstration de l'augmentation de la production d'IFN- α par les pDC traitées par de l'IFN de type III (Yin et al., 2012). De plus, tout comme pour l'IFN- β , une activation des tumeurs par l'IFN- λ 1 est associée à une induction significative de la synthèse d'IFN- γ . Des résultats préliminaires nous permettent d'envisager une réponse directe des LT CD4⁺ et CD8⁺ aux IFN-III. En effet, leur activation par de l'IFN- λ entraîne bien une phosphorylation de STAT1 [Fig.Discussion 3], mais de façon moins importante que par les IFN-I. Il se pourrait alors que, contrairement aux IFNAR dont l'expression est ubiquitaire, le récepteur aux IFN-III ne soit pas exprimé par la totalité des LT, mais seulement par des sous-populations particulières. Nous utiliserons donc des marquages intracytoplasmiques afin d'identifier par cytométrie en flux la population de lymphocytes à l'origine de cette production, en étudiant également les cellules NK qui pourraient produire l'IFN- γ en réponse aux IFN-III mais que nous n'avons pas analysées en western blot pour le moment. De plus, contrairement à l'IFN- β , l'IFN- λ 1 permet la synthèse d'IL-12p70. Cette différence pourrait également être expliquée par un profil d'expression de leurs récepteurs différent au sein des cellules immunitaires. Il est intéressant de noter que des analyses du TCGA par Ruffell *et al.* ont révélé une corrélation entre l'expression des gènes *IL12A*, *IFNG*, *BATF3* et *IRF8*, les deux derniers étant des facteurs de transcription impliqués dans le développement des cDC1 (Ruffell et al., 2014). La production d'IFN- λ pourrait donc être en lien avec l'activation d'une réponse immunitaire Th1 dans les tumeurs infiltrées par les cDC1.

Par ailleurs, nous étudierons prochainement les voies modulées par ces IFN dans un modèle tissulaire plus complet en analysant le transcriptome des zones tumorales et immunitaires de larges coupes épaisses de tumeurs humaines fraîches traitées par de l'IFN- λ 1 (en comparaison avec de l'IFN- β). Il se pourrait en effet que les IFN-III aient des effets directs sur les cellules tumorales, comme cela a déjà été démontré *in vitro* (références résumées en Table 5), ou sur d'autres acteurs de l'immunité tels que les LB pour moduler la balance Th1/Th2 et favoriser une réponse médiée par les LT. De plus, si les IFN-III possèdent les mêmes propriétés que les IFN de type I, de par une signalisation commune, ils pourraient alors favoriser l'activation des LT en augmentant les capacités de présentation de Ag par les APC (Gessani et al., 2014).

V. Ciblage thérapeutique des cDC1

1. Poly(I:C) et activation des cDC1 : intérêt thérapeutique ?

Les données d'impact pronostique des cDC1 et des IFN-III qu'elles sécrètent dans les tumeurs nous ont poussés à évaluer une potentielle stratégie de réactivation de ces cellules. Le poly(I:C), ligand de TLR3, semble un bon candidat pour stimuler les cDC1. En effet, de précédentes études chez la souris ont mis en évidence ses effets positifs sur la maturation des cDC, l'induction de la présentation croisée

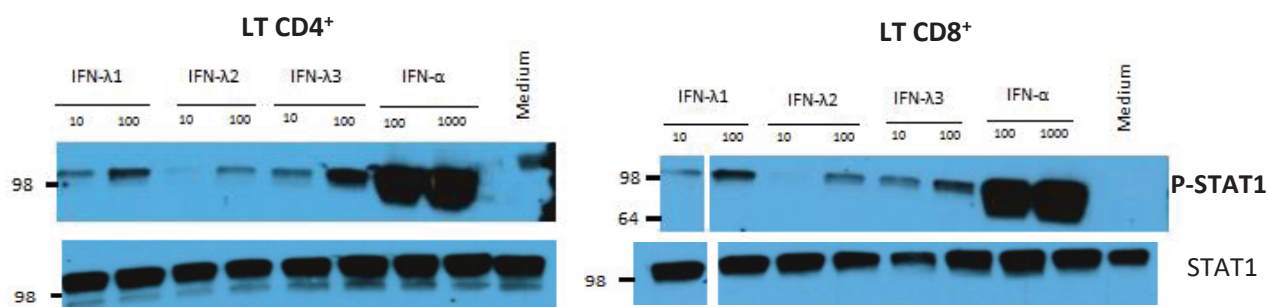


Fig. Discussion 3 – Analyse de la réponse des LT humains aux IFN-I et III

L'induction de la phosphorylation de STAT1 a été évaluée par western blot dans des LT CD4⁺ et CD8⁺ isolés de PBMC de donneurs sains, après 20min d'activation par des IFN-I ou IFN-III.

d'Ag pour activer des réponses CTL spécifiques, ainsi que la mise en place d'une mémoire CD8 (Fujimoto et al., 2004; Loré et al., 2003; Takeda et al., 2017). Le poly(I:C) permet également de contrôler le développement des tumeurs implantées chez la souris (Azuma et al., 2016; Salmon et al., 2016; Takeda et al., 2017) de façon dépendante des cDC1 (Azuma et al., 2016), et conduit à la régression complète des tumeurs lorsqu'il est injecté en combinaison avec des anticorps anti-PD-L1 (Salmon et al., 2016; Takeda et al., 2017). Cependant, le rôle des IFN-III potentiellement produits par les cDC1 activées par ce ligand de TLR n'a jamais été décrit ou analysé dans ces modèles. Nous pourrions donc utiliser le modèle NOP23 de tumeur mammaire implanté dans des souris déficientes pour le récepteur IL-28Rα (*Il28ra*^{-/-}) et traitées par poly(I:C) pour évaluer l'implication des IFN-λ dans l'immunité antitumorale et la réponse aux immunothérapies. Chez l'Homme, le poly(I:C) augmente la capacité de présentation croisée des cDC1 circulantes *in vitro* (Nizzoli et al., 2013). Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle des IFN-III dans la cross-présentation d'Ag par des cDC1 générées *in vitro* (CD34-DC) en utilisant un anticorps anti-IL-28Rα neutralisant.

2. Ciblage des cDC1 par le poly(I:C) et mise en place d'une réponse antitumorale Th1

Bien que n'ayant pas abordé tout le versant présentation croisée par les TA-cDC1 pour le moment, notre étude a tout de même apporté des preuves de l'intérêt du ciblage des cDC1 par un ligand de TLR3 pour induire la synthèse de multiples cytokines. En effet, l'activation de coupes épaisses de tumeurs humaines par du poly(I:C) permet d'induire la synthèse d'IFN-λ1 mais aussi de CXCR3-L et IFN-γ, expliquant alors les corrélations observées dans les surnageants de dilacération de tumeurs. Un TLR3-L conduirait donc non seulement à la production de molécules nécessaires au recrutement des effecteurs immunitaires cytotoxiques dans les tumeurs, mais aussi à leur activation comme le témoigne l'induction de l'IFN-γ. Bien que de nombreux types cellulaires expriment TLR3, dont les cellules tumorales mammaires (Salaun et al., 2006, 2011), nous avons démontré par cytométrie en flux que seules les cDC1 produisent de l'IFN-λ1 en réponse à poly(I:C). En revanche, l'activation étant relativement longue (48h), nous ne pouvons pas affirmer que les chimiokines induites par le poly(I:C) sont elles aussi directement produites par les cDC1.

Il est important de noter ici que les TA-cDC1 ne semblent pas inhibées par le microenvironnement tumoral pour leur synthèse d'IFN-λ en réponse à un ligand de TLR3, contrairement aux pDC dont la fonction de production d'IFN-α est altérée dans les tumeurs de sein et d'ovaire (Labidi-Galy et al., 2011; Le Mercier et al., 2013; Sisirak et al., 2012). De façon cohérente, une récente étude a mis en évidence l'importante plasticité des pDC soumises à de nombreuses modifications transcriptomiques lorsqu'elles infiltreront les tumeurs. Les « cDC1-enrichies » ont quant à elles un profil proche de la même population identifiée dans les zones péri-tumorales saines (Michea et al., 2018). Nous aimerions cependant affiner l'identification des TA-DC de cette étude, en utilisant notre stratégie de FACS présentée dans les résultats, pour évaluer par RNAseq les modifications transcriptomiques existant entre les DC infiltrant les tumeurs du sein ou de l'ovaire et les populations présentes dans le sang des patientes. En effet, ils nous semblent primordial d'identifier les voies modulées entre les DC circulantes et les TA-DC. Cette approche nous permettra de comparer le transcriptome des différentes sous-populations, d'évaluer l'impact du microenvironnement tumoral sur chacune d'entre elles, ainsi que d'identifier de possibles nouvelles cibles thérapeutiques. Nos résultats soutiennent en effet l'hypothèse selon laquelle les cDC1 pourraient potentiellement répondre à une stimulation *in vivo* et exercer ainsi une fonction antitumorale.

VI. Conclusion générale

Nos travaux ont apporté de nouvelles informations quant à la composition de l'infiltrat immunitaire des tumeurs humaines de sein et d'ovaire et démontrent la présence de plusieurs sous-populations de DC. En ne se focalisant pas exclusivement sur les cDC1, nous avons pu montrer que cette population n'est pas la seule des TA-DC à être associée à une meilleure survie des patientes. En revanche, nous avons mis en évidence la capacité spécifique des cDC1 à produire de l'IFN-III dans le microenvironnement tumoral. Cette cytokine précédemment décrite pour son rôle dans l'immunité antivirale n'avait jusqu'à présent jamais été identifiée dans un contexte tumoral chez l'Homme. Nos données soulèvent l'association entre les IFN-III produits par les cDC1 et un microenvironnement soluble favorable au recrutement et à l'activation de réponses immunitaires Th1/CTL. Cette dernière donnée pourrait potentiellement expliquer l'association existant entre l'expression des IFN-III ou de leur récepteur et une meilleure survie des patientes. Enfin, notre étude soulève l'intérêt de restimuler les TA-cDC1 avec un ligand de TLR3 pour induire leur synthèse d'IFN de type III, le recrutement ainsi que l'activation d'effecteurs cytotoxiques nécessaires à l'élimination des tumeurs et à la réponse aux immunothérapies.

REFERENCES

A

- van der Aa, E., L. van de Laar, H.L. Janssen, N. van Montfoort, and A.M. Woltman. 2015. BDCA3 expression is associated with high IFN- λ production by CD34(+)-derived dendritic cells generated in the presence of GM-CSF, IL-4, and/or TGF- β . *Eur. J. Immunol.* 45:1471–81. doi:10.1002/eji.201444802.
- Abushahba, W., M. Balan, I. Castaneda, Y. Yuan, K. Reuhl, E. Raveche, A. de la Torre, A. Lasfar, and S.V. Kotenko. 2010. Antitumor activity of Type I and Type III interferons in BNL hepatoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 59:1059–1071. doi:10.1007/s00262-010-0831-3.
- Ahrens, S., S. Zelenay, D. Sancho, P. Hanč, S. Kjaer, C. Feest, G. Fletcher, C. Durkin, A. Postigo, M. Skehel, F. Batista, B. Thompson, M. Way, C. Reis e Sousa, and O. Schulz. 2012. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNCR-1, a receptor for dead cells. *Immunity.* 36:635–45. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.008.
- Alase, A.A., E.-S. M Yasser, E.M. Vital, D.J. Tobin, N.A. Turner, and M. Wittmann. 2015. IFN λ Stimulates MxA Production in Human Dermal Fibroblasts via a MAPK-Dependent STAT1-Independent Mechanism. *J Invest Dermatol.* 135:2935–2943. doi:10.1038/jid.2015.317.
- Alcumbre, S.G., S.-A. Violaine, J. Di Domizio, P. Vargas, P. Sirven, P. Bost, M. Maurin, P. Maiuri, M. Wery, M.S. Roman, L. Savey, M. Touzot, B. Terrier, D. Saadoun, C. Conrad, M. Gilliet, A. Morillon, and V. Soumelis. 2018. Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat. Immunol.* 19:63–75. doi:10.1038/s41590-017-0012-z.
- Allan, R.S., C.M. Smith, G.T. Belz, A.L. van Lint, L.M. Wakim, W.R. Heath, and F.R. Carbone. 2003. Epidermal viral immunity induced by CD8 α + dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science.* 301:1925–1928. doi:10.1126/science.1087576.
- Andzinski, L., C.-F. Wu, S. Lienenklaus, A. Kröger, S. Weiss, and J. Jablonska. 2015. Delayed apoptosis of tumor associated neutrophils in the absence of endogenous IFN- β . *Int. J. Cancer.* 136:572–583. doi:10.1002/ijc.28957.
- Arase, N., A. Takeuchi, M. Unno, S. Hirano, T. Yokosuka, H. Arase, and T. Saito. 2005. Heterotypic interaction of CRTAM with Nect2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int. Immunol.* 17:1227–37. doi:10.1093/intimm/dxh299.
- Ardouin, L., H. Luche, R. Chelbi, S. Carpentier, A. Shawket, F. Montanana Sanchis, C. Santa Maria, P. Grenot, Y. Alexandre, C. Grégoire, A. Fries, T.-P.P. Vu Manh, S. Tamoutounour, K. Crozat, E. Tomasello, A. Jorquera, E. Fossum, B. Bogen, H. Azukizawa, M. Bajenoff, S. Henri, M. Dalod, and B. Malissen. 2016. Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity.* 45:305–18. doi:10.1016/j.immuni.2016.07.019.
- Artyomov, M.N., A. Munk, L. Gorvel, D. Korenfeld, M. Cella, T. Tung, and E. Klechevsky. 2015. Modular expression analysis reveals functional conservation between human Langerhans cells and mouse cross-priming dendritic cells. *J. Exp. Med.* 212:743–57. doi:10.1084/jem.20131675.
- Aspord, C., M.-T.T. Leccia, J. Charles, and J. Plumas. 2013. Plasmacytoid dendritic cells support melanoma progression by promoting Th2 and regulatory immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer Immunol Res.* 1:402–15. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0114-T.
- Azuma, M., Y. Takeda, H. Nakajima, H. Sugiyama, T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2016. Biphasic function of TLR3 adjuvant on tumor and spleen dendritic cells promotes tumor T cell infiltration and regression in a vaccine therapy. *Oncoimmunology.* 5. doi:10.1080/2162402X.2016.1188244.

B

- Bachem, A., S. Güttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H. Mages, V. Henn, P.-M. Kloetzel, S. Gurka, and R. Krocze. 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:1273–81. doi:10.1084/jem.20100348.
- Bacher, N., V. Raker, C. Hofmann, E. Graulich, M. Schwenk, R. Baumgrass, T. Bopp, U. Zechner, L. Merten, C. Becker, and K. Steinbrink. 2013. Interferon- α suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer Res.* 73:5647–5656. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3788.

- Bakdash, G., S.I. Buschow, M.A. Gorris, A. Halilovic, S.V. Hato, A.E. Sköld, G. Schreiber, S.P. Sittig, R. Torensma, T. Duiveman-de Boer, C. Schröder, E.L. Smits, C.G. Figdor, and I. de Vries. 2016. Expansion of a BDCA1+CD14+ Myeloid Cell Population in Melanoma Patients May Attenuate the Efficacy of Dendritic Cell Vaccines. *Cancer Res.* 76:4332–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1695.
- Balan, S., A.-S. Catharina, A. Abbas, N. Couespel, J. Savoret, F. Imperatore, A.-C.C. Villani, T.-P.P. Vu Manh, N. Bhardwaj, and M. Dalod. 2018. Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity. *Cell Rep.* 24:1902–1915.e6. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.033.
- Balan, S., V. Ollion, N. Colletti, R. Chelbi, M.-S. Frédéric, H. Liu, T.-P.P. Vu Manh, C. Sanchez, J. Savoret, I. Perrot, A.-C.C. Doffin, E. Fossum, D. Bechlian, C. Chabannon, B. Bogen, A.-P. Carine, M. Shaw, T. Soos, C. Caux, V.-G. Jenny, and M. Dalod. 2014. Human XCR1+ dendritic cells derived in vitro from CD34+ progenitors closely resemble blood dendritic cells, including their adjuvant responsiveness, contrary to monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 193:1622–35. doi:10.4049/jimmunol.1401243.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767–811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- Banchereau, J., T.-S. LuAnn, S. Zurawski, J.-P.P. Blanck, Y. Cao, S. Clayton, J.-P.P. Gorvel, G. Zurawski, and E. Klechevsky. 2012. The differential production of cytokines by human Langerhans cells and dermal CD14(+) DCs controls CTL priming. *Blood.* 119:5742–9. doi:10.1182/blood-2011-08-371245.
- Bao, M., and L.-Y. cell. 2013. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein & cell.*
- Barclay, A., and T.K. Van den Berg. 2014. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPα) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu. Rev. Immunol.* 32:25–50. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120142.
- Barnes, T.A., and E. Amir. 2017. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br J Cancer.* 117:451–460. doi:10.1038/bjc.2017.220.
- Barry, K.C., J. Hsu, M.L. Broz, F.J. Cueto, M. Binnewies, A.J. Combes, A.E. Nelson, K. Loo, R. Kumar, M.D. Rosenblum, M.D. Alvarado, D.M. Wolf, D. Bogunovic, N. Bhardwaj, A.I. Daud, P.K. Ha, W.R. Ryan, J.L. Pollack, B. Samad, S. Asthana, V. Chan, and M.F. Krummel. 2018. A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* 24:1178–1191. doi:10.1038/s41591-018-0085-8.
- Bekeredjian-Ding, I., M. Schäfer, and ... H.-E. 2009. Tumour-derived prostaglandin E2 and transforming growth factor-β synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-α.
- Belardelli, F., M. Ferrantini, E. Proietti, and J.M. Kirkwood. 2002. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:119–34.
- Bell, D., P. Chomarat, D. Broyles, G. Netto, G. Harb, S. Lebecque, J. Valladeau, J. Davoust, K. Palucka, and J. Banchereau. 1999. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J. Exp. Med.* 190:1417–26.
- Bella, D.S., M. Gennaro, M. Vaccari, C. Ferraris, S. Nicola, A. Riva, M. Clerici, M. Greco, and M. Villa. 2003. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. 89:1463.
- Belz, G.T., and S.L. Nutt. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* 12:101–13. doi:10.1038/nri3149.
- Belz, G.T., K. Shortman, M.J. Bevan, and W.R. Heath. 2005. CD8α+ Dendritic Cells Selectively Present MHC Class I-Restricted Noncytolytic Viral and Intracellular Bacterial Antigens In Vivo. *The Journal of Immunology.* 175:196–200. doi:10.4049/jimmunol.175.1.196.
- Belz, G.T., C.M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F.R. Carbone, and W.R. Heath. 2004. Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J. Immunol.* 172:1996–2000.
- Bennaceur, K., I. Popa, J. Portoukalian, B.-V. Odile, and P.-N. Josette. 2006. Melanoma-derived gangliosides impair migratory and antigen-

presenting function of human epidermal Langerhans cells and induce their apoptosis. *Int. Immunol.* 18:879–86. doi:10.1093/intimm/dxl024.

Berthier-Vergnes, O., M. Gaucherand, J. Péguet-Navarro, J. Plouet, J. Pageaux, D. Schmitt, and M. Staquet. 2001. Human melanoma cells inhibit the earliest differentiation steps of human Langerhans cell precursors but failed to affect the functional maturation of epidermal Langerhans cells. *Br. J. Cancer.* 85:1944–51. doi:10.1054/bjoc.2001.2183.

Bidwell, B.N., C.Y. Slaney, N.P. Withana, S. Forster, Y. Cao, S. Loi, D. Andrews, T. Mikeska, N.E. Mangan, S.A. Samarajiwa, N.A. de Weerd, J. Gould, P. Argani, A. Möller, M.J. Smyth, R.L. Anderson, P.J. Hertzog, and B.S. Parker. 2012. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat. Med.* 18:1224–31. doi:10.1038/nm.2830.

Bigley, V., M. Naomi, P. Milne, R. Dickinson, S. Pagan, S. Cookson, M. Haniffa, and M. Collin. 2015. Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c+ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141^{high} XCR1+ dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 97:627–34. doi:10.1189/jlb.1HI0714-351R.

Blazek, K., H.L. Eames, M. Weiss, A.J. Byrne, D. Perocheau, J.E. Pease, S. Doyle, M. Fiona, R.O. Williams, and I.A. Udalova. 2015. IFN- λ resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 β production. 212:845–53. doi:10.1084/jem.20140995.

Blumer, T., C.-L. M, and F. of Biological 2017. SOCS1 is an inducible negative regulator of IFN lambda induced gene expression in vivo. *Journal of Biological* doi:10.1074/jbc.M117.788877.

Boasso, A., J.-P.P. Herbeuval, A.W. Hardy, S.A. Anderson, M.J. Dolan, D. Fuchs, and G.M. Shearer. 2007. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 109:3351–9. doi:10.1182/blood-2006-07-034785.

Bode, C., M. Fox, P. Tewary, A. Steinhagen, R.K. Ellerkmann, D. Klinman, G. Baumgarten, V. Hornung, and F. Steinhagen. 2016. Human plasmacytoid dendritic cells elicit a Type I Interferon response by sensing DNA via the cGAS-STING signaling pathway. *Eur. J. Immunol.* 46:1615–21. doi:10.1002/eji.201546113.

Bolen, C.R., S. Ding, M.D. Robek, and S.H. Kleinstein. 2014. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. 59:1262–72. doi:10.1002/hep.26657.

Boles, K.S., W. Barchet, T. Diacovo, M. Cella, and M. Colonna. 2005. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood.* 106:779–86. doi:10.1182/blood-2005-02-0817.

Boltjes, A., and F. van Wijk. 2014. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol.* 5:131. doi:10.3389/fimmu.2014.00131.

Böttcher, J., E. Bonavita, P. Chakravarty, and B.-H. Cell. 2018. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell.*

Böttcher, J.P., M. Beyer, F. Meissner, Z. Abdullah, J. Sander, B. Höchst, S. Eickhoff, J.C. Rieckmann, C. Russo, T. Bauer, T. Flecken, D. Giesen, D. Engel, S. Jung, D.H. Busch, U. Protzer, R. Thimme, M. Mann, C. Kurts, J.L. Schultze, W. Kastenmüller, and P.A. Knolle. 2015. Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nat Commun.* 6:8306. doi:10.1038/ncomms9306.

Brand, S., F. Beigel, T. Olszak, K. Zitzmann, S.T.T. Eichhorst, J.-M.M. Otte, J. Diebold, H. Diepolder, B. Adler, C.J. Auernhammer, B. Göke, and J. Dambacher. 2005. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289:G960-8. doi:10.1152/ajpgi.00126.2005.

Broggi, A., Y. Tan, F. Granucci, and I. Zanoni. 2017. IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat. Immunol.* doi:10.1038/ni.3821.

Broz, M.L., M. Binnewies, B. Boldajipour, A.E. Nelson, J.L. Pollack, D.J. Erle, A. Barczak, M.D. Rosenblum, A. Daud, D.L. Barber, S. Amigorena, van't V. J Laura, A.I. Sperling, D.M. Wolf, and M.F. Krummel. 2014. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell.* 26:638–652. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.007.

Bullens, D.M., A. Decraene, E. Dilissen, I. Meyts, K. De Boeck, L. Dupont, and J. Ceuppens. 2008. Type III IFN-lambda mRNA expression in sputum of adult and school-aged asthmatics. *Clin. Exp. Allergy*. 38:1459–67. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03045.x.

Burkart, C., K. Arimoto, T. Tang, X. Cong, N. Xiao, Y.-C.C. Liu, S.V. Kotenko, L.G. Ellies, and D.-E.E. Zhang. 2013. Usp18 deficient mammary epithelial cells create an antitumour environment driven by hypersensitivity to IFN- λ and elevated secretion of Cxcl10. *EMBO Mol Med*. 5:1035–50. doi:10.1002/emmm.201201864.

Burnet, F. 1957. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J*. 1:841–7.

Burnet, F. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 13:1–27.

C

Caminschi, I., A.I. Proietto, F. Ahmet, S. Kitsoulis, J. Shin Teh, J.C. Lo, A. Rizzitelli, L. Wu, D. Vremec, S.L. van Dommelen, I.K. Campbell, E. Maraskovsky, H. Braley, G.M. Davey, P. Mottram, N. van de Velde, K. Jensen, A.M. Lew, M.D. Wright, W.R. Heath, K. Shortman, and M.H. Lahoud. 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*. 112:3264–73. doi:10.1182/blood-2008-05-155176.

Caronni, N., F. Simoncello, F. Stafetta, C. Guarnaccia, R.-M. S Juan, B. Opitz, T. Galli, P.-G. Veronique, and F. Benvenuti. 2018. Downregulation of Membrane Trafficking Proteins and Lactate Conditioning Determine Loss of Dendritic Cell Function in Lung Cancer. *Cancer Res*. 78:1685–1699. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1307.

Carpentier, S., T.-P.P. Vu Manh, R. Chelbi, S. Henri, B. Malissen, M. Haniffa, F. Ginhoux, and M. Dalod. 2016. Comparative genomics analysis of mononuclear phagocyte subsets confirms homology between lymphoid tissue-resident and dermal XCR1(+) DCs in mouse and human and distinguishes them from Langerhans cells. *J. Immunol. Methods*. 432:35–49. doi:10.1016/j.jim.2016.02.023.

Casrouge, A., S.-Y. Zhang, C. Eidenschenk, E. Jouanguy, A. Puel, K. Yang, A. Alcais, C. Picard, N. Mahfoufi, and N. Nicolas. 2006. Herpes simplex

virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. 314:308–312. doi:10.1126/science.1128346.

Caux, C., D.-D. C, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*. 360:258–61. doi:10.1038/360258a0.

Caux, C., C. Massacrier, B. Dubois, J. Valladeau, D.-D. C, I. Durand, D. Schmitt, and S. Saeland. 1999. Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. *J. Leukoc. Biol*. 66:781–91.

Caux, C., A.-Y. S, K. Chemin, O. de Bouteiller, D.-N. MC, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik, and A. Vicari. 2000. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin. Immunopathol*. 22:345–69.

Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, D.-D. C, de S.-V. B, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. 184:695–706.

Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, and A.-O. medicine. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine*.

Chan, C.W., E. Crafton, H.-N.N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T.W. Dubensky, M.F. Stins, L.L. Lanier, D.M. Pardoll, and F. Housseau. 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat. Med*. 12:207–13. doi:10.1038/nm1352.

Chen, D.S., and I. Mellman. 2017. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 541:321–330. doi:10.1038/nature21349.

Chen, J., B. Markelc, J. Kaeppler, V.M.L.M. Ogundipe, Y. Cao, M. WG, and R.J. Muschel. 2018. STING-Dependent Interferon- λ 1 Induction in HT29 Cells, a Human Colorectal Cancer Cell Line, After Gamma-Radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 101:97–106. doi:10.1016/j.ijrobp.2018.01.091.

Chen, K., J. Liu, and C.-X. of autoimmunity. 2017. Regulation of type I interferon signaling in immunity

and inflammation: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*.

Chevolet, I., R. Speckaert, M. Schreuer, B. Neyns, O. Krysko, C. Bachert, M. Van Gele, N. van Geel, and L. Brochez. 2015. Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma. *J Transl Med*. 13:9. doi:10.1186/s12967-014-0376-x.

Chiappinelli, K.B., P.L. Strissel, A. Desrichard, H. Li, C. Henke, B. Akman, A. Hein, N.S. Rote, L.M. Cope, A. Snyder, V. Makarov, S. Buhu, D.J. Slamon, J.D. Wolchok, D.M. Pardoll, M.W. Beckmann, C.A. Zahnow, T. Merghoub, T.A. Chan, S.B. Baylin, and R. Strick. 2015. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 162:974–986. doi:10.1016/j.cell.2015.07.011.

Chu, C.-C.C., N. Ali, P. Karagiannis, P. Di Meglio, A. Skowera, L. Napolitano, G. Barinaga, K. Grys, S.-P. Ehsan, S.N. Karagiannis, M. Peakman, G. Lombardi, and F.O. Nestle. 2012. Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med*. 209:935–45. doi:10.1084/jem.20112583.

Cisse, B., M.L. Caton, M. Lehner, T. Maeda, S. Scheu, R. Locksley, D. Holmberg, C. Zweier, N.S. den Hollander, S.G. Kant, W. Holter, A. Rauch, Y. Zhuang, and B. Reizis. 2008. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell*. 135:37–48. doi:10.1016/j.cell.2008.09.016.

Coccia, E.M., M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M.E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande, and G. Uzé. 2004. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol*. 34:796–805. doi:10.1002/eji.200324610.

Cohn, L., B. Chatterjee, F. Esselborn, S.-S. Anna, N. Nakamura, C. Chalouni, B.-C.C. Lee, R. Vandlen, T. Keler, P. Lauer, D. Brockstedt, I. Mellman, and L. Delamarre. 2013. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *J. Exp. Med*. 210:1049–63. doi:10.1084/jem.20121251.

Colletti, N.J., H. Liu, A.C. Gower, Y.O. Alekseyev, C.W. Arendt, and M.H. Shaw. 2016. TLR3 Signaling Promotes the Induction of Unique Human BDCA-3 Dendritic Cell Populations. *Front Immunol*. 7:88. doi:10.3389/fimmu.2016.00088.

Collin, M., and V. Bigley. 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 154:3–20. doi:10.1111/imm.12888.

Collin, M., R. Dickinson, and V. Bigley. 2015. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br. J. Haematol*. 169:173–87. doi:10.1111/bjh.13317.

Conrad, C., J. Gregorio, Y. Wang, T. Ito, and M.-S. research. 2012. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3+ T-regulatory cells. *Cancer research*. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2271.

Contoli, M., S.D. Message, L.-S. Vatile, M.R. Edwards, P.A. Wark, N.W. Bartlett, T. Keadze, P. Mallia, L.A. Stanciu, H.L. Parker, L. Slater, L.-A. Anita, O.M. Kon, S.T. Holgate, D.E. Davies, S.V. Kosenko, A. Papi, and S.L. Johnston. 2006. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat. Med*. 12:1023–6. doi:10.1038/nm1462.

Contreras, V., C. Urien, R. Guiton, Y. Alexandre, T.-P.P. Vu Manh, T. Andrieu, K. Crozat, L. Jouneau, N. Bertho, M. Epardaud, J. Hope, A. Savina, S. Amigorena, M. Bonneau, M. Dalod, and S.-C. Isabelle. 2010. Existence of CD8 α -like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J. Immunol*. 185:3313–25. doi:10.4049/jimmunol.1000824.

Crozat, K., R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C.-A.A. Dutertre, E. Ventre, T.-P.P. Vu Manh, T. Baranek, A.K. Storset, J. Marvel, P. Boudinot, A. Hosmalin, S.-C. Isabelle, and M. Dalod. 2010a. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α + dendritic cells. *J. Exp. Med*. 207:1283–92. doi:10.1084/jem.20100223.

Crozat, K., R. Guiton, M. Guillems, S. Henri, T. Baranek, S.-C. Isabelle, B. Malissen, and M. Dalod. 2010b. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev*.

234:177–98. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00868.x.

Curtsinger, J.M., and M.F. Mescher. 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 22:333–340. doi:10.1016/j.coi.2010.02.013.

Czernielewski, J., and M. Demarchez. 1987. Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 88:17–20.

D

Dai, J., N.J. Megjugorac, G.E. Gallagher, R.Y. Yu, and G. Gallagher. 2009. IFN- λ 1 (IL-29) inhibits GATA3 expression and suppresses Th2 responses in human naive and memory T cells. *Blood.* 113:5829–38. doi:10.1182/blood-2008-09-179507.

Davidson, S., M. M Teresa, S. Crotta, H.H. Gad, E.M. Hessel, S. Beinke, R. Hartmann, and A. Wack. 2016. IFN λ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN α treatment. *EMBO Mol Med.* 8:1099–112. doi:10.15252/emmm.201606413.

De Monte, A., C.-V.V. Olivieri, S. Vitale, S. Bailleux, L. Castillo, V. Giordanengo, J.L. Maryanski, E. Segura, and A. Doglio. 2016. CD1c-Related DCs that Express CD207/Langerin, but Are Distinguishable from Langerhans Cells, Are Consistently Present in Human Tonsils. *Front Immunol.* 7:197. doi:10.3389/fimmu.2016.00197.

Deauvieau, F., V. Ollion, A.-C.C. Doffin, C. Achard, J.-F.F. Fonteneau, E. Verronese, I. Durand, R. Ghittoni, J. Marvel, D.-D. Colette, T. Walzer, H. Vie, I. Perrot, N. Goutagny, C. Caux, and V.-G. Jenny. 2015. Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *Int. J. Cancer.* 136:1085–94. doi:10.1002/ijc.29087.

Dellgren, C., H. Gad, O. Hamming, J. Melchjorsen, and R. Hartmann. 2009. Human interferon- λ 3 is a potent member of the type III interferon family. *Genes Immun.* 10:125–31. doi:10.1038/gene.2008.87.

Demedts, I.K., G.G. Brusselle, K.Y. Vermaelen, and R.A. Pauwels. 2005. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32:177–84. doi:10.1165/rcmb.2004-0279OC.

Deonarain, R., A. Verma, A.C. Porter, D.R. Gewert, L.C. Platanius, and E.N. Fish. 2003. Critical roles for IFN- β in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:13453–8. doi:10.1073/pnas.2230460100.

Dessarthe, B., A. Thedrez, J.-B.B. Latouche, F. Cabillic, A. Drouet, P. Daniel, C.T.T. de La Pintièrre, V. Catros, and O. Toutirais. 2013. CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cells triggers cell death of activated V γ 9V δ 2 T cells. *J. Immunol.* 190:4868–76. doi:10.4049/jimmunol.1202596.

Di Blasio, S., I.M. Wortel, D.A. van Bladel, L.E. de Vries, T. Duiveman-de Boer, K. Worah, N. de Haas, S.I. Buschow, I. de Vries, C.G. Figdor, and S.V. Hato. 2016. Human CD1c(+) DCs are critical cellular mediators of immune responses induced by immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 5:e1192739. doi:10.1080/2162402X.2016.1192739.

Di Pucchio, T., B. Chatterjee, S.-S. Anna, S. Clayton, A. Palazzo, M. Montes, Y. Xue, I. Mellman, J. Banchereau, and J.E. Connolly. 2008. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* 9:551–7. doi:10.1038/ni.1602.

Diamond, M.S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G.P. Dunn, J.M. Archambault, H. Lee, C.D. Arthur, J. White, U. Kalinke, K.M. Murphy, and R.D. Schreiber. 2011. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J. Exp. Med.* 208:1989–2003. doi:10.1084/jem.20101158.

Diana, J., T. Griseri, S. Lagaye, L. Beaudoin, E. Autrusseau, A.-S.S. Gautron, C. Tomkiewicz, A. Herbelin, R. Barouki, M. von Herrath, M. Dalod, and A. Lehuen. 2009. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner. *Immunity.* 30:289–99. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.017.

Dickensheets, H., F. Sheikh, O. Park, B. Gao, and R.P. Donnelly. 2013. Interferon- λ (IFN- λ) induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes, but not in lymphocytes or monocytes. 93:377–85. doi:10.1189/jlb.0812395.

Dieu-Nosjean, M.-C., oc Jérémy, N.A. Giraldo, C. prostaglandin E. and Sautès-Fridman, and W.H. Fridman. 2014. Tertiary lymphoid structures in

- cancer and beyond. *Trends Immunol.* 35:571–80. doi:10.1016/j.it.2014.09.006.
- Dieu-Nosjean, M.-C., A. Martine, C. Danel, D. Heudes, M. Wislez, V. Poulot, N. Rabbe, L. Laurans, E. Tartour, L. de Chaisemartin, S. Lebecque, W.-H.H. Fridman, and J. Cadranel. 2008. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* 26:4410–7. doi:10.1200/JCO.2007.15.0284.
- Dighe, A., E. Richards, L. Old, and R. Schreiber. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity.* 1:447–56.
- Dillon, S.M., L.M. Rogers, R. Howe, L.A. Hostetler, J. Buhrman, M. D. Martin, and C.C. Wilson. 2010. Human intestinal lamina propria CD1c+ dendritic cells display an activated phenotype at steady state and produce IL-23 in response to TLR7/8 stimulation. *J. Immunol.* 184:6612–21. doi:10.4049/jimmunol.1000041.
- Ding, S., K.-H. William, A. Iwasaki, and M.D. Robek. 2014a. Epigenetic reprogramming of the type III interferon response potentiates antiviral activity and suppresses tumor growth. *PLoS Biol.* 12:e1001758. doi:10.1371/journal.pbio.1001758.
- Ding, Y., A. Wilkinson, A. Idris, B. Fancke, O. Meredith, D. Khalil, X. Ju, M.H. Lahoud, I. Caminschi, K. Shortman, R. Rodwell, S. Vuckovic, and K.J. Radford. 2014b. FLT3-ligand treatment of humanized mice results in the generation of large numbers of CD141+ and CD1c+ dendritic cells in vivo. *J. Immunol.* 192:1982–9. doi:10.4049/jimmunol.1302391.
- Dolganiuc, A., K. Kodys, C. Marshall, B. Saha, S. Zhang, S. Bala, and G. Szabo. 2012. Type III interferons, IL-28 and IL-29, are increased in chronic HCV infection and induce myeloid dendritic cell-mediated FoxP3+ regulatory T cells. *PLoS ONE.* 7:e44915. doi:10.1371/journal.pone.0044915.
- Domanski, P., and O. Colamonici. 1996. The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:143–51.
- Donnelly, R.P., and S.V. Kotenko. 2010. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* 30:555–64. doi:10.1089/jir.2010.0078.
- Dorner, B.G., M.B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Güttler, A. Hutloff, H.W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, R.S. Jack, V. Henn, and R.A. Kroccek. 2009. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. 31:823–33. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.027.
- Doyle, S.E., H. Schreckhise, K.-D. Kien, K. Henderson, R. Rosler, H. Storey, L. Yao, H. Liu, F. Barahmandpour, P. Sivakumar, C. Chan, C. Birks, D. Foster, C.H. Clegg, W.-B. Perdita, S. Mihm, and K.M. Klucher. 2006. Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology.* 44:896–906. doi:10.1002/hep.21312.
- Dudziak, D., A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.-W.W. Lee, C.G. Park, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. 315:107–11. doi:10.1126/science.1136080.
- Dumoutier, L., A. Tounsi, T. Michiels, C. Sommereyns, S.V. Kotenko, and J.-C.C. Renauld. 2004. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. 279:32269–74. doi:10.1074/jbc.m404789200.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, K.C. Sheehan, V. Shankaran, R. Uppaluri, J.D. Bui, M.S. Diamond, C.M. Koebel, C. Arthur, J. White, and R.D. Schreiber. 2005. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* 6:722–9. doi:10.1038/ni1213.
- Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22:329–60. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
- Duong, F.H., G. Trincucci, T. Boldanova, D. Calabrese, B. Campana, I. Krol, S.C. Durand, L. Heydmann, M.B. Zeisel, T.F. Baumert, and M.H. Heim. 2014. IFN-λ receptor 1 expression is induced in chronic hepatitis C and correlates with the IFN-λ3 genotype and with nonresponsiveness to IFN-α therapies. *J. Exp. Med.* 211:857–68. doi:10.1084/jem.20131557.
- Dutertre, C.-A.A., L.-F.F. Wang, and F. Ginhoux. 2014. Aligning bona fide dendritic cell populations

across species. *Cell. Immunol.* 291:3–10. doi:10.1016/j.cellimm.2014.08.006.

Dzionek, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. Buck, and J. Schmitz. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol Baltim Md 1950.* 165:6037–46.

Dzionek, A., Y. Inagaki, K. Okawa, J. Nagafune, J. Röck, Y. Sohma, G. Winkels, M. Zysk, Y. Yamaguchi, and J. Schmitz. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol.* 63:1133–48.

E

Egli, A., D.M. Santer, O. Daire, K. Barakat, M. Syedbasha, M. Vollmer, A. Baluch, R. Bhat, J. Groenendyk, M.A. Joyce, L.F. Lisboa, B.S. Thomas, M. Battegay, N. Khanna, T. Mueller, D. Tyrrell, M. Houghton, A. Humar, and D. Kumar. 2014. IL-28B is a key regulator of B- and T-cell vaccine responses against influenza. *PLoS Pathog.* 10:e1004556. doi:10.1371/journal.ppat.1004556.

Esche, C., A. Gambotto, Y. Satoh, V. Gerein, P. Robbins, S. Watkins, M. Lotze, and M. Shurin. 1999. CD154 inhibits tumor-induced apoptosis in dendritic cells and tumor growth. *Eur. J. Immunol.* 29:2148–55. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2148::AID-IMMU2148>3.0.CO;2-F.

F

Faget, J., B.-V. Nathalie, M. Gobert, I. Durand, D. Olive, C. Biota, T. Bachelot, I. Treilleux, G.-L. Sophie, E. Lavergne, S. Chabaud, J.Y. Blay, C. Caux, and M.-C. Christine. 2012. ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4⁺ T cells. *72:6130–41.* doi:10.1158/0008-5472.can-12-2409.

Fernando, S.-F.-G., A. Young, D. Mittal, L. Martinet, C. Bruedigam, K. Takeda, C.E. Andoniou, D.-E. A Mariapia, G.R. Hill, and M.J. Smyth. 2015. NK cells require IL-28R for optimal *in vivo* activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112:E2376-84. doi:10.1073/pnas.1424241112.

Finotti, G., N. Tamassia, and M.A. Cassatella. 2016. Synergistic production of TNF α and IFN α by human

pDCs incubated with IFN λ 3 and IL-3. *Cytokine.* 86:124–131. doi:10.1016/j.cyto.2016.08.005.

Fridman, W.H., F. Pagès, S.-F. Catherine, and J. Galon. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer.* 12:298–306. doi:10.1038/nrc3245.

Fuertes, M.B., A.K. Kacha, J. Kline, S.-R.R. Woo, D.M. Kranz, K.M. Murphy, and T.F. Gajewski. 2011. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 208:2005–16. doi:10.1084/jem.20101159.

Fuertes, M.B., S.-R.R. Woo, B. Burnett, Y.-X.X. Fu, and T.F. Gajewski. 2013. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* 34:67–73. doi:10.1016/j.it.2012.10.004.

Fujimoto, C., Y. Nakagawa, K. Ohara, and H. Takahashi. 2004. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 16:55–63.

Fukami, T., H. Fukuhara, M. Kuramochi, T. Maruyama, K. Isogai, M. Sakamoto, S. Takamoto, and Y. Murakami. 2003. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int. J. Cancer.* 107:53–9. doi:10.1002/ijc.11348.

G

Gabrilovich, D., T. Ishida, T. Oyama, S. Ran, V. Kravtsov, S. Nadaf, and D. Carbone. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vivo*. *Blood.* 92:4150–66.

Gad, H.H., C. Dellgren, O.J. Hamming, S. Vends, S.R.R. Paludan, and R. Hartmann. 2009. Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family. *J. Biol. Chem.* 284:20869–75. doi:10.1074/jbc.M109.002923.

Galani, I.E., V. Triantafyllia, E.-E.E. Eleminiadou, O. Koltsida, A. Stavropoulos, M. Manioudaki, D. Thanos, S.E. Doyle, S.V. Kottenko, K. Thanopoulou, and E. Andreakos. 2017. Interferon- λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising

- Host Fitness. *Immunity*. 46:875-890.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.025.
- Galibert, L., G.S. Diemer, Z. Liu, R.S. Johnson, J.L. Smith, T. Walzer, M.R. Comeau, C.T. Rauch, M.F. Wolfson, R.A. Sorensen, A.-R.R. Van der Vuurst de Vries, D.G. Branstetter, R.M. Koelling, J. Scholler, W.C. Fanslow, P.R. Baum, J.M. Derry, and W. Yan. 2005. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J. Biol. Chem.* 280:21955–64. doi:10.1074/jbc.M502095200.
- Gauzzi, M., M. Del Cornò, and S. Gessani. 2010. Dissecting TLR3 signalling in dendritic cells. *Immunobiology*. 215:713–23. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.008.
- Ge, D., J. Fellay, A.J. Thompson, J.S. Simon, K.V. Shianna, T.J. Urban, E.L. Heinzen, P. Qiu, A.H. Bertelsen, A.J. Muir, M. Sulkowski, M. G John, and D.B. Goldstein. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 461:399–401. doi:10.1038/nature08309.
- Geissmann, F., D.-N. MC, C. Dezutter, J. Valladeau, S. Kayal, M. Leborgne, N. Brousse, S. Saeland, and J. Davoust. 2002. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J. Exp. Med.* 196:417–30.
- Gerlini, G., C. Urso, G. Mariotti, D.P. Gennaro, and P.-D. Clinical 2007. Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clinical*
- Gessani, S., L. Conti, M. Del Cornò, and F. Belardelli. 2014. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*. 6:1696–1723. doi:10.3390/toxins6061696.
- Ghinagow, R., J. De Meester, L.J. Cruz, C. Asford, S. Corgnac, M.-F. Elodie, D. Soulard, J. Fontaine, L. Chaperot, J. Charles, F. Soncin, M.-C. Fathia, J. Plumas, C. Faveeuw, and F. Trottein. 2017. Co-delivery of the NKT agonist α -galactosylceramide and tumor antigens to cross-priming dendritic cells breaks tolerance to self-antigens and promotes antitumor responses. *Oncoimmunology*. 6:e1339855. doi:10.1080/2162402X.2017.1339855.
- Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X.-M.M. Dai, E. Stanley, G.J. Randolph, and M. Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7:265–73. doi:10.1038/ni1307.
- Giraldo, N.A., E. Becht, F. Pagès, G. Skliris, V. Verkarre, Y. Vano, A. Mejean, S.-A. Nicolas, L. Lacroix, I. Natario, A. Lupo, M. Alifano, D. Damotte, A. Cazes, F. Triebel, G.J. Freeman, D.-N. C Marie-Caroline, S. Oudard, W.H. Fridman, and S.-F. Catherine. 2015. Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin. Cancer Res.* 21:3031–40. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2926.
- Gnjatic, S., V. Bronte, L.R. Brunet, M.O. Butler, M.L. Disis, J. Galon, L.G. Hakansson, B.A. Hanks, V. Karanikas, S.N. Khleif, J.M. Kirkwood, L.D. Miller, D.J. Schendel, I. Tanneau, J.M. Wigginton, and L.H. Butterfield. 2017. Identifying baseline immune-related biomarkers to predict clinical outcome of immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 5. doi:10.1186/s40425-017-0243-4.
- Goc, J., W.-H.H. Fridman, S.-F. Catherine, and D.-N. C Marie-Caroline. 2013. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. 2:e26836. doi:10.4161/onci.26836.
- Goubier, A., B. Dubois, H. Gheit, G. Joubert, V.-T. Florence, A.-P. Carine, G. Trinchieri, and D. Kaiserlian. 2008. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity*. 29:464–75. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.017.
- Gresser, I., F. Belardelli, C. Maury, M. Maunoury, and M. Tovey. 1983. Injection of mice with antibody to interferon enhances the growth of transplantable murine tumors. *J. Exp. Med.* 158:2095–107.
- Greter, M., I. Lelios, P. Pelczar, G. Hoeffel, J. Price, M. Leboeuf, T.M. Kündig, K. Frei, F. Ginhoux, M. Merad, and B. Becher. 2012. Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity*. 37:1050–1060. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.001.
- de Groen, R.A., A. Boltjes, J. Hou, B.-S.S. Liu, M. Fiona, J. Friborg, H.L. Janssen, and A. Boonstra. 2015a. IFN- λ -mediated IL-12 production in macrophages induces IFN- γ production in human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 45:250–9. doi:10.1002/eji.201444903.
- de Groen, R.A., Z.M. Groothuisink, B.-S.S. Liu, and A. Boonstra. 2015b. IFN- λ is able to augment TLR-

mediated activation and subsequent function of primary human B cells. *J. Leukoc. Biol.* 98:623–30. doi:10.1189/jlb.3A0215-041RR.

Grouard, G., M. Rissoan, and of ... F.-L. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *Journal of* doi:10.1084/jem.185.6.1101.

Guenterberg, K.D., V.P. Grignol, E.T. Raig, J.M. Zimmerer, A.N. Chan, F.M. Blaskovits, G.S. Young, G.J. Nuovo, B.L. Mundy, G.B. Lesinski, and W.E. Carson. 2010. Interleukin-29 binds to melanoma cells inducing Jak-STAT signal transduction and apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 9:510–20. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0461.

Guermontprez, P., J. Helft, C. Claser, S. Deroubaix, H. Karanje, A. Gazumyan, D.-J. Guillaume, S.B. Telerman, G. Breton, H.A. Schreiber, F.-S. Natalia, E. Billerbeck, M. Dorner, C.M. Rice, A. Ploss, F. Klein, M. Swiecki, M. Colonna, A.O. Kamphorst, M. Meredith, R. Niec, C. Takacs, F. Mikhail, A. Hari, D. Bosque, T. Eisenreich, M. Merad, Y. Shi, F. Ginhoux, L. Réna, B.C. Urban, and M.C. Nussenzweig. 2013. Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during Plasmodium infection. *Nat. Med.* 19:730–8. doi:10.1038/nm.3197.

Guiducci, C., G. Ott, J.H. Chan, E. Damon, C. Calacsan, T. Matray, K.-D.D. Lee, R.L. Coffman, and F.J. Barrat. 2006. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.* 203:1999–2008. doi:10.1084/jem.20060401.

Guilliams, M., C.-A. Dutertre, C.L. Scott, M. Naomi, D. Sichien, S. Chakarov, V.G. Sofie, J. Chen, M. Poidinger, D.P. Sofie, S.J. Tavernier, I. Low, S. Irac, C. Mattar, H. Sumatoh, G. Low, T. Chung, D. Chan, K. Tan, T. Hon, E. Fossum, B. Bogen, M. Choolani, J. Chan, A. Larbi, H. Luche, S. Henri, Y. Saeys, E. Newell, B.N. Lambrecht, B. Malissen, and F. Ginhoux. 2016. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity.* 45:669–684. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.015.

Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14:571–8. doi:10.1038/nri3712.

Guilliams, M., S. Henri, S. Tamoutounour, L. Ardouin, S.-C. Isabelle, M. Dalod, and B. Malissen. 2010. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 40:2089–94. doi:10.1002/eji.201040498.

H

den Haan, J., S. Lehar, and M. Bevan. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. 192:1685–96.

Hambleton, S., S. Salem, J. Bustamante, V. Bigley, B.-D. Stéphanie, J. Azevedo, A. Fortin, M. Haniffa, C.-G. Lourdes, C.M. Bacon, G. Menon, C. Trouillet, M. David, P. Carey, F. Ginhoux, L. Alsina, T.J. Zumwalt, X.-F.F. Kong, D. Kumararatne, K. Butler, M. Hubeau, J. Feinberg, A.-M. Saleh, A. Cant, L. Abel, D. Chaussabel, R. Doffinger, E. Talesnik, A. Grumach, A. Duarte, K. Abarca, M.-V. Dewton, D. Burk, A. Berghuis, F. Geissmann, M. Collin, J.-L.L. Casanova, and P. Gros. 2011. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 365:127–38. doi:10.1056/NEJMoa1100066.

Hamming, O.J., T.-D. Ewa, G. Vieyres, R. Dijkman, S.E. Jørgensen, H. Akhtar, P. Siupka, T. Pietschmann, V. Thiel, and R. Hartmann. 2013. Interferon lambda 4 signals via the IFNλ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *EMBO J.* 32:3055–65. doi:10.1038/emboj.2013.232.

Hanahan, D., and R. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell.*

Hanč, P., T. Fujii, S. Iborra, Y. Yamada, J. Huotari, O. Schulz, S. Ahrens, S. Kjaer, M. Way, D. Sancho, K. Namba, and C. Reis e Sousa. 2015. Structure of the Complex of F-Actin and DNGR-1, a C-Type Lectin Receptor Involved in Dendritic Cell Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens. *Immunity.* 42:839–849. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.009.

Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, M. Naomi, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.-N.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic

cells. *Immunity*. 37:60–73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012.

Harimoto, H., M. Shimizu, Y. Nakagawa, K. Nakatsuka, A. Wakabayashi, C. Sakamoto, and H. Takahashi. 2013. Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 91:545–55. doi:10.1038/icb.2013.38.

Hartung, E., M. Becker, A. Bachem, N. Reeg, A. Jäkel, A. Hutloff, H. Weber, C. Weise, C. Giesecke, V. Henn, S. Gurka, K. Anastassiadis, H.W. Mages, and R.A. Kroczeck. 2015. Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells in vivo via murine or human XCR1. *J. Immunol.* 194:1069–79. doi:10.4049/jimmunol.1401903.

Hashimoto, H., R. Ueda, K. Narumi, Y. Heike, T. Yoshida, and K. Aoki. 2014. Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. *Cancer Gene Ther.* 21:532–541. doi:10.1038/cgt.2014.60.

Headley, M.B., A. Bins, A. Nip, E.W. Roberts, M.R. Looney, A. Gerard, and M.F. Krummel. 2016. Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature*. 531:513–7. doi:10.1038/nature16985.

Heidkamp, G.F., J. Sander, C.H.K.H. Lehmann, L. Heger, N. Eissing, A. Baranska, J.J. Lühr, A. Hoffmann, K.C. Reimer, A. Lux, S. Söder, A. Hartmann, J. Zenk, T. Ulas, M. Naomi, C. Alexiou, B. Spriewald, A. Mackensen, G. Schuler, B. Schauf, A. Forster, R. Repp, P.A. Fasching, A. Purbojo, R. Cesnjevar, E. Ullrich, F. Ginhoux, A. Schlitzer, F. Nimmerjahn, J.L. Schultze, and D. Dudziak. 2016. Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci Immunol.* 1:eaai7677. doi:10.1126/sciimmunol.aai7677.

Hémont, C., A. Neel, M. Heslan, C. Braudeau, and R. Josien. 2013. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* 93:599–609. doi:10.1189/jlb.0912452.

Heng, T., M. Painter, K. Elpek, and L.-K.-V. Nature 2008. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nature*

Hieronymus, T., M. Zenke, J.-H.H. Baek, and K. Seré. 2015. The clash of Langerhans cell homeostasis in

skin: Should I stay or should I go? *Semin. Cell Dev. Biol.* 41:30–8. doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.009.

Hildner, K., B.T. Edelson, W.E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B.U. Schraml, E.R. Unanue, M.S. Diamond, R.D. Schreiber, T.L. Murphy, and K.M. Murphy. 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*. 322:1097–100. doi:10.1126/science.1164206.

Hoeffel, G., A.-C.C. Ripoché, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Escriou, P. Lebon, F. Heshmati, J.-G.G. Guillet, M. Gannagé, C.-Z. Sophie, N. Casartelli, O. Schwartz, H. De la Salle, D. Hanau, A. Hosmalin, and C. Marañón. 2007. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 27:481–92. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.021.

Hoffmann, T.K., M.-B. Jan, R.L. Ferris, J.T. Johnson, W.J. Storkus, and T.L. Whiteside. 2002. Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 8:1787–93.

Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi. 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 434:772–7. doi:10.1038/nature03464.

Hoshino, N., N. Katayama, T. Shibasaki, K. Ohishi, J. Nishioka, M. Masuya, Y. Miyahara, M. Hayashida, D. Shimomura, T. Kato, K. Nakatani, K. Nishii, K. Kuribayashi, T. Nobori, and H. Shiku. 2005. A novel role for Notch ligand Delta-1 as a regulator of human Langerhans cell development from blood monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 78:921–9. doi:10.1189/jlb.1204746.

Hsu, Y.-L.L., M.-Y.Y. Wang, L.-J.J. Ho, and J.-H.H. Lai. 2016. Dengue virus infection induces interferon-lambda1 to facilitate cell migration. *Sci Rep.* 6:24530. doi:10.1038/srep24530.

Hui, X., H. Chen, S. Zhang, X. Ma, X. Wang, and B. Huang. 2011. Antitumor activities of recombinant human interferon (IFN)- 1 in vitro and in xenograft models in vivo for colon cancer. 311:141–151.

Humbert, M., L. Guery, D. Brighthouse, S. Lemeille, and S. Hugues. 2018. Intratumoral CpG-B Promotes Antitumoral Neutrophil, cDC, and T-cell Cooperation without Reprogramming Tolerogenic

pDC. *Cancer Res.* 78:3280–3292. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2549.

Huntington, N.D. 2014. The unconventional expression of IL-15 and its role in NK cell homeostasis. *Immunol. Cell Biol.* 92:210–213. doi:10.1038/icb.2014.1.

I

Ibon, E.-G., A. Bosco, R. Dollner, G.R. Melum, M.H. Lexberg, A.C. Jones, S.A. Dheyauldeen, P.G. Holt, E.S. B\akekeveold, and F.L. Jahnsen. 2016. Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137:1872–1881.e12. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.025.

Iborra, S., H.M. Izquierdo, M.-L. María, B.-M. Noelia, C. Reis e Sousa, and D. Sancho. 2012. The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* 122:1628–43. doi:10.1172/JCI60660.

Idoyaga, J., A. Lubkin, C. Fiorese, M.H. Lahoud, I. Caminschi, Y. Huang, A. Rodriguez, B.E.E. Clausen, C.G. Park, C. Trumpfheller, and R.M. Steinman. 2011. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:2384–9. doi:10.1073/pnas.1019547108.

Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, and R. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178:479–88.

Ioannidis, I., F. Ye, M. B, and W.-M. of virology. 2013. TLR expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *Journal of virology.* doi:10.1128/JVI.01956-12.

Isaacs, A., J. Lindenmann, and R. Valentine. 1957. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc Royal Soc Lond Ser B Biological Sci.* 147:268–73.

Ishida, A., M. Ohta, M. Toda, T. Murata, T. Usui, K. Akita, M. Inoue, and H. Nakada. 2008. Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics.* 8:3342–9. doi:10.1002/pmic.200800039.

Ishigami, S., S. Ueno, M. Matsumoto, H. Okumura, T. Arigami, Y. Uchikado, T. Setoyama, H. Arima, K.

Sasaki, M. Kitazono, H. Shinchu, Y. Kijima, and S. Natsugoe. 2010. Prognostic value of CD208-positive cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 59:389–95. doi:10.1007/s00262-009-0758-8.

Ito, M., Y. Minamiya, H. Kawai, S. Saito, H. Saito, T. Nakagawa, K. Imai, M. Hirokawa, and J. Ogawa. 2006a. Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J. Immunol.* 176:5637–43.

Ito, T., H. Kanzler, O. Duramad, W. Cao, and Y.-J.J. Liu. 2006b. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood.* 107:2423–31. doi:10.1182/blood-2005-07-2709.

Ito, T., Y.-H.H. Wang, and Y.-J.J. Liu. 2005. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin. Immunopathol.* 26:221–9. doi:10.1007/s00281-004-0180-4.

Ito, T., M. Yang, Y.-H.H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O.A. Perng, X.-F.F. Qin, Y.-J.J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* 204:105–15. doi:10.1084/jem.20061660.

Iversen, M.B., and S.R.R. Paludan. 2010. Mechanisms of type III interferon expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 30:573–8. doi:10.1089/jir.2010.0063.

Iwamoto, M., H. Shinohara, A. Miyamoto, M. Okuzawa, H. Mabuchi, T. Nohara, G. Gon, M. Toyoda, and N. Tanigawa. 2003. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int. J. Cancer.* 104:92–7. doi:10.1002/ijc.10915.

Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987–95. doi:10.1038/ni1112.

J

Jablonska, J., S. Leschner, K. Westphal, S. Lienenklaus, and S. Weiss. 2010. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J. Clin. Invest.* 120:1151–1164. doi:10.1172/JCI37223.

- Jablonska, J., C.-F. Wu, L. Andzinski, S. Leschner, and S. Weiss. 2014. CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- β . *Int. J. Cancer*. 134:1346–1358. doi:10.1002/ijc.28551.
- Jahrsdörfer, B., A. Vollmer, S.E. Blackwell, J. Maier, K. Sontheimer, T. Beyer, B. Mandel, O. Lunov, K. Tron, G. Nienhaus, T. Simmet, K.-M.M. Debatin, G.J. Weiner, and D. Fabricius. 2010. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood*. 115:1156–65. doi:10.1182/blood-2009-07-235382.
- Jaiswal, S., C.H.M. Jamieson, W.W. Pang, C.Y. Park, M.P. Chao, R. Majeti, D. Traver, N. van Rooijen, and I.L. Weissman. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 138:271–285. doi:10.1016/j.cell.2009.05.046.
- James, B.R., E.L. Brincks, T.A. Kucaba, L. Boon, and T.S. Griffith. 2014. Effective TRAIL-based immunotherapy requires both plasmacytoid and CD8 α dendritic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 63:685–97. doi:10.1007/s00262-014-1548-5.
- Jardine, L., D. Barge, A.-D. A, and in ... P.-S. 2013. Rapid detection of dendritic cell and monocyte disorders using CD4 as a lineage marker of the human peripheral blood antigen-presenting cell compartment. *Frontiers in ...*
- Jin, J.-O.O., W. Zhang, J.-Y.Y. Du, and Q. Yu. 2014. BDCA1-positive dendritic cells (DCs) represent a unique human myeloid DC subset that induces innate and adaptive immune responses to *Staphylococcus aureus* Infection. *Infect. Immun.* 82:4466–76. doi:10.1128/IAI.01851-14.
- Joffre, O.P., D. Sancho, S. Zelenay, A.M. Keller, and C. Reis e Sousa. 2010. Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4 $^{+}$ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. *Eur. J. Immunol.* 40:1255–65. doi:10.1002/eji.201040419.
- Jongbloed, S.L., A.J. Kassianos, M. J. Kylie, G.J. Clark, X. Ju, C.E. Angel, C.-J.J. Chen, P. Dunbar, R.B. Wadley, V. Jeet, A.J. Vulink, D.N. Hart, and K.J. Radford. 2010. Human CD141 $^{+}$ (BDCA-3) $^{+}$ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. 207:1247–60. doi:10.1084/jem.20092140.
- Jordan, W., J. Eskdale, S. Srinivas, and and ... P.V. 2007. Human interferon lambda-1 (IFN- λ 1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes and ...* doi:10.1038/sj.gene.6364382.
- K**
- Kaplan, D.H., M.C. Jenison, S. Saeland, W.D. Shlomchik, and M.J. Shlomchik. 2005. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity*. 23:611–20. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.008.
- Kasimir, S., J. Brom, and K.-W. Immunology. 1991. Effect of interferon-alpha on neutrophil functions. *Immunology*.
- Kassianos, A.J., M.Y. Hardy, X. Ju, D. Vijayan, Y. Ding, A.J. Vulink, M. J. Kylie, S.L. Jongbloed, R.B. Wadley, C. Wells, D.N. Hart, and K.J. Radford. 2012. Human CD1c (BDCA-1) $^{+}$ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*. *Eur. J. Immunol.* 42:1512–22. doi:10.1002/eji.201142098.
- Katlinski, K.V., J. Gui, Y.V. Katlinskaya, A. Ortiz, R. Chakraborty, S. Bhattacharya, C.J. Carbone, D.P. Beiting, M.A. Gironde, A.R. Peck, E. Puré, P. Chatterji, A.K. Rustgi, J. Diehl, C. Koumenis, H. Rui, and S.Y. Fuchs. 2017. Inactivation of Interferon Receptor Promotes the Establishment of Immune Privileged Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 31:194–207. doi:10.1016/j.ccell.2017.01.004.
- Kelly, A., R. Fahey, J.M. Fletcher, C. Keogh, A.G. Carroll, R. Siddachari, J. Geoghegan, J.E. Hegarty, E.J. Ryan, and O. Cliona. 2014. CD141 $^{+}$ myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver. *J. Hepatol.* 60:135–42. doi:10.1016/j.jhep.2013.08.007.
- Kelly, A., M.W. Robinson, G. Roche, C.A. Biron, O. Cliona, and E.J. Ryan. 2016. Immune Cell Profiling of IFN- λ Response Shows pDCs Express Highest Level of IFN- λ R1 and Are Directly Responsive Via the JAK-STAT Pathway. *J Interf Cytokine Res Official J Int Soc Interf Cytokine Res*. doi:10.1089/jir.2015.0169.
- Kennedy, J., A. Vicari, V. Saylor, S. Zurawski, N. Copeland, D. Gilbert, N. Jenkins, and A. Zlotnik. 2000. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J. Leukoc. Biol.* 67:725–34.
- Kim, J.H., Y. Hu, T. Yongqing, J. Kim, V.A. Hughes, J. Le Nours, E.A. Marquez, A.W. Purcell, Q. Wan, M. Sugita, J. Rossjohn, and F. Winau. 2016. CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin

disease. *Nat. Immunol.* 17:1159–66. doi:10.1038/ni.3523.

Kim, S., M.-J. Kim, C.-H. Kim, J. Kang, H. Shin, D.-Y. Kim, T.-B. Won, D. Han, C. Rhee, and J.-H. Yoon. 2017. The Superiority of IFN- as a Therapeutic Candidate to Control Acute Influenza Viral Lung Infection. *56*:202–212.

Kim, T., S. Pazhoor, M. Bao, Z. Zhang, S. Hanabuchi, V. Facchinetti, L. Bover, J. Plumas, L. Chaperot, J. Qin, and Y.-J.J. Liu. 2010. Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:15181–6. doi:10.1073/pnas.1006539107.

Kini Bailur, J., B. Gueckel, and G. Pawelec. 2016. Prognostic impact of high levels of circulating plasmacytoid dendritic cells in breast cancer. *J Transl Med.* 14:151. doi:10.1186/s12967-016-0905-x.

Kirkwood, J., J. Ibrahim, J. Sosman, V. Sondak, S. Agarwala, M. Ernstoff, and U. Rao. 2001. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J. Clin. Oncol.* 19:2370–80. doi:10.1200/JCO.2001.19.9.2370.

Kirkwood, J.M., C. Bender, S. Agarwala, A. Tarhini, S.-S. Janice, B. Smelko, S. Donnelly, and L. Stover. 2002. Mechanisms and Management of Toxicities Associated With High-Dose Interferon Alfa-2b Therapy. *J Clin Oncol.* 20:3703–3718. doi:10.1200/JCO.2002.03.052.

Klechevsky, E., R. Morita, M. Liu, Y. Cao, S. Coquery, T.-S. Luann, F. Briere, D. Chaussabel, G. Zurawski, A. Palucka, Y. Reiter, J. Banchereau, and H. Ueno. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity.* 29:497–510. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.013.

Kleinman, M.E., K. Yamada, A. Takeda, V. Chandrasekaran, M. Nozaki, J.Z. Baffi, R.J. Albuquerque, S. Yamasaki, M. Itaya, Y. Pan, B. Appukuttan, D. Gibbs, Z. Yang, K. Karikó, B.K. Ambati, T.A. Wilgus, D. A Luisa, E. Sakurai, K. Zhang, J.R. Smith, E.W. Taylor, and J. Ambati. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis

suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* 452:591–7. doi:10.1038/nature06765.

Koch, S., and S. Finotto. 2015. Role of Interferon- λ in Allergic Asthma. 7:224–30. doi:10.1159/000369459.

Koltsida, O., M. Hausding, A. Stavropoulos, S. Koch, G. Tzelepis, C. Übel, S.V. Kotenko, P. Sideras, H.A. Lehr, M. Tepe, K.M. Klucher, S.E. Doyle, M.F. Neurath, S. Finotto, and E. Andreakos. 2011. IL-28A (IFN- λ 2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease. *Embo Mol Med.* 3:348–361. doi:10.1002/emmm.201100142.

Kotenko, S.V., G. Gallagher, V.V. Baurin, L.-A. Anita, M. Shen, N.K. Shah, J.A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, and R.P. Donnelly. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4:69–77. doi:10.1038/ni875.

Kotenko, S.V., and J.A. Langer. 2004. Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *Int. Immunopharmacol.* 4:593–608. doi:10.1016/j.intimp.2004.01.003.

Krämer, B., M. Eisenhardt, and of the ... G.A. 2011. Do λ -IFNs IL28A and IL28B act on human natural killer cells? *Proceedings of the*

Kremski, J., L. Karyampudi, M.D. Behrens, C.L. Erskine, L. Hartmann, H. Dong, E.L. Goode, K.R. Kalli, and K.L. Knutson. 2011. Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *J. Immunol.* 186:6905–13. doi:10.4049/jimmunol.1100274.

L

Labidi-Galy, S., V. Sisirak, P. Meeus, M. Gobert, I. Treilleux, A. Bajard, J.-D. Combes, J. Faget, F. Mithieux, A. Cassagnol, O. Tredan, I. Durand, M.-C. Christine, C. Caux, J.-Y. Blay, R.-C. Isabelle, and B.-V. Nathalie. 2011. Quantitative and Functional Alterations of Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Immune Tolerance in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 71:5423–5434. doi:10.1158/0008-5472.can-11-0367.

Labidi-Galy, S., I. Treilleux, S. Goddard-Léon, J.-D. Combes, J.-Y. Blay, R.-C. Isabelle, C. Caux, and B.-V. Nathalie. 2014. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor

prognosis. *Oncoimmunology*. 1:380–382. doi:10.4161/onci.18801.

Ladányi, A., J. Kiss, B. Somlai, K. Gilde, Z. Fejos, A. Mohos, I. Gaudi, and J. Tímár. 2007. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1459–69. doi:10.1007/s00262-007-0286-3.

Lahoud, M.H., F. Ahmet, S. Kitsoulis, S.S. Wan, D. Vremec, C.-N.N. Lee, B. Phipson, W. Shi, G.K. Smyth, A.M. Lew, Y. Kato, S.N. Mueller, G.M. Davey, W.R. Heath, K. Shortman, and I. Caminschi. 2011. Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype. *J. Immunol.* 187:842–50. doi:10.4049/jimmunol.1101176.

Langerhans, P. 1868. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. 44:325–337. doi:10.1007/BF01959006.

Laoui, D., J. Keirsse, Y. Morias, E. Van Overmeire, X. Geeraerts, Y. Elkrim, M. Kiss, E. Bolli, Q. Lahmar, D. Sichien, J. Serneels, C.L. Scott, L. Boon, P. De Baetselier, M. Mazzone, M. Guillems, and J.A. Van Ginderachter. 2016. The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun.* 7:13720. doi:10.1038/ncomms13720.

Lasfar, A., L.-A. Anita, S.V. Smirnov, S. Anantha, W. Abushahba, B. Tian, K. Reuhl, H. Dickensheets, F. Sheikh, R.P. Donnelly, E. Raveche, and S.V. Kotenko. 2006. Characterization of the Mouse IFN- λ Ligand-Receptor System: IFN- λ s Exhibit Antitumor Activity against B16 Melanoma. *Cancer Res.* 66:4468–4477. doi:10.1158/0008-5472.can-05-3653.

Lasfar, A., A. Zloza, and C.-S. A Karine. 2016. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. 21:167–171. doi:10.1016/j.drudis.2015.10.021.

Lauterbach, H., B. Bathke, S. Gilles, T.-H. Claudia, C.A. Luber, G. Fejer, M.A. Freudenberg, G.M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, L. Wu, K. Shortman, P. Chaplin, M. Suter, O. Meredith, and H. Hochrein. 2010. Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J. Exp. Med.* 207:2703–17. doi:10.1084/jem.20092720.

Lavin, Y., S. Kobayashi, A. Leader, E.-A.D. Amir, N. Elefant, C. Bigenwald, R. Remark, R. Sweeney, C.D. Becker, J.H. Levine, K. Meinhof, A. Chow, K.-S. Seunghee, A. Wolf, C. Medaglia, H. Li, J.A. Rytlewski, R.O. Emerson, A. Solovyov, B.D. Greenbaum, C. Sanders, M. Vignali, M.B. Beasley, R. Flores, S. Gnjatich, D. Pe'er, A. Rahman, I. Amit, and M. Merad. 2017. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell*. 169:750–765.e17. doi:10.1016/j.cell.2017.04.014.

Le Mercier, I., D. Poujol, A. Sanlaville, V. Sisirak, M. Gobert, I. Durand, B. Dubois, I. Treilleux, J. Marvel, J. Vlach, J.-Y.Y. Blay, B.-V. Nathalie, C. Caux, I. Puisieux, and N. Goutagny. 2013. Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res.* 73:4629–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3058.

Leach, D., M. Krummel, and J. Allison. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade.

Lee, H.-C.C., S. Narayanan, S.-J.J. Park, S.-Y.Y. Seong, and Y.S. Hahn. 2014. Transcriptional regulation of IFN- λ genes in hepatitis C virus-infected hepatocytes via IRF-3-IRF-7-NF- κ B complex. *J. Biol. Chem.* 289:5310–9. doi:10.1074/jbc.M113.536102.

Lee, J., G. Breton, T.Y. Oliveira, Y.J. Zhou, A. Aljoufi, S. Pühr, M.J. Cameron, R.-P.P. Sékaly, M.C. Nussenzweig, and K. Liu. 2015. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* 212:385–99. doi:10.1084/jem.20141442.

Lei, Y., A.M. Ripen, N. Ishimaru, I. Ohigashi, T. Nagasawa, L.T. Jeker, M.R. Bösl, G.A. Holländer, Y. Hayashi, R. de W. Malefyt, T. Nitta, and Y. Takahama. 2011. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 208:383–94. doi:10.1084/jem.20102327.

León, B., L.-B. María, and C. Ardavín. 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity*. 26:519–31. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.017.

Lespagnard, L., D. Gancberg, G. Rouas, G. Leclercq, N. de Saint-Aubain Somerhausen, A. Di Leo, M. Piccart, A. Verhest, and D. Larsimont. 1999. Tumor-

infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int. J. Cancer*. 84:309–14.

Levy, D.E., I.J. Marié, and J.E. Durbin. 2011. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol*. 1:476–86. doi:10.1016/j.coviro.2011.11.001.

Lewko, B., A. Zóltowska, J. Stepieński, and R.-A. Sci 2000. Dendritic and cancer cells in the breast tumors—An immunohistochemical study. *Med Sci*

Li, J., F. Ahmet, L.C. Sullivan, A.G. Brooks, S.J. Kent, R. De Rose, A.M. Salazar, C. Reis e Sousa, K. Shortman, M.H. Lahoud, W.R. Heath, and I. Caminschi. 2015. Antibodies targeting Clec9A promote strong humoral immunity without adjuvant in mice and non-human primates. *Eur. J. Immunol*. 45:854–64. doi:10.1002/eji.201445127.

Li, W., L.-A. A, J. Huang, M. Balan, and S. Kotenko. 2008. Regulation of apoptosis by type III interferons. *Cell Prolif*. 41:960–979. doi:10.1111/j.1365-2184.2008.00558.x.

Li, Y., C. Kuo, G. Shi, and W.-H. of. 2012. The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation. *Journal of*

Lievens, D., K.L. Habets, A.-K.K. Robertson, Y. Laouar, H. Winkels, T. Rademakers, L. Beckers, E. Wijnands, L. Boon, M. Mosaheb, A.-O. Hafid, Z. Mallat, R.A. Flavell, M. Rudling, C.J. Binder, N. Gerdes, E.A. Biessen, C. Weber, M.J. Daemen, J. Kuiper, and E. Lutgens. 2013. Abrogated transforming growth factor beta receptor II (TGFβRII) signalling in dendritic cells promotes immune reactivity of T cells resulting in enhanced atherosclerosis. *Eur. Heart J*. 34:3717–27. doi:10.1093/eurheartj/ehs106.

Lindstedt, M., K. Lundberg, and C.A. Borrebaeck. 2005. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J. Immunol*. 175:4839–46.

Liu, B., S. Chen, Y. Guan, and C.-L. one. 2015. Type III interferon induces distinct SOCS1 expression pattern that contributes to delayed but prolonged activation of Jak/STAT signaling pathway: implications *PloS one*.

Liu, B., H. Janssen, and A. Boonstra. 2012. Type I and III interferons enhance IL-10R expression on human monocytes and macrophages, resulting in IL-10-mediated suppression of TLR-induced IL-12. *Eur J Immunol*. 42:2431–2440. doi:10.1002/eji.201142360.

Liu, B.-S.S., H.L. Janssen, and A. Boonstra. 2011. IL-29 and IFNα differ in their ability to modulate IL-12 production by TLR-activated human macrophages and exhibit differential regulation of the IFNγ receptor expression. *Blood*. 117:2385–95. doi:10.1182/blood-2010-07-298976.

Loré, K., M.R. Betts, J.M. Brenchley, J. Kuruppu, S. Khojasteh, S. Perfetto, M. Roederer, R.A. Seder, and R.A. Koup. 2003. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J. Immunol*. 171:4320–4328.

Lorenzi, S., F. Mattei, A. Sistigu, L. Bracci, F. Spadaro, M. Sanchez, M. Spada, F. Belardelli, L. Gabriele, and G. Schiavoni. 2011. Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8α(+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming. *J. Immunol*. 186:5142–5150. doi:10.4049/jimmunol.1004163.

Ludmila, P.-O., B. Muchmore, W. Tang, R.M. Pfeiffer, H. Park, H. Dickensheets, D. Hergott, P.-G. Patricia, A. Mumy, I. Kohaar, S. Chen, N. Brand, M. Tarway, L. Liu, F. Sheikh, J. Astemborski, H.L. Bonkovsky, B.R. Edlin, C.D. Howell, T.R. Morgan, D.L. Thomas, B. Rehermann, R.P. Donnelly, and O. R Thomas. 2013. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet*. 45:164–71. doi:10.1038/ng.2521.

M

MacDonald, K., D.J. Munster, G.J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, and D.N. Hart. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. 100:45124520. doi:10.1182/blood-2001-11-0097.

Madera, S., M. Rapp, M.A. Firth, J.N. Beilke, L.L. Lanier, and J.C. Sun. 2016. Type I IFN promotes NK cell expansion during viral infection by protecting NK cells against fratricide. *J. Exp. Med*. 213:225–33. doi:10.1084/jem.20150712.

Maher, S.G., F. Sheikh, A.J. Scarzello, R.-W. L Ana, D.P. Baker, R.P. Donnelly, and A.M. Gamero. 2008. IFNα and IFNλ differ in their

antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity. *Cancer Biol. Ther.* 7:1109–15.

Majeti, R., M.P. Chao, A.A. Alizadeh, W.W. Pang, S. Jaiswal, K.D. Gibbs, N. van Rooijen, and I.L. Weissman. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell.* 138:286–299. doi:10.1016/j.cell.2009.05.045.

Mantegazza, A.R., J.G. Magalhaes, S. Amigorena, and M.S. Marks. 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic.* 14:135–52. doi:10.1111/tra.12026.

Marcello, T., A. Grakoui, B.-S. Giovanna, E.S. Machlin, S.V. Kotenko, M. R. Margaret, and C.M. Rice. 2006. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *J. Virol.* 80:1887–98. doi:10.1053/j.viro.2006.09.052.

Marquet, F., T.-P.P. Vu Manh, P. Maisonnasse, E.-Y. Jamila, C. Urien, E. Bouguyon, L. Jouneau, M. Bourge, G. Simon, A. Ezquerro, J. Lecardonnel, M. Bonneau, M. Dalod, S.-C. Isabelle, and N. Bertho. 2014. Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *J. Immunol.* 193:5883–93. doi:10.4049/jimmunol.1303150.

Martinet, L., T. Filleron, S. Le Guellec, P. Rochaix, I. Garrido, and J.-P.P. Girard. 2013. High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β -producing dendritic cells in human breast cancer. *J. Immunol.* 191:2001–8. doi:10.4049/jimmunol.1300872.

Martinez, J., X. Huang, and Y. Yang. 2008. Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. *J. Immunol.* 180:1592–7.

Martínez-Cingolani, C., and M. Grandclaudon. 2014. Human blood BDCA-1 dendritic cells differentiate into Langerhans-like cells with thymic stromal lymphopoietin and TGF- β . *Blood.*

Matsumoto, M., and T. Seya. 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:805–12. doi:10.1016/j.addr.2007.11.005.

Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli, and D.F. Tough. 2001. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J. Immunol.* 167:1179–1187.

Meager, A., K. Visvalingam, P. Dilger, D. Bryan, and M. Wadhwa. 2005. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Immunol. Rev.* 211:109–18. doi:10.1016/j.cyt.2005.04.003.

Megjugorac, N.J., G.E. Gallagher, and G. Gallagher. 2009. Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN-lambda1 (IL-29). *J. Leukoc. Biol.* 86:1359–63. doi:10.1189/jlb.0509347.

Mellman, I., and R. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106:255–8.

Mendoza, J.L., W.M. Schneider, H.-H.H. Hoffmann, K. Vercauteren, K.M. Jude, A. Xiong, I. Moraga, T.M. Horton, J.S. Glenn, Y.P. de Jong, C.M. Rice, and K. Garcia. 2017. The IFN- λ -IFN- λ R1-IL-10R β Complex Reveals Structural Features Underlying Type III IFN Functional Plasticity. *Immunity.* 46:379–392. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.017.

Mennechet, F.J., and G. Uzé. 2006. Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. *Blood.* 107:4417–23. doi:10.1182/blood-2005-10-4129.

Merad, M., and M.G. Manz. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood.* 113:3418–27. doi:10.1182/blood-2008-12-180646.

Meredith, O., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J.L. Miller, E. Anders, L. Wu, M.H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman. 2002. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196:1307–19.

Michea, P., F. Noël, E. Zakine, U. Czerwinska, P. Sirven, O. Abouzid, C. Goudot, S.-D. Alix, V.-S. Anne, F. Rey, S. Amigorena, G.-D. Maude, E. Segura, and V. Soumelis. 2018. Adjustment of dendritic cells to the breast-cancer microenvironment is subset specific. *Nat. Immunol.* 19:885–897. doi:10.1038/s41590-018-0145-8.

- Miknis, Z.J., E. Magracheva, W. Li, A. Zdanov, S.V. Kotenko, and A. Wlodawer. 2010. Crystal structure of human interferon- λ 1 in complex with its high-affinity receptor interferon- λ R1. *J. Mol. Biol.* 404:650–64. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.068.
- Miller, J.C., B.D. Brown, T. Shay, E.L. Gautier, V. Jojic, A. Cohain, G. Pandey, M. Leboeuf, K.G. Elpek, J. Helft, D. Hashimoto, A. Chow, J. Price, M. Greter, M. Bogunovic, B.-P. Angelique, P.S. Frenette, G.J. Randolph, S.J. Turley, and M. and Merad. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13:888–99. doi:10.1038/ni.2370.
- Milne, P., V. Bigley, M. Gunawan, M. Haniffa, and C.-M. Blood. 2015. CD1c+ blood dendritic cells have Langerhans cell potential. *Blood*.
- Mittag, D., A.I. Proietto, T. Loudovaris, S.I. Mannering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu, and L.C. Harrison. 2011. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. 1002632. doi:10.4049/jimmunol.1002632.
- Mittal, S.K., and P.A. Roche. 2015. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* 34:22–7. doi:10.1016/j.coi.2014.12.009.
- Montoya, M., G. Schiavoni, F. Mattei, and G.-I. Blood. 2002. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood*.
- Morrow, M.P., J. Yan, P. Pankhong, D.J. Shedlock, M.G. Lewis, K. Talbott, R. Toporovski, A.S. Khan, N.Y. Sardesai, and D.B. Weiner. 2010. IL-28B/IFN- λ 3 drives granzyme B loading and significantly increases CTL killing activity in macaques. *Mol. Ther.* 18:1714–23. doi:10.1038/mt.2010.118.
- Movassagh, M., A. Spatz, J. Davoust, S. Lebecque, P. Romero, M. Pittet, D. Rimoldi, D. Liénard, O. Gugerli, L. Ferradini, C. Robert, M.-F. Avril, L. Zitvogel, and E. Angevin. 2004. Selective accumulation of mature DC-Lamp+ dendritic cells in tumor sites is associated with efficient T-cell-mediated antitumor response and control of metastatic dissemination in melanoma. *Cancer Res.* 64:2192–8.
- Muir, A.J., S. Arora, G. Everson, R. Flisiak, J. George, R. Ghalib, S.C. Gordon, T. Gray, S. Greenbloom, T. Hassanein, J. Hillson, M.A. Horga, I.M. Jacobson, L. Jeffers, K.V. Kowdley, E. Lawitz, S. Lueth, R.-T. Maribel, V. Rustgi, L. Shemanski, M.L. Shiffman, S. Srinivasan, H.E. Vargas, J.M. Vierling, D. Xu, L.-T. C. Juan, and S. and Zeuzem. 2014. A randomized phase 2b study of peginterferon λ 1a for the treatment of chronic HCV infection. *J. Hepatol.* 61:1238–46. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.022.
- Müller, L., P. Aigner, and D. Stoiber. 2017. Type I Interferons and Natural Killer Cell Regulation in Cancer. *Front Immunol.* 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00304.
- Müller, U., U. Steinhoff, L. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. Zinkernagel, and M. Aguet. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. 264:1918–21.
- Murakami, Y. 2005. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci.* 96:543–52. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00089.x.
- Murata, K., M. Sugiyama, T. Kimura, S. Yoshio, T. Kanto, I. Kirikae, H. Saito, Y. Aoki, S. Hiramane, T. Matsui, K. Ito, M. Korenaga, M. Imamura, N. Masaki, and M. Mizokami. 2014a. Ex vivo induction of IFN- λ 3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J. Gastroenterol.* 49:126–37. doi:10.1007/s00535-013-0814-1.
- Murata, Y., T. Kotani, H. Ohnishi, and T. Matozaki. 2014b. The CD47-SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J. Biochem.* 155:335–44. doi:10.1093/jb/mvu017.
- Murphy, T.L., G.-R. E Gary, X. Wu, R. Tussiwand, C.G. Briseño, A. Iwata, N.M. Kretzer, V. Durai, and K.M. Murphy. 2016. Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* 34:93–119. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120204.
- N**
- Nagorsen, D., S. Voigt, E. Berg, H. Stein, E. Thiel, and C. Loddenkemper. 2007. Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med.* 5:62. doi:10.1186/1479-5876-5-62.
- Nancy, A.-Y., R. Mandhana, and C.M. Horvath. 2013. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAKSTAT.* 2:e23931. doi:10.4161/jkst.23931.

Nizzoli, G., J. Krietsch, A. Weick, S. Steinfelder, and F.-F. Blood. 2013. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T cell responses. *Blood*.

Nizzoli, G., P. Larghi, M. Paroni, M.C. Crosti, M. Moro, P. Neddermann, F. Caprioli, M. Pagani, R. De Francesco, S. Abrignani, and J. Geginat. 2016. IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8(+) memory T cells and, when produced by CD1c(+) DCs, shapes naive CD8(+) T-cell priming. *Eur. J. Immunol.* 46:1622–32. doi:10.1002/eji.201546136.

Numasaki, M., M. Tagawa, F. Iwata, T. Suzuki, A. Nakamura, M. Okada, Y. Iwakura, S. Aiba, and M. Yamaya. 2007. IL-28 elicits antitumor responses against murine fibrosarcoma. *J Immunol Baltim Md* 1950. 178:5086–98.

O

O'Brien, T., L. Prokunina-Olsson, and R.P. Donnelly. 2014. IFN- λ 4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. *J. Interferon Cytokine Res.* 34:829–38. doi:10.1089/jir.2013.0136.

Odendall, C., E. Dixit, F. Stavru, H. Bierne, K.M. Franz, A.F. Durbin, S. Boulant, L. Gehrke, P. Cossart, and J.C. Kagan. 2014. Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat. Immunol.* 15:717–26. doi:10.1038/ni.2915.

Odendall, C., and J.C. Kagan. 2015. The unique regulation and functions of type III interferons in antiviral immunity. *Curr Opin Virol.* 12:47–52. doi:10.1016/j.coviro.2015.02.003.

O'Neill, L., D. Golenbock, and A.G. Bowie. 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13:453–60. doi:10.1038/nri3446.

Onodera, K., T. Fujiwara, Y. Onishi, I.-N. Ari, Y. Okitsu, N. Fukuhara, K. Ishizawa, R. Shimizu, M. Yamamoto, and H. Harigae. 2016. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood*. 128:508–18. doi:10.1182/blood-2016-02-698118.

Onoguchi, K., M. Yoneyama, A. Takemura, S. Akira, T. Taniguchi, H. Namiki, and T. Fujita. 2007. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282:7576–81. doi:10.1074/jbc.M608618200.

Osterlund, P.I., T.E. Pietilä, V. Veckman, S.V. Kotenko, and I. Julkunen. 2007. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN- λ) genes. *J. Immunol.* 179:3434–42.

Ouyang, W., S. Rutz, N.K. Crellin, P.A. Valdez, and S.G. Hymowitz. 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29:71–109. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312.

P

Pace, L., S. Vitale, B. Dettori, C. Palombi, V. La Sorsa, F. Belardelli, E. Proietti, and G. Doria. 2010. APC activation by IFN- α decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions. *J. Immunol.* 184:5969–5979. doi:10.4049/jimmunol.0900526.

Paolini, R., G. Bernardini, R. Molfetta, and A. Santoni. 2015. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26:113–20. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.11.003.

Park, H.-Y.Y., A. Light, M.H. Lahoud, I. Caminschi, D.M. Tarlinton, and K. Shortman. 2013. Evolution of B cell responses to Clec9A-targeted antigen. *J. Immunol.* 191:4919–25. doi:10.4049/jimmunol.1301947.

Pasquali, S., and S. Mocellin. 2010. The anticancer face of interferon alpha (IFN- α): from biology to clinical results, with a focus on melanoma. *Curr. Med. Chem.* 17:3327–36.

Patricia, B.-A., P.-C. Begoña, I.-U. Nuria, M.C. Puertas, M.-P. Javier, P.-B. Ricardo, N.-G. Mar, and F.E. Borràs. 2012. Capture of cell-derived microvesicles (exosomes and apoptotic bodies) by human plasmacytoid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 91:751–8. doi:10.1189/jlb.0111054.

Péguet-Navarro, J., M. Sportouch, I. Popa, O. Berthier, D. Schmitt, and J. Portoukalian. 2003. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol.* 170:3488–94.

Perrot, I., D. Blanchard, N. Freymond, S. Isaac, B. Guibert, Y. Pachéco, and S. Lebecque. 2007. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J. Immunol.* 178:2763–9. doi:10.4049/jimmunol.178.5.2763.

Pervolaraki, K., M.L. Stanifer, S. Münchau, L.A. Renn, D. Albrecht, S. Kurzhals, E. Senís, D. Grimm, S.-B.

- Jutta, R.L. Rabin, and S. Boulant. 2017. Type I and Type III Interferons Display Different Dependency on Mitogen-Activated Protein Kinases to Mount an Antiviral State in the Human Gut. *Front Immunol.* 8:459. doi:10.3389/fimmu.2017.00459.
- Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202:8–32. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x.
- Phillips, S., S. Mistry, A. Riva, H. Cooksley, H.-L. Tanya, S. Plavova, K. Katzarov, M. Simonova, S. Zeuzem, C. Woffendin, P.-J.J. Chen, C.-Y.Y. Peng, T.-T.T. Chang, S. Lueth, R. De Knecht, M.-S.S. Choi, H. Wedemeyer, M. Dao, C.-W.W. Kim, H.-C.C. Chu, W.-R. Megan, R. Williams, E. Cooney, and S. Chokshi. 2017. Peg-Interferon Lambda Treatment Induces Robust Innate and Adaptive Immunity in Chronic Hepatitis B Patients. *Front Immunol.* 8:621. doi:10.3389/fimmu.2017.00621.
- Picco, G., R. Beatson, T.-P. Joyce, and J.M. Burchell. 2014. Targeting DNNGR-1 (CLEC9A) with antibody/MUC1 peptide conjugates as a vaccine for carcinomas. *Eur. J. Immunol.* 44:1947–55. doi:10.1002/eji.201344076.
- Piganis, R.A., N.A. De Weerd, J.A. Gould, C.W. Schindler, A. Mansell, S.E. Nicholson, and P.J. Hertzog. 2011. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2. *J. Biol. Chem.* 286:33811–8. doi:10.1074/jbc.M111.270207.
- Pinzon-Charry, A., C. Ho, T. Maxwell, M. MA, C. Schmidt, C. Furnival, C. Pyke, and J. López. 2007. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br. J. Cancer.* 97:1251–9. doi:10.1038/sj.bjc.6604018.
- Platanias, L.C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5:375–86. doi:10.1038/nri1604.
- Pooley, J., W. Heath, and K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. 166:5327–30.
- Poulin, L.F., Y. Rey, U.-H. Heli, B.U. Schraml, D. Sancho, K.M. Murphy, U.K. Håkansson, L.F. Moita, W.W. Agace, D. Bonnet, and C. Reis e Sousa. 2012. DNNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood.* 119:6052–62. doi:10.1182/blood-2012-01-406967.
- Poulin, L.F., M. Salio, E. Griessinger, A.-A. Fernando, L. Craciun, J.-L.L. Chen, A.M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, D. Bonnet, and C. Reis e Sousa. 2010. Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:1261–71. doi:10.1084/jem.20092618.
- Proietto, A., D. Mittag, A. Roberts, N. Sprigg, and L. Wu. 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. *Cell. Mol. Immunol.* 9:446–54. doi:10.1038/cmi.2012.48.
- R**
- Ramos, R.N., L.S. Chin, A.P. Dos Santos, B.-S. C. Patrícia C., F. Laginha, and J.A.A. Barbuto. 2012. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 92:673–82. doi:10.1189/jlb.0112048.
- Rautela, J., N. Baschuk, C.Y. Slaney, K.M. Jayatileke, K. Xiao, B.N. Bidwell, E.C. Lucas, E.D. Hawkins, P. Lock, C.S. Wong, W. Chen, R.L. Anderson, P.J. Hertzog, D.M. Andrews, A. Möller, and B.S. Parker. 2015. Loss of Host Type-I IFN Signaling Accelerates Metastasis and Impairs NK-cell Antitumor Function in Multiple Models of Breast Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 3:1207–17. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0065.
- Reid, E., N. Juleff, M. Windsor, S. Gubbins, L. Roberts, S. Morgan, G. Meyers, P.-M. Eva, E. Tchilian, B. Charleston, and J. Seago. 2016. Type I and III IFNs Produced by Plasmacytoid Dendritic Cells in Response to a Member of the Flaviviridae Suppress Cellular Immune Responses. *J. Immunol.* 196:4214–26. doi:10.4049/jimmunol.1600049.
- Reis e Sousa, C., P. Stahl, and J. Austyn. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178:509–19.
- Robbins, S.H., T. Walzer, D. Dembélé, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, F.R. Sharp, S. Chan, P. Kastner, and M. Dalod. 2008. Novel insights into the relationships between

dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9:1–27. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r17.

Roberts, E.W., M.L. Broz, M. Binnewies, M.B. Headley, A.E. Nelson, D.M. Wolf, T. Kaisho, D. Bogunovic, N. Bhardwaj, and M.F. Krummel. 2016. Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell.* 30:324–336. doi:10.1016/j.ccell.2016.06.003.

Romani, N., P. Brunner, and S.-G. of Dermatology. 2012. Changing views of the role of Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology.*

Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. Fritsch, R. Steinman, and G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83–93.

Romano, E., J.W. Cotari, R. Barreira da Silva, B.C. Betts, D.J. Chung, F. Avogadri, M.J. Fink, E.T. St Angelo, B. Mehrara, G. Heller, C. Münz, A.-B. Gregoire, and J.W. Young. 2012. Human Langerhans cells use an IL-15R- α /IL-15/pSTAT5-dependent mechanism to break T-cell tolerance against the self-differentiation tumor antigen WT1. *Blood.* 119:5182–90. doi:10.1182/blood-2011-09-382200.

Rönnblom, L., and E.-M. opinion in rheumatology. 2013. The interferon signature in autoimmune diseases. *Current opinion in rheumatology.*

Ruffell, B., C.-S. Debbie, V. Chan, A. Rosenbusch, C.M. Ho, N. Pryer, D. Daniel, S.E. Hwang, H.S. Rugo, and L.M. Coussens. 2014. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. 26:623–637.

S

Salaun, B., I. Coste, M.-C.C. Rissoan, S.J. Lebecque, and T. Renno. 2006. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J. Immunol.* 176:4894–901.

Salaun, B., L. Zitvogel, C. Asselin-Paturel, Y. Morel, K. Chemin, C. Dubois, C. Massacrier, R. Conforti, M.P. Chenard, J.-C. Sabourin, A. Goubar, S. Lebecque, M. Pierres, D. Rimoldi, P. Romero, and F. Andre. 2011. TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer Res.*

71:1607–1614. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3490.

Sali, T.M., K.M. Pryke, J. Abraham, A. Liu, I. Archer, R. Broeckel, J.A. Staverosky, J.L. Smith, A.-S. Ahmed, L. Amsler, K. Sheridan, A. Nilsen, D.N. Streblow, and D. R Victor. 2015. Characterization of a Novel Human-Specific STING Agonist that Elicits Antiviral Activity Against Emerging Alphaviruses. *PLoS Pathog.* 11:e1005324. doi:10.1371/journal.ppat.1005324.

Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 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 alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109–18.

Salmon, H., J. Idoyaga, A. Rahman, M. Leboeuf, R. Remark, S. Jordan, C.-A. Maria, M. Khudoynazarova, J. Agudo, N. Tung, S. Chakarov, C. Rivera, B. Hogstad, M. Bosenberg, D. Hashimoto, S. Gnjatich, N. Bhardwaj, A.K. Palucka, B.D. Brown, J. Brody, F. Ginhoux, and M. Merad. 2016. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity.* 44:924–38. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.012.

Sánchez-Paulete, A., M. Cueto, Martínez-López, S. Labiano, M.-K. Aizea, R.-R. E María, J.-K. Maria, A. Azpilikueta, A.M. Aznar, J.I. Quetglas, D. Sancho, and I. Melero. 2016. Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells. *Cancer Discov.* 6:71–79. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0510.

Sancho, D., M.-S. Diego, O.P. Joffre, O. Schulz, N.C. Rogers, D.J. Pennington, J.R. Carlyle, and C. Reis e Sousa. 2008. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest.* 118:2098–110. doi:10.1172/JCI34584.

Sancho, D., O.P. Joffre, A.M. Keller, N.C. Rogers, D. Martínez, H.-F. Patricia, I. Rosewell, and C. Reis e Sousa. 2009. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature.* 458:899–903. doi:10.1038/nature07750.

Sancho, D., and C. Reis e Sousa. 2012. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and

- homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 30:491–529. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101352.
- Sandel, M.H., A.R. Dadabayev, A.G. Menon, H. Morreau, C.J. Melief, R. Offringa, S.H. van der Burg, C.M. Janssen-van Rhijn, N. Ensink, R.A. Tollenaar, C.J. van de Velde, and P.J. Kuppen. 2005. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin. Cancer Res.* 11:2576–82. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1448.
- Sato, A., M. Ohtsuki, M. Hata, E. Kobayashi, and T. Murakami. 2006. Antitumor activity of IFN- λ in murine tumor models. 176:7686–94.
- Satpathy, A.T., K.M. Murphy, and K. Wumesh. 2011. Transcription factor networks in dendritic cell development. *Semin. Immunol.* 23:388–97. doi:10.1016/j.smim.2011.08.009.
- Satpathy, A.T., X. Wu, J.C.C. Albring, and K.M. Murphy. 2012. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13:1145–54. doi:10.1038/ni.2467.
- Schiavoni, G., F. Mattei, and L. Gabriele. 2013. Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front Immunol.* 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00483.
- Schlitzer, A., M. Naomi, P. Teo, T. Zelante, K. Atarashi, D. Low, A.W. Ho, P. See, A. Shin, P.S. Wasan, G. Hoeffel, B. Malleret, A. Heiseke, S. Chew, L. Jardine, H.A. Purvis, C.M. Hilkens, J. Tam, M. Poidinger, E. Stanley, A.B. Krug, L. Renia, B. Sivasankar, L.G. Ng, M. Collin, R.-C. Paola, K. Honda, M. Haniffa, and F. Ginhoux. 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity.* 38:970–83. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.011.
- Schreibelt, G., L.J.J. Klinkenberg, L.J. Cruz, P.J. Tacken, J. Tel, M. Kreutz, G.J. Adema, G.D. Brown, C.G. Figdor, and I. de Vries. 2012. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3⁺ myeloid dendritic cells. *Blood.* 119:2284–92. doi:10.1182/blood-2011-08-373944.
- Schulz, O., S.S. Diebold, M. Chen, T.I. Näslund, M.A. Nolte, L. Alexopoulou, Y.-T. Azuma, R.A. Flavell, P. Liljeström, and C. Reis e Sousa. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature.* 433:887–892. doi:10.1038/nature03326.
- See, P., C.-A.A. Dutertre, J. Chen, P. Günther, M. Naomi, S.E. Irac, M. Gunawan, M. Beyer, K. Händler, K. Duan, H.R.B.R. Sumatoh, N. Ruffin, M. Jouve, G.-M. Ester, R.C.M.C. Hennekam, T. Lim, C.C. Yip, M. Wen, B. Malleret, I. Low, N.B. Shadan, C.F.S.F. Fen, A. Tay, J. Lum, F. Zolezzi, A. Larbi, M. Poidinger, J.K.Y.K. Chan, Q. Chen, L. Rénia, M. Haniffa, P. Benaroch, A. Schlitzer, J.L. Schultze, E.W. Newell, and F. Ginhoux. 2017. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science.* 356:eaag3009. doi:10.1126/science.aag3009.
- Seeger, P., T. Musso, and S. Sozzani. 2015. The TGF- β superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth F R.* 26:647–657. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.06.002.
- Segura, E., and S. Amigorena. 2015. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Adv. Immunol.* 127:1–31. doi:10.1016/bs.ai.2015.03.002.
- Segura, E., M. Durand, and S. Amigorena. 2013a. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J. Exp. Med.* 210:1035–47. doi:10.1084/jem.20121103.
- Segura, E., V.-G. Jenny, M.-H.H. Donnadieu, S.-G. Xavier, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209:653–60. doi:10.1084/jem.20111457.
- Segura, E., M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiocchia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2013b. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 38:336–48. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.018.
- Seneschal, J., R.A. Clark, A. Gehad, B.-A. M. Clare, and T.S. Kupper. 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity.* 36:873–84. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.018.
- Séré, K., J.-H.H. Baek, O.-B. Julia, M.-N. Gerhard, F. Tacke, Y. Yokota, M. Zenke, and T. Hieronymus. 2012. Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and

- inflammation. *Immunity*. 37:905–16. doi:10.1016/j.immuni.2012.07.019.
- Seth, S., L. Oberdörfer, R. Hyde, K. Hoff, V. Thies, T. Worbs, S. Schmitz, and R. Förster. 2011. CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J. Immunol.* 186:3364–72. doi:10.4049/jimmunol.1002598.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. Bruce, J. White, P. Swanson, L. Old, and R. Schreiber. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 410:1107–11. doi:10.1038/35074122.
- Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T.E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong, J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F.J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, M. Gary, C. Clegg, D. Foster, and K.M. Klucher. 2002. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. 4:6368. doi:10.1038/ni873.
- Shi, M., X. Chen, K. Ye, Y. Yao, and Y. Li. 2016. Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy: Systematic review. 95.
- Shortman, K., and W.R. Heath. 2010. The CD8+ dendritic cell subset. 234:18–31. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.
- Shortman, K., P. Sathe, D. Vremec, S. Naik, and O. Meredith. 2013. Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv. Immunol.* 120:105–26. doi:10.1016/B978-0-12-417028-5.00004-1.
- Siegal, F.P., N. Kadowaki, M. Shodell, F.-B. A Patricia, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y.-J. Liu. 1999. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. 284:18351837. doi:10.1126/science.284.5421.1835.
- Siegel, R., J. Eskdale, and G. Gallagher. 2011. Regulation of IFN- λ 1 promoter activity (IFN- λ 1/IL-29) in human airway epithelial cells. 187:5636–44. doi:10.4049/jimmunol.1003988.
- Sirén, J., J. Pirhonen, I. Julkunen, and S. Matikainen. 2005. IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J. Immunol.* 174:1932–7.
- Sisirak, V., J. Faget, M. Gobert, N. Goutagny, N. Vey, I. Treilleux, S. Renaudineau, G. Poyet, L.-G. Sana, G.-L. Sophie, I. Durand, I. Mercier, A. Bajard, T. Bachelot, A. Puisieux, I. Puisieux, J.-Y. Blay, M.-C. Christine, C. Caux, and B.-V. Nathalie. 2012. Impaired IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Favors Regulatory T-cell Expansion That May Contribute to Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* 72:5188–5197. doi:10.1158/0008-5472.can-11-3468.
- Sisirak, V., N. Vey, N. Goutagny, S. Renaudineau, M. Malfroy, S. Thys, I. Treilleux, L.-G. Sana, T. Bachelot, D.-D. Colette, M.-C. Christine, J. Blay, C. Caux, and B.-V. Nathalie. 2013. Breast cancer-derived transforming growth factor- β and tumor necrosis factor- α compromise interferon- α production by tumor-associated plasmacytoid dendritic cells. *Int J Cancer*. 133:771–778. doi:10.1002/ijc.28072.
- Sittig, S.P., G. Bakdash, J. Weiden, A.E. Sköld, J. Tel, C.G. Figdor, I. de Vries, and G. Schreiber. 2016. A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators Inflamm.* 2016:3605643. doi:10.1155/2016/3605643.
- Sommerey, C., S. Paul, P. Staeheli, and T. Michiels. 2008. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. 4:e1000017. doi:10.1371/journal.ppat.1000017.
- Song, S., P. Yuan, H. Wu, J. Chen, J. Fu, P. Li, J. Lu, and W. Wei. 2014. Dendritic cells with an increased PD-L1 by TGF- β induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells. *Int. Immunopharmacol.* 20:117–23. doi:10.1016/j.intimp.2014.02.027.
- Soumelis, V., and Y.-J.J. Liu. 2006. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 36:2286–92. doi:10.1002/eji.200636026.
- Spranger, S., R. Bao, and T.F. Gajewski. 2015. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*. 523:231–5. doi:10.1038/nature14404.
- Spranger, S., D. Dai, B. Horton, and T.F. Gajewski. 2017. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell*. 31:711–723.e4. doi:10.1016/j.ccell.2017.04.003.

- Spranger, S., and T.F. Gajewski. 2018. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat. Rev. Cancer*. doi:10.1038/nrc.2017.117.
- Srinivas, S., J. Dai, J. Eskdale, G.E. Gallagher, N.J. Megjugorac, and G. Gallagher. 2008. Interferon- λ 1 (interleukin-29) preferentially down-regulates interleukin-13 over other T helper type 2 cytokine responses in vitro. *Immunology*. 125:492–502. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02862.x.
- Stanton, S., S. Adams, and D.-M. oncology. 2016. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA oncology*.
- Steinman, R., and Z. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142–62.
- Steinman, R., and Z. Cohn. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* 139:380–97.
- Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:685–711. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040.
- Suppiah, V., M. Moldovan, G. Ahlenstiel, T. Berg, M. Weltman, M.L. Abate, M. Bassendine, U. Spengler, G.J. Dore, E. Powell, S. Riordan, D. Sheridan, A. Smedile, V. Fragomeli, T. Müller, M. Bahlo, G.J. Stewart, D.R. Booth, and J. George. 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* 41:1100–4. doi:10.1038/ng.447.
- Swider, A., R. Siegel, J. Eskdale, and G.-G. Cytokine. 2014. Regulation of interferon lambda-1 (IFNL1/IFN- λ 1/IL-29) expression in human colon epithelial cells. *Cytokine*.
- Swiecki, M., and M. Colonna. 2010. Accumulation of plasmacytoid DC: Roles in disease pathogenesis and targets for immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 40:2094–8. doi:10.1002/eji.201040602.
- Syedbasha, M., and A. Egli. 2017. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front Immunol.* 8:119. doi:10.3389/fimmu.2017.00119.
- Szabo, A., Z. Magyarics, K. Pazmandi, L. Gopcsa, E. Rajnavolgyi, and A. Bacsí. 2014. TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner. *Immunol. Cell Biol.* 92:671–8. doi:10.1038/icb.2014.38.
- ## T
- Tabarkiewicz, J., P. Rybojad, and J.-A. Oncology 2008. CD1c+ and CD303+ dendritic cells in peripheral blood, lymph nodes and tumor tissue of patients with non-small cell lung cancer. *Oncology*
- Takagi, T., O. Taguchi, M. Toda, D.B. Ruiz, P.G. Bernabe, D.-G. N Corina, Y. Miyake, T. Kobayashi, S. Aoki, F. Chiba, Y. Yano, E.M. Conway, S. Munesue, Y. Yamamoto, H. Yamamoto, K. Suzuki, Y. Takei, J. Morser, and E.C. Gabazza. 2011. Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183:31–42. doi:10.1164/rccm.201001-0107OC.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335–76. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- Takeda, Y., K. Kataoka, J. Yamagishi, S. Ogawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2017. A TLR3-Specific Adjuvant Relieves Innate Resistance to PD-L1 Blockade without Cytokine Toxicity in Tumor Vaccine Immunotherapy. *Cell Rep.* 19:1874–1887. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.015.
- Tanaka, Y., N. Nishida, M. Sugiyama, M. Kurosaki, K. Matsuura, N. Sakamoto, M. Nakagawa, M. Korenaga, K. Hino, S. Hige, Y. Ito, E. Mita, E. Tanaka, S. Mochida, Y. Murawaki, M. Honda, A. Sakai, Y. Hiasa, S. Nishiguchi, A. Koike, I. Sakaida, M. Imamura, K. Ito, K. Yano, N. Masaki, F. Sugauchi, N. Izumi, K. Tokunaga, and M. Mizokami. 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 41:1105–9. doi:10.1038/ng.449.
- Tezuka, Y., S. Endo, A. Matsui, A. Sato, K. Saito, K. Semba, M. Takahashi, and T. Murakami. 2012. Potential anti-tumor effect of IFN- λ 2 (IL-28A) against human lung cancer cells. *Lung Cancer.* 78:185–92. doi:10.1016/j.lungcan.2012.09.005.
- Thomas, D.L., C.L. Thio, M.P. Martin, Y. Qi, D. Ge, O. Colm, J. Kidd, K. Kidd, S.I. Khakoo, G. Alexander, J.J.

- Goedert, G.D. Kirk, S.M. Donfield, H.R. Rosen, L.H. Tobler, M.P. Busch, M. G John, D.B. Goldstein, and M. Carrington. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 461:798–801. doi:10.1038/nature08463.
- Thomson, S.J., F.G. Goh, H. Banks, T. Krausgruber, S.V. Kutenko, B.M. Foxwell, and I.A. Udalova. 2009. The role of transposable elements in the regulation of IFN-lambda1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:11564–9. doi:10.1073/pnas.0904477106.
- Thordardottir, S., B.N. Hangalapura, T. Hutten, M. Cossu, J. Spanholtz, N. Schaap, T.R. Radstake, R. van der Voort, and H. Dolstra. 2014. The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 23:955–67. doi:10.1089/scd.2013.0521.
- Tian, S., X. Hui, Z. Fan, Q. Li, J. Zhang, X. Yang, and F.... X Ma-. 2014. Suppression of hepatocellular carcinoma proliferation and hepatitis B surface antigen secretion with interferon-λ1 or PEG-interferon-λ1. *The FASEB*
- Tjomsland, V., P. Sandström, A. Spångeus, D. Messmer, J. Emilsson, U. Falkmer, S. Falkmer, K.-E.E. Magnusson, K. Borch, and M. Larsson. 2010. Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer*. 10:87. doi:10.1186/1471-2407-10-87.
- Toi, M., T. Matsumoto, and H. Bando. 2001. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol.* 2:667–73. doi:10.1016/S1470-2045(01)00556-3.
- Treilleux, I., J.-Y. Blay, B.-V. Nathalie, R.-C. Isabelle, T. Bachelot, J.-P. Guastalla, A. Bremond, S. Goddard, J.-J. Pin, B.-D. Clarisse, and S. Lebecque. 2004. Dendritic Cell Infiltration and Prognosis of Early Stage Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 10:7466–7474. doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-0684.
- Tschurtschenthaler, M., J. Wang, C. Fricke, T.M.J. Fritz, L. Niederreiter, T.E. Adolph, E. Sarcevic, S. Künzel, F.A. Offner, U. Kalinke, J.F. Baines, H. Tilg, and A. Kaser. 2014. Type I interferon signalling in the intestinal epithelium affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut*. 63:1921–1931. doi:10.1136/gutjnl-2013-305863.
- Tsoumakidou, M., N. Tzanakis, H.A. Papadaki, H. Koutala, and N.M. Siafakas. 2006. Isolation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from human bronchoalveolar lavage fluid. *Immunol. Cell Biol.* 84:267–73. doi:10.1111/j.1440-1711.2006.01428.x.
- Tsukamoto, N., S. Okada, Y. Onami, Y. Sasaki, K. Umezawa, and Y. Kawakami. 2009. Impairment of plasmacytoid dendritic cells for IFN production by the ligand for immunoglobulin-like transcript 7 expressed on human cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 15:5733–43. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0171.
- Tullett, K.M., I.M. Leal Rojas, Y. Minoda, P.S. Tan, J.-G.G. Zhang, C. Smith, R. Khanna, K. Shortman, I. Caminschi, M.H. Lahoud, and K.J. Radford. 2016. Targeting CLEC9A delivers antigen to human CD141+ DC for CD4+ and CD8+T cell recognition. *JCI Insight*. 1:e87102. doi:10.1172/jci.insight.87102.
- ## V
- Vadiveloo, P., G. Vairo, P. Hertzog, I. Kola, and H.-J. Cytokine. 2000. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. *Cytokine*.
- Valladeau, J., O. Ravel, D.-D. C, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, D.-F. V, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, and S. Saeland. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 12:71–81.
- Van Pottelberge, G.R., K.R. Bracke, I.K. Demedts, K. De Rijck, S.M. Reinartz, C.M. van Drunen, G.M. Verleden, F.E. Vermassen, G.F. Joos, and G.G. Brusselle. 2010. Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respir. Res.* 11:35. doi:10.1186/1465-9921-11-35.
- Van Voorhis, W., L. Hair, R. Steinman, and G. Kaplan. 1982. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 155:1172–87.
- Velten, F.W., K. Duperrier, J. Bohlender, P. Metharom, and S. Goerd. 2004. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced

allostimulatory capacity in vitro. *Eur. J. Immunol.* 34:2800–11. doi:10.1002/eji.200324732.

Vermi, W., R. Bonecchi, F. Facchetti, D. Bianchi, S. Sozzani, S. Festa, A. Berenzi, M. Cella, and M. Colonna. 2003. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J. Pathol.* 200:255–68. doi:10.1002/path.1344.

Villadangos, J.A.A., and L. Young. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* 29:352–61. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.002.

Villani, A.-C.C., R. Satija, G. Reynolds, S. Sarkizova, K. Shekhar, J. Fletcher, M. Griesbeck, A. Butler, S. Zheng, S. Lazo, L. Jardine, D. Dixon, E. Stephenson, E. Nilsson, I. Grundberg, M. David, A. Filby, W. Li, P.L. De Jager, R.-R. Orit, A.A. Lane, M. Haniffa, A. Regev, and N. Hacohen. 2017. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 356:eaah4573. doi:10.1126/science.aah4573.

Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. Saunders, C. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176:47–58.

Vu Manh, T.-P., Y. Alexandre, T. Baranek, K. Crozat, and M. Dalod. 2013. Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation. *Eur. J. Immunol.* 43:1706–15. doi:10.1002/eji.201243106.

Vu Manh, T.-P.P., and M. Dalod. 2016. Characterization of Dendritic Cell Subsets Through Gene Expression Analysis. *Methods Mol. Biol.* 1423:211–43. doi:10.1007/978-1-4939-3606-9_16.

Vu Manh, T.-P.P., E.-Y. Jamila, C. Urien, S. Ruscanu, L. Jouneau, M. Bourge, M. Moroldo, G. Foucras, H. Salmon, H. Marty, P. Quéré, N. Bertho, P. Boudinot, M. Dalod, and S.-C. Isabelle. 2015. Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics. *Front Immunol.* 6:299. doi:10.3389/fimmu.2015.00299.

Vu Manh, T.-P.P., H. Marty, P. Sibille, Y. Le Vern, B. Kaspers, M. Dalod, S.-C. Isabelle, and P. Quéré.

2014. Existence of conventional dendritic cells in *Gallus gallus* revealed by comparative gene expression profiling. *J. Immunol.* 192:4510–7. doi:10.4049/jimmunol.1303405.

W

Wall, E.M., K. Milne, M.L. Martin, P.H. Watson, P. Theiss, and B.H. Nelson. 2007. Spontaneous mammary tumors differ widely in their inherent sensitivity to adoptively transferred T cells. *Cancer Res.* 67:6442–50. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0622.

Wang, N., H. Liang, and Z.-K. in immunology. 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in immunology.*

Wang, Z., H. Zhang, J. Hou, J. Niu, Z. Ma, H. Zhao, and C. Liu. 2015. Clinical implications of β -catenin protein expression in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:14989–14994.

Waskow, C., K. Liu, D.-J. Guillaume, P. Guernonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, and M. Nussenzweig. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 9:676–83. doi:10.1038/ni.1615.

Watchmaker, P.B., K. Lahl, M. Lee, D. Baumjohann, J. Morton, S.J. Kim, R. Zeng, A. Dent, K. Ansel, B. Diamond, H. Hadeiba, and E.C. Butcher. 2014. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* 15:98–108. doi:10.1038/ni.2768.

Wei, S., I. Kryczek, L. Zou, B. Daniel, P. Cheng, P. Mottram, T. Curiel, A. Lange, and W. Zou. 2005. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 65:5020–6. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4043.

Weinberg, R., and D. Hanahan. 2000. The hallmarks of cancer. 100:57–70.

Willingham, S.B., J.-P.P. Volkmer, A.J. Gentles, D. Sahoo, P. Dalerba, S.S. Mitra, J. Wang, C.-T. Humberto, R. Martin, J.D. Cohen, P. Lovelace, F.A. Scheeren, M.P. Chao, K. Weiskopf, C. Tang, A.K. Volkmer, T.J. Naik, T.A. Storm, A.R. Mosley, B. Edris, S.M. Schmid, C.K. Sun, M.-S.S. Chua, O. Murillo, P. Rajendran, A.C. Cha, R.K. Chin, D. Kim, M. Adorno, T. Raveh, D. Tseng, S. Jaiswal, P.Ø. Enger, G.K.

- Steinberg, G. Li, S.K. So, R. Majeti, G.R. Harsh, M. van de Rijn, N.N. Teng, J.B. Sunwoo, A.A. Alizadeh, M.F. Clarke, and I.L. Weissman. 2012. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:6662–7. doi:10.1073/pnas.1121623109.
- Witte, K., G. Gruetz, H.-D.D. Volk, A. Looman, K. Asadullah, W. Sterry, R. Sabat, and K. Wolk. 2009. Despite IFN-lambda receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines. *Genes Immun.* 10:702–14. doi:10.1038/gene.2009.72.
- Wolchok, J.D., H. Kluger, M.K. Callahan, M.A. Postow, N.A. Rizvi, A.M. Lesokhin, N.H. Segal, C.E. Ariyan, R.-A.A. Gordon, K. Reed, M.M. Burke, A. Caldwell, S.A. Kronenberg, B.U. Agunwamba, X. Zhang, I. Lowy, H.D. Inzunza, W. Feely, C.E. Horak, Q. Hong, A.J. Korman, J.M. Wigginton, A. Gupta, and M. Sznol. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369:122–33. doi:10.1056/NEJMoa1302369.
- Wolff, K. 1967. The fine structure of the Langerhans cell granule. *J. Cell Biol.* 35:468–73.
- Wollenberg, A., S. Kraft, D. Hanau, and T. Bieber. 1996. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* 106:446–53.
- Wollenberg, A., M. Mommaas, T. Oppel, E.-M.M. Schottdorf, S. Günther, and M. Moderer. 2002. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 118:327–34. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x.
- Wongthida, P., R.M. Diaz, F. Galivo, T. Kottke, J. Thompson, J. Pulido, K. Pavelko, L. Pease, A. Melcher, and R. Vile. 2010. Type III IFN interleukin-28 mediates the antitumor efficacy of oncolytic virus VSV in immune-competent mouse models of cancer. 70:4539–49. doi:10.1158/0008-5472.can-09-4658.
- Wu, C.-F., L. Andzinski, N. Kasnitz, A. Kröger, F. Klawonn, S. Lienenklaus, S. Weiss, and J. Jablonska. 2015. The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. *Int. J. Cancer.* 137:837–847. doi:10.1002/ijc.29444.
- Wu, X., C.G. Briseño, V. Durai, J.C.C. Albring, M. Haldar, P. Bagadia, K.-W.W. Kim, G.J. Randolph, T.L. Murphy, and K.M. Murphy. 2016. Mafb lineage tracing to distinguish macrophages from other immune lineages reveals dual identity of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 213:2553–2565. doi:10.1084/jem.20160600.
- X**
- Xie, C., C. Liu, B. Wu, Y. Lin, and M.-T. International 2016. Effects of IRF1 and IFN- β interaction on the M1 polarization of macrophages and its antitumor function. *International*
- Y**
- Yamazaki, C., R. Miyamoto, K. Hoshino, Y. Fukuda, I. Sasaki, M. Saito, H. Ishiguchi, T. Yano, T. Sugiyama, H. Hemmi, T. Tanaka, E. Hamada, T. Hirashima, R. Amakawa, S. Fukuhara, S. Nomura, T. Ito, and T. Kaisho. 2010. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397:756–61. doi:10.1016/j.bbrc.2010.06.029.
- Yan, Y., J. Zhang, Y. Liu, T. Zhu, L. Yuan, Y. Ge, H. Ding, and X. Bu. 2013. Inhibition of lung adenocarcinoma transfected with interleukin 28A recombinant adenovirus (Ad-mIFN- λ 2) in vivo. *Cancer Biother. Radiopharm.* 28:124–30. doi:10.1089/cbr.2012.1247.
- Yan, Z., Y. Wu, J. Du, G. Li, S. Wang, W. Cao, X. Zhou, C. Wu, D. Zhang, and X. Jing. 2016. A novel peptide targeting Clec9a on dendritic cell for cancer immunotherapy. 7:40437.
- Yin, X., H. Yu, X. Jin, J. Li, H. Guo, Q. Shi, Z. Yin, Y. Xu, X. Wang, R. Liu, S. Wang, and L. Zhang. 2017. Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Encompass CD5high and CD5low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions. *J. Immunol.* 198:1553–1564. doi:10.4049/jimmunol.1600193.
- Yin, Z., J. Dai, J. Deng, F. Sheikh, M. Natalia, T. Shih, L.-A. Anita, S.B. Amrute, U. Garrigues, S. Doyle, R.P. Donnelly, S.V. Kotenko, and F.-B. Patricia. 2012. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 189:2735–45. doi:10.4049/jimmunol.1102038.

Yoon, S.-I.I., B.C. Jones, N.J. Logsdon, B.D. Harris, A. Deshpande, S. Radaeva, B.A. Halloran, B. Gao, and M.R. Walter. 2010. Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure*. 18:638–48. doi:10.1016/j.str.2010.02.009.

Yoshio, S., T. Kanto, S. Kuroda, T. Matsubara, K. Higashitani, N. Kakita, H. Ishida, N. Hiramatsu, H. Nagano, M. Sugiyama, K. Murata, T. Fukuhara, Y. Matsuura, N. Hayashi, M. Mizokami, and T. Takehara. 2013. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 57:1705–15. doi:10.1002/hep.26182.

Yu, J., W. Du, F. Yan, Y. Wang, H. Li, S. Cao, W. Yu, C. Shen, J. Liu, and X. Ren. 2013. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J. Immunol.* 190:3783–3797. doi:10.4049/jimmunol.1201449.

Z

Zarembek, K.A., and P.J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* 168:554–61.

Zelenay, S., A.M. Keller, P.G. Whitney, B.U. Schraml, S. Deddouche, N.C. Rogers, O. Schulz, D. Sancho, and C. Reis e Sousa. 2012. The dendritic cell receptor DNCR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J. Clin. Invest.* 122:1615–27. doi:10.1172/JCI60644.

Zelenay, S., A.G. van der Veen, J.P. Böttcher, K.J. Snelgrove, N. Rogers, S.E. Acton, P. Chakravarty, M.R. Girotti, R. Marais, S.A. Quezada, E. Sahai, and C. Reis e Sousa. 2015. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*. 162:1257–70. doi:10.1016/j.cell.2015.08.015.

Zeng, B., A.P. Middelberg, A. Gemiarto, M. Kelli, A.G. Baxter, M. Talekar, D. Moi, K.M. Tullett, I. Caminschi, M.H. Lahoud, R. Mazzieri, R. Dolcetti, and R. Thomas. 2018. Self-adjuvanting nanoemulsion targeting dendritic cell receptor Clec9A enables antigen-specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 128:1971–1984. doi:10.1172/JCI96791.

Zhang, J.-G.G., P.E. Czabotar, A.N. Policheni, I. Caminschi, S.S. Wan, S. Kitsoulis, K.M. Tullett, A.Y. Robin, R. Brammananth, M.F. van Delft, J. Lu, O. A Lorraine, E.C. Josefsson, B.T. Kile, W.J. Chin, J.D. Mintern, M.A. Olshina, W. Wong, J. Baum, M.D. Wright, D.C. Huang, N. Mohandas, R.L. Coppel, P.M. Colman, N.A. Nicola, K. Shortman, and M.H. Lahoud. 2012. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity*. 36:646–57. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.009.

Zhang, L., N. Jilg, R.-X.X. Shao, W. Lin, D.N. Fusco, H. Zhao, K. Goto, L.F. Peng, W.-C.C. Chen, and R.T. Chung. 2011a. IL28B inhibits hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. *J. Hepatol.* 55:289–98. doi:10.1016/j.jhep.2010.11.019.

Zhang, S., K. Kodys, K. Li, and G. Szabo. 2013. Human Type 2 Myeloid Dendritic Cells Produce Interferon- λ and Amplify Interferon- α in Response to Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology*. 144:414–425.e7. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.034.

Zhang, X., T.W. Brann, M. Zhou, J. Yang, R.M. Oguariri, K.B. Lidie, H. Imamichi, D.-W.W. Huang, R.A. Lempicki, M.W. Baseler, T.D. Veenstra, H.A. Young, H. Lane, and T. Imamichi. 2011b. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *J. Immunol.* 186:4541–5. doi:10.4049/jimmunol.1003389.

Zhou, Z., O.J. Hamming, N. Ank, S.R.R. Paludan, A.L. Nielsen, and R. Hartmann. 2007. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.* 81:7749–58. doi:10.1128/JVI.02438-06.

Zitvogel, L., L. Galluzzi, O. Kepp, M.J. Smyth, and G. Kroemer. 2015. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15:405–14. doi:10.1038/nri3845.

Zitzmann, K., S. Brand, S. Baehs, B. Göke, J. Meinecke, G. Spöttl, H. Meyer, and C.J. Auernhammer. 2006. Novel interferon- λ s induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochem Biophys Res Co.* 344:1334–1341. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.043.

Zoglmeier, C., H. Bauer, D. Nörenberg, G. Wedekind, P. Bittner, N. Sandholzer, M. Rapp, D. Anz, S. Endres,

and C. Bourquin. 2011. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin. Cancer Res.* 17:1765–1775. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2672.

Zou, W., J.D. Wolchok, and L. Chen. 2016. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med.* 8:328rv4. doi:10.1126/scitranslmed.aad7118.

ANNEXES

Annexe 1

Circulating and hepatic BDCA1⁺, BDCA2⁺, and BDCA3⁺ dendritic cells are subverted in patients with chronic HBV infection

Author Names:

Laurissa Ouaguia ^{1,2}, Vincent Leroy ^{3,4,5}, Tania Dufeu-Duchesne ^{1,4}, Thomas Decaens ^{3,4,5}, David Durantel⁶, Margaux Hubert⁶, Jenny Valladeau-Guilemond⁶, Nathalie Bendriss-Vermare⁶, Laurence Chaperot ^{1,2}, Caroline Aspod ^{1,2,*}.

Affiliations:

- 1- Institute for Advanced Biosciences, Research Center Inserm U1209/CNRS 5309/UGA, Immunobiology and immunotherapy of chronic diseases, Grenoble, France.
- 2- EFS Rhone-Alpes Auvergne, R&D Laboratory, La Tronche, F-38701, France.
- 3- Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.
- 4- CHU Grenoble Alpes, Hepato-gastroenterology unit, Grenoble, F-38043, France.
- 5- Institute for Advanced Biosciences, Research Center Inserm U1209/CNRS 5309/UGA, Analytic Immunology of chronic pathologies, La Tronche, F-38706, France.
- 6- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, 69373, France.

Abbreviations:

ALT, Alanine Aminotransferase; CD, cluster of differentiation; cDC, conventional dendritic cells ; CPGA, class A CPG ; DC, dendritic cell; DNA, deoxyribonucleic acid; GITRL, Glucocorticoid induced TNFR-related protein ligand; HLA-DR, human leukocyte antigen D Related; HBV, hepatitis B virus; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B s antigen; ICOSL, Inducible T-cell co-stimulator ligand; IL-12, interleukin 12; IFN, interferon; LMNC, liver mononuclear cell; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; ns, non-significant; pDC, plasmacytoid DC; NK, natural killer cells; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PDL1, programmed death ligand 1; polyI:C, Polyinosinic:polycytidylic acid; OX40L, OX40 ligand; TNF α , tumor necrosis factor α ; TLR, toll like receptor; 4-1BB (CD137); 4-1BBL, 4-1BB ligand.

Author contributions

Study Concept and design: C.A., D.D., N.B.V., V.L., L.O. Acquisition of data: L.O. and T.D.D, Analysis and interpretation of data: L.O., C.A., N.B.V., D.D., V.L., T.D.D., L.C. Statistical analyses: L.O and C.A. Material Support: V.L., T.D. Technical support: M.H., J.V-G. Drafting of the manuscript: L.O. and C.A. Manuscript revision: C.A., L.O., V.L., N.B.V., L.C., D.D., T.D.

Abstract

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a major health burden potentially evolving towards cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HBV physiopathology is strongly related to the host immunity, yet the immuno-pathogenic mechanisms of viral evasion from immune-surveillance are still misunderstood. Dendritic cells (DCs) are crucial immune sentinels which orchestrate antiviral immunity and determine the outcome of infection; however their precise involvement in HBV pathogenesis is not fully explored. In a pioneer way, we investigated the phenotypic and functional features of both circulating and intrahepatic BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 simultaneously in patients with chronic HBV infection by designing a unique multi-parametric flow cytometry approach. We showed modulations of the frequencies and basal activation status of blood and liver DCs associated with impaired expressions of specific immune checkpoints and TLR molecules on circulating DC subsets. Furthermore, we highlighted an impaired maturation of circulating and hepatic pDCs and cDCs following stimulation with specific TLR agonists in chronic HBV patients, associated with drastic dysfunctions in the capacity of circulating DC subsets to produce IL-12p70, TNF α , IFN α , IFN λ 1 and IFN λ 2 while intrahepatic DCs remained fully functional. Most of these modulations correlated with HBsAg and HBV-DNA levels. **Conclusion:** We highlight potent alterations in the distribution, phenotype and function of all DC subsets in both blood and liver, revealing that HBV may hijack the immune system by subverting DCs. Our findings provide innovative insights into the immuno-pathogenesis of HBV and the mechanisms of virus escape from immune control. Such understanding is promising for developing new therapeutic strategies restoring an efficient immune control of the virus.

Keywords: Hepatitis B virus, Human dendritic cell subsets, Antiviral immune responses, Viral immune evasion.

Introduction

Infection with Hepatitis B virus (HBV) is a major health problem affecting around 3.61% of the global world population¹. HBV is a double stranded DNA virus transmitted through blood, which specifically infects hepatocytes and can cause chronic liver diseases such as cirrhosis, liver failure, and liver cancer^{2, 3}. The natural history of HBV infection is the result of complex interactions between the replicating non-cytopathic virus and host's immune system⁴. While 95% of infected adults are capable of spontaneously clearing the viral infection within six months, 30-90% of infected children cannot clear the infection during their lifetime and are more likely to become chronic patients⁵⁻⁷. Whereas patients who clear the infection elicit potent humoral responses and cytotoxic effectors specific of viral antigens (HBsAg, HBcAg) able to eliminate the virus and virally-infected cells, patients who evolve toward chronic infection display weak and inappropriate responses. The physiopathology of HBV is strongly related to the host immunity, yet the mechanisms of modulation of the immune system by the virus are still misunderstood. Initiation of an effective antiviral immune response appears to be crucial for the resolution of HBV infection. However, the early steps in the recognition of the virus by immune cells and the functional consequences of this interaction remained to be studied.

A pivotal involvement of dendritic cells (DCs) is expected due to their central role in orchestrating antiviral immunity. Indeed, DCs are able to detect viruses and their components through multiple pattern recognition receptors (PRR), to subsequently produce large amount of antiviral cytokines especially type I and type III interferons (IFNs), and to cooperate with other immune effectors through immune checkpoints. DCs have a unique ability to uptake antigens, perform cross-presentation and prime virus-specific cytotoxic T cells⁸⁻¹⁰. DCs form a heterogeneous population consisting of specialized DC subsets that differ in ontology, localization, surface marker expression, molecular phenotype, cytokine production and antigen-processing and presentation capacity¹¹. There are 3 major DC subsets in humans: or myeloid or conventional dendritic cells (cDCs) subdivided into two subsets based on the differential expression of CD1c/BDCA1 (cDC2) and CD141/BDCA3 (cDC1) molecules¹¹, and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) expressing BDCA2 marker¹². Each DC subset displays its own repertoire of toll like receptors (TLRs), underlying their functional specialization^{8, 10}. TLR3 and TLR4 can detect respectively double stranded RNA and molecular motif like lipopolysaccharide, while TLR7 and TLR8 can detect single-stranded RNA and TLR9 can sense viral DNA^{10, 12}. TLR7 and TLR9 are mainly expressed in pDCs, while *cDC* subsets mostly express TLR3, TLR4 and TLR8, although TLR3 and TLR4 expression levels are almost exclusives on BDCA3+ cDC1 and BDCA1+ cDC2 respectively^{10, 12}. TLRs stimulation triggers the expression of co-activation molecules CD40, CD80 and CD86 on DCs, and the production of wide amount of pro-inflammatory and anti-viral cytokines that can inhibit the viral infection and modulate innate and adaptive anti-viral immunity⁹. The high plasticity of DCs allows them

to orientate responses towards immunity or tolerance, depending on surrounding signals, which offer to pathogens opportunity to subvert them to escape immunity¹³.

BDCA1+ cDC2 represent the main blood DC population, whereas BDCA3+ cDC1 are enriched within hepatic DCs¹⁴. BDCA3+ cDC1 are the most potent producers of IFN- λ in response to viruses that induces TLR3 signaling or to synthetic RNA polyI:C^{15, 16} and are specialized in antigen cross-presentation, therefore actively participating in the control of hepatotropic viruses^{11, 17, 18}. In the context of chronic HBV infection, functional perturbations in DC subsets have been described¹⁹⁻²¹, potentially through HBsAg²², HBcAg²³ or HBeAg²⁴ viral antigens, which are present in large amount in the blood of patients. It has been shown that BDCA1+ cDC2 can take up HBsAg, the main envelop glycoprotein present on HBV infectious particles²⁵. The effect of HBsAg on BDCA1+ cDC2 purified from healthy donors is controversial. Indeed, it either contributes to DC dysfunction²⁵ or drives a strong activation of BDCA1+ cDC2 in a TLR4- and CD14-dependent manner²². Yet, few studies showed that circulating BDCA1+ cDC2 from HBV patients displayed impairment in their maturation associated with a defective IL-12 production upon stimulation^{20, 21, 25}. Viral particles²⁶ or HBs/HBc viral antigens have also been found within pDCs from chronic HBV patients²⁷, suggesting direct interactions between HBV and pDCs. Decreased frequencies and functional impairment of circulating BDCA2+ pDCs from chronic HBV patients have been reported^{21, 27, 28}, as well as inhibition of pDCs from healthy donors by HBV virus and HBsAg²⁹. We previously reported *in vivo* modulations of CD40 and CD86 expression in both blood and liver BDCA2+ pDCs from chronic HBV patients compared to healthy donors³⁰, associated with an altered OX40L expression and reduced IFN α production in response to TLR9 triggering leading to a defective triggering of NK cytotoxic effectors³⁰. We also demonstrated that pDCs were able to trigger functional virus-specific T cells from HBeAg-negative chronic HBV patients³¹. Alterations of pDC functions in HBV patients could be linked to the binding of HBsAg to BDCA2^{28, 29} or to the impairment of TLR9 expression^{26, 27}. BDCA3+ cDC1 are prominently present in HBV infected liver¹⁶. Few studies showed controversial impacts of IFN λ on HBV replication in cell lines and mouse studies^{18, 32}, but others revealed that PEG-IFN λ induced a significant reduction of HBV replication in HBeAg-positive patients³³, suggesting that this cytokine may be valuable to fight chronic HBV infection. In addition, the group of A. Woltman reported an impaired maturation as well as a reduced IFN λ 1 production by blood BDCA3+ cDC1 from chronic HBV patients after TLR3 triggering¹⁶. However, the phenotype and function of both circulating and hepatic DC subsets from HBV patients has not been extensively studied neither the correlation of these alterations with the patient's clinical parameters. Furthermore, it is still unknown whether HBV impacts liver BDCA3+ cDC1 features. Hence, the mechanisms involved in the dysfunction of all these cells, as well as those involved in the disturbances of the dialogues with other immune effectors have not yet been completely elucidated, especially because of the difficulty to perform such studies in the liver itself.

Despite the crucial role of DCs in orientating antiviral responses and determining the outcome of infection, their precise involvement in HBV pathogenesis is not fully understood. In this study, we investigated in human how chronic HBV infection affects the functions of both blood and liver BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1, by analyzing their basal activation status, their expression of specific immune checkpoints and TLR molecules, and their ability to respond to specific TLR stimulations. We also assessed the clinical relevance of these modulations. Our findings highlighted major alterations of DC's phenotype and function in chronic HBV patients, suggesting deep impairments of the innate immune response. This study demonstrates that HBV may subvert DCs to escape immunity and brought insights into the mechanisms of virus escape from immune control. A better understanding of the mechanisms of subversion of DC functions by HBV may be promising for developing new therapeutic strategies restoring an efficient immune control of the virus.

Materials and Methods

Patient and control samples

This study protocol conformed to the local ethics committee of Grenoble University Hospital (CHU Grenoble) and the French Blood Service's (EFS Auvergne Rhone-Alpes) Institutional Review Board and were declared under the number DC-2008-787 and DC-2011-1487. Written informed consent was obtained from each participant prior their enrolment in this study. Blood samples were obtained from chronically HBV infected patients (HBV, 130 in total) and healthy donors (HD, 85 in total). Exclusion criteria included infection with human immunodeficiency virus (HIV), co-infection with hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus (HDV), other liver diseases, and current treatment with IFN α or immunosuppressive agents. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood samples using Ficoll-paque density gradient centrifugation according to the manufacturer's instructions (Eurobio, Courtaboeuf, France). Plasma samples were collected and stored frozen. Serum HBsAg and viral load (HBV DNA) levels were quantified using the Abbott Architect i2000sr QT assay (Abbott Diagnostics, Rungis, France) and COBAS Ampliprep/Taqman (Roche Diagnostics, Meylan, France) respectively. Liver biopsy samples were obtained from 29 HBV-infected patients and 33 non-viral infected patients comprising of 28 nonalcoholic metabolic steatohepatitis (NASH), 2 unknown hypertransaminasemia, 1 primary sclerosing cholangitis (CSP), 1 primary biliary cholangitis (CBP) and 1 unknown steatopathy. Briefly, liver tissue was reduced to cell suspensions using a potter and the digested material was subsequently separated from other aggregates. Liver mononuclear cells (LMNCs) were counted using a viability dye trypan blue 0.02%. A mean of $1.3 \cdot 10^6$

LMNCs was generally obtained after this procedure. The main clinical characteristics of the patients are summarized in Supporting Table 1.

Flow cytometry phenotypic analysis

For phenotypic analysis, fresh PBMCs were stained with fluorochrome-labeled anti-human CD11c, CD86, HLA-DR, OX40L, 4-1BBL (BD, Pont de Claix, France), Lin (Biolegend, San Diego, USA), CD40, CD45, CD80, CD1c/BDCA1, TLR4 (Beckman, Villepinte, France), 4-1BBL (Clinisciences, Nanterre, France), ICOS-L/CD275, TLR9 (eBiosciences/ ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France), BDCA2, BDCA3 (Miltenyi Biotec, Paris, France), and GITRL (R&D systems, Abingdon, United Kingdom) antibodies. TLR3, TLR8 and TLR9 staining were performed after surface molecules staining and cell permeabilization by using fluorochrome-labeled anti-human TLR3 (Abcam, Paris, France), TLR8 (Novus Biologicals/R&D systems) and TLR9 (eBiosciences/ ThermoFisher). Fresh liver cell suspension (LMNCs) were stained with anti-human CD11c, CD86, HLA-DR(BD), Lin (Biolegend); CD40, CD45, CD80, CD1c/BDCA1(Beckman), BDCA2 and BDCA3 (Miltenyi Biotec) antibodies. Stained cells were then analyzed using a LSRII Flow Cytometer or FACSCanto II instruments and FACSDiva software (BD). Isotype controls were used to discriminate positive cells from nonspecific background staining and dead cells were excluded with Live and Dead cell stain (ThermoFisher). When the percentage expression was not enough to discriminate between groups, mean fluorescence intensity (MFI) were analyzed and shown only when the mean percentage of total positive cells was $\geq 30\%$. BDCA1+ cDC2 were defined as CD45+Lin-HLA-DR+CD11c+BDCA1+ cells, BDCA2+ pDCs were defined as CD45+Lin-HLA-DR+CD11c-BDCA2+ cells, and BDCA3+ cDC1 were defined as CD45+Lin-HLA-DR+CD11c+BDCA3^{high} cells. To ensure quality control during the study, we performed a systematic standardization of the fluorescence intensities using cytometer setup and tracking beads (CST) (BD).

Functional analysis of circulating and intrahepatic DC subsets in response to TLRs triggering

Intracellular cytokine staining

For intracellular cytokine characterization, 500 μ l of fresh whole blood samples of healthy donors or chronic HBV patients were cultured for 5 hours with or without toll like receptors (TLRs) ligands alone or mixed together, comprising polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C, 100 μ g/mL), Imiquimod (R848, 1 μ g/mL) and Class A CpG oligonucleotide ODN-2336 (CpG_A, 50 μ g/mL) (Invivogen, San Diego, USA). During the last 4 hours, cells were incubated with 1 μ g/mL of Brefeldin A (BD, Pont de Claix, France). Subsequently, cells were stained for surface molecules with fluorochrome-labeled anti-human CD11c, HLA-DR (BD), Lin (Biolegend), CD45, CD1c/BDCA1(Beckman), Live and Dead (ThermoFisher), BDCA2 and BDCA3 (Miltenyi Biotec) antibodies. Cells were then fixed and permeabilized for intracellular cytokine staining using the fluorochrome-labeled anti-human TNF α , IL-12p40/70 (BD), IFN α (Miltenyi

Biotec) antibodies and anti-human IFN λ 1 (Novus Biologicals/R&D systems, Lille, France) stained with mix-n-stain CF488 (Biotum, Fremont, USA). Cytokine-producing cell frequencies were analyzed by flow cytometry using LSRII Flow Cytometer instrument and FACSDiva software (BD).

Maturation and cytokine secretion

To analyze the maturation of DCs upon TLR triggering, freshly isolated PBMCs and LMNCs from chronic HBV patients or healthy donors / non-viral infected controls were cultured at a concentration of 1.10^6 cells/mL for 22 hours with or without a single or a mixture (MIX) of TLRs comprising polyI:C (30 μ g/mL), R848 (1 μ g/mL) and CpG_A ODN-2336 (1 μ mole/L) (Invivogen). All cultures were performed in RPMI 1640/GlutaMAX (Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 1% non-essential amino acids, 100 μ g/mL gentamycin, 10% fetal calf serum (Invitrogen/Thermoscientific, Illkirch-Graffenstaden, France), and 1 mmol/L sodium pyruvate (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Peripheral and hepatic DC's activation status was measured by flow cytometry using fluorochrome-labeled anti-human CD11c, CD86, HLA-DR (BD), Lin (Biolegend), CD40, CD45, CD1c/BDCA1, CD80 (Beckman), Live and Dead (ThermoFisher), BDCA2 and BDCA3 (Miltenyi Biotec) antibodies. Analysis was performed using LSRII Flow Cytometer and FACSDiva software (BD). PBMCs and LMNCs supernatants were harvested after 22 hours of culture and cytokine secretions of IL-12p70, IFN α 2, IFN λ 1, TNF α , TGF β 1, IFN β , IP10, MCP-1 and IFN λ 2 were measured by Luminex Technology (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Cytokines were divided into 4 panels based on assay dynamic compatibility. Each 96-well plate included 8-fold serial dilutions of standards tested in duplicate and samples. The experiment was then performed according to manufacturer's magnetic Luminex screening assay protocol (Bio-Rad). Briefly, a microparticle cocktail of capture beads, cell supernatants or cytokine standards were added to a 96-well plate. Following incubation, plates were washed and a biotin antibody detection cocktail was added. After incubation, streptavidin-Phycoerythrin (PE) was added and plates were read on the MAGPIX[®]200 instrument. Raw data were analyzed using the xPONENT[®] software. Inter-assay variability was determined by quantifying the same control sample on each day of analysis, which was frozen in multiple aliquots thawed once on the day of the assay. Cytokine secretion was reported to corresponding major DC subsets by calculating the amount/ 10^5 DC number.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Mann–Whitney non-parametric *U*-test, 2-way row matching analysis of variance (2 way RM-ANOVA) and Spearman correlation using Graph Pad Prism software version 5.01 (Graph Pad, La Jolla, CA).

Results

Circulating and intrahepatic BDCA1+ cDC2, BDCA2+pDCs, and BDCA3+ cDC1 from chronic HBV infected patients display an altered frequency

The features of circulating and liver-infiltrating DC subsets from chronic HBV patients are not well studied due to the limited amount of blood and biopsy materials. We designed a multiparametric flow cytometry analysis strategy allowing the simultaneous and extensive analysis of the phenotype of the three major DC subsets, from blood or liver samples (**Supporting Fig. S1A**). Among CD45+ cells within PBMC from fresh blood or LMNCs from liver cell suspensions, DCs were identified by their lack of expression of Lin markers and their positivity for HLA-DR. Then, BDCA1+ cDC2 were defined as CD11c+ CD1c/BDCA1+ cells, pDCs identified as CD11c-BDCA1-BDCA2+ cells, and BDCA3+ cDC1 picked out as CD11c+BDCA3^{high} cells (**Supporting Fig. S1A**). Evaluation of the proportions of BDCA1+ cDC2, pDCs and BDCA3+ cDC1 highlighted significant reduced frequencies of all circulating DC subsets in chronic HBV patients compared to healthy donors (**Fig. 1A**). Importantly, our study revealed a significantly higher frequency of BDCA2+ pDCs in liver from chronic HBV patients compared to non-viral infected controls (**Fig. 1A**) while similar percentages of BDCA1+ and BDCA3+ cDCs were observed in liver from HBV and non-HBV infected patients, suggesting a specific active recruitment of pDCs in the liver of HBV patients. Notably, the frequency of circulating BDCA1+ cDC2 negatively correlated with HBsAg level (spearman $r = -0.47$, $p = 0.007$) whereas the proportion of intrahepatic BDCA2+ pDCs positively correlated with HBsAg level (spearman $r = 0.58$, $p = 0.012$) (**Supporting Fig. S1B**), suggesting that HBV virus may modulate DC subsets repartition in blood and liver. In addition, frequencies of circulating and intrahepatic DC subsets were also correlated between them in chronic HBV patients (**Supporting Fig. S1C, S1D**), suggesting that all DC subsets were modulated simultaneously. Thus, chronic HBV infection appears to decrease peripheral DC subset frequencies and favor pDC's infiltration into the liver.

The modulated expression of immune checkpoints by circulating DC subsets from chronic HBV patients correlates with viral load and HBsAg levels

We next investigated the basal activation status of the DC subsets in both blood (**Fig. 1B and Supporting Fig.S2A**) and liver (**Fig. 1C and Supporting Fig.S2A**) samples from chronic HBV infected patients. Analyses revealed that circulating and hepatic BDCA1+ cDC2 from HBV patients displayed reduced expression of CD40 and/or CD80 (**Fig. 1B and 1C**) indicating that BDCA1+ cDC2 in HBV patients are less activated compared to HD. In contrast, circulating (**Fig. 1B**) as well as intrahepatic (**Supporting Fig. S2B**) BDCA2+ pDCs displayed an upregulation of CD40 suggesting that chronic HBV infection could also modulate pDC activation status. Furthermore, we observed a lower expression of CD80 on

circulating BDCA3+ cDC1 (**Fig. 1B**) while intrahepatic BDCA3+ cDC1 showed higher expression of CD40 activation marker (**Fig. 1C**) which correlated positively with HBsAg level (**Supporting Fig. S2C**). This suggests that circulating BDCA3+ cDC1 with an immature status become activated when infiltrating HBV-infected liver. Interestingly, CD80 expression was correlated between peripheral BDCA1+ cDC2 and BDCA3+ cDC1 (**Supporting Fig. S2D**), as well as between intrahepatic DC subsets (**Supporting Fig. S2E**) in chronic HBV patients, suggesting that HBV infection modulates CD80 expression simultaneously on blood and liver DCs subsets. In addition, significant correlations were obtained between the expression of co-activation markers by DCs from blood (**Supporting Table 3**) or liver (**Supporting Table 5**) of chronic HBV patients and parameters linked to HBV chronic infection (HBsAg and HBV DNA), pointing out the clinical relevance of the modulation of the basal activation status of DC subsets.

As DCs are crucial in immune response induction and regulation, we further assessed the expression of co-stimulatory/co-inhibitory molecules involved in DC cross-talks with other immune effectors, including OX40L, 4-1BBL, GITRL, ICOSL, and PDL1 (**Fig. 2 and Supporting Fig. S3A**). The expression of both OX40L and 4-1BBL co-stimulatory molecules expression was significantly down-regulated on BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 while only OX40L expression was reduced on BDCA1+ cDC2 (**Fig. 2A**) from chronic HBV patients compared to healthy donors. The proportion of blood and liver DC subsets expressing the co-inhibitory molecule PDL1 was similar between chronic HBV patients and controls (**Supporting Fig. S3B**), but negatively correlated with viral load in viremic patients for BDCA1+ cDC2 and BDCA2+pDCs (**Supporting Table 2 and 3**). Importantly, the proportion of cells expressing these checkpoint inhibitors is negatively correlated with HBV DNA levels in viremic patients (**Supporting Fig. S3C**) and/or HBsAg levels (**Supporting Table 2, 3, and 4**). Furthermore, analyses highlighted tight correlations of the expression of OX40L and 4-1BBL between peripheral BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 in chronic patients (**Fig. 2B**), indicating that expression of costimulatory molecules on chronic HBV patients is impaired in the same way on all blood DCs subsets. Hence, these results indicated that by altering the immune checkpoints OX40L and 4-1BBL expression on blood DC subsets, HBV may subvert DC cross-talks with other immune cells and impair the subsequent activation of anti-viral immune effectors.

TLR4, TLR8 and TLR9 expression is altered in blood DC subsets from chronic HBV patients

To assess the influence of chronic HBV infection on DC ability to sense pathogens through TLR, we first investigated the basal expression levels of specific TLRs on each DC subset by flow cytometry (**Fig. 3 and Supporting Fig. S4**). We observed a significant alteration of TLR4 and TLR8 expression on BDCA1+ cDC2 as well as a reduced expression of TLR9 on BDCA2+ pDCs (**Fig. 3**) from chronic HBV infected patients compared to healthy donors. Our results also revealed a tendency to a down-regulation of TLR3 expression on BDCA3+ cDC1, although not significant (**Fig. 3**). These data strongly suggest that HBV impairs TLRs expression by circulating DCs which may lead to a defect of their innate functions.

Taken together, these data indicated that chronic HBV infection could impair pattern recognition receptors expression on DC subsets which may in turn reduce their innate immune functions.

The maturation of circulating and hepatic pDCs and cDCs upon TLR triggering is impaired in chronic HBV patients according to HBsAg levels

To understand whether the alterations of TLR expression on circulating DC subsets resulted in an impairment of their ability to respond to TLR stimulation, we monitored the expression of activation molecules by BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 in response to specific single or combined TLR ligands (**Fig. 4 and Supporting Fig. S5**). For this purpose, the expression of CD40, CD80, and CD86 was studied after stimulation of PBMCs with or without TLR3-L (polyI:C), TLR7/8-L (R848) and TLR9-L (CPG_A) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A). The upregulation of CD40, CD80, and CD86 (% and/or MFI) was significantly hampered on circulating BDCA1+ cDC2 (**Fig. 4A and Supporting Fig. S5A**), BDCA2+ pDCs (**Fig. 4B and Supporting Fig. S5B**), and BDCA3+ cDC1 (**Fig. 4C and Supporting Fig. S5C**) from chronic HBV patients compared to healthy donors upon TLR3, TLR7/8, and/or 9 triggering. Extensive analyses showed that these modulations were positively correlated between peripheral BDCA1+ cDC2 and BDCA2+ pDCs (**Supporting Fig. S6A**) in chronic patients, with also cross-correlations between the activation markers (**Supporting Fig. S6B**). These data indicate that the maturation of peripheral DC's after TLR triggering is altered alike on all blood DCs subsets in chronic HBV patients. Interestingly, further analyses indicated significant negative correlations between the impaired maturation status of DCs from chronic HBV patients with HBV DNA and HBsAg levels (**Fig. 4D and Supporting Table 2, 4**). Hence, these data indicated that circulating DC subsets from chronic HBV patients exhibit dysfunctional maturation responses to TLR stimuli that are closely linked to liver and/or viral parameters.

Due to the limited amount of biopsy material, we assessed the ability of intrahepatic DCs to respond to TLR triggering by stimulation of the liver cell suspensions with only the mixture of TLR ligands (MIX: polyI:C+R848+CPG_A). The ability of BDCA1+ cDC2 to mature in response to TLR triggering was similar between chronic HBV patients and controls (**Fig. 5A**). Noteworthy, we revealed an impairment of the upregulation of CD40 and CD86 molecules on hepatic BDCA2+ pDCs and of CD40 and CD80 markers on hepatic BDCA3+ cDC1 (**Fig. 5A**) from chronic HBV patients compared to controls. In addition, we showed that the impaired upregulation of CD80 on BDCA3+ cDC1 upon TLR triggering was correlated to patient viral load (spearman $r=-0.681$, $p=0.050$) (**Fig. 5B**). Further analyses revealed that the expression of CD86 after TLRs stimulation correlated between intrahepatic DC subsets (**Supporting Fig. S7A, S7B, S7C**) in chronic HBV patients. BDCA1+ cDC2 maturation was similar between chronic HBV patients and controls after TLR triggering. Taken together, these results suggest that HBV infection modulates the hepatic DC's maturation in a comparative way on pDC and cDC1 liver DCs. Taken

together, these results strongly suggest that HBV infection can impair DC's maturation at both peripheral and hepatic levels and that could be linked to liver disease state and/or viral parameters.

cDCs and pDCs from blood of chronic HBV patients display an impaired antiviral cytokine production upon TLR triggering that correlates with HBV infection parameters

The functional capacity of blood DC subsets to produce cytokines in response to TLR stimulation was next investigated by performing intracellular labeling of IL-12p40/70, TNF α , IFN α , and IFN λ 1 (IL-29) upon culturing whole blood cells 5h with or without single or mixed TLR (Fig. 6 and Supporting Fig. S8A). We observed significant impairments of IL-12p40/70 and TNF α production under stimulation with polyI:C, R848, and/or mixed TLR (MIX) agonists by BDCA1+ cDC2 from chronic HBV infected patients compared to healthy donors (Fig. 6A). Importantly, BDCA2+ pDCs from chronic HBV patients displayed an impaired production of IFN α , TNF α and IFN λ 1 under R848 and/or mixed TLR ligands (MIX) stimulation compared to controls (Fig. 6B). Furthermore, we highlighted an altered production of IFN λ 1, TNF α , and IL-12p40/70 under polyI:C, R848, and/or mixed TLR (MIX) stimulation by BDCA3+ cDC1 from chronic HBV patients compared to controls (Fig. 6C). Interestingly, the proportions of cytokine-producing cells within each DC subset after TLRs stimulation were highly correlated in chronic HBV patients, as observed for IL-12p40/70- and TNF α -producing BDCA1+ cDC2 (Supporting Fig. S8B), IFN α - and TNF α -producing BDCA2+ pDCs (Supporting Fig. S8C), and IFN λ 1-, TNF α -, and IL-12p40/70-producing BDCA3+ cDC1 (Supporting Fig. S8D). Moreover, the impaired productions of anti-viral cytokines upon TLR triggering within specific blood DC subsets were closely related, as we observed positive cross-correlations between IFN α /TNF α -producing-BDCA2+ pDCs, IL-12p40/70/TNF α -producing BDCA1+ cDC2, and IFN λ 1-producing BDCA3+ cDC1 (Supporting Fig. S9A, S9B, S9C). Notably, we noticed that impairments of peripheral BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 to produce IFN λ 1, TNF α , and IL-12p40/70 were negatively correlated with HBsAg or HBV DNA levels from chronic HBV patients (Supporting Fig. S9D, Table 2, 3 and 4). All together these data indicate that the capacity of circulating DC subsets to produce anti-viral cytokines upon TLR activation is highly impaired in chronic HBV infected patients. Due to the limited number of cytokines that could be analyzed by intracellular staining, we explored the secretion of a larger panel of cytokines and chemokines by Luminex in the supernatants of PBMCs stimulated or not with a single or a mixture of TLR ligands. We observed a lower production of IFN α 2, IFN β , IFN λ 1, and IFN λ 2 anti-viral cytokines upon stimulation of PBMC with polyI:C and/or CpG α TLR ligands (Supporting Fig. S10A). Interestingly, there was a tendency in a negative correlation between IFN λ 1 secretion in response to polyI:C with HBsAg level in chronic HBV patients (not shown) suggesting that HBsAg may modulate peripheral IFN λ 1 production. As we know which DC subsets are the major producers of specific cytokines, we assessed the impact of HBV on each DC subset's for specific cytokines by expressing the concentration of the secreted cytokines

IL-12p70 per cDC1+cDC2, IFN α 2 and IFN β per pDCs, IFN λ 1 and IFN λ 2 per cDC1+pDCs in the corresponding samples. Analyses confirmed an impaired secretion of IL-12p70, IFN α 2, IFN β , IFN λ 1, and IFN λ 2 in the corresponding DC producing them upon polyI:C, CpGA and/or MIX stimulation (**Fig. 6D**), that negatively correlated with HBV viral load in patients (**Supporting Fig. S10B, Supporting Table 5**). Among the other cytokines or chemokines commonly produced by DC family, we found an overexpression of the chemokine MCP-1 upon polyI:C and CpGA stimulation (**Supporting Fig. S11A**) that positively correlated with HBsAg levels (**Supporting Fig. S11B**). This data suggests that HBV may favor the recruitment of immune cells like monocytes or dendritic cells to the sites of inflammation or infection. In an interesting way, we also highlighted a significant increased production of the immunosuppressive cytokine TGF- β 1 by PBMC from chronic HBV patients compared to healthy donors under steady state conditions that was conserved upon stimulation with TLRL (**Supporting Fig. S11A**). Taken together, these data indicated that HBV impairs antiviral cytokine production and increase immuno-regulatory cytokine secretion by blood DC subsets.

Intrahepatic BDCA1+ cDC2 from chronic HBV patients display higher cytokine production upon TLR triggering

We investigated the impact of HBV on cytokine production by LMNCs upon stimulation with a mixture of TLRL (**Fig. 7**). Most of the cytokines/chemokines analyzed were similarly produced by LMNCs from chronic HBV patients and controls (**Fig. 7A**) but positively correlated with HBsAg level in patients (**Fig. 7B, Supporting Table 6**). IFN α 2 secretion by hepatic cells was not shown because samples were below the detection limit of the assay. As previously described for PBMCs, we calculated the concentration IL-12p70 per cDC1+cDC2, IFN α 2 and IFN β per pDCs, IFN λ 1 and IFN λ 2 per cDC1+pDCs in the corresponding samples. Very interestingly, analyses highlighted a similar ability of intrahepatic DCs to secrete of IL-12p70, IFN β , IFN λ 1 and IFN λ 2 in patients compared to controls (**Fig. 7C**). These results suggest that intrahepatic DC subsets are still functional with an improved capacity to respond to TLR triggering by secreting the critical IL-12, IFN β , IFN λ 1, and IFN λ 2. Notably, the productions of anti-viral cytokines upon TLR triggering within specific hepatic DC subset were closely related, as we observed tight positive cross-correlations between IL-12p70-producing-cDC1+cDC2 and IFN λ 2-producing cDC1+pDCs, as well as strong positive cross-correlations between IFN β -producing-pDCs and IFN λ 1/IFN λ 2-producing cDC1+pDCs (**Supporting Fig. S12**). Hence, the higher levels of pro-inflammatory cytokines in the liver following TLR activation could indicate that HBV might favor liver inflammation that could lead to a worsening of the liver disease, while dampening DCs' fitness driving an impaired anti-viral immunity.

Discussion:

DCs are crucial immune sentinels which play a central role in viral infections because of their unique ability to rapidly sense pathogens or virus-infected cells through TLR and trigger antiviral effectors through co-activation and co-stimulatory molecules, as well as production of several cytokines. HBV develops multifaceted strategies to evade this immune surveillance, yet the pathogenic mechanisms of this escape remains poorly investigated. We highlight here potent alterations in the phenotype and function of circulating and hepatic BDCA1+, BDCA2+ and BDCA3+ DC subsets, revealing that HBV may subvert DCs to escape immune control. DCs analyses have been primarily limited to circulating BDCA1+ cDC2 and BDCA2+ pDCs of chronic HBV patients. Very few studies have investigated the impact of HBV on blood BDCA3+ cDC1 and even less studies assessed the features of hepatic DC subsets as well as the functionality of DCs directly in patients. This work provides novel insights into the immunopathogenesis of HBV and the reasons for the failure of the triggering of an effective anti-viral immune response.

In the context of HBV infection, most studies on DCs were performed by analyzing the impact of HBV or HBV antigens *in vitro* on DCs purified from healthy donors, and/or in patients but limited to the assessment of activation markers and few cytokines. In the present work, we performed an extensive analysis of the phenotype and function of the three major DC subsets simultaneously, directly *in vivo* in HBV patients, in both blood and liver, and by examining frequency, activation markers but also immune checkpoints, TLR expression, and their ability to secrete a large panel of cytokines including type I and type III IFN in response to TLR triggering. All these parameters are critical in determining the outcome of subsequent immune responses triggered by DCs and deciphering about the immunopathogenesis of HBV infection.

We first showed reduced frequencies of the 3 circulating DC subsets (BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs as well as BDCA3+ cDC1) together with an increased frequency of pDCs in the liver in patients with chronic HBV infection compared to non-infected samples. Perturbations of circulating DC subsets have been already reported in HBV patients, especially lower frequencies of blood BDCA1+ cDC2 and BDCA2+ pDCs^{27, 30}. Accumulation of CD11c+ cells^{34, 35}, pDCs³⁵ and BDCA3+ cDC1¹⁶ into portal areas of the liver of HBV patients were highlighted by assessing the density of these cells upon immunohistochemical staining of liver sections. We performed flow cytometry analyses of LMNCs, which allows analyzing a larger portion of tissue and more precisely defining DC subsets using a combination of several markers, which may explain the discrepancies between our results and the one from other teams, as we observed no difference between hepatic mDC subsets from chronic HBV patients compared to controls. Interestingly, our study revealed tight correlations between frequencies of DC subsets, both in circulation and in liver, suggesting that DC's frequency modulations by HBV are simultaneously affected. In addition, we observed a strong negative correlation between the frequency of peripheral

BDCA1+ cDC2 and plasmatic HBsAg levels, while the frequency of hepatic BDCA2+ pDCs correlated positively with HBsAg levels. Our data together with other studies suggest an active recruitment of pDCs from the blood to the inflamed liver and local sites of infection. HBV may therefore directly impact DC trafficking, although we cannot exclude other factors which may result in reduction of circulating DC pools such as the potential direct impact of HBV or HBV-derived factors on DCs enhancing their susceptibility to apoptosis²⁰, or the potential reduction of DC progenitors within the bone marrow^{34, 36}.

We show that blood and/or liver BDCA1+ cDC2 display an impaired basal expression of co-activation (CD40, CD80) and co-stimulatory (OX40L) markers associated with a reduced expression of TLR8 and TLR4 sensors. Interestingly, we also highlight impairments in the ability to mature as well as in the secretion of IL-12p70 and TNF α upon TLR3, TLR8 for circulating BDCA1+ cDC2 of chronic HBV patients compared to controls, whereas liver BDCA1+ cDC2 display no impairment in their maturation capacity and a potential improved response to TLR triggering. These results bring additional evidences to observations describing decreased expression of co-activation molecules and defective IL-12 production by circulating BDCA1+ cDC2 of patients with chronic HBV infection^{20, 21, 25}. The observed modulations of maturation and cytokine secretion upon TLR triggering could result either from a direct effect of specific TLR on corresponding DC subsets or can be linked to the indirect impact of other DC subsets. In addition, we describe for the first time correlations between BDCA1+ cDC2 impairments and plasmatic HBV DNA and HBsAg levels, indicating a direct impact of HBV and/or HBV proteins and chronic inflammation on BDCA1+ cDC2 phenotype, maturation and function. Indeed, it is known that the liver and peripheral blood of HBV infected individuals can reach levels of 10^9 - 10^{10} infectious particles per mL and 10,000-fold higher concentrations of HBsAg³⁷. This may allow multiple interactions between the virus / viral particles, and DCs. Previous data reported *in vitro* that HBsAg can interact with BDCA1+ cDC2 from healthy donors in a TLR4- and CD14-dependent manner²² or via the mannose receptor³⁸, potentially resulting in HBsAg picking up by cDCs²⁵. The subsequent impact of HBsAg on cDCs is still controversial, triggering either an inhibition of cDCs function²⁵ or a strong activation of BDCA1+ cDC2²² depending on the source of HBsAg (purified from patients' plasma or recombinant form). HBcAg and HBeAg may also drive cDCs toward a regulatory / inhibitory phenotype^{23, 24}. Hence, these results suggest that HBV may hijack the anti-viral immune responses through hampering BDCA1+ cDC2.

We previously demonstrated that BDCA2+ pDCs from chronic HBV patients display a modulation of co-activation and co-stimulatory markers in both blood and liver associated with a reduced ability to produce IFN α following TLR9 triggering for blood BDCA2+ pDCs³⁰. We confirmed here on a new cohort that blood and liver BDCA2+ pDCs from chronic HBV patients display a more activated status, and further showed a down-regulation of OX40L and 4-1BBL expression together with an alteration of TLR9

expression on circulating pDCs, associated with a defective maturation and a reduced IFN α , IFN λ 1, and TNF α production in response to stimulation with TLR7/9L and the mixture of TLRL. This is in line with other studies reporting an impairment of TLR9 expression on blood pDCs associated with an alteration of pDC functions in the presence of HBV^{26,27}. The inability to reveal IFN α production by pDCs after CpG_A triggering following intracellular cytokine staining from whole blood (not shown) is concordant with others studies revealing the incapacity to detect IFN α within pDCs after whole blood stimulation with classical concentrations of CpG_A³⁹. However, stimulation of PBMC with standard concentrations of CpG_A showed an impaired production of IFN α by pDCs from chronic HBV patients, both in proportion (as revealed by intracellular staining) and in amount of cytokine per cells (as confirmed by analysis of culture supernatant). IFN β production upon TLR9 triggering was also altered. Our analysis revealed correlations between pDCs modulations and plasmatic HBV DNA and HBsAg levels, suggesting that pDCs status is strongly linked to viral parameters and inflammation patterns. Results found in HBV patients are concordant with the impact of HBV *in vitro* on BDCA2+ pDCs from healthy donors showing that HBV actively inhibits pDC function through HBsAg and HBeAg, potentially by binding BDCA2 molecules^{28,29}. Interestingly, in response to TLR triggering, hepatic BDCA2+ pDCs were impaired in their maturation capacity. Taken together, these data demonstrated functional defects of pDCs from chronic HBV patients which might contribute to the failure to properly elicit anti-viral immune responses required for long term viral control. Therefore, skewing pDCs may be a strategy used by HBV to escape anti-viral immunity.

The proportion of BDCA3+ cDC1 within CD45+ cells is higher in HBV infected liver compared to blood; yet, the scarceness of this subset renders their functional analysis extremely challenging. A single study described that blood BDCA3+ cDC1 from chronic HBV patient display an altered capacity to mature and to produce IFN λ 1 after TLR3 triggering¹⁶. However, the features of intrahepatic BDCA3+ cDC1 in chronic HBV patients have never been explored before. For the first time, by performing phenotypic and functional analyses on both blood and liver BDCA3+ cDC1, we demonstrate in chronic HBV patients perturbations of their basal activation status, reduced expression of OX40L and 4-1BBL molecules, and impaired TLR3 sensors associated with an alteration of the maturation capacity and deficient production of IFN λ 1, TNF α and IL-12 following TLR3, TLR7/8, and/or TLR9 triggering. Analysis of supernatants of TLR-stimulated PBMC confirmed the defective IFN λ 1 production following TLR3 triggering and highlighted also an impaired IFN λ 2 secretion. Notably, our analyses revealed tight correlations between BDCA3+ cDC1 impairment and the clinical viral HBsAg and HBV DNA parameters, suggesting a direct impact of HBV or HBV antigens on BDCA3+ cDC1' functionality. This hypothesis is supported by a study showing that, *in vitro*, exposition of "healthy" blood or hepatic BDCA3+ cDC1 to HBsAg altered their capacity to produce IFN λ 1 upon TLR3 stimulation¹⁶.

The functional exploration of DC subsets within liver biopsies is very challenging. In contrast to the reduced IL-12p70, IFN α , IFN β , IFN λ 1, and IFN λ 2 cytokine production that was observed in PBMC in response to TLRs stimulation, IL-12, IFN β , IFN λ 1 and IFN λ 2 productions per corresponding hepatic DC subsets were similar in chronic HBV patients compared to controls. Hence, these data suggest that intrahepatic DC subsets are still functional with a tendency towards an improved capacity to respond to TLR triggering by secreting the critical IL-12, IFN β , IFN λ 1 and IFN λ 2 antiviral cytokines. This is in accordance with a recent study showing that liver specimen from patient with HBV infection did produce IFNs and induce expression of interferon stimulating genes (ISG) following PRR stimulation⁴⁰. These hepatic features were tightly linked with HBsAg levels, suggesting a differential impact of HBV within the liver. Indeed, those crucial cytokines, besides being anti-viral cytokines, are also pro-inflammatory cytokines that can be released by immune cells during HBV infection where it can contribute to the liver inflammation⁴¹. Hence, HBV and/or HBV proteins can impact DC function in order to favor the chronic inflammation itself. This suggests that the capacities of intrahepatic DC subsets can be restored using TLR ligands which are promising for immunotherapeutic purposes. In addition, we showed an increased production of the immunosuppressive cytokine TGF- β 1 by PBMC from HBV patients without any stimulation, which was maintained upon TLRs stimulation. This result is consistent with reported studies showing an up-regulation of TGF- β 1 in HBV patients that can suppress HBV replication and which might be associated with disease severity^{42, 43}. Furthermore, our study revealed increased production of MCP1 after TLR3 and TLR9 triggering of PBMCs from HBV patients. This suggests that via MCP-1 production, HBV might also favor immune cell recruitment at inflamed infection sites where they can increase the inflammation process and liver damages. This is in line with reported data suggesting that higher MCP-1 levels are associated with poor clinical outcomes in HBV infection⁴⁴.

The original and novel multi-parametric design of our study offers the unique opportunity to decipher the features of all three DC subsets within the same patient. Whereas no correlation between different DC subsets have been investigated in previous studies, we show for the first time that most of the alterations observed tightly correlated between BDCA1+ cDC2 and/or BDCA2+ pDCs and/or BDCA3+ cDC1, both for circulating and intrahepatic DCs. These observations indicate that the expression of co-activation and co-stimulatory molecules, TLR expression, modulations of maturation markers and/or cytokines secretion upon TLR triggering are subverted simultaneously on all DC subsets by HBV. Hence, subverted DCs can potentially, in turn, cross-regulate the other immune cell subsets. This result is supported by some studies presenting a cross-regulation between type I IFN and TNF α in immune-mediated inflammatory disease⁴⁵. These data suggest that modulations of circulating and hepatic DC features can result from direct impact of HBV, or from interactions of DC components with HBV proteins, as well as from cross-modulations of anterior modulated parameters on others.

Taken together, our findings clearly demonstrate that the features of the 3 major DC subsets are deeply subverted in chronic HBV patients in both blood and liver, and highlight the clinical relevance of these observations. As BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 are crucial in driving anti-viral responses, their phenotypic and functional alterations induced by HBV may subsequently impair proper cross-presentation of viral antigens⁴⁶, skew activation of cytotoxic effectors such as T cells and NK cells³⁰, and prevent elicitation of B cell immunity⁴⁷ which is ultimately required to counteract HBV infection, and such hijacking of DCs may therefore favor disease persistence. Type I and type III IFNs, which are deeply hampered by HBV, are crucial to innate and adaptive immune responses to viral infections^{48, 49} and inhibition of HBV replication. These substantial evidences suggest a deep impairment of the innate immune response, that, together with hijacking of other innate sensors⁵⁰, might alter the induction of effective adaptive immune responses and thus, explain the establishment of a persistent HBV infection. Moreover, these results indicate that DCs are available in the liver where they can be exploited to improve or redirect HBV-specific immune responses. For example, by targeting hepatic BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs or BDCA3+ cDC1 with TLR4, TLR9, and TLR3 ligands respectively, local IL-12, type I IFNs and IFN λ s production important for HBV clearance could be achieved. This work supports further investigations to assess the molecular mechanisms involved in BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 subversion by HBV, in order to exploit DC plasticity to restore efficient anti-viral responses. Our findings bring novel insights into the mechanisms of orientation of immune responses by HBV and virus escape from immune control. They provide bases for designing innovative immunotherapeutic strategies aiming at restoring DC functions through unlocking of the inhibition triggered by the virus, and allowing to restore efficient immune control of the virus and compromise the chronicity of infection.

Acknowledgements

We thank D. Legrand and her staff at EFS Auvergne Rhone-Alpes for providing healthy volunteers' blood samples; A. Marlu, L. Bordy, M. Médrala and S. Astolfi for providing samples and clinical information from chronic HBV patients; Pr B. Toussaint, Dr A. Legouellec and C. Trocme from TIMC-IMAG UMR 5525, University Grenoble Alpes, CNRS, CHU Grenoble for providing the Luminex assay platform; M. Pezet and P. Marche for providing the LSR II Flow cytometry platform; and the healthy volunteers and patients who agreed to participate in this study. We thank ANRS, FINOVI and EFS AuRA for their financial support to this study.

References:

1. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, et al. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015;386:1546-55.
2. Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* 2012;61 Suppl 1:i6-17.
3. Bertoletti A, Kennedy PTF, Durantel D. HBV infection and HCC: the 'dangerous liaisons'. *Gut* 2018;67:787-788.
4. Guidotti LG, Isogawa M, Chisari FV. Host-virus interactions in hepatitis B virus infection. *Curr Opin Immunol* 2015;36:61-6.
5. Peeridogaheh H, Meshkat Z, Habibzadeh S, et al. Current concepts on immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Virus Res* 2018;245:29-43.
6. Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:215-29.
7. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017;67:370-398.
8. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 2018.
9. Sittig SP, Bakdash G, Weiden J, et al. A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators Inflamm* 2016;2016:3605643.
10. Hemont C, Neel A, Heslan M, et al. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol* 2013;93:599-609.
11. Worah K, Mathan TSM, Vu Manh TP, et al. Proteomics of Human Dendritic Cell Subsets Reveals Subset-Specific Surface Markers and Differential Inflammasome Function. *Cell Rep* 2016;16:2953-2966.
12. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:471-85.
13. Palucka K, Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 2002;14:420-31.
14. Soysa R, Wu X, Crispe IN. Dendritic cells in hepatitis and liver transplantation. *Liver Transpl* 2017;23:1433-1439.
15. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, et al. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-15.
16. van der Aa E, Buschow SI, Biesta PJ, et al. The Effect of Chronic Hepatitis B Virus Infection on BDCA3+ Dendritic Cell Frequency and Function. *PLoS One* 2016;11:e0161235.
17. van der Aa E, van Montfoort N, Woltman AM. BDCA3(+)CLEC9A(+) human dendritic cell function and development. *Semin Cell Dev Biol* 2015;41:39-48.
18. Wegscheid C, Karimi K, Tiegs G. Hepatic CD141(+)IFNlambda(+) DC subset: one against all? *J Hepatol* 2014;60:9-11.
19. Woltman AM, Boonstra A, Janssen HL. Dendritic cells in chronic viral hepatitis B and C: victims or guardian angels? *Gut* 2010;59:115-25.
20. van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004;40:738-46.
21. Duan XZ, Zhuang H, Wang M, et al. Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection (R2). *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:234-42.
22. van Montfoort N, van der Aa E, van den Bosch A, et al. Hepatitis B Virus Surface Antigen Activates Myeloid Dendritic Cells via a Soluble CD14-Dependent Mechanism. *J Virol* 2016;90:6187-99.
23. Li M, Zhou ZH, Sun XH, et al. Hepatitis B core antigen upregulates B7-H1 on dendritic cells by activating the AKT/ERK/P38 pathway: a possible mechanism of hepatitis B virus persistence. *Lab Invest* 2016;96:1156-1164.
24. Lan S, Wu L, Wang X, et al. Impact of HBeAg on the maturation and function of dendritic cells. *Int J Infect Dis* 2016;46:42-8.
25. Op den Brouw ML, Binda RS, van Roosmalen MH, et al. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology* 2009;126:280-9.
26. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, et al. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 2011;6:e26315.
27. Xie Q, Shen HC, Jia NN, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect* 2009;11:515-23.

28. Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 2009;46:2640-6.
29. Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, et al. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 2011;6:e15324.
30. Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder Costa J, et al. Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. *Gastroenterology* 2012;143:1586-1596 e8.
31. Martinet J, Leroy V, Dufeu-Duchesne T, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce efficient stimulation of antiviral immunity in the context of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2012;56:1706-18.
32. Pagliaccetti NE, Chu EN, Bolen CR, et al. Lambda and alpha interferons inhibit hepatitis B virus replication through a common molecular mechanism but with different in vivo activities. *Virology* 2010;401:197-206.
33. Chan HLY, Ahn SH, Chang TT, et al. Peginterferon lambda for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomized phase 2b study (LIRA-B). *J Hepatol* 2016;64:1011-1019.
34. Zhang Z, Chen D, Yao J, et al. Increased infiltration of intrahepatic DC subsets closely correlate with viral control and liver injury in immune active pediatric patients with chronic hepatitis B. *Clin Immunol* 2007;122:173-80.
35. Zhang Z, Zou ZS, Fu JL, et al. Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *J Hepatol* 2008;49:396-406.
36. Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2002;14:373-9.
37. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004;106:199-209.
38. Op den Brouw ML, Binda RS, Geijtenbeek TB, et al. The mannose receptor acts as hepatitis B virus surface antigen receptor mediating interaction with intrahepatic dendritic cells. *Virology* 2009;393:84-90.
39. Verronese E, Delgado A, Valladeau-Guilemond J, et al. Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay. *Oncoimmunology* 2016;5:e1100791.
40. Suslov A, Boldanova T, Wang X, et al. Hepatitis B Virus Does Not Interfere With Innate Immune Responses in the Human Liver. *Gastroenterology* 2018;154:1778-1790.
41. Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 2007;204:667-80.
42. Hong MH, Chou YC, Wu YC, et al. Transforming growth factor-beta1 suppresses hepatitis B virus replication by the reduction of hepatocyte nuclear factor-4alpha expression. *PLoS One* 2012;7:e30360.
43. Yu X, Guo R, Ming D, et al. The Transforming Growth Factor beta1/Interleukin-31 Pathway Is Upregulated in Patients with Hepatitis B Virus-Related Acute-on-Chronic Liver Failure and Is Associated with Disease Severity and Survival. *Clin Vaccine Immunol* 2015;22:484-92.
44. Grzegorzewska AE, Pajzderski D, Sowinska A, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 gene (MCP-1-2518 A/G) polymorphism and serological markers of hepatitis B virus infection in hemodialysis patients. *Med Sci Monit* 2014;20:1101-16.
45. Cantaert T, Baeten D, Tak PP, et al. Type I IFN and TNFalpha cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. *Arthritis Res Ther* 2010;12:219.
46. Gehring AJ, Haniffa M, Kennedy PT, et al. Mobilizing monocytes to cross-present circulating viral antigen in chronic infection. *J Clin Invest* 2013;123:3766-76.
47. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003;19:225-34.
48. Murira A, Lamarre A. Type-I Interferon Responses: From Friend to Foe in the Battle against Chronic Viral Infection. *Front Immunol* 2016;7:609.
49. Egli A, Santer DM, O'Shea D, et al. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg Microbes Infect* 2014;3:e51.
50. Faure-Dupuy S, Lucifora J, Durantel D. Interplay between the Hepatitis B Virus and Innate Immunity: From an Understanding to the Development of Therapeutic Concepts. *Viruses* 2017;9.

Figure legends

Fig. 1. Peripheral and intrahepatic DC subsets from chronic HBV patients displayed modulation of their basal activation status. DC subset's frequencies and expression of co-activation molecules CD40 and CD80 were analyzed by flow cytometry on peripheral blood and liver biopsies of chronic HBV patients and healthy donors or non-viral infected controls. Frequency analyses of BDCA1+, BDCA2+, and BDCA3+ DC subsets within **(A)** PBMC (from blood) and LMNCs (from liver biopsy) among alived CD45+ cells. Open symbols, healthy donors (HD) or non-viral infected controls (CTRL) (blood, n=19-21; liver, n=27 for BDCA2+ pDCs and n=15 for BDCA1+ and BDCA3+ cDC1); filled symbols, chronically HBV-infected patients (HBV) (blood, n=28-30; liver, n=25-27 for BDCA2+pDCs and n=11 for BDCA1+ and BDCA3+ cDC1). **(B, C)** Expression levels of the co-activation molecules CD40, CD80 and CD86 on circulating **(B)** and intrahepatic **(C)** BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 **((B)**, open symbols, HD (n=21); filled symbols, HBV (n =29-31) or **(C)** open symbols, controls (n=15); filled symbols, HBV (n=11-12)). Results are expressed as percentages or MFI of positive cells. Bars indicate mean. P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (straight line, *p≤0.05, **p<0.01, ***p<0.001) and non-parametric Mann–Whitney test (dashed lines).

Fig. 2. Impaired OX40L and 4-1BBL co-stimulatory molecules expression on peripheral DC subsets from chronic HBV patients. Co-stimulatory molecules expression was determined by flow cytometry on peripheral DC subsets among fresh PBMC isolated from HD and HBV patients. **(A)** Percentages of BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 expressing OX40L, 4-1BBL, ICOSL, and GITRL within PBMC. Open symbols, HD (n=17-18); filled symbols, HBV (n =23-25). Bars indicate mean. P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (straight line) and the Mann-Whitney test (dashed lines). **(B)** Spearman's correlations of OX40L and 4-1BBL expression between peripheral BDCA1+mDC, BDCA2+pDC and BDCA3+mDC subsets in chronic HBV patients (n=29-31).

Fig. 3. Impaired expression of TLR4, TLR8 and TLR9 in peripheral DC subsets from chronic HBV patients. Surface (TLR4) or intracellular (TLR3, TLR8 and TLR9) expression of TLRs was evaluated by flow cytometry on peripheral DC subsets from fresh PBMC isolated from HD and HBV patients. Percentages of BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 expressing the TLR molecules within the corresponding DC subset. Open symbols, HD (n=14-15 for TLR3,8,9 and n=27 for TLR4); filled symbols, patients with chronic HBV (n =24 for TLR3,7,9 and n=35 for TLR4). Bars indicate median. P values were calculated using the Mann-Whitney test.

Fig. 4. Defective maturation of circulating BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 of chronic HBV patients upon TLR triggering. PBMCs from HD or HBV patients were stimulated for 22 hours with or without TLRs (polyI:C, R848 or CPG_A (ODN2336)) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the expression of the maturation markers was measured by flow cytometry. Percentages of CD40, CD80, and CD86 molecules on **(A)** BDCA1+ cDC2, **(B)** BDCA2+ pDCs and **(C)** BDCA3+ cDC1. Open symbols, HD (n=13-18); filled symbols, HBV (n=22-26). P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (straight line) *p≤0.05, **p<0.01 and non-parametric Mann–Whitney test (dashed lines). Bar indicates mean. **(D)** Correlations between the expression of maturation molecule on BDCA1+ cDC2 and BDCA3+ cDC1 from HBV patients and plasmatic HBsAg level (n=19-21) (Spearman correlation).

Fig. 5. Altered maturation of intrahepatic BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 in chronic HBV patients after TLRs stimulation. Liver-infiltrating mononuclear cell (LMNCs) suspensions from non-viral infected controls or HBV patients were stimulated for 22 hours with a mixture of TLRs (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the expression of the maturation markers CD40, CD80, and CD86 was measured by flow cytometry. **(A)** Percentages or MFI of CD40, CD80, and CD86 molecules on BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1. Open symbols, CTRL (n=15-16); filled symbols, HBV (n=10-12). P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (straight line, *p≤0.05) and non-parametric Mann–Whitney test (dashed lines). Bar indicated mean. **(D)** Correlations between the maturation molecule expression of CD80 on intrahepatic BDCA3+ cDC1 from viremic HBV patients after MIX stimulation with viral load (n=9) (Spearman correlation).

Fig. 6. Impairment of intracellular IL-12p70, TNFα, IFNα and IFNλ1 (IL-29) production by blood DC subsets from chronic HBV patients upon TLR triggering. Whole blood samples were stimulated for 5 hours with or without polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the production of cytokines by each DC subset was measured by intracellular staining by flow cytometry. Percentages of cytokine-expressing cells within **(A)** BDCA1+ cDC2, **(B)** BDCA2+ pDCs, and **(C)** BDCA3+ cDC1. Open symbols, HD (n=20-24); filled symbols, HBV (n=20-26). **(D)** Cytokine's secretion by PBMC were reported to the absolute number of DCs present in sample before stimulation with TLRs by calculating the cytokine production per DC subset in each sample (amount of cytokine / 10⁵ DCs) for BDCA1+ cDC2 & BDCA3+ cDC1 (IL-12p70), BDCA2+ pDCs (IFNα2, IFNβ) and BDCA3+ cDC1 & BDCA2+ pDCs (IFNλ1, IFNλ2). Results are expressed in ng or pg/10⁵ DC subsets. Open symbols, HD (n=20-24); filled symbols, HBV patients (n=20-26). P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (straight line) *p≤0.05, **p<0.01, ***p≤0.001 ; and the Mann–Whitney test (dashed lines).

Fig. 7. Improvement of cytokine secretion by liver-infiltrating mononuclear cells (LMNCs) in chronic HBV patients upon TLR triggering. Liver-infiltrating cell suspensions (1×10^6 cells/ml) from non-viral infected controls or HBV patients were stimulated for 22 hours with a mixture of TLRL (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the culture supernatants were examined for the presence of IL-12p70, IFN β , IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2, TNF α , IP10, MCP1, IL-10, and TGF- β 1 by Luminex technology. **(A)** Quantification of cytokine secretion in the supernatants. Open symbols, HD (n=16); filled symbols, HBV (n=11-12). P values were calculated using Mann–Whitney test. **(B)** Correlation between the IL-12p70 secretion by intrahepatic DCs from HBV patients with plasmatic HBsAg levels (n=10) (Spearman correlation). **(C)** Cytokine's secretion by liver cell suspensions were reported to the absolute number of DCs present in samples before stimulation with the mix of TLRLs (amount of cytokine / 10^5 DC) as shown for BDCA1+ cDC2 & BDCA3+ cDC1 (IL-12p70), BDCA2+ pDCs (IFN β) and BDCA3+ cDC1 & BDCA2+ pDCs (IFN λ 1, IFN λ 2). Open symbols, HD (n=16-17); filled symbols, HBV (n=28-30). P values were calculated using Mann–Whitney test.

Supporting Tables and Figures legends

Supporting Table 1: Clinical characteristics of patients included in this study.

Supporting Table 2: Correlations between peripheral BDCA1+ cDC2 features and clinical parameters in HBV patients. The frequency and the expression of co-stimulatory and co-inhibitory as well as the maturation and intracellular cytokine production upon TLR triggering were evaluated within BDCA1+ cDC2 from fresh PBMC isolated from HBV patients and correlated with the clinical viral parameters. Spearman's correlations between the BDCA1+ cDC2 features and viral load (n=10-12) and/or plasmatic HBsAg level (n=23-30). Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$ or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$ are shown. Blue: negative correlation. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supporting Table 3: Correlations between peripheral BDCA2+ pDCs features and clinical patterns in HBV patients. The expression of co-stimulatory, co-inhibitory and TLR molecules as well as the intracellular cytokine production upon TLRL triggering were evaluated within BDCA2+ pDCs from fresh PBMC isolated from HBV patients and correlated with the clinical parameters. Spearman's correlations between the BDCA2+ pDCs features and viral load (n=10-12) and/or plasmatic HBsAg level (n=23-30).

Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$ or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$ are shown. Blue: negative correlation, * $p \leq 0.05$.

Supporting Table 4: Correlations between peripheral BDCA3+ cDC1 features and clinical patterns in HBV patients. The expression of co-stimulatory, co-inhibitory and TLR molecules as well as the maturation and intracellular cytokine production upon TLR triggering were evaluated within BDCA3+ cDC1 from fresh PBMC isolated from HBV patients and correlated with clinical parameters. Spearman's correlations between the secreted cytokines with viral load ($n=10-12$) and plasmatic HBsAg level ($n=22-30$). Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$ or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$ are shown. Blue: negative correlation, Red: positive correlation. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supporting Table 5: Correlations between circulating DC subset features and clinical patterns in HBV patients. PBMCs from HBV patients were cultured for 22 hours with or without TLRs *i.e.* polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and supernatants were harvested for the analysis of secreted cytokines by Luminex technology. IFN α 2, IFN λ 1 and IFN λ 2 secretion by PBMC were reported to the absolute number of BDCA2+ pDCs and/or BDCA3+ cDC1 present in samples before stimulation with TLRs by calculating the cytokine production per DC subset in each sample (amount of cytokine / 10^5 DCs). Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$ or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$ are shown. Blue: negative correlation, * $p \leq 0.05$, *** $p < 0.001$.

Supporting Table 6: Correlations between intrahepatic DC subset features and clinical patterns in HBV patients. DC subset's frequencies and expression of co-activation molecules were analyzed by flow cytometry on liver biopsies from chronic HBV patients. The activation status of DC subsets and cytokine secretion by LMNCs were evaluated after TLR triggering with a mixture of TLR (MIX) and correlated with the clinical parameters. Spearman's correlations between the BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 features and viral load and plasmatic HBsAg level ($n=10-12$). Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$ or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$ are shown. Blue: negative correlation, Red: positive correlation. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$.

Supporting Fig. S1. Circulating and intrahepatic DC subset's frequencies from chronic HBV patients and healthy donors or non-viral infected controls. DC subset's frequencies were analyzed by flow cytometry on peripheral blood and liver biopsies of chronic HBV patients and healthy donors or non-viral infected controls. **(A)** DC subsets gating strategy (representative flow cytometry plots of a HBV patient). Fresh cell suspension was analyzed by first gating on lived living cells. The DC populations were identified as CD45+HLA-DR+Lineage- (Lin: CD3/CD14/CD16/CD19/CD20/CD56) mononuclear

cells and subdivided as CD11c+CD1c/BDCA1+ cDC2, CD11c-BDCA2+ pDCs, and CD11c+BDCA2-BDCA3+ cDC1. **(B)** Spearman's correlations between the frequency of DC subsets from HBV patients and plasmatic HBsAg levels (blood BDCA1+ cDC2, n=31; intrahepatic BDCA2+ pDCs, n = 18). **(C)** Spearman's correlations of frequencies between the three different circulating DC subsets (n=31) or **(D)** intrahepatic DC subsets (n=10) from chronic HBV patients.

Supporting Fig. S2. Modulation of the basal activation status of circulating and intrahepatic DCs in chronic HBV patients. The expression of the co-activation molecules CD40, CD80, and CD86 was analyzed by flow cytometry on peripheral blood and liver biopsies of chronic HBV patients and healthy donors or non-viral infected controls. **(A)** Representative flow cytometry plots of a HD or CTRL and HBV patient. Fresh cell suspension was analyzed by first gating BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 as described above and the expression of activation molecules (here CD40) on each subset was analyzed. **(B)** MFI of CD40 expression on CD40+ intrahepatic DC subsets. Open symbols, CTRL (n=15); filled symbols, HBV (n =10-11). Bars indicate mean. P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (straight line) and non-parametric Mann–Whitney test (dashed lines). **(C)** Spearman's correlations of CD40 MFI on intrahepatic BDCA3+ cDC1 from HBV patients with plasmatic HBsAg levels (n=12). **(D)** Spearman's correlation of CD80 expression between peripheral BDCA1+ mDC and BDCA3+ mDC subsets in chronic HBV patients (n=30). **(E)** Spearman's correlation of %CD80 between intrahepatic BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 from chronic HBV patients (n=11-12).

Supporting Fig. S3. Modulation of co-stimulatory molecules expression on circulating BDCA2+ pDCs in chronic HBV patients. OX40L, 4-1BBL and ICOSL expressions were determined by flow cytometry on peripheral DC subsets from fresh PBMC isolated from HD and HBV patients. **(A)** Representative flow cytometry plots of a HD and HBV patient. Fresh cell suspension was analyzed by first gating BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 as described above and the expression of activation molecules (here OX40L) on each subset was analyzed. **(B)** Flow cytometry quantification of PDL1 expression on BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 from fresh PBMCs of HBV patients or healthy donors. Open symbols, HD (n=21); filled symbols, HBV patients (n =29-31). Bars indicate mean. P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (straight line). **(C)** Correlations between %4-1BBL sion on circulating BDCA3+ cDC1 from viremic HBV patients with viral load (n=11) (Spearman correlation).

Supporting Fig. S4. Gating strategy of TLR expression among circulating DC subsets. Fresh cell suspensions were analyzed by first gating BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 as described above and TLR expression was analyzed in corresponding DC subset. Surface TLR4 and intracellular

TLR8 in BDCA1+ cDC2, intracellular TLR9 in BDCA2+ pDCs; and intracellular TLR3 and TLR8 in BDCA3+ cDC1. Representative flow cytometry plots of a HD and HBV patient.

Supporting Fig. S5. Altered maturation of blood DC subsets in chronic HBV patients upon TLR stimulation. PBMCs from HD or HBV patients were cultured for 22 hours with or without polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A). Flow cytometry quantification of CD40, CD80, and CD86 (MFI) on positive cells within **(A)** BDCA1+ cDC2, **(B)** BDCA2+ pDCs, and **(C)** BDCA3+ cDC1. Open symbols, HD (n=13-18); filled symbols, HBV patients (n=22-26). P values were calculated using the 2-way-ANOVA test (straight line, *p<0.05, **p<0.01) or the Mann–Whitney test (dashed lines).

Supporting Fig. S6. Correlations of maturation molecules modulation upon TLR triggering between circulating DC subsets in chronic HBV patients. PBMCs from chronic HBV patients were cultured for 22 hours with or without polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A). The expression of the maturation markers CD40, CD80, and CD86 was measured on blood DC subsets by flow cytometry. **(A)** Spearman's correlations of single maturation marker modulation after TLR stimulation between peripheral BDCA1+ cDC2, and BDCA2+ pDCs; **(B)** Spearman's cross-correlations between distinct maturation markers expression under TLR stimulation between peripheral BDCA1+ cDC2 and BDCA2+ pDCs in chronic HBV patients (Spearman correlation, n=23-24). Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $r \geq 0.45$ or $r \leq -0.45$ with $p \leq 0.025$ are shown.

Supporting Fig. S7. Correlations of maturation molecules modulation upon TLR triggering between intrahepatic DC subsets in chronic HBV patients. LMNCs from chronic HBV patients were cultured for 22 hours with or without mixed TLR (MIX: polyI:C+R848+CPG_A). The expression of the maturation markers CD40, CD80 and CD86 was measured on hepatic DC subsets by flow cytometry. Spearman's correlations of CD86 expression after stimulation with mixed TLR between intrahepatic **(A)** BDCA1+ cDC2 and BDCA2+ pDCs, **(B)** BDCA1+ cDC2 and BDCA3+ cDC1, and **(C)** BDCA3+ cDC1 and BDCA2+ pDCs in chronic HBV patients (n=10-11).

Supporting Fig. S8. Correlations between the intracellular productions of antiviral cytokines by circulating DC subsets in chronic HBV patients after TLRs triggering. Whole blood samples were cultured for 5 hours with or without polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the production of intracellular cytokines by each subset was measured by flow cytometry. **(A)** Representative flow cytometry plots of a HD and HBV patient. Fresh cell suspension was analyzed by first gating BDCA1+ cDC2, BDCA2+ pDCs, and BDCA3+ cDC1 as described above and

the intracellular production of corresponding cytokines (here IL12p40/70 for BDCA1+ cDC2, IFN α for BDCA2+pDCs, and IFN λ 1 for BDCA3+ cDC1) on each subset was analyzed. Spearman correlations between the intracellular cytokine production by peripheral DC subsets from HBV patients within **(B)** IL-12p40/70 and TNF α by BDCA1+ cDC2, **(C)** TNF α and IFN α by BDCA2+ pDCs and **(D)** TNF α , IL-12p40/70, and IFN λ 1 by BDCA3+ cDC1 (n=23). Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $r \geq 0.45$ or $r \leq -0.45$ with $p \leq 0.025$ are shown.

Supporting Fig. S9. The impaired productions of intracellular IL-12p70, TNF α , IFN α and IFN λ 1 (IL-29) cytokines after TLRs triggering are tightly correlated among peripheral DC subsets in chronic HBV patients. Whole blood samples were cultured for 5 hours with or without polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the production of intracellular cytokines by each subset was measured by flow cytometry. Cross-correlations between the intracellular cytokine production were performed between **(A)** IL-12p70/TNF α -producing BDCA1+ cDC2 and IFN α /TNF α -producing BDCA2+ pDCs, **(B)** IL-12p70-producing BDCA1+ cDC2 and IFN λ 1-producing BDCA3+ cDC1, and **(C)** IFN α -producing BDCA2+ pDCs and IFN λ 1-producing BDCA3+ cDC1 (spearman correlation, n=24). **(D)** Spearman correlations between cytokine production by corresponding blood BDCA2+ pDCs and BDCA3+ cDC1 with HBsAg levels (n=18-20) and viral DNA (n=9). Only spearman $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$ and $r \geq 0.45$ or $r \leq -0.45$ or $r \geq -0.45$ with $p \leq 0.025$ are shown.

Supporting Fig. S10. Hepatitis B infection impairs IFN α 2, IFN β , IFN λ 1 and IFN λ 2 anti-viral cytokine secretion from chronic HBV patients after TLR triggering. DC subset's frequencies were analyzed by flow cytometry on PBMC of chronic HBV patients and healthy donors as previously described. PBMCs of HD or HBV patients were cultured for 22 hours with or without polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and culture supernatants were examined for the secretion of IL-12p70, IFN α 2, IFN β , IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2, TNF α , and TGF β 1 by Luminex technology. **(A)** Comparative cytokine secretion in HD and HBV patients (pg/ml). Open symbols, HD (n=14-16); filled symbols, HBV patients (n=26-27). **(B)** IFN α 2, IFN λ 1 and IFN λ 2 secretions by PBMC suspensions were reported to the absolute number of BDCA2+ pDCs and/or BDCA3+ cDC1 present in samples before stimulation and correlated with the viral DNA (n=11-12) in HBV patients.

Supporting Fig. S11. Modulation of the secretion of MCP-1 chemokine and increased regulatory TGF- β 1 secretion from PBMCs in HBV context after TLRs triggering. PBMCs from chronic HBV patients and healthy donors were cultured for 22 hours with or without polyI:C, R848, CPG_A (ODN2336) alone or mixed together (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the supernatant of culture was examined for

cytokine secretion by Luminex technology. **(A)** Comparative secretion of MCP-1, IP-10, IL-10 and TGF β 1 in HD and HBV patients (pg/ml). Open symbols, healthy donors (n=14-16); filled symbols, patients with chronic HBV (n=27-28). P values were calculated using the 2-way-RM ANOVA test (*p $\leq$ 0.05, straight line) and the Mann–Whitney test (dashed lines). **(B)** Spearman's correlations between MCP-1 cytokine secretion by PBMCs from HBV patients and plasmatic HBsAg levels (n=27).

Supporting Fig. S12. Correlations between the secretions of IL-12p70, TNF α , IFN β , IFN λ 1 (IL-29) and IFN λ 2 (IL-28A) cytokines after TLRs triggering of LMNCs in chronic HBV patients. DC subset's frequencies were analyzed by flow cytometry on LMNC of chronic HBV patients as previously described. Liver-infiltrating cell suspensions (1×10^6 cells/ml) from HBV patients were stimulated for 22 hours with a mixture of TLR (MIX: polyI:C+R848+CPG_A) and the supernatant of the cultures were examined for the presence of cytokine by Luminex technology. Cytokine's secretion by liver cell suspensions were reported to the absolute number of DCs present in samples before stimulation with the mixture of TLRs. Correlations between IL-12p70 reported to cDC1+cDC2 and IFN λ 2 reported to cDC1+pDCs, and IFN β reported to pDCs and IFN λ 1 or IFN λ 2 reported to cDC1+pDCs (spearman correlation, n=12).

Fig. 1

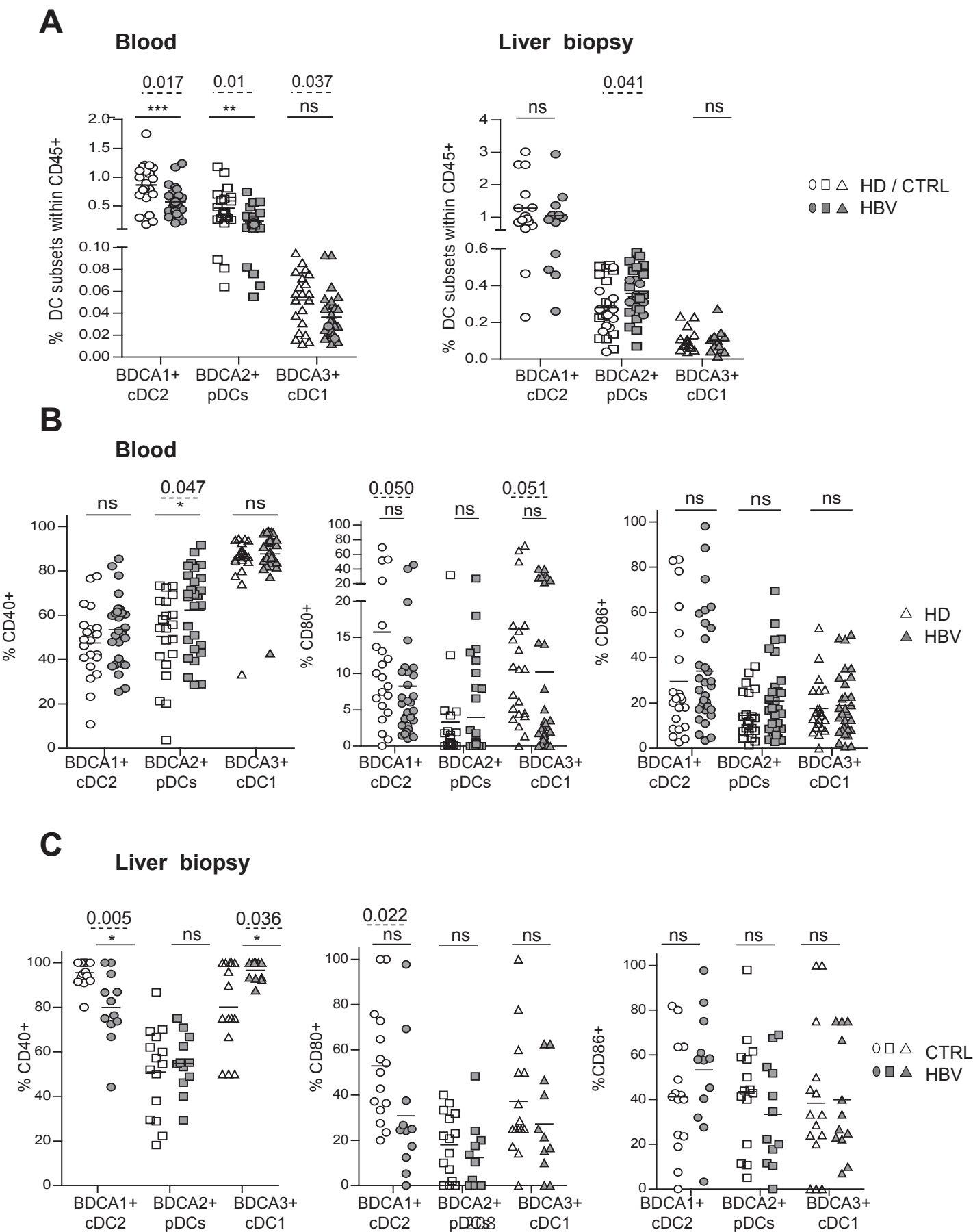
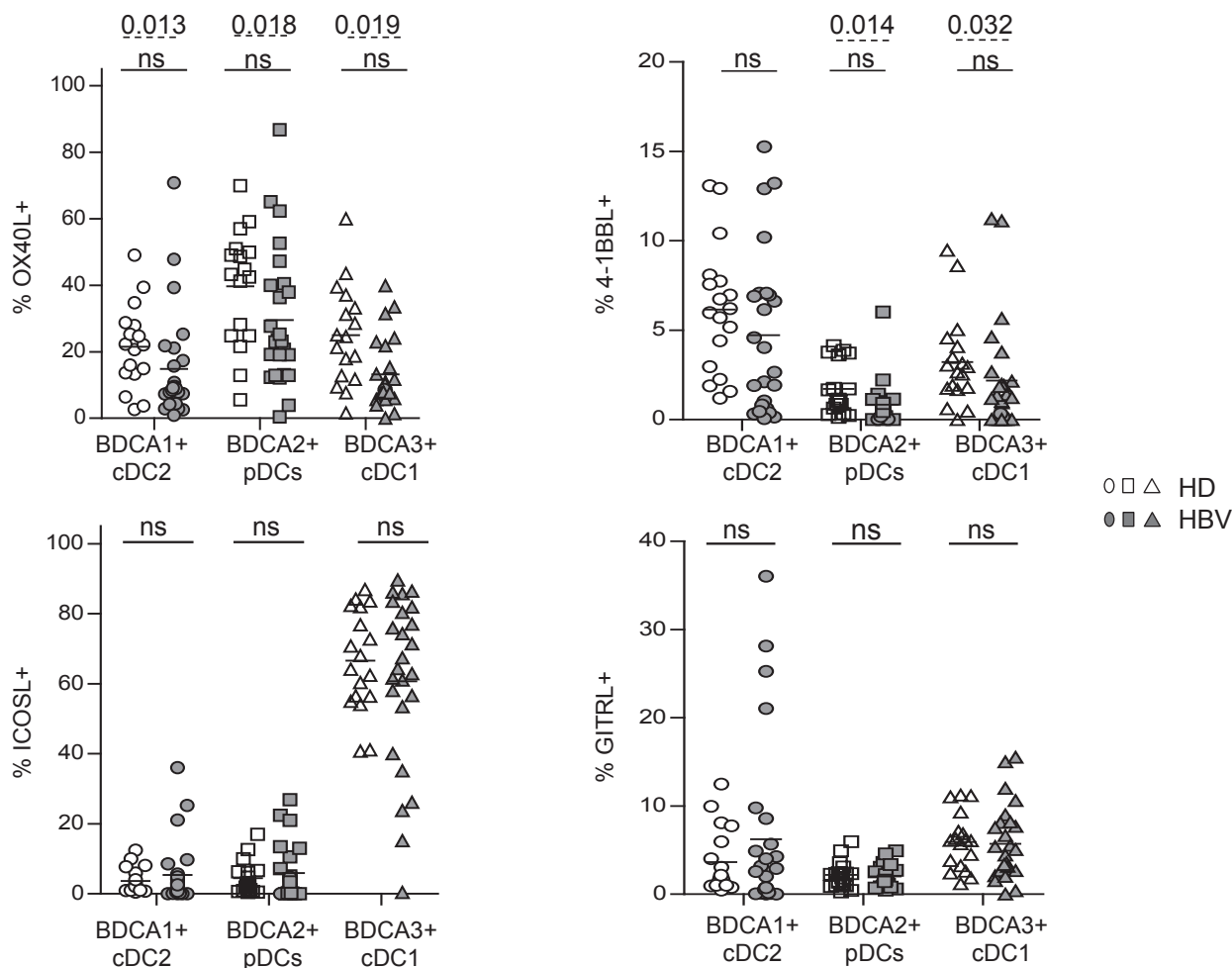


Fig. 2

A

Blood



B

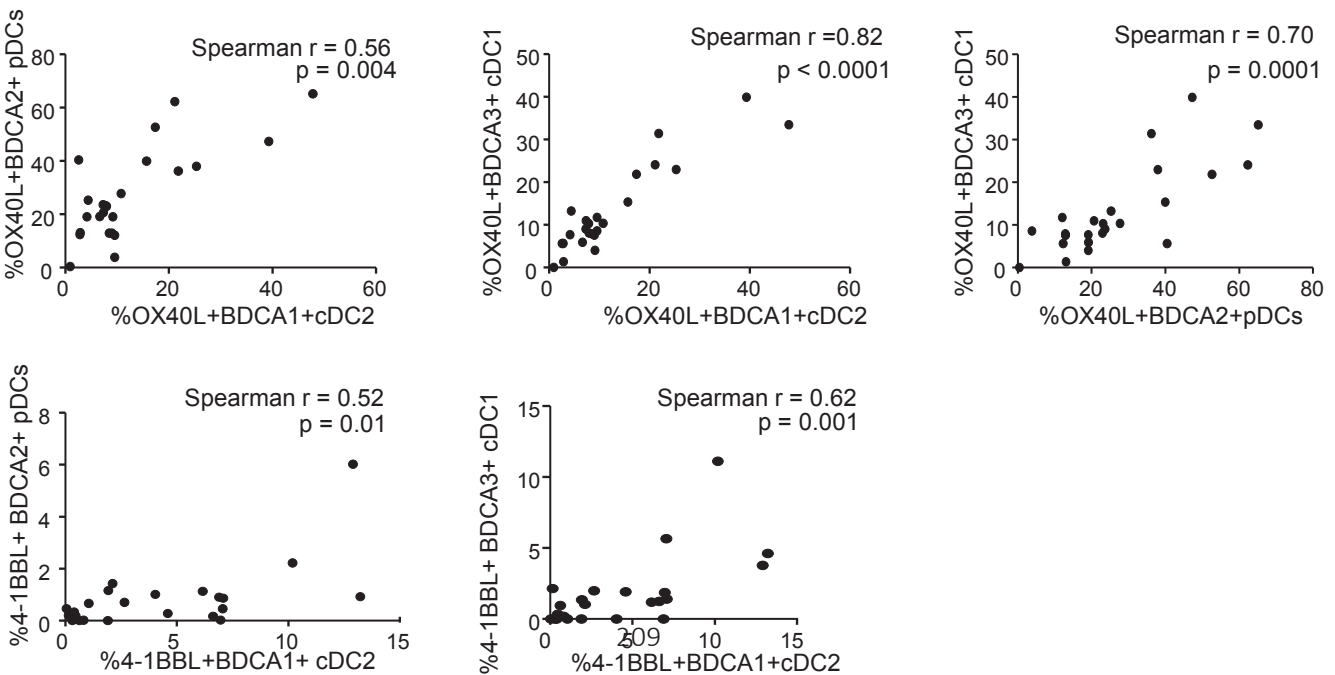


Fig. 3

Blood

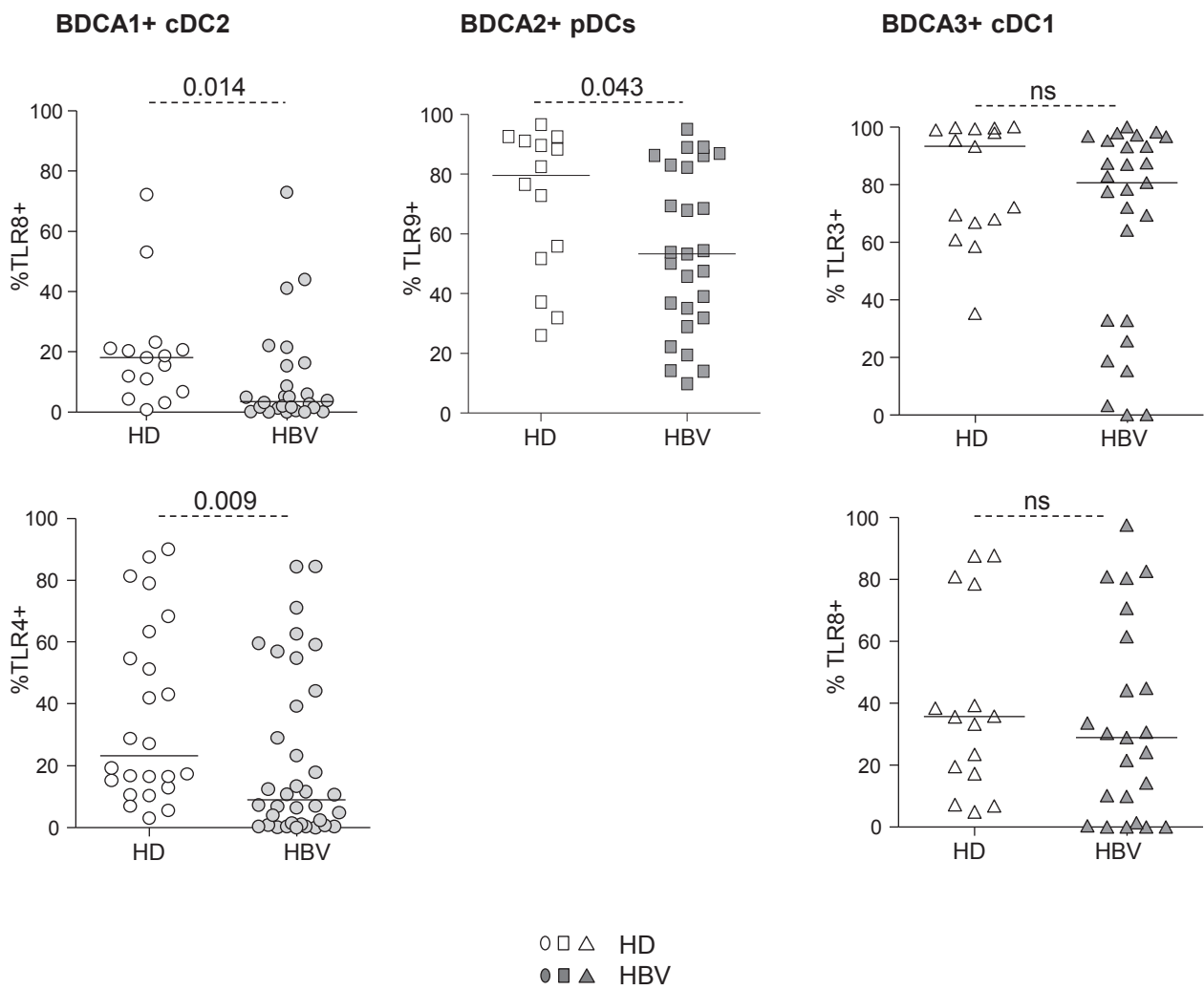


Fig. 4

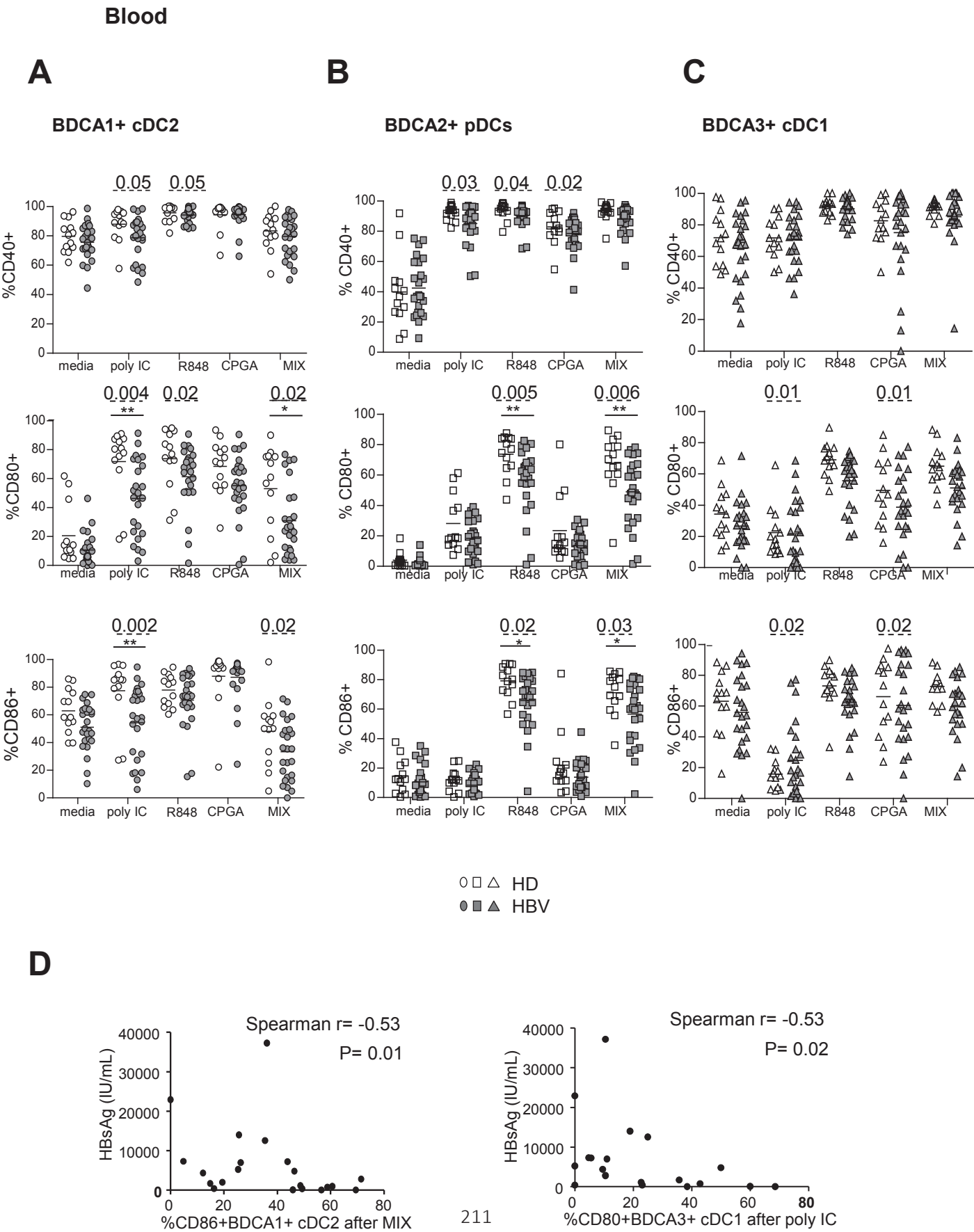


Fig. 5

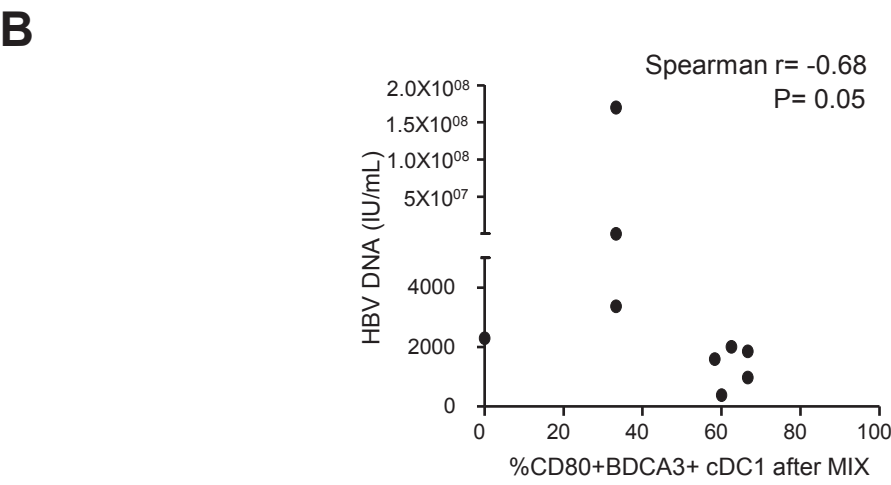
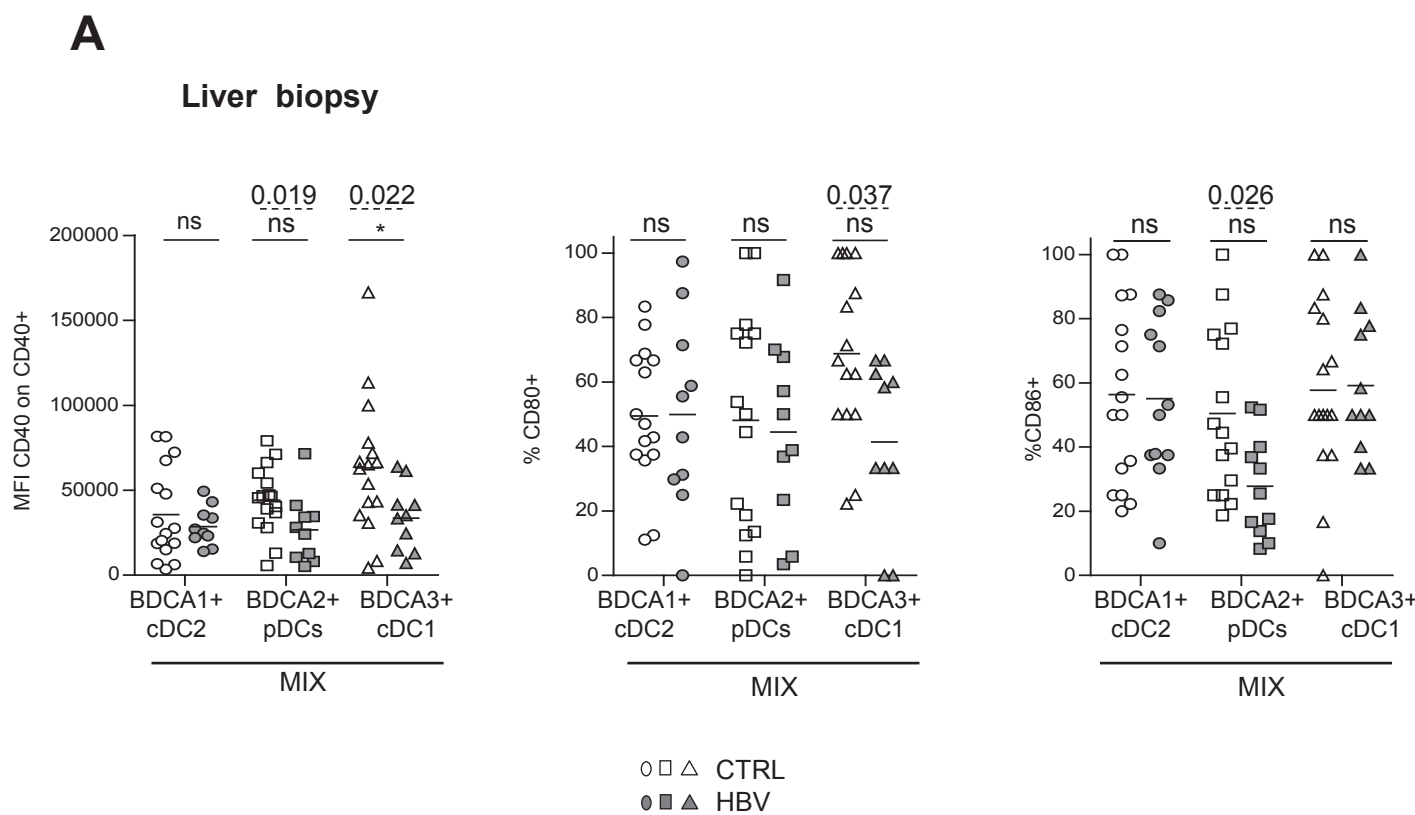


Fig. 6

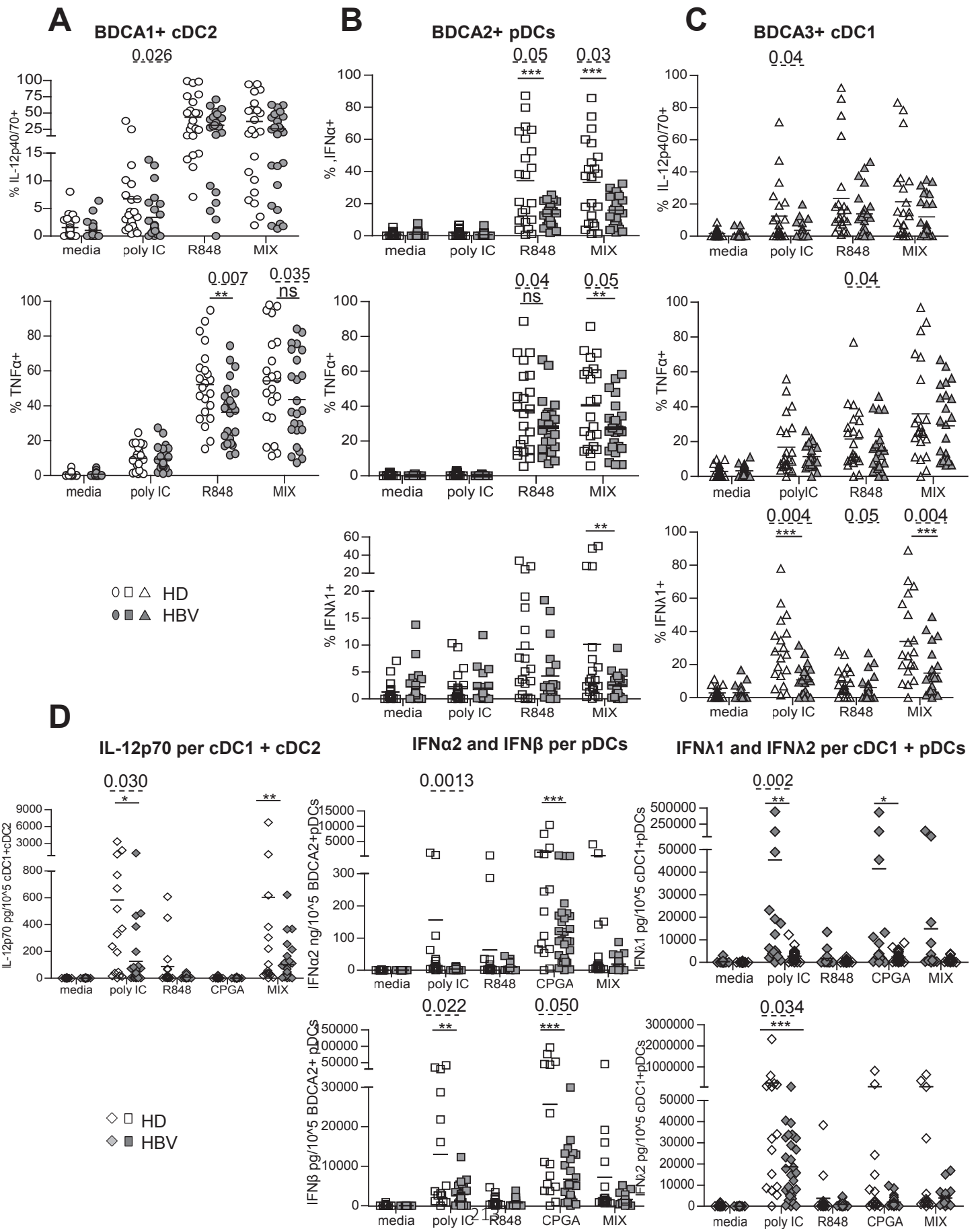
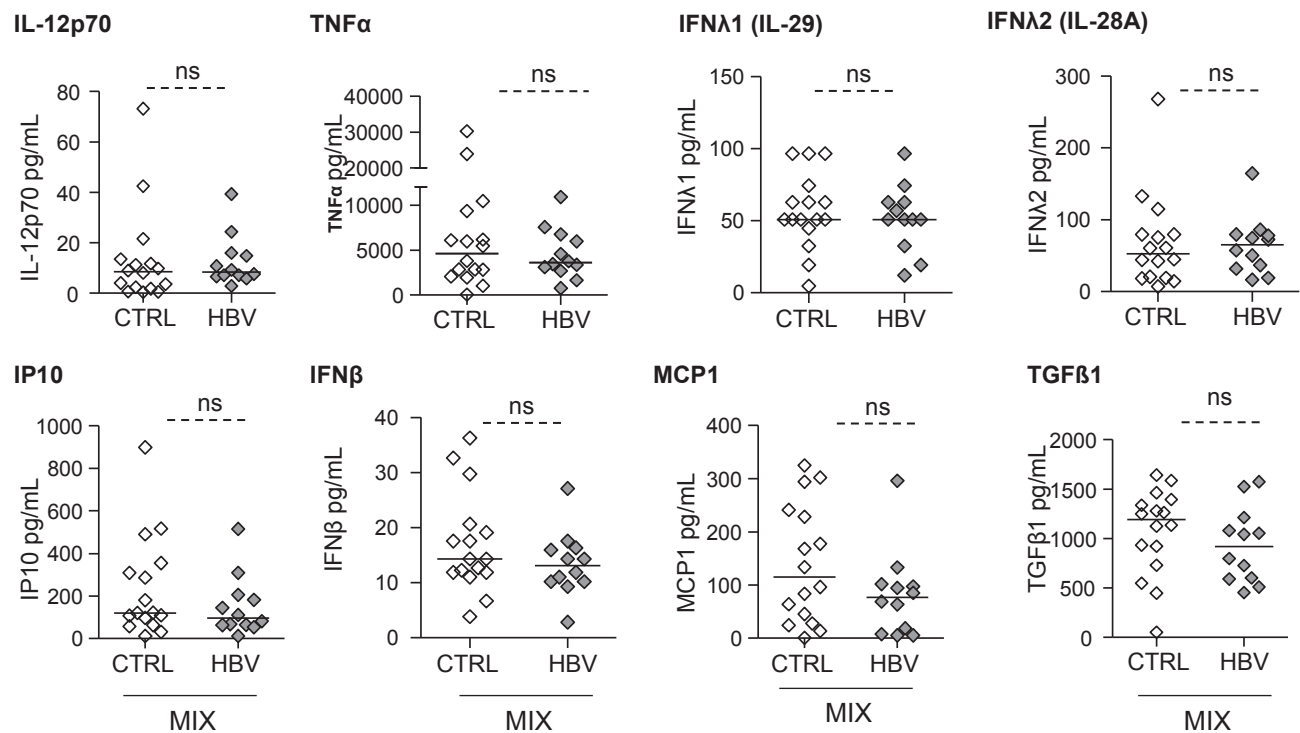


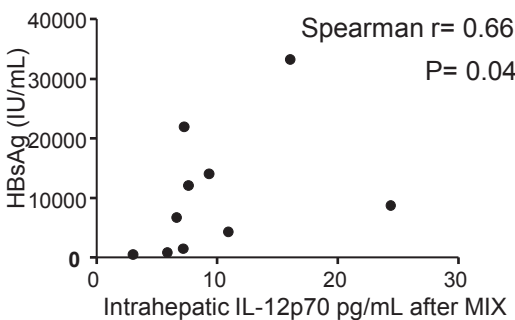
Fig. 7

A

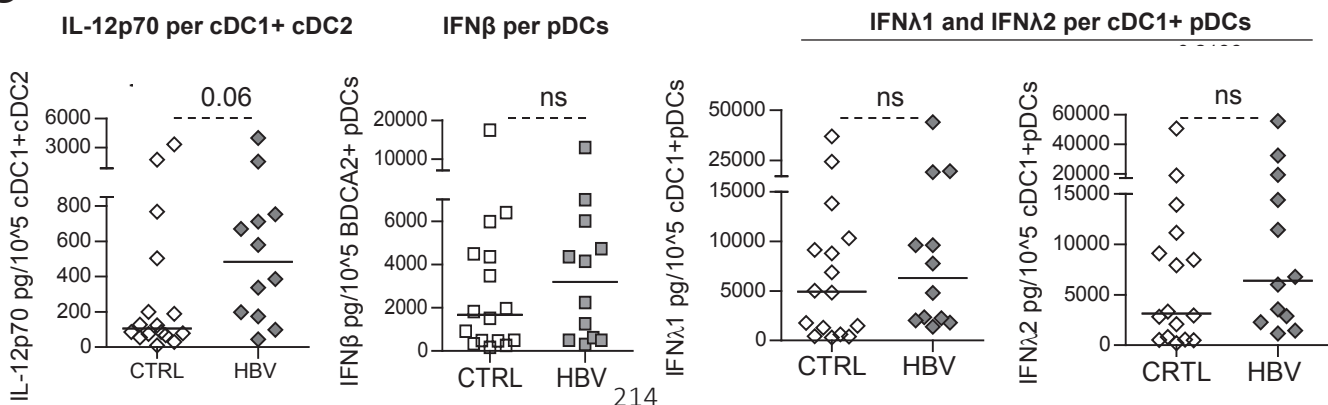
Liver biopsy



B



C



Supporting Table 1

	Blood samples						Liver biopsy samples	
Classification	HBeAg positive			HBeAg negative			Chronic Hepatitis B	Non viral liver diseases
	Chronic infection	Chronic hepatitis		Chronic infection	Chronic hepatitis			
Old terminology	Immune tolerant	Immune reactive		inactive carriers	HBeAg negative chronic hepatitis			
		untreated	Treated		untreated	Treated		
n	3	4	10	39	10	64	29	33
Age (y)	27 ± 9.82	35 ± 11.27	43 ± 18.40	39 ± 14.58	34 ± 14.75	54±15.81	37 ± 14.23	55 ± 11.24
Sex (%, Male/Female)	66.7/33.3	100/0	90/10	74.3/25.7	60/40	76.6/23.4	69/31	51.5/48.5
ALT level (IU/L)	76.33 ± 54.35	59 ± 49.24	48 ± 15.70	38 ± 16.57	54 ± 40.13	36 ± 14.21	62 ± 39.91	72 ± 42.33
HBV DNA (log10 IU/mL)	8.230 ± 0	6.743 ± 0.609	1.168 ± 0.115	2.422 ± 0.705	3.888 ± 0.420	1.192 ± 0.204	4.420 ± 1.915	-
HBsAg IU/mL	38588.5± 1928.28	16804 ± 14553.86	8105 ± 7397.32	9224 ± 11262.22	9159 ± 6929.85	4807± 8283.90	10355 ± 8562.86	-
METAVIR A	-	2 ± 0.71	2 ± 0.88	1 ± 0.66	-	1± 0.76	1 ± 0.8	2 ± 1.17
METAVIR F	-	1 ± 0	1 ± 0.98	1 ± 1.05	-	2±1.04	1 ± 1.003	1 ± 1.20
F3-F4 (%)	-	-	-	-	-	-	13,79	9,09
On treatment (%)	0 ^a	0 ^a	100 ^b	0 ^a	0 ^a	100 ^c	3.44 ^d	-

Data are expressed as mean ± SD unless indicated otherwise

a) No treatment (100%)

b) Tenofovir (100%)

c) 3,12% Entecavir+Tenofovir, 68,75% Tenofovir, 21,86% Entecavir, 4,69% Lamavudine, 1,56% Adefovir

d) 96.55% No Treatment, 3.44% Entecavir,

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; F, female; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B s antigen; HBV, hepatitis B virus; M, male ; n, number of patient; y, year; %, percentage

Supporting Table 2

Circulating BDCA1+ cDC2			Viral patterns	
		TLRL stimulation	HBsAg IU/mL	HBV DNA IU/mL on viremic HBV patients
Frequency within CD45+	% Frequency	-	**	
Immune checkpoints: Costimulatory and coinhibitory molecules	% OX40L+		*	
	%PDL1+			*
Maturation after TLRs triggering	%CD40+	polyI:C	*	
		MIX		*
	%CD80+	polyI:C	*	
	MFI CD80+	MIX		*
	%CD86+	polyI:C	**	
		MIX	*	
Intracellular cytokine secretion after TLRs stimulation	%IL-12p40/70+	MIX	*	

Spearman correlation $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$

and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$

or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$

Blue : negative correlation

* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$

Supporting Table 3

Circulating BDCA2+ pDCs			Viral patterns	
		TLRL stimulation	HBsAg IU/mL	HBV DNA IU/mL on viremic HBV patients
Immune checkpoints: Costimulatory and coinhibitory molecules	% OX40L+	-		*
	%PDL1+			*
Intracellular cytokine secretion after TLRs Stimulation	% IFN α	MIX	*	
	%IFN λ 1	R848		*
		MIX		*
	%TNF α +	R848	*	

Spearman correlation $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$

and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$

or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$

Blue : negative correlation

* $p \leq 0.05$

Supporting Table 4

Circulating BDCA3+ cDC1			Viral patterns	
		TLRL stimulation	HBsAg IU/mL	HBV DNA IU/mL on viremic HBV patients
Immune checkpoints: Costimulatory and coinhibitory molecules	%41BBL+	-		*
Maturation after TLRLs	MFI CD40+	CPGA	**	
	% CD80	polyI:C	*	
	MFI CD80+	R848	**	
		CPGA	**	
	%CD86+	R848		*
	MFI CD86+	polyI:C	*	
		MIX	*	
Intracellular cytokine secretion after TLRLs	%IFN λ 1+	polyI:C		*
		R848		*

Spearman correlation $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$

and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$

or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$

Blue : negative correlation

Red : positive correlation

* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$

Supporting Table 5

Circulating DC subsets			Viral patterns
		TLRL stimulation	HBV DNA IU/mL on viremic HBV patients
Cytokines per 10 ⁵ BDCA2+ pDC subsets	IFN α	MIX	***
Cytokines per 10 ⁵ cDC1+ pDC subsets	IFN λ 1	R848	*
		MIX	*
	IFN λ 2	poly I:C	*

Spearman correlation $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$

and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$

or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$

Blue : negative correlation

* $p \leq 0.05$, *** $p < 0.001$

Supporting Table 6

Intrahepatic DC subsets			Viral patterns
Co-Activation molecules and Frequency		TLRL stimulation	HBsAg IU/mL
BDCA1+ cDC2	MFI CD40+	-	*
BDCA2+ pDCs	% within CD45+		*
BDCA3+ cDC1	% CD40+	MIX	*
Secreted cytokines			
Cytokines secretion from LMNC	TGF-β1	MIX	**
	MCP1	MIX	*
	IP10	MIX	*
	IL-12p70	MIX	*

Spearman correlation $r \geq 0.5$ or $r \leq -0.5$ with $p \leq 0.05$

and $0.45 \leq r \leq 0.5$ with $p \leq 0.01$

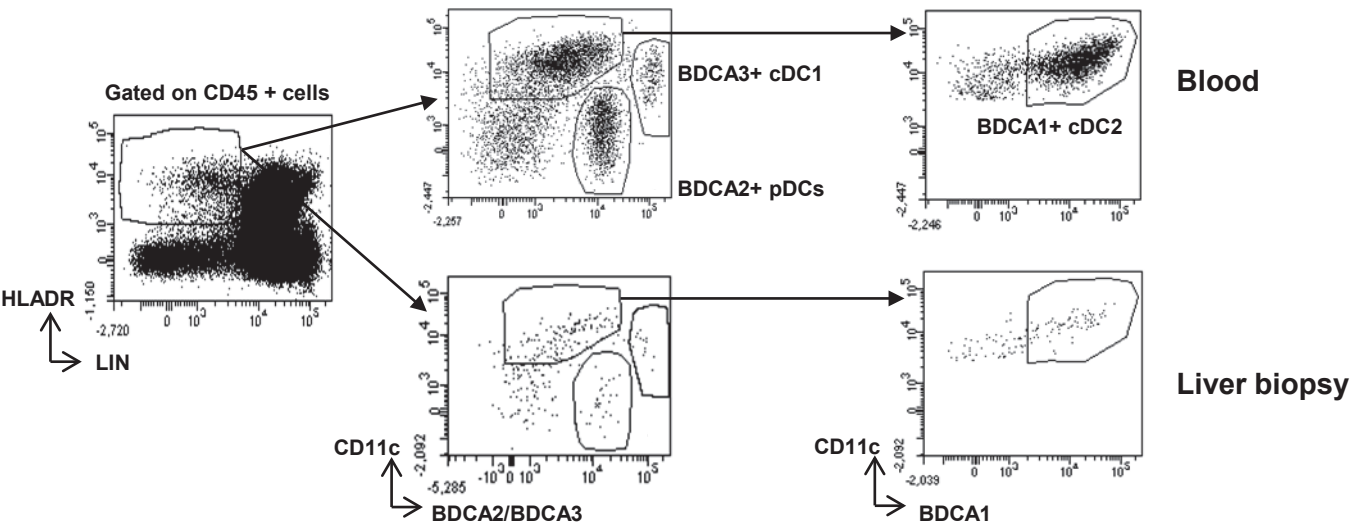
or $-0.5 \leq r \leq -0.45$ with $p \leq 0.01$

Red : positive correlation

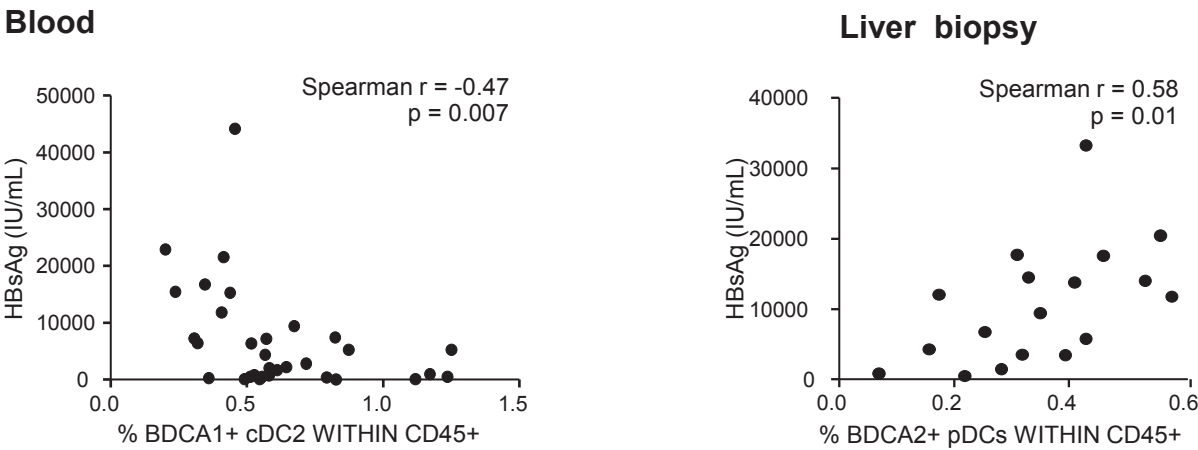
* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$

Supporting Fig. S1

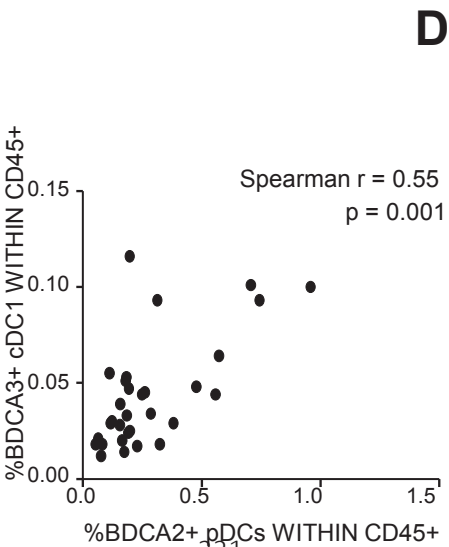
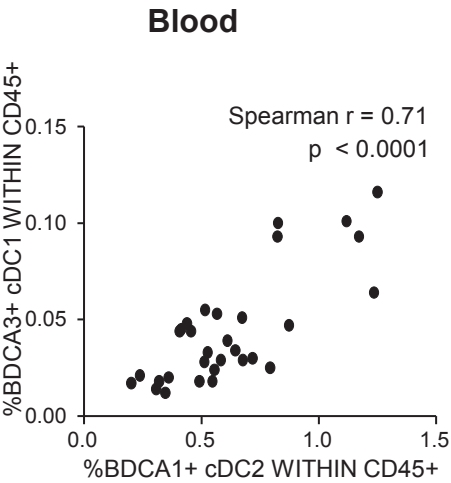
A



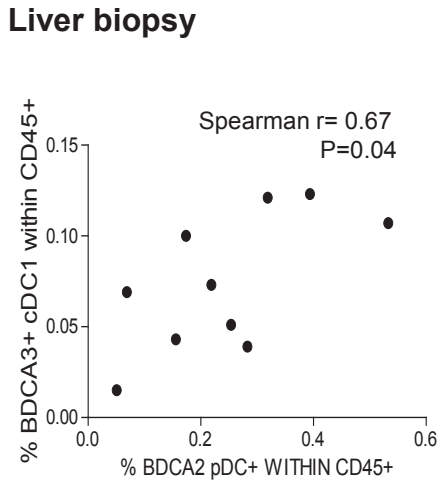
B



C



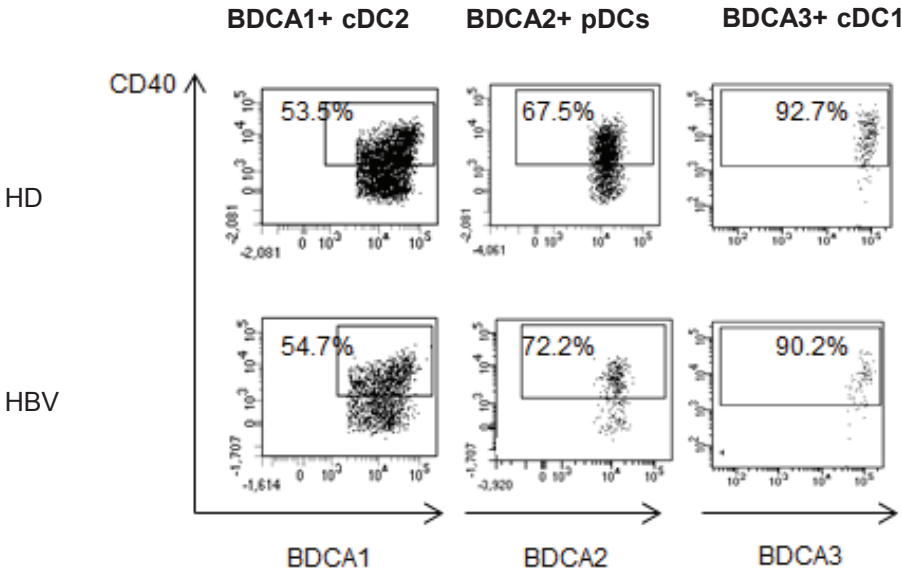
D



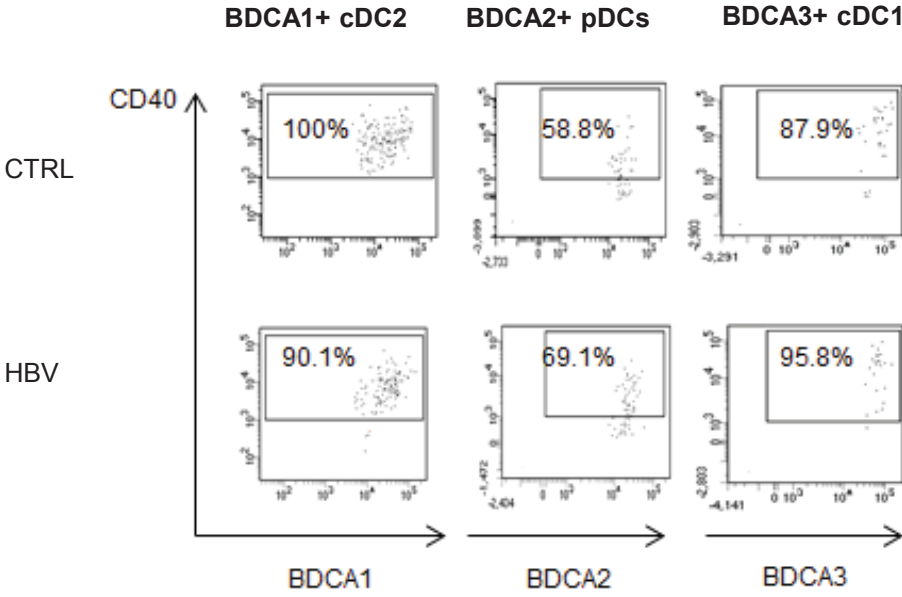
Supporting Fig. S2

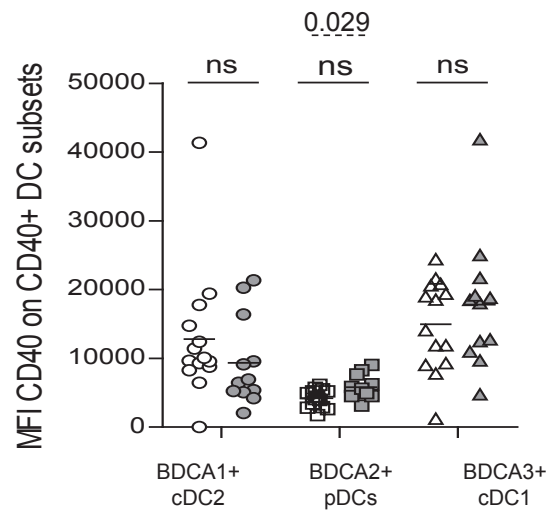
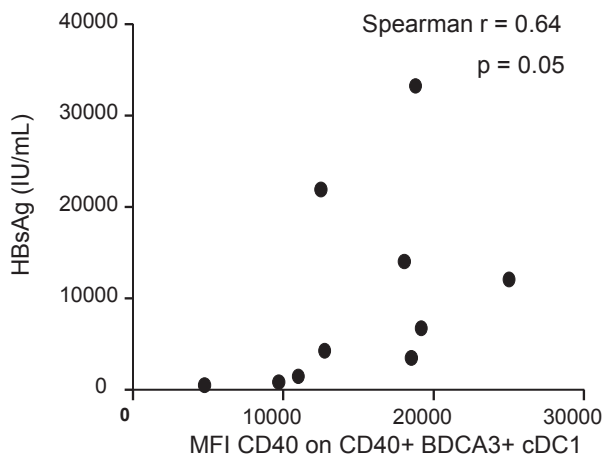
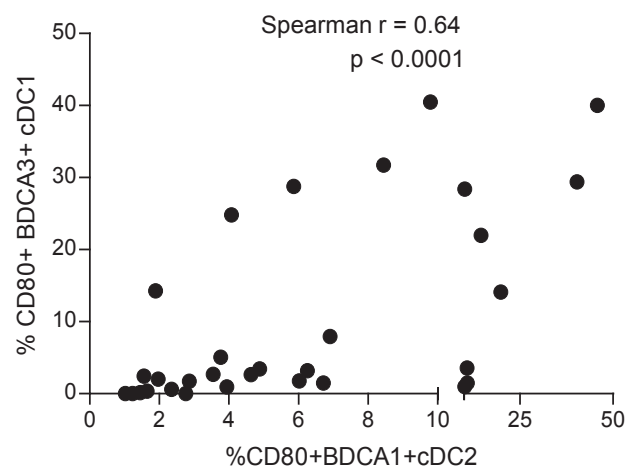
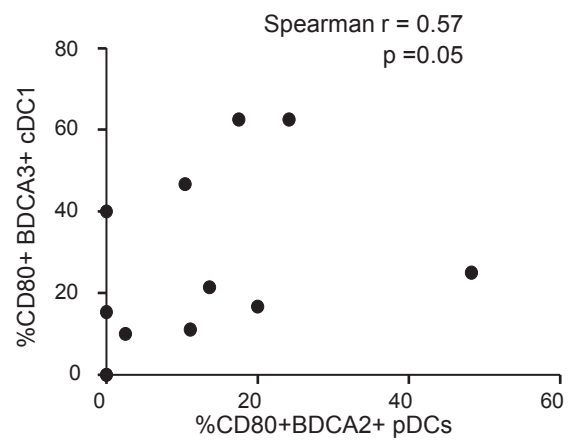
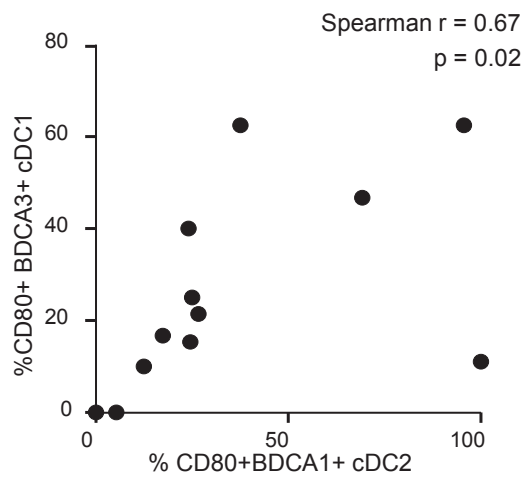
A

Blood



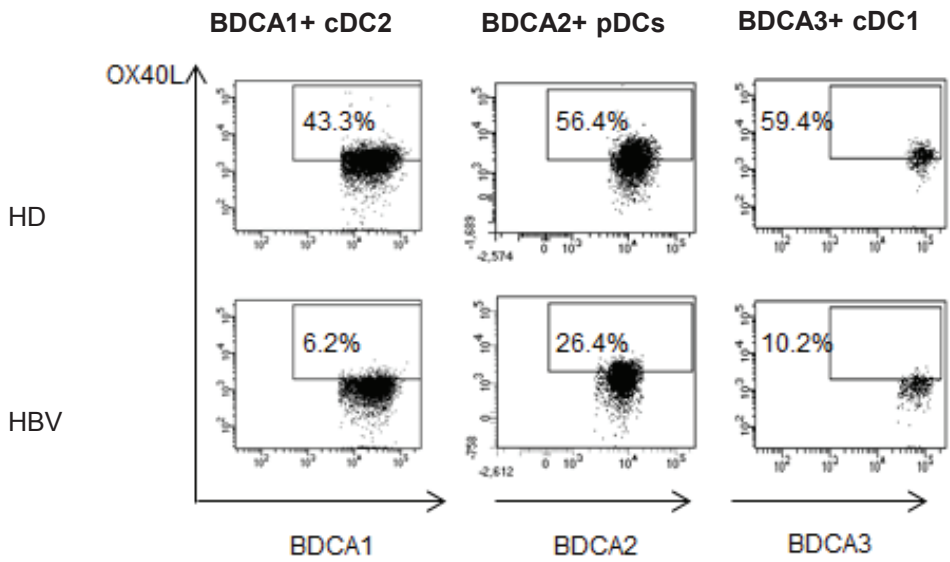
Liver biopsy



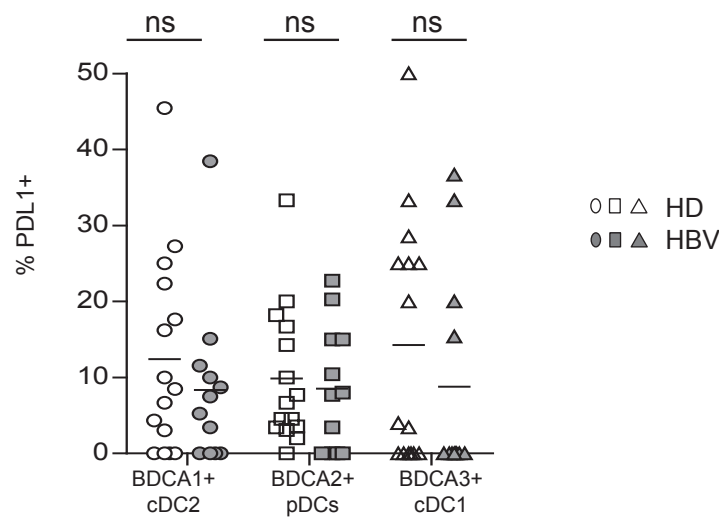
B**Liver biopsy****C****Liver biopsy****D****Blood****E****Liver biopsy**

Supporting Fig. S3

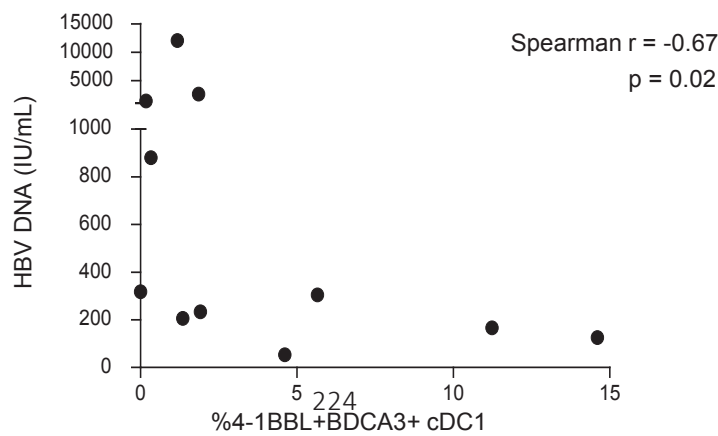
A Blood



B

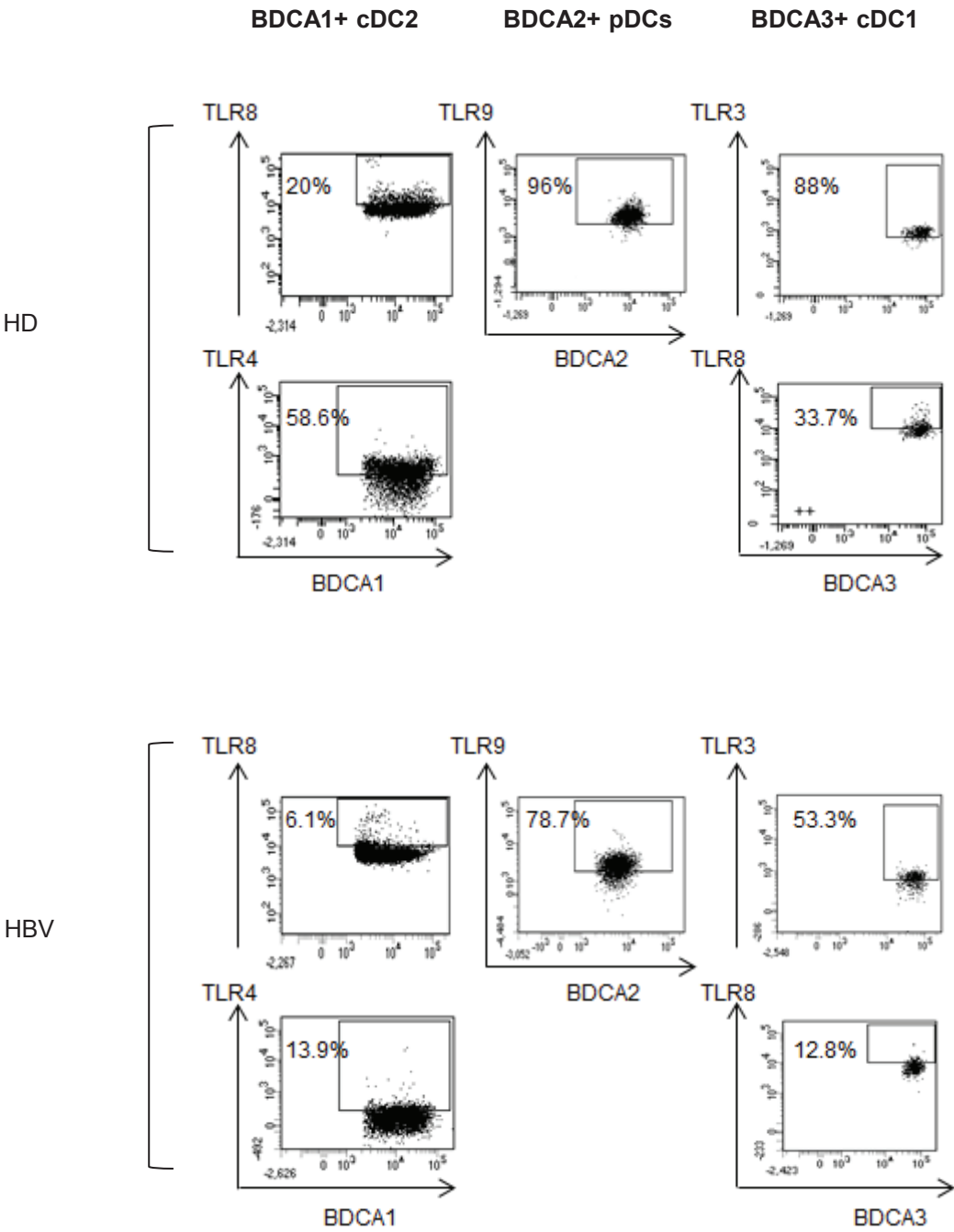


C

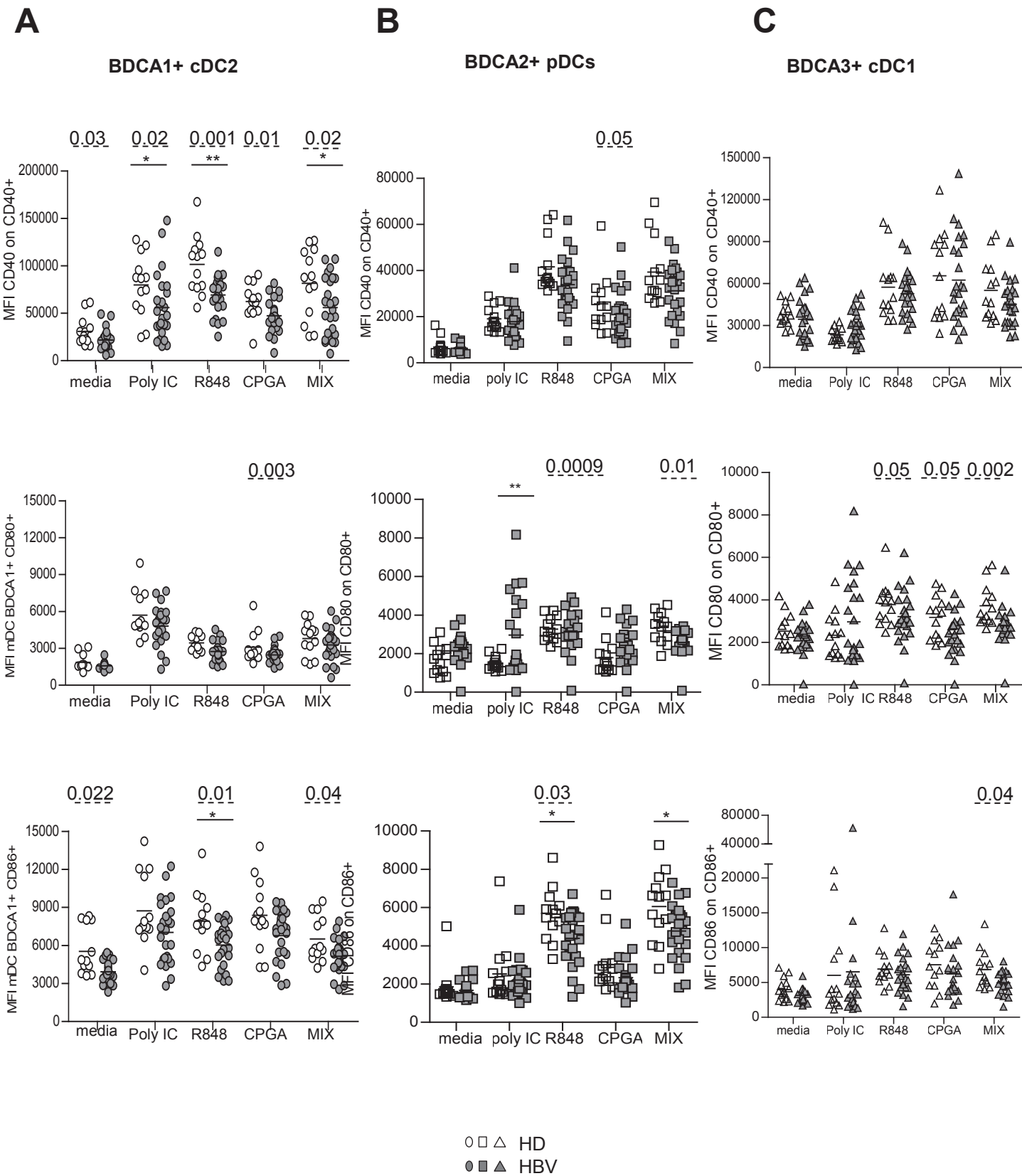


Supporting Fig. S4

Blood

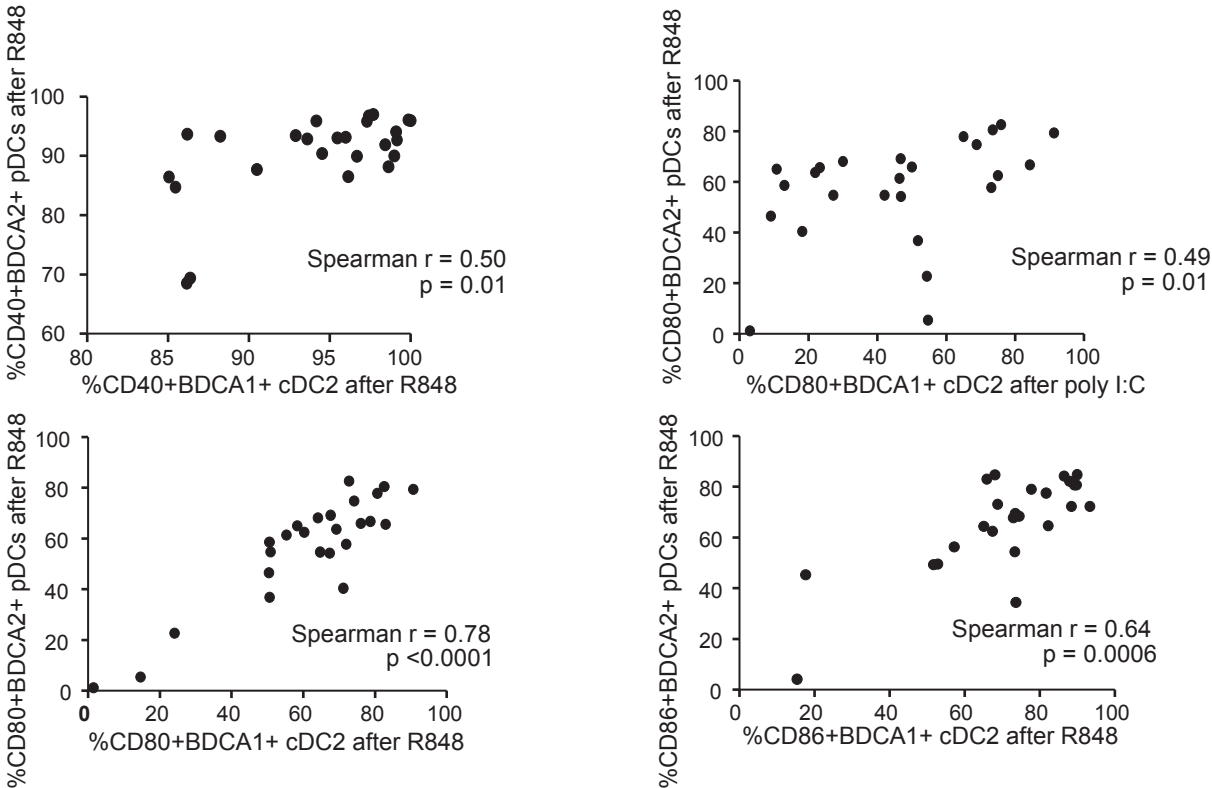


Supporting Fig. S5

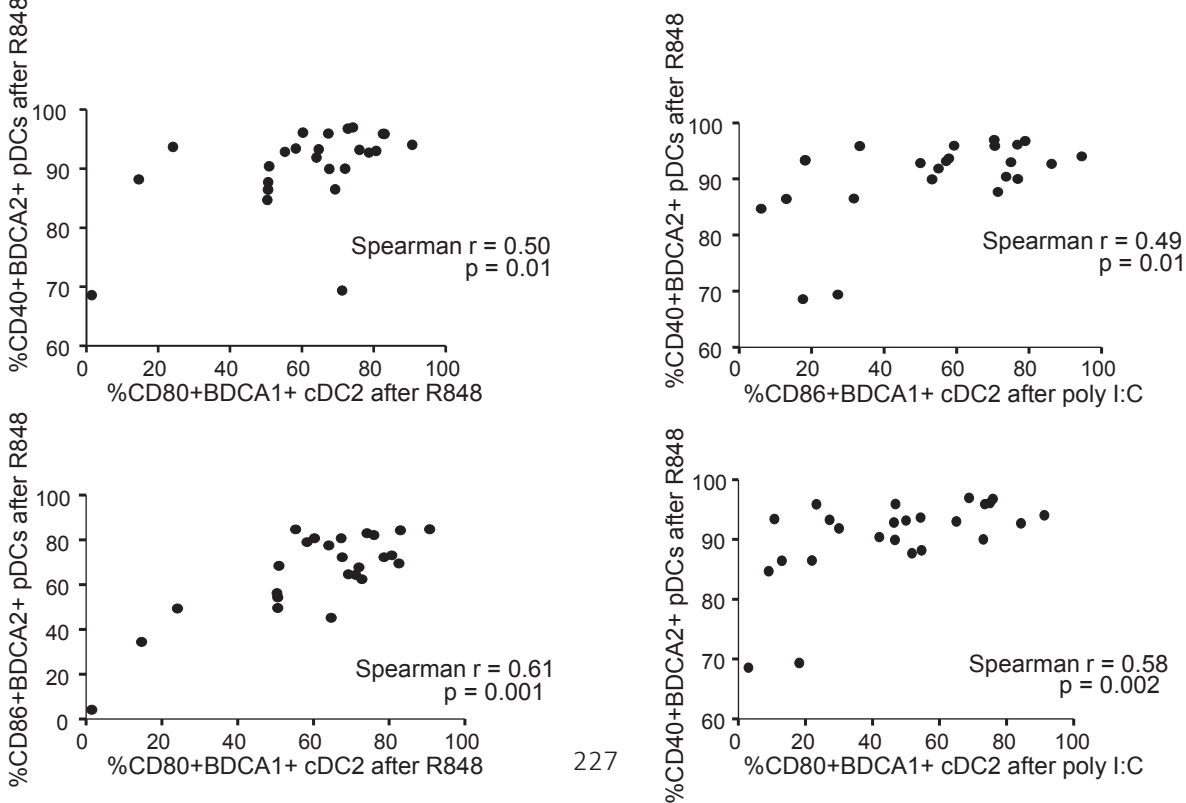


Supporting Fig. S6

A Correlation circulating BDCA1+ cDC2 & BDCA2+ pDCs



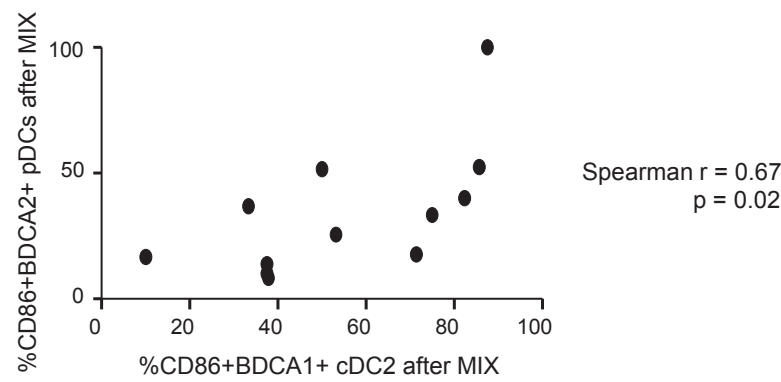
B Correlation circulating BDCA1+ cDC2 & BDCA2+ pDCs



Supporting Fig. S7

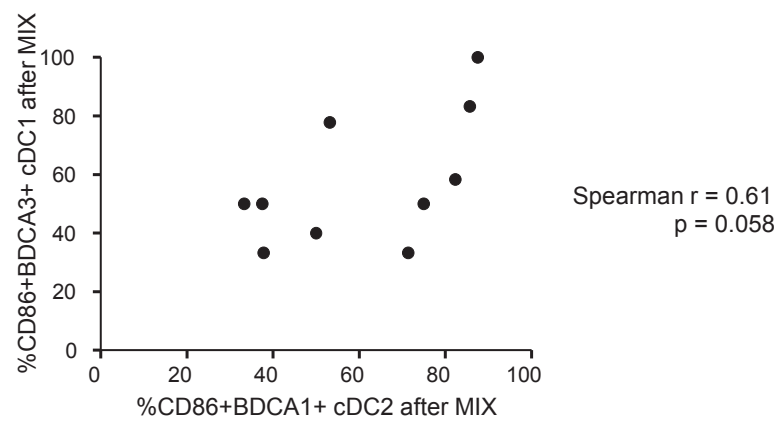
A

Correlation intrahepatic BDCA1+ cDC2 & BDCA2+ pDCs



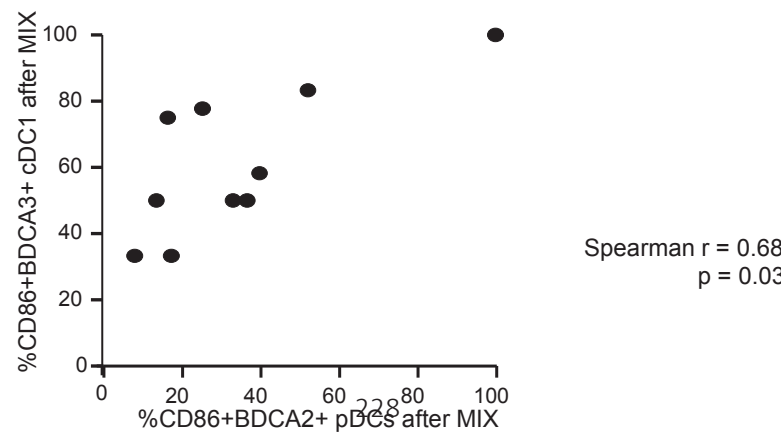
B

Correlation intrahepatic BDCA1+ cDC2 & BDCA3+ cDC1



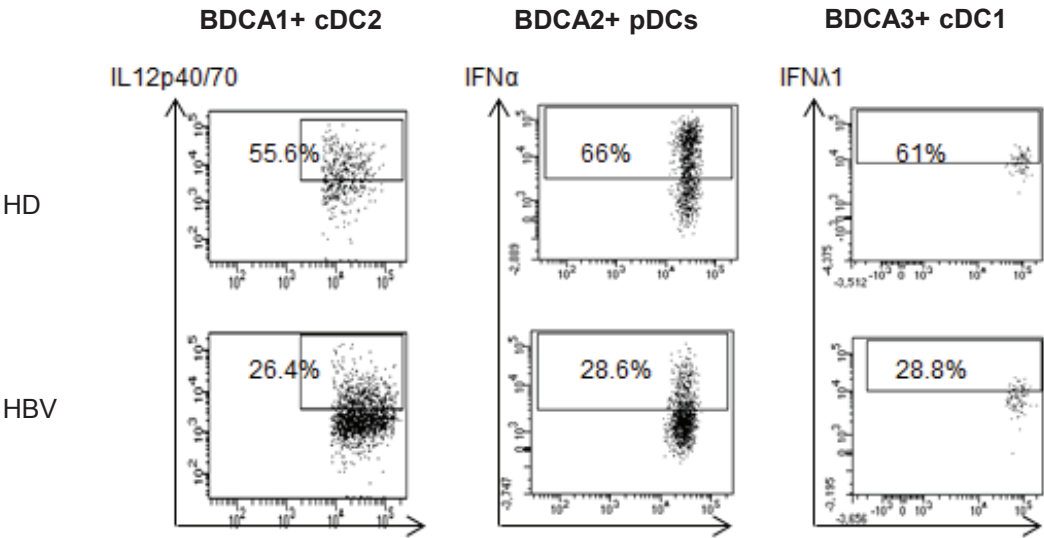
C

Correlation intrahepatic BDCA3+ cDC1 & BDCA2+ pDCs

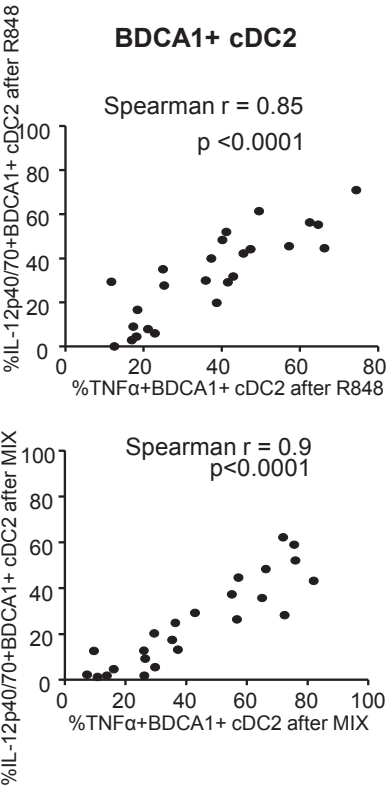


Supporting Fig. S8

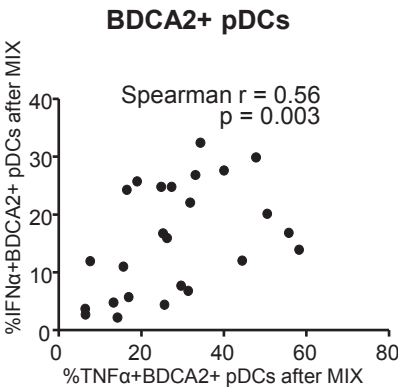
A



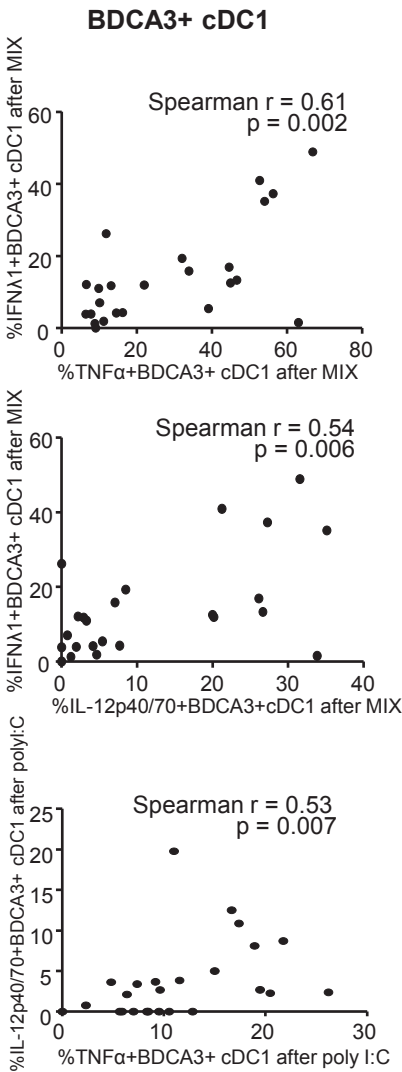
B



C



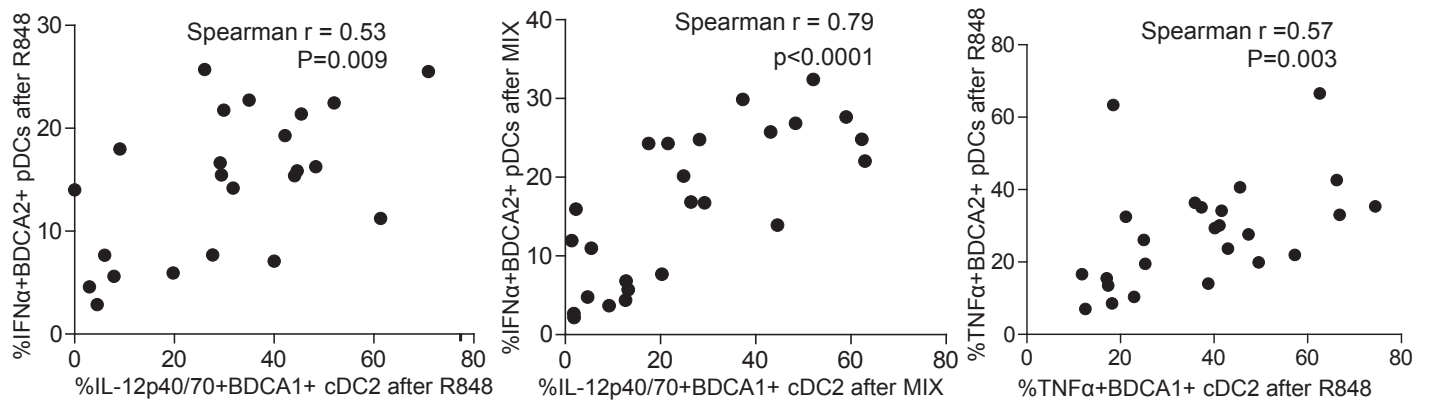
D



Supporting Fig. S9

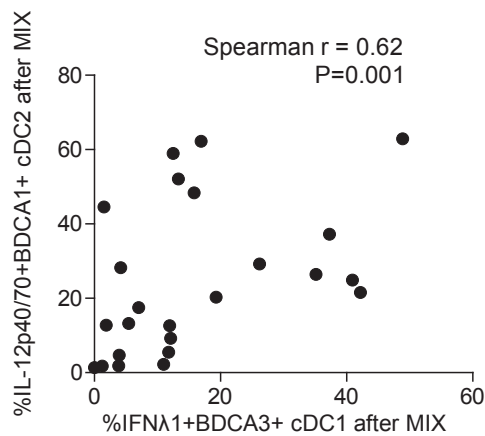
A

BDCA1+ cDC2 & BDCA2+ pDCs



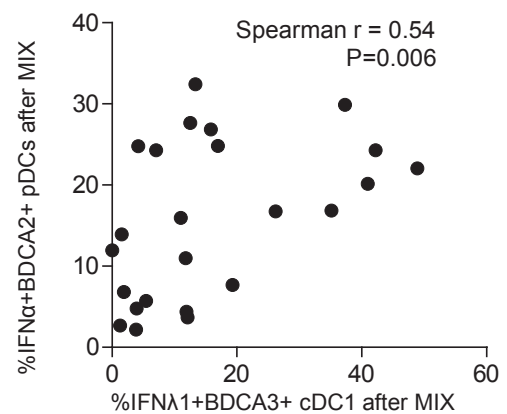
B

BDCA1+ cDC2 & BDCA3+ cDC1

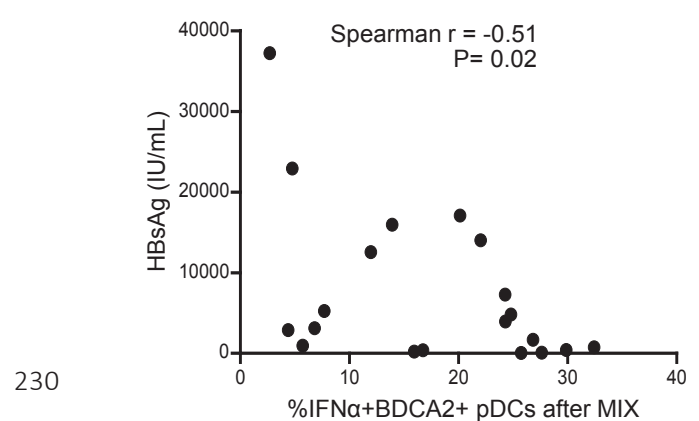
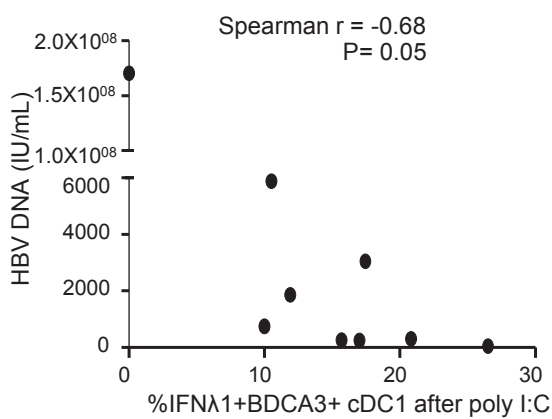


C

BDCA2+ pDCs & BDCA3+ cDC1

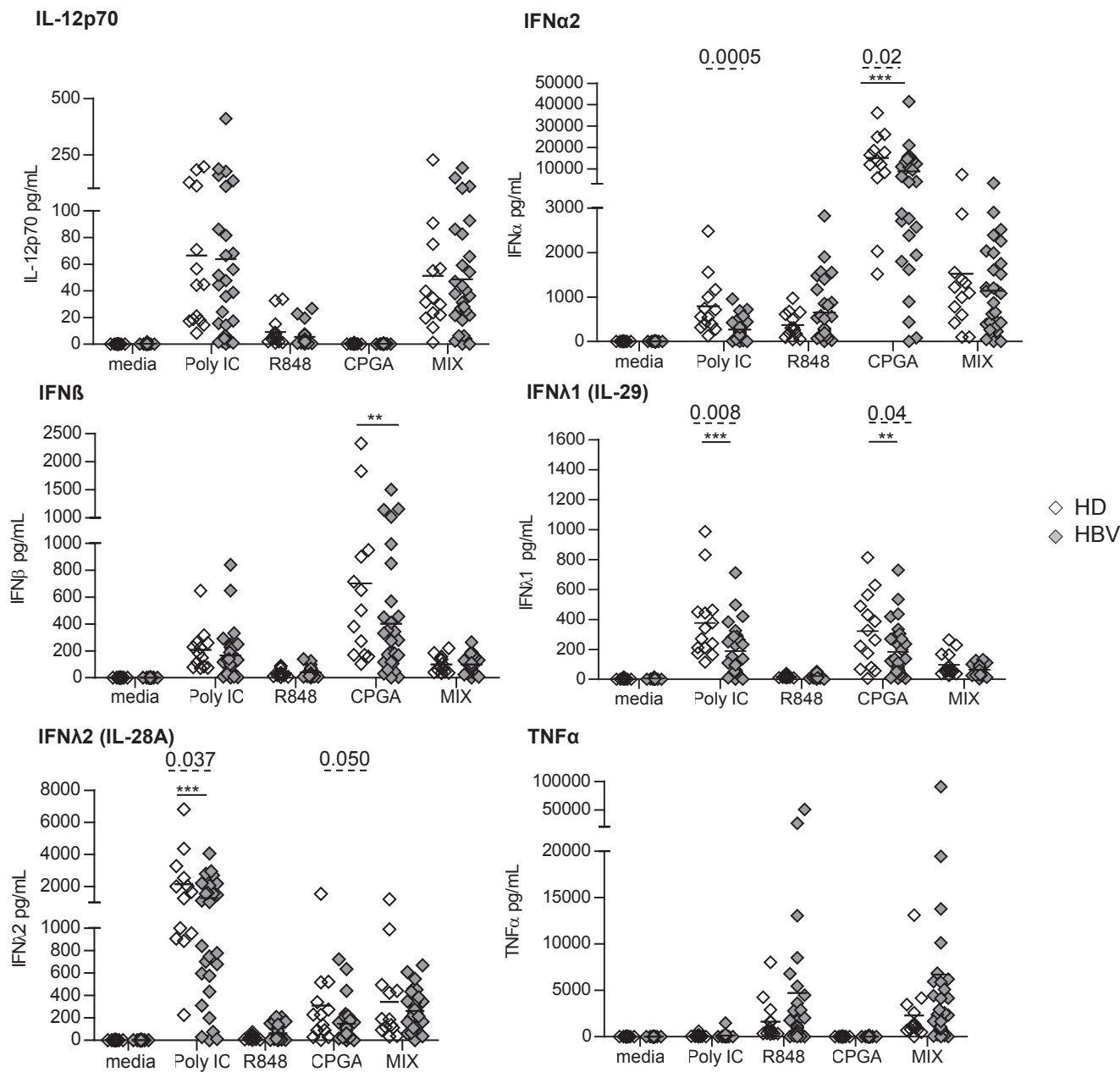


D

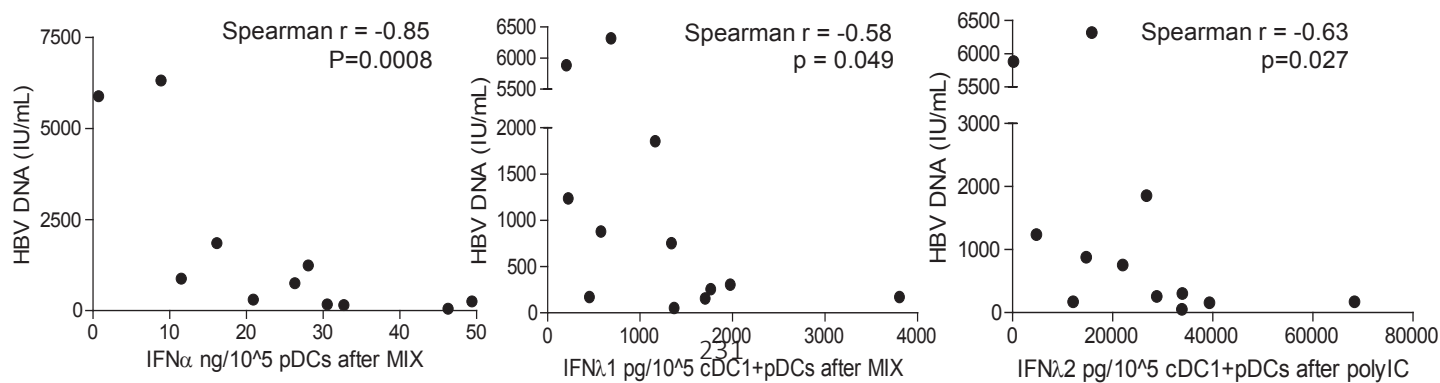


Supporting Fig. S10

A

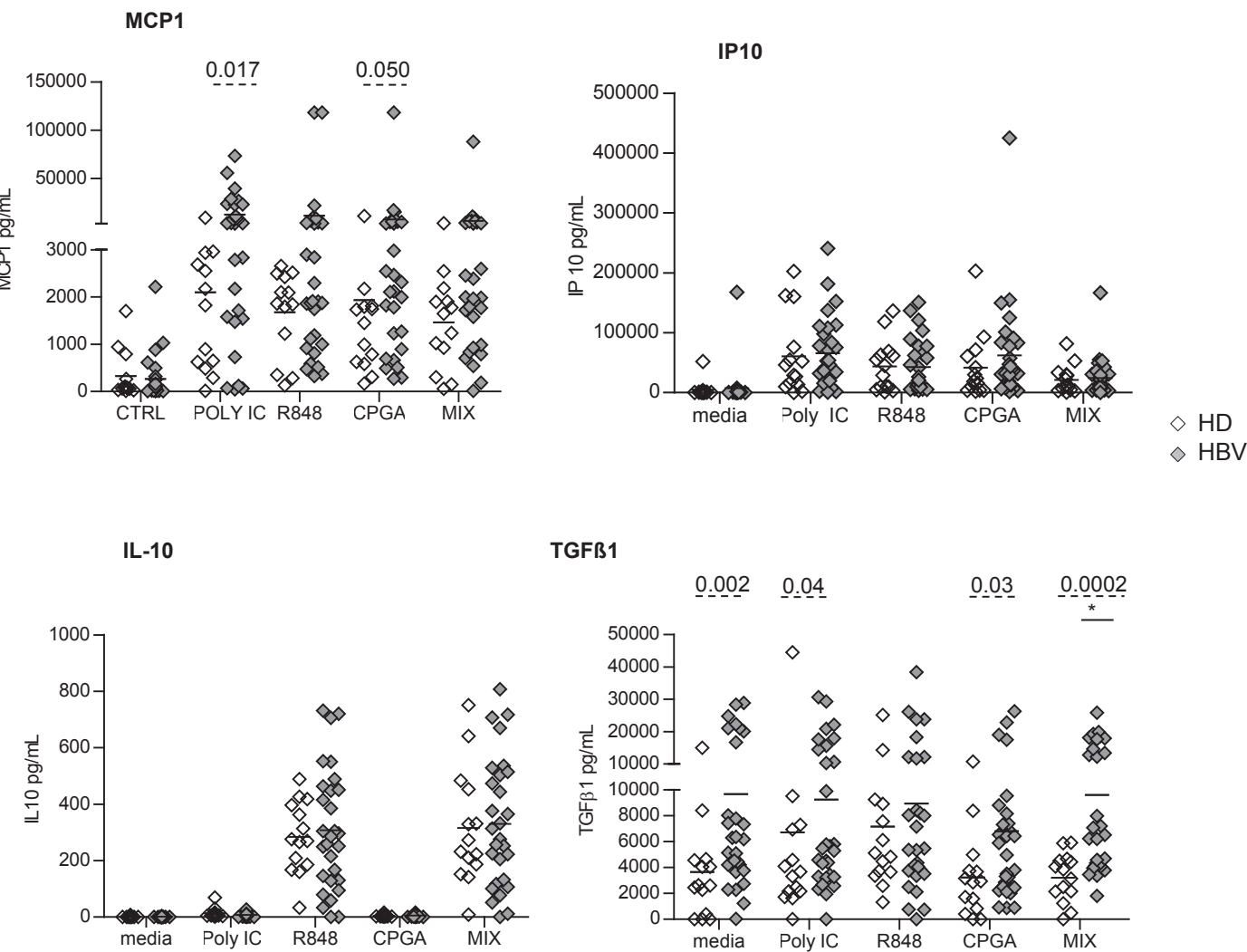


B

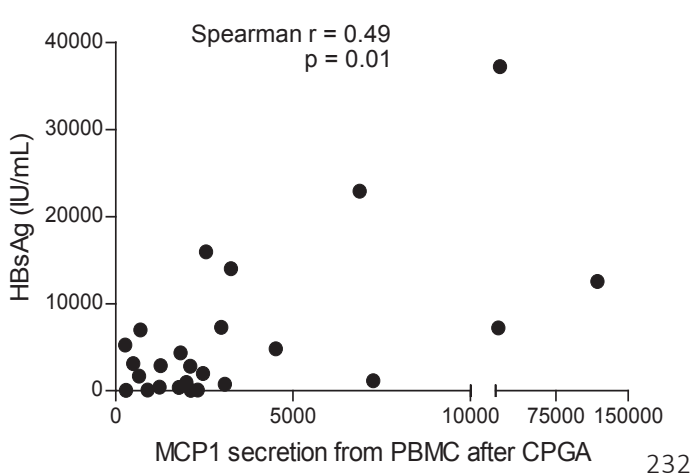


Supporting Fig. S11

A



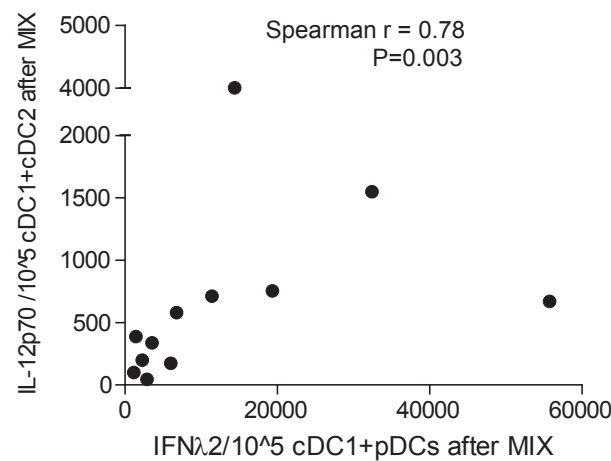
B



Supporting Fig. S12

Liver Biopsy

IL-12p70 per cDC1+cDC2 & IFNλ2 per cDC1+pDCs



IFNβ per pDCs and IFNλ1 or IFNλ2/cDC1+pDCs

