



Hétérogénéité et mécanismes d'initiation de la réponse humorale dans les tumeurs du sein et de l'ovaire

Coline Couillault

► To cite this version:

Coline Couillault. Hétérogénéité et mécanismes d'initiation de la réponse humorale dans les tumeurs du sein et de l'ovaire. Immunologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1051 . tel-02463459

HAL Id: tel-02463459

<https://theses.hal.science/tel-02463459>

Submitted on 1 Feb 2020

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 :

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N°340
BMIC Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

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

Soutenue publiquement le 04/04/2019, par :
Coline COUILLAULT

**Hétérogénéité et mécanismes
d'initiation de la réponse humorale
dans les tumeurs du sein et de l'ovaire**

Devant le jury composé de :

ANJUERE Fabienne
TARTE Karin
NICOLAS Jean-François
DEFrance Thierry
PAUL Stéphane
DUBOIS Bertrand

CR Inserm, IPMC
PU-PH, MICMAC
PU-PH, UCBL
DR Inserm, CIRI
PU-PH, GIMAP
DR Inserm, CRCL

Rapporteure
Rapporteure
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur 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

À ma merveilleuse famille

Et en pensée à Ludo

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Mme Fabienne Anjuère** et **Mme Karin Tarte** d'avoir accepté d'être rapporteuses de mon travail et d'avoir pris le temps d'évaluer ce manuscrit. Je remercie également **M. Stéphane Paul** et **M. Thierry Defrance** d'avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'examinateurs, mais également pour leurs conseils et commentaires précieux accompagnés de leur soutien lors de mes trois comités de suivi de thèse, et **M. Jean-François Nicolas** de présider ce jury de thèse. Merci d'avance à vous cinq pour votre présence le jour de ma défense de thèse pour discuter de mes travaux.

C'est en étudiant les laboratoires ayant des thématiques centrées sur l'immunologie des cancers que j'ai découvert le nom de **Christophe** et en demandant des conseils à des personnes du domaine, on m'a dit que ton laboratoire serait excellent pour me former à cette discipline et que j'aurais la chance de travailler avec quelqu'un de passionné. Sept ans plus tard, je ne peux que souligner à quel point cela est vrai. Mon grand intérêt pour la recherche a débuté par un intérêt médical, comme si nous étions dans les coulisses pour essayer d'améliorer la prise en charge des patients, et c'est cela qui te motive au quotidien. Je me retrouve donc dans cette passion qui te conduit à exercer ce métier, et ta volonté de transmettre cette passion est un grand soutien dans notre formation. Je te remercie d'avoir accepté que je vienne pour un petit stage de 8 semaines en tant que L3, ce qui représente un investissement de la part du laboratoire, mais qui a été très important pour moi, et d'avoir considéré comme évident mon retour en thèse par la suite. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces 5 ans de stages/thèse. Tes connaissances scientifiques et ta vision d'ensemble qui permet de construire des projets m'impressionnent, et discuter avec toi nous apporte beaucoup. Merci également pour ta disponibilité et de toujours prendre le temps de nous écouter, même si on l'a parfois oublié, nous pouvons toujours frapper à ta porte lorsque nous avons une question ou un problème.

Lorsque je suis revenue au laboratoire pour ma thèse, j'arrivais en terrain connu, mais avec une inconnue : mon directeur de thèse. **Bertrand**, tu étais fraîchement arrivé au laboratoire lors de mon retour, me permettant de découvrir un nouveau projet pour lequel j'aurais difficilement pu trouver un encadrement me convenant plus que le tien. Tu m'as offert un très bon équilibre entre autonomie et encadrement en me faisant confiance pour les manips et l'organisation tout en gardant toujours ta porte ouverte pour mes questions. Tes analyses et remarques permettent de générer de nombreuses réflexions pour avancer les projets et tu as un œil particulièrement avisé pour les présentations et l'écriture, que j'espère être capable d'utiliser par la suite. Je te remercie de plus d'avoir toujours été compréhensif vis-à-vis de mes problèmes médicaux et diverses absences.

Nous faisons partie d'une grande équipe, ce qui nous permet d'échanger avec de nombreuses personnes qui m'ont aidée chacune à leur manière à avancer dans ma thèse en commençant par nos chers PIs dont la présence est plus qu'importante. **Christine**, tu es surnommée la « maman » du labo, et ce titre correspond bien à l'image que j'aie de toi. Que ce soit professionnellement lors des réunions d'équipe ou personnellement, tu m'as toujours posé des questions avec bienveillance et pour m'aider (des e-mails récents illustrent bien cela !). Merci de m'avoir prêté ton oreille attentive de nombreuses fois et de chercher des solutions à tous les problèmes, je t'en suis extrêmement reconnaissante. Et merci aussi pour les heures tardives devant l'ordinateur pour compléter mes tableaux Excel ! **Jenny**, nos discussions ont été aussi nombreuses que variées, en bonnes voisines d'openspace. Je te remercie de ta présence pour discuter manip, organisation du labo, mais aussi pour m'aider à réfléchir à la suite ou juste pour prendre des nouvelles. Merci pour les barbecues, la piscine et les excursions horticoles. Désolée d'abandonner ton dos à son propre sort en quittant le labo, tu viendras chercher des massages au Texas ! **Nath**, j'ai toujours eu l'impression d'être autant une collègue qu'une étudiante lors des discussions avec toi, et cela est bénéfique pour prendre un peu confiance en soi pour la suite. J'ai notamment beaucoup apprécié que tu m'amènes avec toi à Dijon en me présentant un peu plus précisément à l'équipe, et que tu cherches activement à me trouver des pistes de post-docs en mentionnant mon nom lorsque tu pouvais, même si je me suis finalement dirigée ailleurs. De plus ton amour du chocolat créé forcément un lien ! Merci pour ton soutien tout au long de mon passage au laboratoire. **Marie**, tu représentes une onde de positivité au

laboratoire, qui permet d'aller de l'avant et de voir le bon côté des choses, tout en discutant ouvertement et honnêtement des différents problèmes qui peuvent exister, ce qui est essentiel au quotidien. Merci pour les diverses discussions, qu'elles soient scientifiques ou personnelles. Et continue bien à titiller Pauline quand je serai partie :) ! **Isabelle**, merci d'être la voix de la sagesse au laboratoire lorsqu'il s'agit de manip souris, et la voix du délire quand il s'agit de faire des blagues, tu ajoutes une dose d'humour dans l'openspace. Merci aussi pour les séances visionnage de belles photos de safari en fin de journée. Bon vent à toi pour la suite ! **Yenkel**, ton hébergement au laboratoire fut bref, même si plus long que prévu, mais nous avons beaucoup bénéficié de ta présence grâce à tes questions pertinentes. Merci également pour ton aide concernant le post-doc et les discussions concernant le « post post-doc » permettant de mieux se rendre compte de ce qui nous attend ! J'en profite ici pour adresser un grand merci à **Virginie** et **Jérôme** qui m'ont permis d'aborder un deuxième projet pendant ma thèse, combinant auto-immunité et tumeur, en collaboration directe avec des médecins. Cela m'a permis de découvrir un nouveau sujet passionnant, complétant mon premier projet, et de plus de m'associer à une publication. Je vous remercie pour tout cela. Merci également à **Aude** et **Mathilde** pour leur collaboration sur ces projets.

Au sein de notre grande équipe, nous évoluons tout d'abord avec le petit noyau qu'est notre sous-groupe. **Pauline**, je reviendrai sur ton cas par la suite, mais je t'adresse un premier grand merci ici. **Justine**, tu es arrivée comme premier pilier permanent du sous-groupe et tu m'as apporté beaucoup d'aide dans les manip (jusqu'à la fin !) et pour interagir avec les autres étudiants passés dans le groupe, et je te remercie pour cela. Merci également d'être toujours disponible pour discuter et pour ta volonté à faire partie d'un sous-groupe au sein duquel l'entraide est le mot d'ordre, et pour les soirées labo chez toi. **Olivia**, j'étais moins disponible lorsque tu es arrivée au laboratoire et je regrette de n'avoir pas pu plus échanger avec toi, mais je suis ravie d'avoir pu profiter de ta présence pendant plus d'un an, ta positivité et ton sourire sont un réel rayon de soleil au laboratoire. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite, et à petit Paul aussi. **Pina** ton passage chez nous est rapide, mais je suis heureuse d'avoir eu quelques mois pour connaître ta douceur infinie. **Yasmine**, je te passe le flambeau de manière peu idéale, mais je suis sûre que tu as le caractère pour prendre les choses en main et t'investir pleinement dans ce projet. Merci infiniment pour ton aide précieuse pour me permettre de terminer certains aspects de mon projet et je te souhaite bonne continuation. Je tiens également à remercier les étudiants ayant fait partie du sous-groupe à un moment ou à un autre, et particulièrement **Julie**. Tu es une personne extraordinaire qui l'oublie trop souvent. Tu as montré une persévérance sans limite lors de ton passage au laboratoire, une organisation sans faille, et une volonté d'aider et d'interagir avec les autres indispensables à notre métier. Je suis sûre que tu feras une superbe thèse de l'autre côté de la Manche, profite bien de cette expérience, et j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau ! **Priscillia**, tu possèdes également ces capacités d'organisation et de persévérance qui m'ont beaucoup aidée pour avancer lors de ton passage au laboratoire et c'était un réel plaisir de travailler avec toi. Je suis heureuse que tu aies trouvé un travail qui te plaît et que tout se passe bien pour toi. **Gaëlle**, ton passage au laboratoire n'a pas toujours été évident pour toi, mais tu ne t'es jamais laissé abattre et tu as maintenu tous tes efforts jusqu'à la fin, ce qui a fini par payer vu ta situation actuelle. Et par ailleurs, on a passé de super moments pendant que tu étais là ! Merci également à **Morgane**, qui a passé des heures à faire des IF avec moi lorsque nous étions délocalisés à cause d'un certain incendie. Pouvoir transmettre son expérience est un des aspects qui compte beaucoup pour moi dans l'aventure qu'est la thèse, et j'ai eu de la chance de toutes vous rencontrer pendant ces 5 ans.

L'équipe bénéficie grandement de personnes qui restent plus longtemps, qui étaient présentes avant que j'arrive et resteront après, permettant d'assurer une continuité dans la vie du labo. Je remercie bien sûr **Céline**, pour ton accueil chaleureux lorsque l'on arrive au laboratoire et que l'on est un peu perdu, tu es toujours présente pour répondre à nos questions et aider pour à peu près tout et n'importe quoi. Tu es un repère et un pilier très important dans cette équipe. **Lyvia**, je pense que le plus important est de te remercier pour tes câlins sur demande, et te dire qu'ils vont fortement me manquer, ça résume tout le reste ! Merci pour toute ton aide. **Axelle** et **Charlotte**, vous êtes plus loin de nous, mais je vous remercie pour votre accueil lorsque nous étions SLF (Sans Labo Fixe). Merci pour votre gentillesse et c'était un vrai bonheur de pouvoir passer un peu plus de temps

avec vous lors des retraites de département. Merci également à **Anne-Claire** et **Dom**, grâce à vous, nous avons l'impression que les étagères du labo sont comme la hotte du père Noël, se remplissant automatiquement de tout le matériel dont nous avons besoin, alors que c'est en réalité le travail de deux elfes extrêmement importants. Merci également à vous pour les conversations très matinales quand le labo est encore vide.

D'autres personnes sont arrivées plus récemment pour participer à cette vie d'équipe. Des étudiants pour commencer : **Anaïs** et **Pacôme**, je vous vois encore comme les nouveaux thésards fraîchement arrivés, mais vos récentes demandes de quatrième année prouvent le contraire ! **Anaïs**, merci pour la compagnie lors de nos nombreux repas dans le couloir et en dehors. Certaines de tes perles me resteront en mémoire pour me rappeler des souvenirs à des milliers de kilomètres. **Pacôme** merci pour ton esprit dans les nuages qui nous fait voyager, que ce soit lors de discussions scientifiques ou non-scientifiques tout autant passionnées et ambitieuses. Bon courage à vous deux pour la dernière ligne droite. Merci également à **Anthony** pour toutes tes crises de rangement qui nous permettent d'avoir de jolies boîtes bien renseignées dans tous les frigos du labo, c'est agréable pour travailler. **Nabil**, même à l'écrit, je ne vais pas changer nos bonnes habitudes : je suis vraiment désolée ! Bon courage aux réels petits nouveaux, **Manuela** et **Benjamin**, pour votre M2 et la thèse qui suivra sûrement. En dehors des étudiants, merci également à **Paola** pour les PBMC HLA-A2 positifs et les partages de galère d'ELISPOT en compagnie de **Virginie**, mais aussi pour nous avoir fait découvrir le hockey subaquatique et pour nous faire rêver de l'Italie que j'adore. **Aurélien**, le labo avait besoin de toi, pour tes compétences en manips souris, mais également pour ton altruisme et ta bonne humeur. Merci pour ta gentillesse, et bonne continuation au laboratoire. **Fanny**, merci pour les discussions en tout genre lors de nos repas dans le couloir. **Maude** j'espère que tous nos CD et autres termes immuno ne vont pas trop te faire peur et que tu te plairas ici, le labo a besoin de toi et c'est dommage que je n'aie pas eu le temps de mieux apprendre à te connaître. Merci également à tous les étudiants médecins passés par le labo, qui nous permettent d'avoir un pied un peu plus ancré dans l'hôpital. **Vincent** et **Matthieu**, j'espère que votre thèse au labo vous plaira. Un merci particulier à **Benoit**, super pédiatre, et **Hélène** au caractère extraordinaire, qui ont laissé une forte empreinte au labo. Merci également à **Émilie** et **Emmanuelle** pour leur aide dans le versant anapath du projet.

Les anciens du labo, je ne vous ai bien sûr pas oubliés. Un merci infini à **Franceline**. Tu nous as apporté une aide précieuse au laboratoire, mais tu m'as aussi apporté une belle amitié et toi, ton accent et ton sourire me manquent à l'autre bout de la France ! **Nico** tu m'as beaucoup appris, notamment pour la prise en charge des prélèvements, ton départ a laissé un grand vide et c'est toujours un plaisir de te revoir, à Lyon ou à Marseille. **Odile** et **Suzanne**, il n'y a pas que les vieux prénoms qui vous rassemblent. Vous apportiez une dose infinie de gentillesse et de douceur au laboratoire qui nous manque souvent. Je suis heureuse que vous ayez trouvé votre bonheur et je suis contente de vous revoir bientôt. Pour revenir au tout début, merci **Estelle** pour m'avoir appris à manipuler, particulièrement à faire du FACS (avec le foot féminin des JO en fond), en prenant le temps de tout m'expliquer et de supporter ma lenteur extrême. Tu as confirmé mon envie de faire de la recherche. Merci pour les séances de chant en salle de culture, accompagné de **Nelly**, particulièrement sur des extraits de Disney. Merci également à **Nadège** pour ton aide concernant l'écriture de mon rapport pendant ce stage.

Merci également à **Alex** et à **Marie CC**, vous n'êtes/n'étiez pas au Cheney D 3^{ème}, mais vous avez quand même marqué cette aventure pour moi et je suis heureuse de votre présence le jour J. J'ai une pensée ici également pour **Ludo**, qui m'a donné de précieux conseils après avoir animé les séances TP à l'ENS.

Un peu en dehors de l'équipe, merci à **Isabelle**, **Amélie** et **Laetitia** sans qui de nombreuses parties de ma thèse n'auraient pas été faisables. Merci pour les discussions anapath très intéressantes, et Amélie et Laetitia merci pour votre réactivité et votre efficacité qui nous laissent rêveurs.

La thèse au sein d'un hôpital permet de participer à des projets scientifiques fondamentaux et translationnels, mais également à des projets humains extrêmement importants. J'ai eu la chance de participer aux **ateliers des petits génies** avec les enfants de l'IHOPE, une pause magique quelques mercredi après-midi par an. Merci à **Elise** de m'avoir fait confiance pour aider Virginie à reprendre la main des ateliers et à créer

l'association. **Virginie, Stéphane, Anne, Fleur** et **Yvana**, c'était un plaisir de passer la première année de l'association avec vous. Merci à **Solène, Anne-Laure** et **Mélanie** d'avoir repris le flambeau. J'espère que les ateliers vivront encore longtemps ! Merci à **Maggy** et tes talents de bricolage manuel pour toutes les fois où tu viens nous accompagner.

Je suis passée par deux laboratoires avant de revenir à Lyon et j'aimerais dire merci à **Boris** pour m'avoir accueillie en toute confiance dans son laboratoire, et un énorme merci à **Vanja** d'avoir défendu mon cas et de m'avoir encadrée par la suite. Tu m'as appris énormément tout en me faisant confiance pour les manips. Merci également pour toutes les sorties avec **Katie** qui m'ont permis de profiter pleinement de mon expérience New Yorkaise. Merci également à **Marie-Caroline** de m'avoir accueillie pendant 4 mois, et à **Samantha, Jeremy** et **Claire** de m'avoir permis d'apprendre beaucoup de nouvelles choses pendant ce stage, je n'aurais pas été loin sans vous.

Certaines personnes ne se sont pas encore retrouvées dans ce texte bien que faisant partie du laboratoire, mais c'est pour qu'elles puissent apparaître vers mes amis, car elles sont là depuis le début et leur présence devient une évidence nécessaire et leur soutien quotidien est précieux, que ce soit au labo ou en dehors. **Marion**, merci pour tous les sushis partagés et les soirées Halloween et de Noël pour lesquelles tu nous as accueillis chez toi. Tu permets une cohésion de groupe cruciale pour conserver une bonne ambiance au laboratoire, favorisant les échanges et l'entraide. Je te remercie grandement pour tous tes petits messages de soutien pendant les moments difficiles, et te souhaite bonne continuation maintenant que les choses se mettent en place pour la rentrée prochaine ! **Margaux**, nos interactions dépassent largement le cadre du laboratoire et c'est avec grand plaisir que je vois ton petit bout d'Adèle grandir. Tu as toujours gardé le cap de ta thèse tout en jouant le rôle de maman et en gérant le reste, ce qui est assez impressionnant. Merci pour tous les repas partagés au milieu de tout ça. Profite de ta nouvelle vie après thèse pour vivre de nouvelles belles aventures, qui j'espère croiseront mon chemin par la suite !

Julie, nous nous sommes vu dans tous les états possibles et imaginables, en partageant d'innombrables séances de jeu et d'aquabike, des chambres en congrès ou ailleurs, et en se tenant compagnie quand nécessaire. Tu es une force tranquille qui permet de discrètement rassembler les gens et de passer des messages importants sans faire de remous. Le laboratoire a énormément bénéficié de tes années de présence, même s'il est l'heure maintenant que tu te construis ailleurs. Je suis heureuse que tu aies trouvé un travail à Paris, je te souhaite tout le bonheur là-bas et je te remercie pour toute ton aide, toutes tes aides.

Amélien, merci pour tous les jeux et sushis (décidément, on aime ça dans ce labo !), les desserts de chez Bouillet® et toute autre nourriture entre gourmands, les sorties piscine et ciné. Merci pour ton oreille grande ouverte à chaque fois que je viens la chercher et je pense qu'on a tous les deux grandement apprécié notre soutien mutuel pendant ces quelques années, le tien m'a été précieux en tout cas. Il est temps maintenant de profiter de nouvelles aventures, et j'attendrai de pied ferme ta visite !

Pauline, on échange régulièrement la place de maman et d'enfant toutes les deux en fonction des événements. La communication est le maître-mot et ça fait du bien (autant à toi qu'à moi je pense) de pouvoir dire les choses plutôt que de les ruminer inlassablement, mal équipées que nous sommes ;-) Merci (mais non merci !) pour tous les McDo et pizzas enfilés pendant presque 4 ans. Merci pour mes merveilleux cadeaux d'anniversaire et pour tes super week-ends d'anniversaires et fêtes de nouvel an. Merci pour toutes les petites (et grandes) attentions, les zestes qui comptent et les grandes attentions cachées dans des phrases banales. Merci aussi à Quentin qui a dû me supporter un certain nombre de fois. Et je m'en vais loin, mais je reste à portée de téléphone et ça nous permettra de vivre de nouvelles aventures ensemble ! BBCCF

Elena, personne ne me connaît mieux que toi je pense, car il n'y a rien que je ne puisse te dire. Je ne sais même pas par où commencer pour te remercier. Nous nous sommes rencontrées encore bébés de la science avant de commencer nos thèses respectives. Ça y est tu as la tienne et bientôt je soutiendrai la mienne, et tu es partie de l'autre côté de la manche où tu assures ton rôle de support technique comme une championne :-). Je te remercie pour toutes nos séances de jeux, tous nos repas, le trampoline, les voyages à la Rochelle, à Londres et à Cambridge. Bientôt, c'est toi qui viendras me voir ! Merci pour ton aide dans la gestion de mes douleurs, tu

m'as permis de comprendre ce qui pouvait m'aider à ne pas les laisser m'envahir. Merci pour ton oreille grande ouverte en permanence et pour ta confiance dans l'autre sens lorsque tu as besoin de quelqu'un. Tu es d'une honnêteté associée à une gentillesse (avec moi !) infinies, et je t'en remercie. Et merci pour tous les bons moments tout simplement. Vivement la suite !

De nombreuses personnes étaient bien sûr là avant la thèse, et je tiens à remercier tout d'abord **Delphine**. Qu'est-ce qu'une chaise vide au lycée ne peut provoquer ?! Que de changements pour nous deux en ce moment, vivement le 6 Juillet et la suite pour vous voir construire votre petit bonheur avec **Alex**. Merci à **Ariane** pour la compagnie et l'entraide pendant nos deux années de prépa. Merci **Alfred** et **HB** pour votre compagnie à l'ENS et pour nos rotations (pas tout à fait) mensuelles ces dernières années. Bon courage à vous deux pour la suite, la lumière n'est (presque) pas loin ! J'en profite aussi pour remercier **Seb** le Parisien exilé en Allemagne, j'espère qu'on arrivera à se recroiser bientôt ! Et bien sûr merci à **Adrien**, on n'est pas arrivé tout à fait où l'on pensait, mais je garde de merveilleux souvenirs et voyages en tête, et surtout une belle amitié.

Enfin, revenons-en au tout début. On dit bien souvent qu'on ne choisit pas sa famille, mais je n'aurais guère pu faire mieux si cela avait été le cas. **Papa, Maman**, vous êtes des personnes merveilleuses, très ouvertes, curieuses de découvrir plein de choses, et extrêmement tolérantes, qui nous ont appris à nous conduire de cette manière également. Grâce à vous, nous avons toujours pu suivre notre voie sans nous soucier des problèmes financiers ou de ce que les autres peuvent penser de nos choix, pour avancer dans la direction que nous avons choisie, et c'est un luxe merveilleux. Merci Maman pour ta patience, ta gentillesse, et ta disponibilité permanente. Merci Papa pour m'avoir transmis la curiosité et l'intérêt pour notre domaine qui m'a probablement grandement conduite où je suis aujourd'hui. Merci bien sûr à mes frangin(e)s, **Léa** et **Grégoire**. Des réels « grand frère » et « grande sœur » que j'ai toujours vus veiller sur moi. Greg qui me défendait dans la cours de récré quand j'étais en CP et Léa qui me faisait tourner dans les airs quand j'étais petite. Un grand merci à vous d'être là tout le temps. Un grand merci également aux frangin(e)s plus récents, **Amandine** et **Clément**, c'est un grand bonheur de vous avoir dans la famille. Enfin merci pour tout à ma **deuxième Maman** qui se reconnaîtra, et à toute la famille. Et bien sûr un grand merci pour tout le futur bonheur à petite **Léone**. Encore une fois, vivement la suite !

Un grand **MERCI** à tous

Table des matières

ABRÉVIATIONS	17
INTRODUCTION	21
CHAPITRE 1 : LES LYMPHOCYTES B, DES ACTEURS DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL LONGTEMPS IGNORÉS.....	23
1. <i>Surveillance immunitaire des cancers et échappement</i>	23
1.1. De l'élimination à l'échappement des tumeurs	23
1.2. L'immunosurveillance permettant l'élimination des cellules tumorales	24
1.3. Un détournement du système immunitaire favorise le développement des tumeurs	27
1.4. Exploiter les connaissances sur le microenvironnement immunitaire des tumeurs pour développer de nouvelles thérapies.....	29
a. Analyser l'ensemble des cellules immunitaires infiltrant la tumeur.....	29
b. Utiliser les cellules immunitaires en thérapie pour éliminer les tumeurs	30
2. <i>Les lymphocytes B, des cellules pro- ou anti-tumorales ?.....</i>	32
2.1. Ontogénie et différenciation des lymphocytes B.....	32
a. Différenciation des lymphocytes B naïfs en cellules mémoires et en plasmocytes.....	32
b. Marqueurs de surface caractérisant les différents stades de maturation des LB	33
2.2. Différentes populations de LB infiltrant les tumeurs solides	34
2.3. Arguments en faveur d'un rôle anti-tumoral des LB.....	36
a. Les lymphocytes B sont nécessaires à l'élimination des tumeurs murines et leur présence est souvent associée à un meilleur pronostic chez l'Homme	36
b. Les structures lymphoïdes tertiaires modifient la réponse anti-tumorale localement	36
2.4. Arguments pour un rôle pro-tumoral des lymphocytes B	40
3. <i>Les syndromes neurologiques paranéoplasiques : un modèle d'étude des réponses humorales anti-tumorales</i>	42
3.1. Des pathologies auto-immunes associées à une forte réponse humorale	42
3.2. Des tumeurs mieux contrôlées par le système immunitaire ?.....	43
CHAPITRE 2 : IMPACT DES ANTICORPS SUR LA CROISSANCE TUMORALE	46
1. <i>Le développement du cancer est souvent associé à l'induction d'une réponse anticorps</i>	46
1.1. Des immunoglobulines spécifiques d'antigènes tumoraux comme reflet de l'immunogénicité des tumeurs ...	46
a. Méthodes d'identification des cibles des anticorps présents chez les patients atteints de cancers .	46
b. Diversité des réponses anticorps entre les patients et les types de cancers.....	47
c. Les différentes catégories d'antigènes ciblés par les anticorps sériques des patients	48
1.2. Des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux sont produits dans l'environnement tumoral	50
1.3. Fonctions de la réponse anticorps endogène	51
2. <i>Mécanismes responsables de l'action anti-tumorale des anticorps.....</i>	52
2.1. Activation des fonctions cytotoxiques et de phagocytose des cellules accessoires via l'engagement des récepteurs Fc	52
2.2. Mort des cellules tumorales grâce à la cytotoxicité dépendante du complément	54
2.3. Présentation croisée des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8 ⁺ grâce aux complexes immuns	57
3. <i>Mécanismes responsables de l'action pro-tumorale des anticorps.....</i>	59
3.1. Inhibition de l'ADCC par les IgA et par les IgG4.....	59

3.2. Induction d'une réponse inflammatoire pro-tumorale.....	60
3.3. Induction d'un phénotype tolérogène des cellules présentatrices d'antigènes par les IgA.....	61
4. <i>Utiliser les connaissances des rôles pro- et anti-tumoraux des anticorps pour concevoir des anticorps thérapeutiques plus efficaces</i>	62
CHAPITRE 3 : RÔLES DE LA PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES ET DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES LYMPHOCYTES B DANS LES TUMEURS	64
1. <i>Impact de la présentation d'antigènes par les lymphocytes B sur la réponse T anti-tumorale</i>	64
1.1. Les lymphocytes B comme cellules présentatrices d'antigènes	64
1.2. La présentation d'antigènes par les lymphocytes B permet l'induction d'une réponse anti-tumorale.....	65
1.3. La présentation d'antigènes par les lymphocytes B peut inhiber la réponse T anti-tumorale.....	67
2. <i>Impact des cytokines produites par les lymphocytes B sur la croissance tumorale</i>	68
2.1. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes B pouvant jouer un rôle anti-tumoral	68
2.2. Les cytokines pro-tumorales produites par les lymphocytes B : un rôle central de l'IL-10 et de l'IL-35	68
2.3. Diverses populations de lymphocytes B produisent des cytokines immunorégulatrices	69
OBJECTIFS DE LA THÈSE	72
RÉSULTATS	75
HÉTÉROGÉNÉITÉ DES LYMPHOCYTES B ET DE LA RÉPONSE HUMORALE DANS LES TUMEURS DE SEIN ET D'OVAIRE	77
1. <i>Hétérogénéité et impact clinique des plasmocytes infiltrant les tumeurs de sein</i>	77
2. <i>Diversité des lymphocytes B et de la réponse humorale dans les tumeurs d'ovaire</i>	108
2.1. L'infiltrat B des tumeurs ovariennes est souvent organisé en structures lymphoïdes tertiaires et principalement constitué de plasmocytes et de LB à mémoire	108
2.2. Diversité des anticorps produits dans le microenvironnement des tumeurs de l'ovaire.....	109
3. <i>Résultats complémentaires</i>	113
3.1. Certaines populations immunitaires infiltrant les tumeurs expriment CD89 et CD209	113
3.2. Les lymphocytes B et les plasmocytes expriment différents ligands de points de contrôle immunitaires	115
DIVERSITÉ DES ANTIGÈNES CIBLES DES IGG ET DES IGA PRODUITS DANS LES TUMEURS DU SEIN ET DE L'OVAIRE.....	116
1. <i>Détermination des antigènes reconnus par les immunoglobulines présentes dans la tumeur</i>	116
2. <i>Plusieurs centaines de cibles parfois partagées entre les patientes sont reconnues par les IgG et/ou les IgA intra-tumoraux</i>	116
EXPLORATION DES TUMEURS ASSOCIÉES AUX SYNDROMES NEUROLOGIQUES PARANÉOPLASIQUES POUR L'ÉTUDE DES CARACTÉRISTIQUES ET DES MÉCANISMES D'INDUCTION DE LA RÉPONSE HUMORALE DIRIGÉE CONTRE DES ANTIGÈNES TUMORAUX.....	120
1. <i>Des altérations génétiques des antigènes onco-neuronaux et une contexture immunitaire anti-tumorale caractérisent les tumeurs ovariennes associées aux dégénérescences cérébelleuses à anticorps Yo</i>	120
2. <i>Caractérisation de l'infiltrat immunitaire d'une tumeur ovarienne associée à une dégénérescence cérébelleuse paranéoplasique avec une nouvelle spécificité antigénique</i>	133
DISCUSSION	137

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	139
1. <i>Des lymphocytes B à différents stades de différenciation infiltrent les tumeurs du sein et de l’ovaire : reflet d’une induction et/ou amplification locale de la réponse humorale ?.....</i>	139
1.1. Diversité des lymphocytes B présents dans les tumeurs de sein et d’ovaire.....	139
1.2. Les structures lymphoïdes tertiaires pourraient permettre une induction et/ou une amplification locale de la réponse humorale.....	140
2. <i>Diversité et spécificité des anticorps produits dans le microenvironnement tumoral</i>	141
2.1. Hétérogénéité des classes d’anticorps exprimés par les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes infiltrant les tumeurs du sein et de l’ovaire	141
2.2. Différentes formes moléculaires d’IgA sont produites dans les tumeurs	143
2.3. Les IgG et les IgA du microenvironnement tumoral ciblent majoritairement des antigènes différents	143
3. <i>Un rôle différentiel des plasmocytes à IgG et des plasmocytes à IgA dans les tumeurs ?.....</i>	146
4. <i>Un aperçu des mécanismes responsables d’une réponse anticorps anti-tumorale grâce à l’étude des syndromes paranéoplasiques</i>	148
4.1. Les tumeurs de l’ovaire associées à des syndromes neurologiques paranéoplasiques présentent une contexture immunitaire particulière	148
4.2. Des altérations des gènes des antigènes onco-neuronaux pourraient induire la rupture de tolérance contre ces antigènes	149
5. <i>Conclusion générale.....</i>	149
RÉFÉRENCES	151
ANNEXES	169

Abréviations

Ac	Anticorps	ICP-L	Ligand de point de Contrôle Immunitaire
ADCC/P	Antibody-Dependant Cell Cytotoxicity/Phagocytosis	IF	Immunofluorescence
Ag	Antigène	IFN γ	Interféron Gamma
Bcl6	B-cell lymphoma 6	Ig	Immunoglobulin
BCR	B Cell Receptor	IHC	ImmunoHistoChimie
C(X)CL/R	Chemokine (C-(X)-C motif) Ligand/Receptor	IL	Interleukine
CCIS	Carcinome Canalaire In Situ	IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
CD	Cluster de Différenciation	ITAM/ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation/Inhibition Motif
CD(C)C/P	Complement-Dependant (Cell) Cytotoxicity/Phagocytosis	LB	Lymphocyte B
cDC	Cellule Dendritique Conventiennelle	LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
CDR2(L)	Cerebellar Degeneration-Related Protein 2 (Like)	LPS	Lipopolysaccharide
CG	Centre Germinatif	LT	Lymphocyte T
CMF	Cytométrie en Flux	LTfh	Lymphocyte T auxiliaire folliculaire
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	LTh	Lymphocyte T auxiliaire
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes	LT β R	Lymphotoxin β Récepteur
CTA	Cancer Testis Antigen	M2	Macrophages de type 2
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4	MAPPING	Multiple Affinity Protein Profiling
DC	Cellule Dendritique	MET	MicroEnvironnement Tumoral
DCP	Dégénérescence Cérébelleuse Paranéoplasique	NK	Natural Killer
DC-SIGN	Dendritic Dell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin	NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	OLS	Organe Lymphoïde Secondaire
ER	Récepteur aux oestrogènes	PC	Plasmocyte
FcR	Récepteur au fragment Fc	PD-(L)1	Programmed Cell Death Protein (Ligand) 1
FDC	Cellule Dendritique Folliculaire	pDC	Cellule Dendritique plasmacytoïde
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded	PR	Récepteur à la progestérone
FRC	Fibroblastic Reticular Cell	SEREX	SErological identification of antigens by Recombinant EXpression cloning
GrB	Granzyme B	SERPA	SERological Proteome Analysis
HER2	Human Epithelial growth factor Receptor 2	SNP	Syndrome Neurologique Paranéoplasique
HERV	Human Enfogenous RetroVirus	STM	Soluble Tumor Milieu
HEV	High Endothelial Venules	TCGA	The Cancer Genome Atlas
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR isotype	TCR	T Cell Receptor
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	TGF β	Transforming Growth Factor beta
ICPi	Point de Contrôle Immunitaire (inhibiteur)	TLR	Toll Like Receptor
		TLS	Structure Lymphoïde Tertiaire
		TMA	Tissue MicroArray
		TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
		TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Introduction

Chapitre 1 : Les lymphocytes B, des acteurs du microenvironnement tumoral longtemps ignorés

1. Surveillance immunitaire des cancers et échappement

Les cellules tumorales se développent dans un microenvironnement supportant la croissance de la tumeur. Ce stroma est composé notamment de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques issus de la néo-angiogenèse, et de la matrice extracellulaire. Les cellules du système immunitaire peuvent également infiltrer le microenvironnement tumoral et influencer le développement de la tumeur.

1.1. De l'élimination à l'échappement des tumeurs

En 1909, Ehrlich a émis l'hypothèse selon laquelle la surveillance par le système immunitaire permet d'éliminer la majorité des tumeurs émergentes, et que sans ce phénomène la fréquence de cancer serait beaucoup plus élevée. Burnet a par la suite formulé la théorie de l'immunosurveillance, postulant que des cellules immunitaires sentinelles provenant du thymus surveillent les tissus afin de détecter l'apparition de cellules cancéreuses (Burnet, 1970). Ce rôle du système immunitaire dans le développement des tumeurs a été précisé par Robert Schreiber en 2002 sous la forme d'une théorie dite des trois E pour Élimination/Équilibre/Échappement (**figure 1**, Dunn et al., 2002), dans laquelle il postule que le rôle du système immunitaire dans le microenvironnement tumoral (MET) évolue au cours du développement de la tumeur. Tout d'abord, les cellules immunitaires peuvent tuer les cellules tumorales naissantes pendant la phase d'élimination, qui vraisemblablement est très efficace et explique que l'apparition de tumeurs est relativement limitée. Cependant, la pression exercée par le système immunitaire conduit à la sélection de cellules tumorales ayant subi des mutations qui leur permettent de résister à l'attaque des cellules immunitaires. Ce phénomène appelé « immuno-editing » se reflète en partie par la perte de l'expression des antigènes (Ags) tumoraux par les cellules tumorales, empêchant leur reconnaissance par les cellules immunitaires, mais également par la mise en place de mécanismes supprimant la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette phase d'équilibre, qui est souvent asymptomatique peut probablement durer pendant plusieurs mois voire plusieurs années sans que la tumeur ne soit détectée chez le patient. L'accumulation de mutations avantageuses pour la tumeur conduit à une phase d'échappement pendant laquelle le système immunitaire ne peut plus contrôler la croissance de la tumeur qui va alors se développer voire se disséminer à des sites distants pour former des métastases.

Différentes cellules immunitaires jouent un rôle tout au long de ce processus. Certaines sont capables de tuer les cellules tumorales et de jouer un rôle dans l'immunosurveillance des tumeurs

permettant leur élimination, tandis que d'autres exercent un rôle pro-tumoral par des fonctions immunosuppressives et conduisent à l'échappement des cellules tumorales (figure 1).

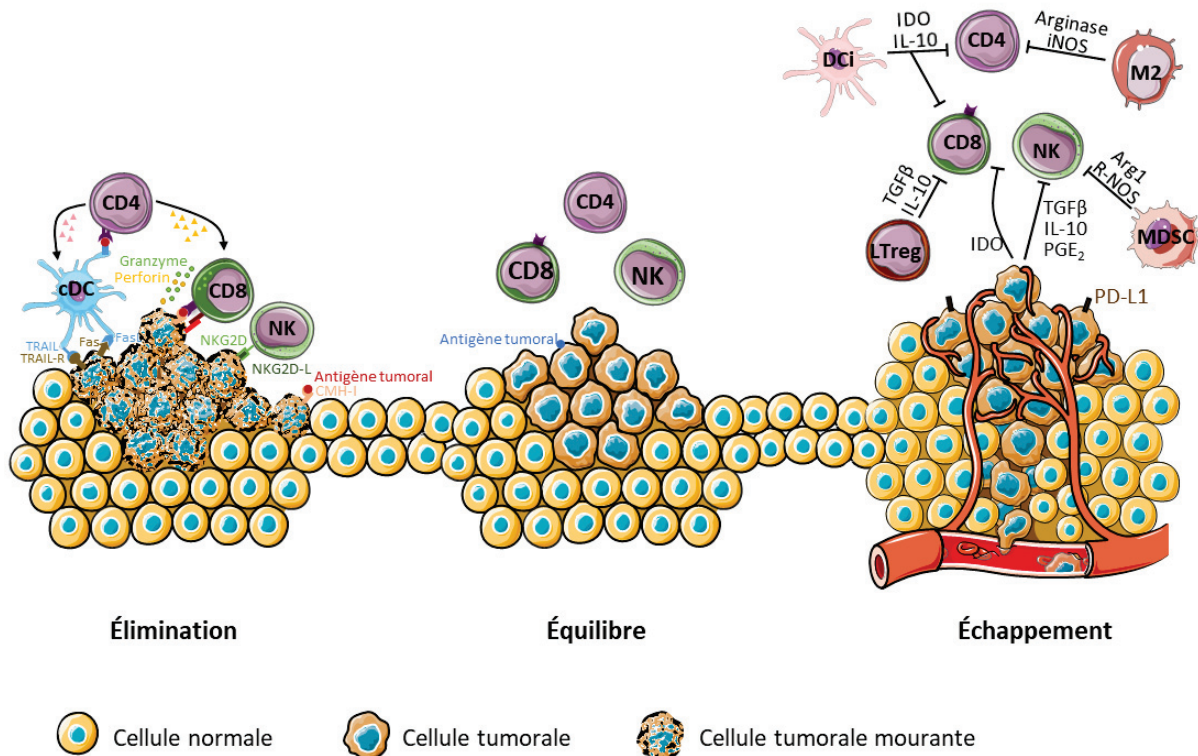


Figure 1 : Hypothèse des trois E dans l'immunité anti-tumorale. Lors de l'apparition de cellules tumorales, des cellules de l'immunité innée comme les cellules NK sont capables de lyser les cellules tumorales. De plus, la présentation des Ags tumoraux par les DC sur le CMH-I ou II permet l'induction de différentes populations de lymphocytes T (LT) effecteurs, permettant notamment la lyse des cellules tumorales par les LT CD8⁺ (phase d'élimination). Suite à des mutations dans les cellules tumorales, seuls les clones pouvant échapper aux cellules immunitaires infiltrant la tumeur persistent, par un phénomène d'immuno-editing. La tumeur n'est alors plus entièrement contrôlée par les cellules immunitaires et on parle de phase d'équilibre qui peut être longue et asymptomatique, pendant laquelle la tumeur ne se développe pas. L'accumulation de ces mutations par les cellules tumorales leur permet d'échapper aux cellules effectrices et de recruter des cellules immunosuppressives, permettant à la tumeur de se développer (phase d'échappement).

1.2. L'immunosurveillance permettant l'élimination des cellules tumorales

Différentes cellules et composantes du système immunitaire inné et adaptatif participent à l'élimination des cellules tumorales.

Tout d'abord, les fonctions cytotoxiques des cellules Natural Killer (NK), des lymphocytes T (LT) CD8⁺, et des neutrophiles permettent de tuer les cellules tumorales. Les neutrophiles sont capables de tuer des cellules tumorales *in vitro* par différents mécanismes, dont le relargage d'espèces réactives de l'oxygène et la sécrétion de pièges extracellulaires appelés NET (Clark and Klebanoff, 1975; Yan et al., 2014). Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques de l'immunité innée capables de lyser des cellules infectées par des virus et les cellules tumorales, de manière indépendante de l'Ag (Kärre et al., 1986), et sont nécessaires à l'élimination des tumeurs *in vivo* chez la souris (Ljunggren and Kärre, 1985).

Les cellules NK peuvent tuer les cellules tumorales *in vivo* par la sécrétion de perforine (Broek et al., 1995), mais également par l'expression de TRAIL, qui provoque l'apoptose des cellules tumorales (Takeda et al., 2001). Ainsi, le blocage de TRAIL par des anticorps (Acs) dans un modèle murin de cancer du poumon réduit la mort des cellules tumorales. Chez l'Homme, les cellules NK isolées de sang de patients atteints de cancer du sein par exemple sont capables de tuer des cellules tumorales autologues ou allogéniques (Shenouda et al., 2017). De plus, une forte densité de cellules NK est associée à une meilleure survie des patients dans plusieurs types de cancers solides (Waldhauer and Steinle, 2008). Cependant, les cellules NK peuvent être inhibées dans les tumeurs et devenir anergiques et incapables de tuer les cellules tumorales, expliquant qu'elles n'éliminent pas forcément la tumeur même si elles sont présentes. Dans les tumeurs pulmonaires chez l'Homme, les cellules NK infiltrant la tumeur sous-expriment les récepteurs activateurs CD16, ILT2, DNAM-1, NKp30 et NKp80 sous l'influence du TGF β produit par la tumeur (Platonova et al., 2011). Les fonctions de dégranulation et de production d'IFN γ , toutes deux impliquées dans le rôle anti-tumoral des cellules NK, sont également inhibées dans ce cancer. Les LT CD8⁺, cellules cytotoxiques de l'immunité adaptative, spécifiques d'un Ag, sont également nécessaires à l'élimination des cellules tumorales dans les modèles tumoraux murins (Townsend and Allison, 1993). La présence en forte densité dans les tumeurs des LT CD8⁺ cytotoxiques est aussi associée à un meilleur pronostic dans de nombreux cancers solides comme les cancers du côlon (Pagès et al., 2009), du sein (Mahmoud et al., 2011), et de l'ovaire (Leffers et al., 2008). Dans les tumeurs de l'ovaire, la valeur pronostique positive des LT CD8⁺ concerne les cellules présentes dans les nids tumoraux et non pas les cellules présentes dans le stroma, soulignant l'importance du contact entre ces cellules avec les cellules tumorales (Sato et al., 2005). Par ailleurs, un ratio élevé de LT CD8⁺ par rapport aux LT régulateurs (LTreg), cellules immuno-suppressives, permet une discrimination des patients encore plus pertinente lorsque l'on étudie leur survie (Sato et al., 2005).

Les cytokines produites par les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs participent également à l'élimination des cellules tumorales. Les LT CD4⁺ auxiliaires (LTh) peuvent produire de nombreuses cytokines en fonction de leur polarisation. Les LTh1, qui produisent principalement de l'IFN γ , de l'IL-2, et du TNF α , exercent principalement un rôle anti-tumoral, alors que les LTh2 producteurs d'IL-4, IL-5 et IL-13 jouent le plus souvent un rôle pro-tumoral. Ainsi, la présence de chimiokines permettant le recrutement LTh1 est associée à un bon pronostic dans le cancer du rein (Kondo et al., 2006), de la même manière que la prédominance de cytokines associées aux LTh1 par rapport aux LTh2 dans les tumeurs de l'ovaire (Hao et al., 2016). L'IFN γ est une cytokine cruciale dans l'immunité anti-tumorale qui peut être produite par les LT CD8⁺, par les LT CD4⁺ auxiliaires Th1 et par les cellules NK. Les tumeurs se développent plus rapidement chez les souris injectées avec un anti-IFN γ ou déficientes pour le récepteur de cette cytokine, à la fois dans des modèles murins de tumeurs

transplantées (fibrosarcome Meth A, Dighe et al., 1994) et de tumeurs induites par du methylcholanthrene (Kaplan et al., 1998), indiquant que l'IFN γ est nécessaire au contrôle de la tumeur. Différents mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer ce rôle. L'IFN γ peut tout d'abord agir directement sur les cellules tumorales en augmentant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I, ce qui permet une meilleure reconnaissance des cellules tumorales par les LT CD8 $^{+}$, comme démontré dans un modèle murin de cancer de la prostate (Martini et al., 2010). L'IFN γ peut également, par l'intermédiaire de l'activation de STAT1, inhiber la prolifération (Chin et al., 1996) et induire l'apoptose des cellules tumorales humaines et murines *in vitro* et *in vivo* (Chin et al., 1997; Detjen et al., 2001; Komita et al., 2006). L'IFN γ peut aussi moduler la fonction des cellules immunitaires en activant les macrophages pour les mener à éliminer des cellules infectées ou tumorales (Schreiber et al., 1986), et en augmentant la motilité et la cytotoxicité des LT CD8 $^{+}$ (Bhat et al., 2017). Cette cytokine produite à la fois par des cellules recrutées rapidement, les cellules NK, et par des LT recrutés plus tardivement dans la tumeur, peut jouer un rôle tout au long du développement de la tumeur, et l'IFN γ produit par les cellules NK pourrait contribuer au recrutement d'autres populations immunitaires dans la tumeur. Cependant, certaines lignées tumorales humaines sont insensibles à l'IFN γ du fait d'une perte d'expression de son récepteur, ce qui suggère une adaptation des cellules tumorales pour résister à la réponse immunitaire. Il a d'ailleurs été montré dans des souris déficientes pour l'IFN γ que cette cytokine pourrait être impliquée dans l'immuno-editing en favorisant la sélection d'altérations génétiques (Takeda et al., 2017).

L'induction d'une réponse anti-tumorale adaptative nécessite la présentation d'Ags exprimés par les cellules tumorales aux LT. Ces Ags peuvent être des protéines normalement exprimées dans l'organisme, mais surexprimées ou exprimées de manière ectopique dans le tissu tumoral, ou ayant subi des mutations, créant ainsi des néo-Ags. Certaines protéines virales ou dérivées de séquences rétrovirales endogènes peuvent également être exprimées par les cellules tumorales et constituer des Ag tumoraux. Le TCR des LT CD4 $^{+}$ reconnaît des peptides présentés sur le CMH-II, exprimé de manière constitutive par les cellules présentatrices d'Ags (CPA) professionnelles, c'est-à-dire les lymphocytes B (LB), les macrophages et les cellules dendritiques (DC). La primo-activation des LT CD8 $^{+}$ nécessite la présentation croisée des Ags, c'est-à-dire la capture par des CPA d'Ags exprimés par la cellule tumorale et leur présentation sur le CMH-I. Cette capacité de présentation croisée est restreinte à certaines sous-populations de cellules dendritiques. Dans tous les cas, les DC conventionnelles (cDC, en opposition aux DC plasmocytoïdes) sont considérées comme les principales CPA capables d'activer les LT grâce à leur capacité à migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (OLS) pour éduquer les LT, à capturer et présenter les Ags sur le CMH-I et le CMH-II, et à exprimer les molécules co-stimulatrices et les cytokines nécessaires à la différenciation des LT en cellules effectrices et mémoires. Différents arguments montrent que les DC sont essentielles pour l'induction d'une réponse T anti-tumorale. Tout

d'abord, la déplétion chez la souris des DC CD11c⁺, comprenant les différentes populations de cDC, empêchent l'induction de LT CD8⁺ cytotoxiques et producteurs d'IFN γ permettant l'élimination non seulement de pathogènes (Jung et al., 2002), mais également de tumeurs (Murillo et al., 2009). De plus, l'injection chez la souris de DC chargées avec des Ags tumoraux permet le rejet de cette tumeur, notamment grâce à l'expansion des LT CD8⁺ spécifiques et producteurs de cytokines anti-tumorales (Celluzzi et al., 1996; Thurner et al., 1999). Dans un modèle murin de déplétion des DC dans la phase précoce *versus* tardive du développement de tumeurs ovariennes, il a été montré que les DC jouent initialement un rôle anti-tumoral en induisant des LT CD8 cytotoxiques, puis un rôle pro-tumoral via l'acquisition de fonctions tolérogènes (Scarlett et al., 2012). Il a par ailleurs été montré que les DC majoritairement impliquées dans la présentation croisée des Ags aux LT CD8⁺ sont les cDC1 exprimant le facteur de transcription Batf3 et caractérisées par l'expression de XCR1, ainsi que CLEC9A et BDCA3 chez l'Homme et CD103 ou CD8a chez la souris. L'utilisation de souris déficientes pour Batf3 montre en effet que ces cellules sont indispensables au rejet de tumeurs et à l'induction de LT CD8⁺ cytotoxiques dirigés contre les cellules tumorales (Hildner et al., 2008). Chez l'Homme, une forte densité de DC matures, caractérisées par l'expression de DC-LAMP, constitue un facteur pronostique favorable dans le cancer du poumon (Goc et al., 2013). Par ailleurs, l'exploitation des données du transcriptome de base de données publiques TCGA (The Cancer Genome Atlas) montre qu'une signature de cDC1 dans la tumeur est associée à une meilleure survie des patients dans plusieurs types de cancers solides (Broz et al., 2014).

Différentes populations cellulaires sont donc nécessaires à l'élimination des tumeurs, que ce soient les DC, capables de présenter les Ags tumoraux aux LT pour permettre la reconnaissance des cellules tumorales, les cellules NK et les LT eux-mêmes permettant d'induire la mort des cellules tumorales.

1.3. Un détournement du système immunitaire favorise le développement des tumeurs

Malgré l'existence d'une réponse immunitaire anti-tumorale, la tumeur se développe souvent grâce à des mécanismes d'échappement, en empêchant sa reconnaissance par les cellules immunitaires et/ou en favorisant la mise en place d'un environnement immunosuppresseur.

Des mécanismes intrinsèques aux cellules tumorales conduisent à une absence de leur reconnaissance par les cellules immunitaires, et ils sont dus au moins en partie à la pression du système immunitaire, phénomène appelé immuno-edding. L'impact des LT sur la tumeur par exemple a été mis en évidence dans le cancer de l'ovaire, dans lequel les cellules tumorales présentent des mutations différentes en fonction des clones de LT présents à leur proximité (Zhang et al., 2018a). Les cellules tumorales qui arrivent à croître ont subi des mutations leur permettant d'échapper aux cellules

immunitaires, notamment via une perte d'expression des Ags reconnus par les LT infiltrants ou des altérations fonctionnelles de la machinerie de présentation des Ags sur le CMH-I, comme décrit pour la β 2-microglobuline par exemple (Bicknell et al., 1996).

Les cellules tumorales peuvent également produire des molécules immunosuppressives inhibant les cellules immunitaires infiltrant la tumeur. Elles peuvent exprimer des enzymes comme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) transformant le tryptophane en kynurénine entraînant l'apoptose des LT, mais aussi sécréter des cytokines telles l'IL-10 ou le TGF β , qui peuvent inhiber les fonctions effectrices des LT CD8⁺ et induire le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives. L'IL-10 inhibe la production d'IL-12 par les DC, ce qui conduit à une diminution des réponses Th1 et des fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ (Ruffell et al., 2014), et le TGF β peut inhiber la production des granzymes par les LT CD8⁺ (Thomas and Massagué, 2005), ce qui empêche l'élimination des tumeurs. Le TGF β favorise également la différenciation de LT régulateurs (LTreg, (Hadaschik and Enk, 2015) qui peuvent eux-mêmes inhiber les LT CD8⁺ cytotoxiques en produisant du TGF β (Chen et al., 2005). Dans des modèles murins de tumeurs, les LT CD4⁺CD25⁺ ayant des propriétés régulatrices s'accumulent dans les tumeurs (Yu et al., 2005), et la déplétion des cellules CD4⁺ ou des cellules CD25⁺ (Onizuka et al., 1999), permettant notamment d'éliminer les LTreg, conduit à l'élimination des tumeurs *in vivo*. Chez l'Homme, la présence de LTreg est généralement associée à un mauvais pronostic, dans les cancers du sein (Gobert et al., 2009), de l'ovaire (Curiel et al., 2004), et du foie (Fu et al., 2007) par exemple. Les macrophages de type M2 peuvent également infiltrer les tumeurs solides et, contrairement aux macrophages de type M1, exercent des fonctions anti-inflammatoires et un rôle pro-tumoral. Les M2 peuvent comme les LTreg produire de l'IL-10 et du TGF β , mais également exprimer des enzymes comme l'arginase 1 et iNOS, permettant d'inhiber les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺. L'environnement tumoral peut reprogrammer les macrophages vers un phénotype M2 (Sousa et al., 2015), et une forte densité de ces cellules est associée à une plus forte progression tumorale dans les cancers gastriques (Yamaguchi et al., 2016) et à une moins bonne survie des patients atteints de cancer du pancréas (Hu et al., 2016) ou du sein (Miyasato et al., 2017). Les neutrophiles et les cellules myéloïdes suppressives dérivées de monocytes peuvent également promouvoir la croissance tumorale, soit en favorisant la prolifération et les capacités d'invasion des cellules tumorales soit en inhibant les cellules immunitaires effectrices (Galdiero et al., 2013; Qu et al., 2016).

Enfin, les cellules tumorales peuvent devenir résistantes à la lyse par les cellules immunitaires cytotoxiques en exprimant des ligands de récepteurs de mort, induisant la mort des cellules effectrices exprimant ces récepteurs, ou en exprimant des ligands de points de contrôle immunitaire (ICP-L) inhibiteurs. L'exposition chronique des LT à l'Ag conduit à l'épuisement de ces LT, qui vont alors exprimer de nombreux ICP inhibiteurs (ICPi), qui peuvent être engagés par les ligands exprimés par les

cellules tumorales et augmenter l'inhibition des fonctions des LT. Les LT ne sont alors plus capables d'exercer leurs fonctions anti-tumorales, ce qui permet la croissance de la tumeur.

De nombreux mécanismes sont donc mis en place par la tumeur pour permettre sa croissance, en empêchant sa reconnaissance par le système immunitaire et/ou en favorisant le recrutement de cellules immunosuppressives inhibant la réponse anti-tumorale. Les cytokines et chimiokines produites dans le MET jouent un rôle crucial dans cet échappement.

1.4. Exploiter les connaissances sur le microenvironnement immunitaire des tumeurs pour développer de nouvelles thérapies

a. Analyser l'ensemble des cellules immunitaires infiltrant la tumeur

Les premières études de l'infiltrat immunitaire des tumeurs se sont essentiellement concentrées sur un type cellulaire particulier. Cependant, étudier l'ensemble de l'infiltrat permet de mieux comprendre les interactions entre les différentes cellules et l'impact global du système immunitaire sur la tumeur. L'importance d'étudier plusieurs populations immunitaires a tout d'abord été mise en évidence par Jérôme Galon par l'établissement de l'immunoscore, qui consiste en la considération simultanée de la densité de LT CD8⁺ et de LT CD4⁺ mémoires déterminée par IHC. La prise en compte de ces deux populations permet d'atteindre une valeur prédictive bien supérieure à la considération de populations isolées, mais aussi à la prise en compte des paramètres clinico-pathologiques étudiés auparavant, dans le cancer du côlon (Galon et al., 2012). D'autres études ont documenté l'infiltrat immunitaire des tumeurs dans son ensemble grâce à l'utilisation de données transcriptomiques disponibles sur la base de données du TCGA (Gentles et al., 2015; Thorsson et al., 2018), mais également grâce à des techniques d'imagerie multiplexes permettant de combiner jusqu'à 36 marqueurs (Keren et al., 2018). Ces deux types d'approches mettent en évidence que les proportions des différentes populations de cellules immunitaires varient en fonction des types de cancers, mais également entre les patients atteints d'un même type de cancer. Les cellules majoritaires dans les tumeurs sont généralement les LT ou les macrophages, et de manière cohérente avec les études précédentes, une dominance de M2 est associée à un mauvais pronostic, tandis qu'une prédominance de cellules de type 1, comme les LT CD8⁺, les LTh1 et les M1, est associée à un bon pronostic. L'imagerie permet en outre d'étudier la localisation des cellules et met en évidence que différents profils d'organisation des cellules immunitaires par rapport aux cellules tumorales sont observables. Les cellules immunitaires peuvent être agrégées ou éparses au sein de la tumeur, et cela est associé à des différences d'expression des ICP-L : ils sont majoritairement exprimés par les cellules immunitaires dans le premier cas, et par les cellules tumorales dans le deuxième cas. Cette localisation

pourrait influencer la survie des patients, car les tumeurs ayant des cellules immunitaires agrégées présentent un meilleur pronostic (Keren et al., 2018).

Le répertoire des lymphocytes infiltrant les tumeurs et leur capacité à reconnaître des Ags tumoraux est également un point essentiel à considérer. Des études récentes montrent que seule une minorité des LT présent dans le MET sont spécifiques d'Ag tumoraux. Yannick Simoni et collaborateurs ont ainsi démontré dans les cancers du côlon et du poumon que seuls les LT CD8⁺ exprimant CD39 sont spécifiques d'Ag tumoraux et que leur densité, très variable entre les patients, est corrélée avec le statut mutationnel (Simoni et al., 2018). Sur la base d'une forte expression de PD-1, des observations assez similaires ont été réalisées dans le mélanome (Gros et al., 2014). Une étude très récente par le groupe de Ton Schumacher du répertoire TCR des LT infiltrant les mélanomes et les tumeurs de l'ovaire et du côlon montre qu'en moyenne 10% des LT CD8⁺ sont capables de reconnaître des cellules tumorales autologues, avec une extrême variabilité inter-patient (Scheper et al., 2019). Même s'il existe souvent une similitude de texture immunitaire entre tumeur primaire et métastases (Remark et al., 2013), la densité de l'infiltrat immunitaire et surtout la diversité clonotypique des LT varient également en fonction de la zone tumorale et des mutations exprimées par les cellules tumorales, comme il a été montré dans le cancer de l'ovaire (Zhang et al., 2018a) et du colon (Angelova et al., 2018). Cette hétérogénéité intra-patient est étroitement liée à la nature des Ag exprimés par les clones tumoraux et influe sur le développement des métastases (Angelova et al., 2018; Zhang et al., 2018a).

La densité et la qualité de l'infiltrat immunitaire des tumeurs varient donc fortement d'un type de cancer à un autre, entre patients, mais également au sein d'un même patient en fonction de la zone tumorale et du temps. Il est néanmoins possible de dégager des caractéristiques communes pour former des groupes de patients. Il reste maintenant à tirer les conséquences de ces connaissances pour les appliquer au traitement et à la prise en charge des patients.

b. Utiliser les cellules immunitaires en thérapie pour éliminer les tumeurs

Les connaissances sur la réponse anti-tumorale ont permis la mise en place d'un certain nombre de traitements. Parmi les voies explorées, la vaccination avec des DC chargées avec un Ag tumoral pour induire des LT capables de tuer les cellules tumorales présente jusqu'ici peu de succès dans les phases 3 des essais cliniques (Wong et al., 2016). L'utilisation de « CAR T cells », des LT exprimant un récepteur modifié avec le but de cibler les cellules tumorales par ces LT obtient à ce jour plus de succès dans les cancers hématologiques (Gomes-Silva and Ramos, 2018). Les immunothérapies utilisées aujourd'hui et présentant un succès important dans les tumeurs solides agissent principalement en permettant de lever le frein imposé aux LT infiltrant la tumeur en inhibant les ICPI ou leurs ligands (ICP-L). Les deux molécules principalement ciblées aujourd'hui sont CTLA-4 et PD-1, découvertes par James Allison et Tasuku Honjo, qui ont par la suite exploré la possibilité de cibler ces

molécules en immunothérapie du cancer, travaux qui leur ont valu le prix Nobel de médecine en 2018. Ces molécules sont des ICPI qui vont entraîner l'inhibition des LT suite à l'interaction avec leurs ligands. Des études postérieures ont démontré que le blocage de telles molécules dans des modèles murins de cancer (Leach et al., 1996), puis chez les patients (Ribas et al., 2005; Topalian et al., 2012), permet l'élimination des tumeurs et une augmentation durable de la survie d'une proportion de patients. Ces thérapies par blocage des ICPI sont très efficaces lorsqu'elles fonctionnent, mais cela n'est vrai que pour une fraction des patients très variable en fonction des types de tumeurs. En effet, le taux de réponse peut atteindre plus de 50% dans le mélanome, tandis qu'il ne dépasse pas 15% dans d'autres cancers. Différents paramètres sont corrélés partiellement avec le taux de réponse aux immunothérapies, comme l'expression des ICP cibles dans le MET (Gibney et al., 2016). L'immunogénicité des tumeurs et la quantité ainsi que la qualité de l'infiltrat immunitaire sont également des paramètres à ne pas négliger dans la compréhension de l'efficacité des immunothérapies. En effet, le taux de réponse est corrélé en partie avec la charge mutationnelle des cellules tumorales et le nombre de néo-épitopes potentiels créés par les mutations (Schumacher and Schreiber, 2015), mais également avec la densité de LT CD8⁺ infiltrant la tumeur avant le début du traitement (Chen et al., 2016; Tumeh et al., 2014) et la présence de structures lymphoïdes dans le MET (Messina et al., 2012). Un répertoire TCR restreint de ces LT, correspondant à une réponse clonale, est également prédictif d'une meilleure réponse, soulignant l'importance de la qualité de ces LT (Tumeh et al., 2014). Au contraire, une hétérogénéité de l'infiltrat et des antigènes exprimés au sein d'une tumeur est associée à une moins bonne réponse au thérapie anti-ICP (McGranahan et al., 2016). À la fois une faible hétérogénéité des néo-antigènes exprimés et du répertoire TCR est donc nécessaire à une meilleure réponse aux immunothérapies par blocage d'ICP inhibiteurs. Les facteurs étudiés ne sont pas des indicateurs absolus de la réponse à ces traitements et varient entre les différents types de cancers, rendant ainsi l'identification d'autres facteurs toujours nécessaire. Dans les tumeurs du sein et de l'ovaire, que nous avons étudiées dans nos travaux, les taux de réponse à ces immunothérapies restent inférieurs à 20% démontrant la nécessité de mieux connaître le microenvironnement immunitaire de ces tumeurs afin de déterminer les meilleures molécules à cibler et les meilleures combinaisons de traitement possibles, ainsi que les mécanismes de résistances primaires et acquises aux traitements existants.

De nombreuses études, conduites à la fois chez l'Homme et dans des modèles murins, ont permis de mieux comprendre les fonctions des cellules immunitaires dans les tumeurs, avec l'identification et la caractérisation d'entités pro- et anti-tumorales au sein des LT, des macrophages, et des DC. Cette hétérogénéité fonctionnelle est beaucoup moins bien appréciée pour les LB qui ont longtemps été négligés, mais sont pourtant des acteurs clés du MET.

2. Les lymphocytes B, des cellules pro- ou anti-tumorales ?

2.1. Ontogénie et différenciation des lymphocytes B

a. Différenciation des lymphocytes B naïfs en cellules mémoires et en plasmocytes

Les LB sont des cellules du système immunitaire adaptatif générées dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs immatures appelés les cellules pro-B. Ces cellules subissent différents processus afin de devenir des cellules matures exprimant un récepteur spécifique à l'Ag (B Cell Receptor, BCR) fonctionnel. Pour cela, les gènes des chaînes légères et lourdes du BCR subissent des réarrangements géniques des différents fragments V (Variable) et D (de Diversité), avec les fragments J (Jonctions) supplémentaires pour les chaînes lourdes. Après une première phase de réarrangements, les LB immatures suivent un processus dit de tolérance centrale qui permet d'éliminer les LB avec un BCR non fonctionnel ou ayant une trop forte avidité pour les auto-Ags. Les gènes des chaînes légères peuvent ensuite subir de nouveaux réarrangements (« receptor-editing ») pour ajuster la spécificité du BCR. À la fin du processus de maturation dans la moelle osseuse, les LB obtenus sont des LB transitionnels caractérisés par l'expression d'IgM et IgD en surface ainsi que des marqueurs CD24, CD38, et par leur capacité à quitter la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine et les OLS pour devenir des LB naïfs (figure 2).

Dans les OLS, les LB rencontrent l'Ag et interagissent avec des LT auxiliaires folliculaires (LTfh), ou pré-LTfh, en dehors des follicules. À l'issue de cette interaction, une partie des LB se différencie localement, de manière extra-folliculaire, tandis que l'autre partie rejoint les follicules pour se différencier en subissant la réaction du centre germinatif (CG). La différenciation extra-folliculaire aboutit à des plasmocytes (PC) et des LB mémoires à IgM. Cette voie de différenciation est plus rapide que la différenciation dans les follicules, et il est souvent considéré que les PC obtenus sont à courte durée de vie, mais cette caractéristique est maintenant remise en cause et il a été montré que ces PC peuvent survivre sur de longues durées (Bohannon et al., 2016). Dans les follicules, les LB subissent une expansion massive, formant ainsi la zone sombre des CG, ainsi que des hypermutations somatiques qui vont modifier l'affinité de leur BCR. Ils migrent ensuite dans la zone claire des CG, dans laquelle les LB ayant une forte affinité pour l'Ag présenté par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) survivent et présentent l'Ag aux LTfh dirigés contre ce même Ag, tandis que les LB ayant une faible affinité pour l'Ag vont mourir par apoptose (Anderson et al., 2009). La présentation de l'Ag sur le CMH-II des LB au TCR des LTfh, accompagné d'un signal de co-simulation par l'interaction entre CD28 sur les LT et CD80/CD86 sur les LB, augmente l'expression de CD40L par les LTfh. L'engagement de CD40 sur les LB par le CD40L est nécessaire à la formation des CG, mais également à la commutation de classe des LB lors de leur différenciation (Kawabe et al., 1994). Par conséquent, le signal de co-simulation

délivré au LT par les LB est indispensable à une bonne différenciation des LB (Borriello et al., 1997). À la suite de la réaction du CG, les LB se différencient en LB mémoires ou en PC qui, suite à la commutation isotypique, n'expriment plus IgD, mais IgA, IgG, ou IgE, ou conserve l'expression d'IgM. Chez l'Homme, il existe quatre sous-classes d'IgG et 2 sous-classes d'IgA. La classe d'immunoglobulines (Ig) exprimées par les LB différenciés est majoritairement déterminée par les cytokines produites par les LTfh, les cytokines majoritairement identifiées étant l'IFN γ (Coffman et al., 1989) et l'IL-21 (Avery et al., 2008) pour les IgG, le TGF β pour les IgA (Cerutti, 2008), et l'IL-4 pour les IgE (Coffman et al., 1989).

b. Marqueurs de surface caractérisant les différents stades de maturation des LB

Les LB transitionnels quittant la moelle osseuse expriment IgM et IgD à leur surface, ainsi que les molécules CD19, CD20, CD24 et CD38, comme les LB naïfs qui perdent uniquement le marqueur CD38 à leur surface. Les LB du centre germinatif ré-expriment CD38, mais ont perdu l'expression de CD24 et IgD lors de la différenciation. Les LB mémoires expriment une seule classe d'Ig en surface et conservent CD19, CD20, et sont généralement définis par l'expression de CD27. Cependant, des LB mémoires n'exprimant pas CD27 ont été observés, notamment chez des patients atteints de cancer de l'ovaire (Wu et al., 2011). Les LB mémoires peuvent avoir une très longue durée de vie en attendant d'être réactivés par l'Ag dont ils sont spécifiques. Les PC eux sont définis par une plus faible expression de CD19 et une absence de CD20, tandis qu'ils expriment fortement CD27 et CD38. Tous les PC possèdent un contingent important d'Ig intracellulaires qu'ils peuvent sécréter spontanément, mais seuls les PC à IgA et à IgM conservent à leur surface un BCR fonctionnel (Blanc et al., 2016; Pinto et al., 2013). L'engagement du BCR sur ces PC active la voie de signalisation sous-jacente ainsi que l'internalisation du BCR. Cela suggère que les PC à IgA et IgM pourraient internaliser les Ags reconnus par leur BCR. Enfin, l'engagement du BCR induit également une meilleure survie des PC à IgA. Par ailleurs, le stade plasmocytaire est caractérisé par l'expression de deux facteurs de transcription, Blimp-1 qui participe à la différenciation en PC (Minnich et al., 2016) et est nécessaire à la sécrétion des Acs (Tellier et al., 2016) et IRF4 qui est également nécessaire à la différenciation des PC et impliqué dans la commutation de classe (Klein et al., 2006).

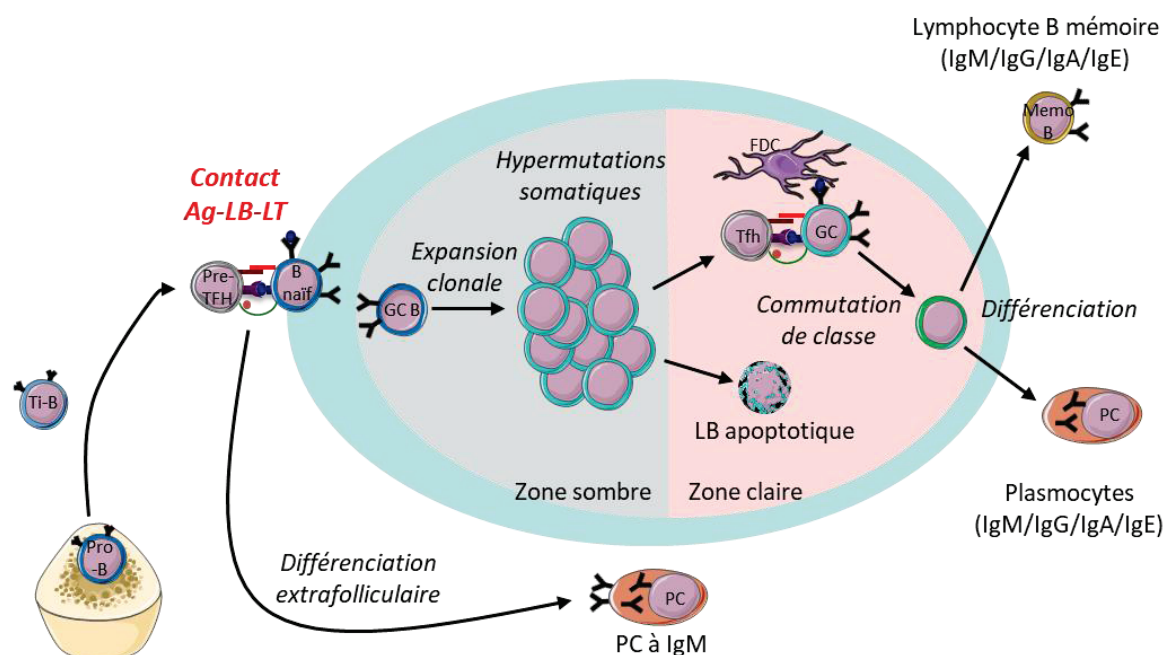


Figure 2 : Différenciation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires. Les LB générés dans la moelle osseuse rejoignent les organes lymphoïdes secondaires pour se différencier. Cette différenciation est déclenchée par la rencontre de l'Ag par les LB, et nécessite leur interaction avec des LT CD4⁺. Une partie des LB se différencie de manière extra-folliculaire pour donner naissance principalement à des PC à IgM assurant la production d'une première vague d'Ac. Les autres LB entre dans la réaction du centre germinatif, permettant leur expansion clonale, l'introduction de mutations somatiques et la commutation de classe induite par des cytokines et l'engagement de CD40, aboutissant à leur différenciation en LB mémoires et en PC exprimant/produisant différents types d'Ig.

2.2. Différentes populations de LB infiltrent les tumeurs solides

Les LB ont été détectés dans différents types de cancers solides principalement par des marquages immunohistochimiques et des analyses transcriptomiques. Des cellules exprimant CD20, un marqueur identifiant l'ensemble des LB à l'exception des PC, sont ainsi détectées dans la majorité des cancers solides, incluant les cancers pulmonaires (Germain et al., 2014), rénaux (Sjöberg et al., 2018), mammaires (Coronella et al., 2002), ovariens (Milne et al., 2009), pancréatiques (Castino et al., 2016), hépatiques (Shi et al., 2013), gastriques (Fristedt et al., 2016), colorectaux (Berntsson et al., 2016) et le mélanome (Ladányi et al., 2011). L'utilisation de signatures géniques appliquées aux données transcriptomiques du TCGA a également permis de mettre en évidence la présence de LB, mais aussi de PC, dans différentes tumeurs solides (Gentles et al., 2015). Les PC peuvent également être observés dans les tumeurs par des marquages IHC dirigés contre CD138 (Berntsson et al., 2016; Lundgren et al., 2016; Mohammed et al., 2013) ou par la détection des Ig qu'ils produisent (Bosisio et al., 2016). De rares analyses par cytométrie en flux décrivent plus précisément les sous-populations de LB dans les tumeurs. Germain et collaborateurs ont mis en évidence que les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) sont infiltrés par des LB à différents stades de différenciation : des LB naïfs, des LB du CG, des LB mémoires, et des PC (Germain et al., 2014). Les tumeurs colorectales sont

principalement infiltrées par des LB mémoires et des PC, avec un contingent de LB exprimant CD24 et CD38 correspondant à des LB transitionnels, mais peu de LB naïfs (Shimabukuro-Vornhagen et al., 2014). L'analyse du répertoire BCR par séquençage dans les tumeurs met en évidence qu'une expansion oligoclonale des LB a lieu dans le MET, notamment dans les cancers du sein médullaires, qui sont des tumeurs fortement infiltrées par des lymphocytes (Hansen et al., 2001), et chez les patientes atteintes de cancers du sein canaux invasifs ou de l'ovaire présentant des structures lymphoïdes dans le MET (Coronella et al., 2002; Nielsen et al., 2012), qui pourraient permettre une expansion locale des LB spécifiques d'antigènes tumoraux. Il a été également montré dans les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage que le répertoire BCR des LB infiltrant la tumeur présente un profil oligoclonal tandis que ce n'est pas le cas dans le tissu sain adjacent et dans le sang (Zhang et al., 2018b). Cette étude montre par ailleurs que le répertoire BCR est hétérogène au sein d'une même tumeur, comme pour les LT. Malgré la possibilité d'une réponse oligoclonale, qui peut être dirigée contre des antigènes tumoraux (Coronella et al., 2002; Hansen et al., 2001), la proportion de LB spécifiques d'antigènes tumoraux dans les tumeurs n'est pas élucidée à ce jour.

Les PC observés dans les tumeurs peuvent être sécréteurs de différentes classes d'Ig. Les PC infiltrant les mélanomes primaires sont constitués de PC à IgG et à IgA (Bosisio et al., 2016), et des PC à IgG4 infiltrant également ces tumeurs (Karagiannis et al., 2013). Les LB mémoires infiltrant les tumeurs d'ovaires (Nielsen et al., 2012) ainsi que les PC présents dans les tumeurs de sein (Wang et al., 2007) et d'ovaire (Kroeger et al., 2016), expriment ou sécrètent majoritairement des IgG. Une étude récente met en évidence le lien entre l'infiltration de tumeurs de sein humaines par des PC et la présence d'IgA et d'IgG dirigés contre des Ags tumoraux dans des surnageants de tumeurs en culture, suggérant que des IgA et IgG sont produits *in situ*, même si cela n'est pas formellement démontré (Garaud et al., 2018).

Les LB infiltrant les tumeurs solides sont donc majoritairement des LB mémoires et dans une moindre mesure des LB naïfs et des PC, mais d'autres stades de différenciation des LB peuvent également être détectés, comme dans les tumeurs du poumon et du côlon. Enfin, des marquages par IHC de coupes de tumeurs montrent que ces LB sont majoritairement situés en périphérie de la tumeur ou dans le stroma tumoral, mais peuvent parfois être au contact des cellules tumorales, et qu'ils peuvent être dispersés dans la tumeur et/ou regroupés en amas.

2.3. Arguments en faveur d'un rôle anti-tumoral des LB

a. Les lymphocytes B sont nécessaires à l'élimination des tumeurs murines et leur présence est souvent associée à un meilleur pronostic chez l'Homme

Une densité importante de LB identifiés par l'expression de CD20 est associée à un meilleur pronostic des patients dans la plupart des cancers solides (Berntsson et al., 2016; Castino et al., 2016; Coronella et al., 2002; Fristedt et al., 2016; Germain et al., 2014; Ladányi et al., 2011; Milne et al., 2009; Shi et al., 2013), à l'exception notable du cancer du rein (Sjöberg et al., 2018), comme discuté dans le paragraphe précédent. L'exploitation des études transcriptomiques montre que la présence d'une signature génique des LB est associée à une meilleure survie des patients dans les tumeurs de sein, d'ovaire (Iglesia et al., 2014; Schmidt et al., 2012), et du poumon (Gentles et al., 2015). La présence de la signature associée aux PC est également associée à une meilleure survie des patients, ainsi que la présence de cellules CD138⁺ (Berntsson et al., 2016; Lundgren et al., 2016; Mohammed et al., 2013) dans différents types de cancer solides.

Dans les modèles murins, la déplétion des LB après l'apparition d'une tumeur, grâce à l'injection d'un Ac anti-CD20 déplétant, conduit à une diminution de l'induction, de la prolifération, et de la sécrétion de cytokines par les LT CD8⁺ et ainsi à une moins bonne élimination des tumeurs (DiLillo et al., 2010), montrant que les LB sont indispensables à une réponse anti-tumorale efficace. Une observation similaire est faite dans un modèle de déplétion génétique des LB par un knock-out de BLNK, une protéine impliquée dans la signalisation du BCR indispensable au développement des LB (Kobayashi et al., 2014). Par ailleurs, le transfert adoptif de LB, isolés de ganglions drainant des tumeurs mammaires et activés *ex vivo* avec du LPS et des Acs anti-CD40, dans des souris portant des tumeurs similaires permet d'activer la sécrétion d'IFN γ par les LT infiltrant la tumeur et l'élimination de ces tumeurs (Li et al., 2011).

L'infiltration des tumeurs par des LB chez l'Homme est ainsi associée majoritairement à une meilleure survie des patients suggérant qu'ils contribuent à l'induction d'une réponse anti-tumorale efficace, hypothèse qui est supportée par des preuves chez la souris montrant que les LB sont indispensables à l'élimination des tumeurs et l'induction d'une réponse CD8.

b. Les structures lymphoïdes tertiaires modifient la réponse anti-tumorale localement

Une organisation fonctionnelle des cellules immunitaires similaire à celle des OLS est parfois observée dans des contextes inflammatoires, auto-immunitaires, ou tumoraux. Ces structures appelées structures lymphoïdes ectopiques ou tertiaires (Tertiary Lymphoid Structure, TLS) sont caractérisées par la présence d'une zone riche en LB ségrégée de zones riches en LT. Elles peuvent

également être constituées de DC matures et de vaisseaux sanguins particuliers appelés HEV (High Endothelial Venules), spécialisés dans l'extravasation et donc le recrutement des cellules immunitaires, ainsi que de cellules fibroblastiques réticulaires (FRC) et de cellules dendritiques folliculaires (FDC) formant des réseaux stromaux pouvant avoir différentes fonctions. Ces structures dans les tumeurs pourraient donc modifier et/ou amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale.

b.1) Mécanismes d'induction des structures lymphoïdes ectopiques

Lors du développement des OLS, des cellules hématopoïétiques appelées « Lymphoid Tissue Inducers » (LTi) expriment la lymphotoxine LT α 1 β 2 ou le ligand LIGHT qui interagissent avec leur récepteur, le LT β R, exprimé par des cellules stromales, les LTo (Lymphoid Tissue Organizer). Ces LTo produisent les chimiokines CXCL13, ligand de CXCR5 exprimé par les LB, et CCL19/ CCL21, ligands de CCR7 exprimé par les LT, dont le gradient permet la ségrégation des LB et des LT. En parallèle, le signal induit par l'engagement du LT β R est également nécessaire à la différenciation des vaisseaux en HEV, permettant le recrutement des lymphocytes. L'organisation ainsi établie est maintenue grâce au soutien de différentes cellules stromales comme les DC folliculaires (FDC) et les cellules fibroblastiques réticulaires (FRC).

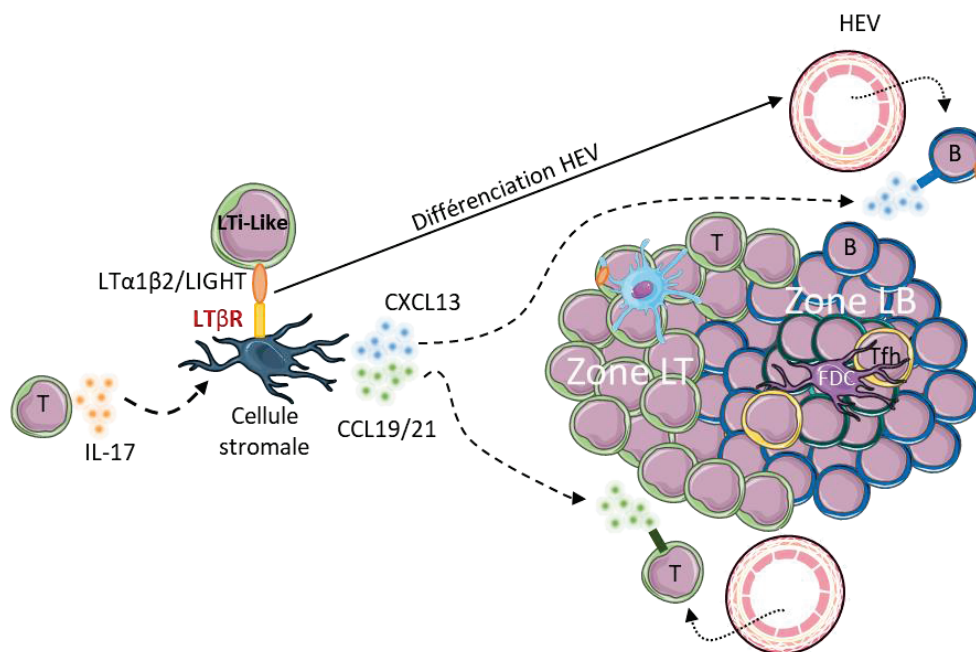


Figure 3 : Mécanismes d'induction des structures lymphoïdes tertiaires dans les tissus non-lymphoïdes. La formation de structures lymphoïdes ectopiques est déclenchée par une inflammation chronique, notamment dans les tumeurs. L'engagement du récepteur LT β R sur des cellules stromales par LT α 1 β 2 et ou LIGHT, en présence de signaux inflammatoires comme IL-17, conduit à la différenciation des vaisseaux en HEV et à la production des chimiokines CXCL13 et CCL19/21 qui vont permettre le recrutement des LB et des LT et leur organisation en zones distinctes. Lors de la mise en place de la structure fonctionnelle, d'autres cellules sont recrutées, telles que des DC et des FDC. Une fois ces structures mises en place, les LB et les DC présentes participent au maintien des TLS grâce à la production de lymphotoxine.

Les voies de signalisation impliquées dans la formation des TLS ont été étudiées majoritairement dans des modèles inflammatoires et sont similaires à celles décrites pour les OLS (Figure 3) avec un rôle central du LT β R, mais les cellules impliquées diffèrent. En effet, les LT_i ne semblent pas nécessaires à ce processus, car leur absence n'empêche pas la formation de TLS dans le poumon suite à une infection par influenza chez la souris (Rangel-Moreno et al., 2011). Au contraire, dans ce modèle, l'IL-17 produite par les LT CD4⁺ est nécessaire à l'induction de la production de CXCL13 et de CCL19 par les fibroblastes pulmonaires. Contrairement au développement des OLS, la présence de cytokines inflammatoires est nécessaire à la formation des TLS. Cependant, cette étude montre que comme pour les OLS, la sécrétion des chimiokines par des cellules stromales jouant le rôle de LT_o est nécessaire à la formation des TLS. Cela est également observé dans un modèle murin d'athérosclérose dans lequel les cellules musculaires lisses produisent les chimiokines CCL13 et CCL21 suite à un engagement du LT β R, qui permettent le recrutement de LB, de LT, et la formation de HEV (Gräbner et al., 2009). Comme pour les OLS, la LT α 1 β 2 est indispensable à la maturation et au maintien des TLS. Elle peut être exprimée par les LT et les LB (McDonald et al., 2005), ou par les DC (Martinet et al., 2013), ces dernières étant indispensables au maintien des TLS (GeurtsvanKessel et al., 2009; Ludewig et al., 1998).

b.2) Les structures lymphoïdes tertiaires permettent le recrutement et l'activation des lymphocytes T

Différentes stratégies sont utilisées pour identifier les TLS dans les tumeurs solides. La majorité des études se basent sur une simple coloration HPS (Hématexiline Phloxine Safran) pour identifier des amas de cellules lymphocytaires en prolifération correspondant à des CG. Des marquages IHC sont également utilisés pour révéler la présence de vaisseaux HEV, de DC matures exprimant DC-LAMP, ou de zones de LT et de LB ségréguées. Des signatures comprenant des gènes de chimiokines ont été également proposées pour identifier les tumeurs ayant des TLS (Chaisemartin et al., 2011; Coppola et al., 2011).

Des TLS ont été décrites dans différents types de cancers solides et sont souvent associées à un meilleur pronostic des patients, à l'exception du cancer du foie. Les TLS sont associées à une meilleure survie des patients et sont observées dans plus de 70% des tumeurs du poumon NSCLC (Dieu-Nosjean et al., 2008), plus de la moitié des tumeurs de sein quel que soit le sous-type (Lee et al., 2015; Liu et al., 2017; Martinet et al., 2011), plus de deux tiers des tumeurs du colon (Meshcheryakova et al., 2014), et un tiers des tumeurs de l'ovaire (Kroeger et al., 2016). Dans les modèles murins de tumeurs, le développement de TLS peut être induit grâce au ciblage de LT α 1 β 2 (Schrama et al., 2001) ou LIGHT sur les cellules tumorales ou les vaisseaux du MET (Johansson-Percival et al., 2017; Tang et al., 2016). L'induction de la formation de TLS dans des modèles de mélanome, de fibrosarcome, de cancer du

pancréas ou du côlon permet la régression des tumeurs, due à une augmentation des fonctions cytotoxiques et de sécrétion de cytokines des LT CD8⁺ et CD4⁺ démontrant une meilleure réponse anti-tumorale (figure 4). L'injection de LTα1β2 dans le mélanome (Schrama et al., 2001) induit une infiltration plus forte de LT CD4⁺ au sein de la tumeur et de LT CD8⁺ en périphérie de la tumeur et à proximité des TLS. Le nombre de clones de LT CD8⁺ est également augmenté, certains TCR sont observés à une fréquence plus importante, et ces LT CD8⁺ sont plus efficaces pour tuer les cellules tumorales *in vitro* montrant une plus forte cytotoxicité que chez les souris non traitées par LTα1β2. L'injection de LIGHT dans le fibrosarcome et les tumeurs du colon (Tang et al., 2016) augmente également la quantité de LT CD8⁺ infiltrant la tumeur et la sécrétion d'IFNγ par ces cellules. Chez l'Homme, la présence de TLS dans les tumeurs du poumon est associée à la présence de LTH1 et de LT CD8⁺, suggérant que les TLS permettent d'orienter les LT vers un phénotype anti-tumoral (Goc et al., 2014). L'augmentation de la quantité de LT CD8⁺ et de leurs fonctions grâce à la présence de TLS est également suggérée chez l'Homme dans les cancers de l'ovaire, où la plus forte densité de TLS dans les tumeurs est associée à une plus forte densité de LT CD8⁺ et une plus forte expression de gènes associés à la cytotoxicité de ces cellules tels *IFNG* et *GZMB*. L'induction de TLS dans les modèles murins permet également une meilleure réponse au blocage d'ICP inhibiteurs, illustrée par une régression plus fréquente des tumeurs suite à un traitement par anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4 lorsqu'il est accompagné d'une injection de LIGHT (Johansson-Percival et al., 2017; Tang et al., 2016).

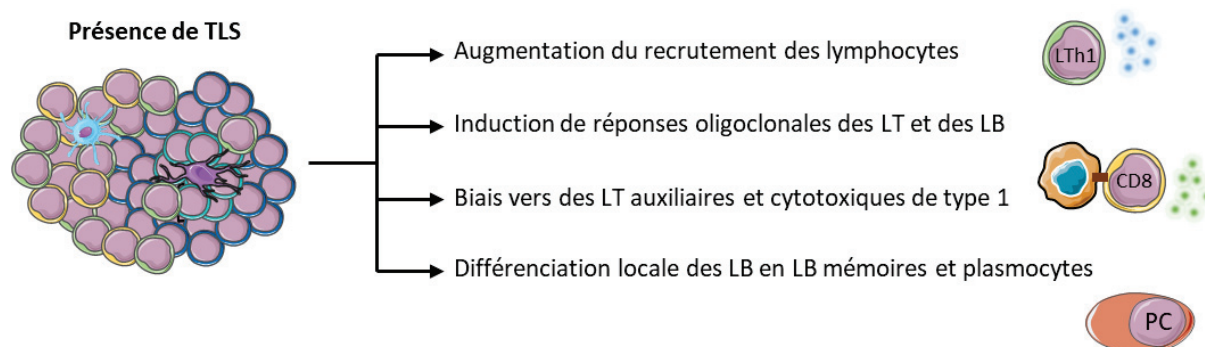


Figure 4 : Rôles probables des TLS dans les tumeurs.

b.3) Les structures lymphoïdes tertiaires comme siège du développement d'une réponse humorale spécifique de la tumeur

Comme les OLS, les TLS présentes dans les tumeurs sont caractérisées par la présence de follicules B contenant des LB naïfs et des LB du CG, ainsi que par la présence de PC en dehors des follicules (Germain et al., 2014). Les CG des TLS sont composés de LB prolifératifs exprimant l'enzyme AID, qui est nécessaire pour les hypermutations somatiques et la commutation de classe, ainsi que des FDC et des LTfh (Gu-Trantien et al., 2013), ce qui suggère une organisation fonctionnelle permettant la différenciation locale des LB. Cette hypothèse est confortée par l'observation de la majorité des

stades de différenciation de LB au sein des tumeurs de poumons (Germain et al., 2014). La présence de TLS est également associée à une plus forte densité de PC dans les tumeurs de l'ovaire, suggérant que ces structures pourraient favoriser la différenciation ou le recrutement de PC (Kroeger et al., 2016) (**figure 4**). De plus, la présence de LTfh est également associée à une meilleure survie des patients atteints de cancer du sein, soulignant le rôle essentiel des TLS et possiblement de la différenciation locale des LB dépendante des TLS dans l'immunité anti-tumorale.

L'observation d'une faible diversité de séquences des gènes variables des Ig exprimés par les LB infiltrant les tumeurs du sein, ainsi que des preuves d'activité de commutation de classe et d'hypermutation somatique, suggèrent que la réponse humorale induite dans les tumeurs contenant des TLS est oligoclonale et dirigée contre un nombre restreint d'Ags, possiblement des Ags tumoraux (Coronella et al., 2002; Nzula et al., 2003; Thorsson et al., 2018; Wang et al., 2007). Le séquençage du BCR des LB infiltrant les tumeurs du sein et de l'ovaire a également permis de corréler la présence de segments de BCR particuliers dans un sous-type de tumeurs du sein triple-négatives avec la survie des patientes, suggérant qu'une réponse des LB contre certains Ags est associée à une meilleure réponse anti-tumorale (Iglesia et al., 2014). Dans les tumeurs du poumon NSCLC, la moitié des tumeurs contiennent des PC ou des LB pouvant se différencier en PC sécrétant des Acs dirigés contre des Ags tumoraux, ce qui pourrait être favorisé par la différenciation locale des LB dans des TLS (Germain et al., 2014).

La présence de TLS dans les tumeurs permet donc le recrutement de cellules immunitaires, à la fois de LT et de LB. Cette structuration permet une activation des LT, orientant les LT CD4⁺ vers une polarisation LTH1 et augmentant la sécrétion d'IFN γ par les LT CD8⁺ et leurs fonctions cytotoxiques, ainsi qu'une potentielle différenciation locale des LB.

2.4. Arguments pour un rôle pro-tumoral des lymphocytes B

La présence de LB dans les tumeurs est majoritairement associée à un meilleur pronostic des patients, mais une exception est observée dans le cancer du rein. En effet, une forte densité de LB CD20⁺ identifiés par IHC est associée à une moins bonne survie des patients atteints d'un carcinome rénal (Iglesia et al., 2014; Sjöberg et al., 2018). Nous avons vu également que l'analyse du transcriptome pan-cancer chez l'Homme met en évidence que l'association d'une signature des LB n'est pas systématiquement associée à une meilleure survie des patients (Gentles et al., 2015). Par ailleurs, si la présence de PC dans la tumeur est majoritairement associée à un meilleur pronostic des patients, une forte densité de PC dans le mélanome est associée à une mauvaise survie (Bosisio et al., 2016), et une proportion élevée d'IgG4 dans le sérum de patients atteints de mélanome est également associée à une moins bonne survie des patients (Karagiannis et al., 2015).

Chez la souris, une déficience génétique en LB conduit généralement à une croissance tumorale moins importante dans différents modèles de tumeurs transplantées. Les LB peuvent en effet jouer un rôle pro-tumoral en augmentant le recrutement des LTreg dans des modèles de cancer du sein (Olkhanud et al., 2011; Zhang et al., 2013), et en inhibant les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ et la production de cytokines par les LTH1 (Inoue et al., 2006; Qin et al., 1998; Shah et al., 2005), de manière dépendante ou indépendante de la sécrétion d'IL-10. Les LB peuvent également favoriser le recrutement, par l'intermédiaire de dépôts d'Acs, de mastocytes et de granulocytes induisant une inflammation chronique de l'épithélium (de Visser et al., 2005). Les complexes immuns observés dans ce modèle conduisent également à une activation des DC par l'engagement des FcγR, induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires jouant un rôle pro-tumoral (Andreu et al., 2010). Dans les modèles de cancer du sein utilisant une déplétion des LB grâce à des Acs anti-CD20, il a été montré qu'un tel traitement conduit à la conservation d'une population de LB exprimant faiblement CD20 aux propriétés régulatrices et à une plus importante croissance tumorale, suggérant des rôles potentiellement contraires des différentes populations de LB (Bodogai et al., 2013). Cela souligne l'importance de distinguer les différentes populations de LB pour l'étude de leurs rôles pro- versus anti-tumoraux. De cette manière, les LB et PC à IgA sont associés à une réduction de la sécrétion d'IFNγ par les LT CD8⁺ et de leur fonction cytotoxique dans des modèles murins de cancer du foie et de la prostate (Shalapour et al., 2015, 2017).

La possibilité d'un rôle pro-tumoral des LB est également reflétée par un rôle pro-tumoral des TLS. Dans les cancers du foie chez l'Homme, les TLS sont observées dans 18% des échantillons et leur présence est associée à un mauvais pronostic des patients (Finkin et al., 2015). Dans ce type de tumeurs, la formation de TLS est induite par une suractivation du facteur de transcription NF-κB. L'utilisation d'un modèle murin dans lequel le gène IKKβ est suractivé dans les cellules hépatiques montre que ces souris développent des hépatocarcinomes avec une pénétrance totale, et que, dans ce modèle présentant une proportion particulièrement élevée de TLS, les premiers progéniteurs tumoraux se développent dans les TLS. Ces structures servent donc de niches aux cellules souches tumorales. De plus, une forte densité de TLS dans les carcinomes mammaires *in situ* (CCIS), tumeurs présentant fréquemment des TLS, est associée à la présence de micro-invasions, suggérant que les CCIS ayant des TLS ont un risque plus élevé de se transformer en carcinomes invasifs (Kim et al., 2016). Cette observation est renforcée par le fait que la présence de LB est associée à un mauvais pronostic dans ces tumeurs (Miligy et al., 2017).

Les LB peuvent donc jouer des rôles anti-tumoraux en activant les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ et sont souvent associés à une meilleure réponse anti-tumorale chez les patients atteints de cancer, mais ils sont également capables d'inhiber les réponses cytotoxiques anti-tumorales et de

favoriser le recrutement de LTreg jouant un rôle pro-tumoral. Il est donc nécessaire d'étudier plus en détail cette population dans les tumeurs afin d'élucider ce qui explique ses différentes fonctions dans l'immunité anti-tumorale.

3. Les syndromes neurologiques paranéoplasiques : un modèle d'étude des réponses humorales anti-tumorales

3.1. Des pathologies auto-immunes associées à une forte réponse humorale

Les syndromes paranéoplasiques sont des pathologies auto-immunes rares, en majorité neurologiques, qui surviennent chez une fraction infime des patients atteints d'un cancer et sont caractérisées par la production d'Acs dirigés contre des Ags exprimés à la fois dans la tumeur et dans le cerveau, appelés Ags onco-neuronaux (Bell and Seetharam, 1977; Bell et al., 1976). Ces Acs sont présents dans le sérum et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Rosenblum, 1993; Venkatraman and Opal, 2016) de tous les patients atteints de syndromes neurologiques paranéoplasiques (SNP), et sont utilisés pour le diagnostic (Honnorat, 2006). La spécificité antigénique des Acs varie en fonction de la pathologie auto-immune et du type de cancer associé. Des Acs anti-Hu sont ainsi associés à des encéphalites et à des tumeurs pulmonaires, tandis que les anti-Yo sont souvent détectés dans les dégénérescences cérébelleuses paranéoplasiques (DCP) en présence de tumeurs de sein ou d'ovaire. Les Ags ciblés dans cette DCP à Yo (Yo-DCP) sont CDR2 (Cerebellar Degeneration Related Protein 2) et son paralogue CDR2 like (CDR2L), des protéines dont l'expression est normalement restreinte au cervelet.

Les cellules responsables de la pathologie auto-immune ne sont pas clairement identifiées. Le LCR des patients atteints de Yo-DCP contient à la fois des PC et des LT CD8⁺ cytotoxiques (Carpenter et al., 2008; Melzer et al., 2012), indiquant un rôle potentiel de l'immunité cellulaire et humorale. Les Acs des patients Yo reconnaissent les protéines CDR2 et CDR2L murines, mais leur injection chez la souris ne conduit pas au développement de la pathologie, et il est donc considéré que les Acs ne sont pas pathogéniques (Tanaka et al., 1995). Cependant, cela n'exclut pas que les Acs puissent jouer un rôle important dans le maintien de la maladie, même s'ils ne sont pas suffisants à son établissement. Bien que l'implication des différents composants du système immunitaire dans la pathologie auto-immune ne soit pas entièrement comprise, le consensus qui prévaut pour l'initiation de ces syndromes est qu'une rupture de tolérance contre l'Ag onco-neuronal se produit dans la tumeur où il est anormalement exprimé, provoquant une réponse immunitaire contre la tumeur et conduisant au SNP (figure 5).

Deux antigènes onco-neuronaux normalement exprimés par les cellules de Purkinje

- CDR2 (Cerebellar Degeneration Related Protein 2)
- Son paralogue CDR2L (Darnell, Genes & Dev. 1999)

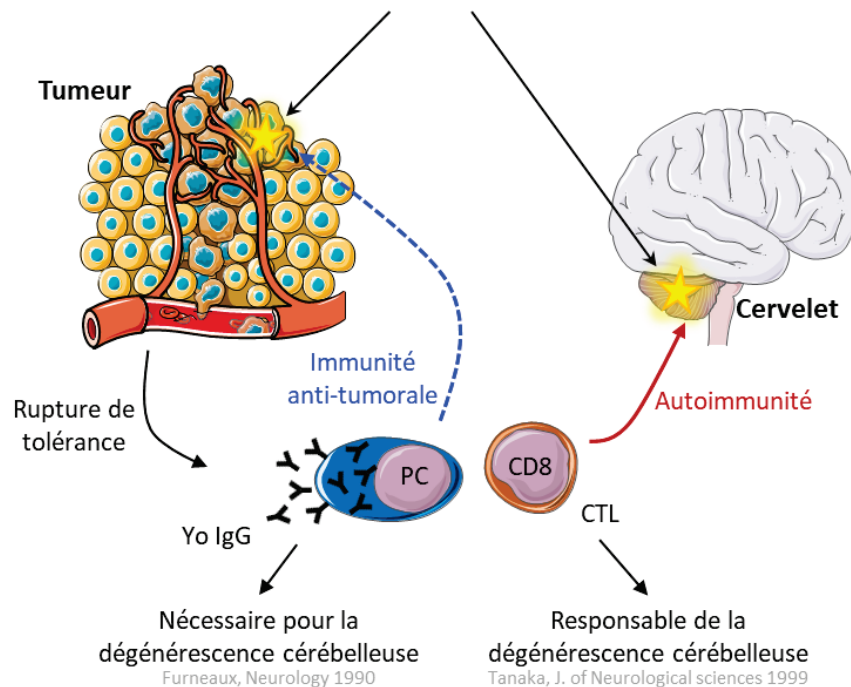


Figure 5 : Hypothèse qu'une rupture de tolérance immunitaire dans la tumeur est à l'origine des syndromes neurologiques paranéoplasiques (Exemple de la Yo-DCP).

3.2. Des tumeurs mieux contrôlées par le système immunitaire ?

Les carcinomes pulmonaires à petites cellules (SCLC) associés à des Acs Hu sont souvent des tumeurs restreintes au thorax et peu invasives (Dalmau et al., 1992). De plus, des rejets spontanés de tumeurs ont été rapportés pour trois patients atteints d'un syndrome Hu, alors que cela est extrêmement rare chez des patients atteints de cancers pulmonaires non associés à des SNP (Darnell and DeAngelis, 1993). Un rôle de la réponse humorale dans le contrôle de la tumeur est suggéré par le fait que des patients sans SNP, mais avec un SCLC, présentent des taux faibles d'Acs Hu, et que la présence de ces Acs est associée à un meilleur pronostic et à des tumeurs moins agressives (Graus et al., 1997). Ces différents éléments mettent en évidence une réponse anti-tumorale plus efficace dans les tumeurs du poumon associées à un SNP par rapport aux autres tumeurs du poumon. Certaines tumeurs de l'ovaire associées à une Yo-DCP sont également découvertes à des stades précoces, lorsque la tumeur est encore asymptomatique, grâce à une recherche de la tumeur déclenchée par l'apparition de la pathologie auto-immune. Néanmoins, une forte proportion de tumeurs gynécologiques associées à des Acs Yo sont agressives et métastatiques (Rojas et al., 2000).

Une autre preuve de la surveillance particulière de ces tumeurs est leur forte infiltration par des cellules immunitaires. Les patients présentent des Acs spécifiques de l'Ag onco-neuronal dans le

sérum et le LCR comme vu précédemment, ainsi que des LT et des PC dans les mêmes fluides (Albert et al., 2000; de Jongste et al., 2013; Melzer et al., 2012). Mais une réponse immunitaire s'observe également *in situ*, dans le tissu tumoral. En effet, les quelques tumeurs associées à des SNP étudiées sont fortement infiltrées par des LT et des PC (Storstein et al., 2009; Verschuuren et al., 1996). Il a également été décrit que les LT infiltrant des tumeurs du poumon à petites cellules présentaient un profil oligoclonal, avec des similarités de famille de TCR V β avec les LT du système nerveux (Voltz et al., 1998), suggérant une réponse immunitaire dirigée contre les mêmes Ags. Par ailleurs, des LT cytotoxiques spécifiques de l'Ag CDR2 ont été détectés dans le sang de patients atteints d'une Yo-DCP, et sont capables de lyser des cellules présentant le peptide CDR2 sur le CMH-I *ex vivo*, et donc vraisemblablement les cellules tumorales (Albert et al., 1998). Les modèles murins pour étudier plus en profondeur les mécanismes de réponse immunitaire dans les tumeurs associées aux SNP sont rares, mais un modèle, établi grâce à l'expression de l'hémagglutinine du virus de la grippe dans les neurones, montre que des LT CD4⁺ et CD8⁺ sont indispensables au contrôle de la tumeur et à l'établissement de la pathologie neurologique (Gebauer et al., 2016).

Les réponses immunitaires anti-tumorales cellulaires et humorales dirigées contre les Ags du soi sont dues à une rupture de tolérance contre ces Ags. Dans les SNP, il est généralement considéré que la rupture de tolérance est due à une expression anormale de l'antigène onco-neuronal dans la tumeur, conduisant à une réponse immunitaire dans la tumeur puis dans le cerveau (figure 5). Les SNP offrent un contexte dans lequel la réponse anti-tumorale est présumée efficace, ce qui offre l'opportunité d'étudier la texture immunitaire des tumeurs associées ainsi que les Ags onco-neuronaux afin d'expliquer quel infiltrat et quelles modifications des Ags permettent une réponse anti-tumorale efficace. Ce contexte permet également d'étudier les cellules immunitaires intra-tumorales spécifiques des Ags onco-neuronaux.

De nombreuses études, conduites à la fois chez l'Homme et dans des modèles murins, ont permis de mieux comprendre les fonctions des cellules immunitaires dans les tumeurs, avec l'identification et la caractérisation d'entités pro- et anti-tumorales au sein des LT, des macrophages, et des DC. Il est également clair aujourd'hui que les LB et la réponse humorale sont des acteurs à ne pas négliger dans le cancer, mais les bases cellulaires et moléculaires de leur fonction pro- *versus* anti-tumorale restent largement méconnues, comparativement aux autres cellules immunitaires. Nous exposerons dans les deux prochains chapitres les possibles mécanismes pro- et anti-tumoraux dépendant des LB et impliquant leurs trois fonctions principales : la production d'Acs, la présentation d'Ags, et la sécrétion de cytokines (figure 6).

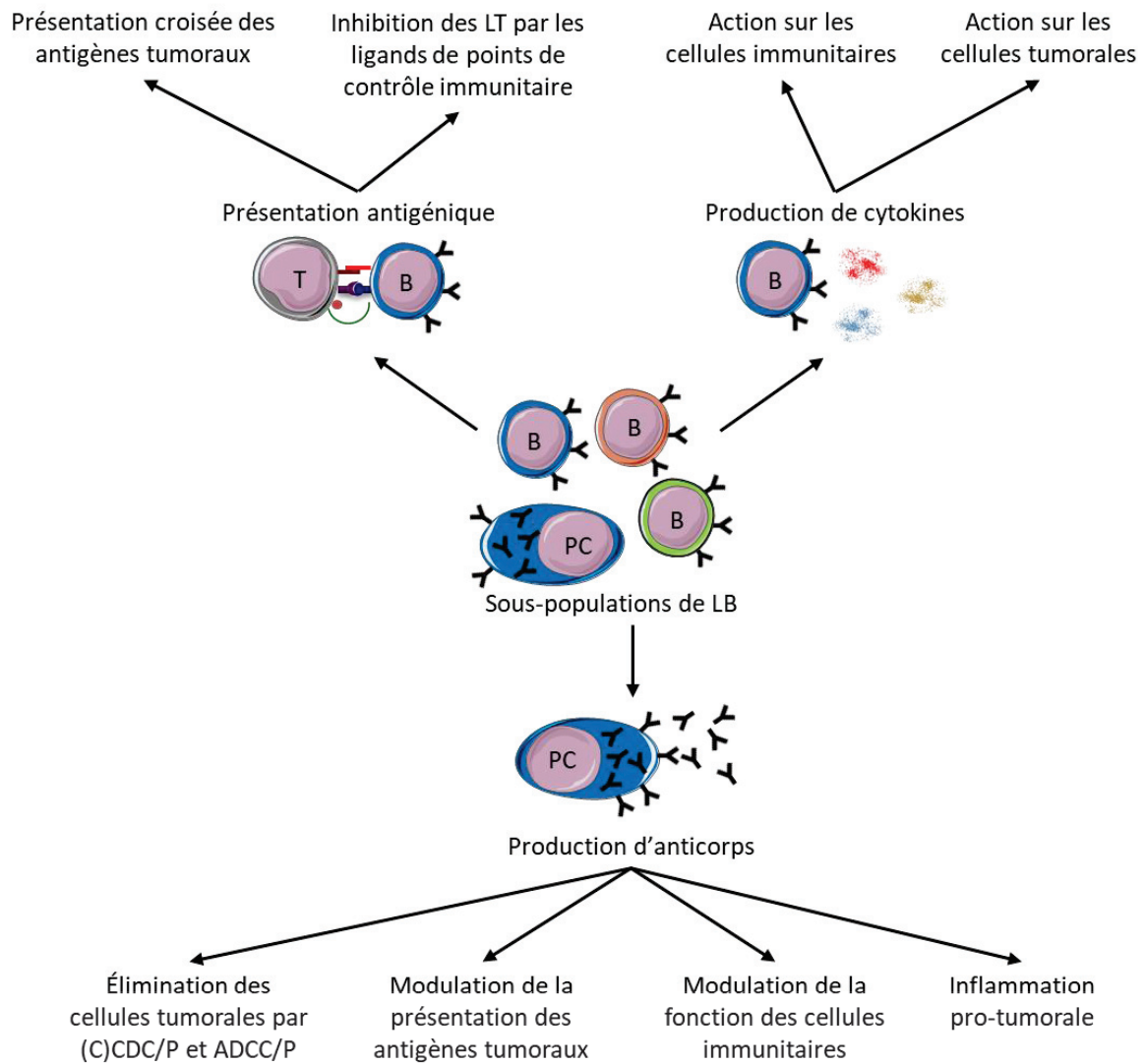


Figure 6 : Le rôle des lymphocytes B dans les cancers pourrait dépendre de l'identité des sous-populations infiltrant les tumeurs et impliquer leurs trois fonctions principales. La présentation antigénique par les LB peut permettre d'activer les LT CD8+ cytotoxiques, mais également les inhiber lorsqu'ils expriment des molécules de surfaces immunosuppressives. Les cytokines produites par les LB peuvent agir directement sur les cellules tumorales en permettant leur élimination ou leur prolifération, mais également sur les autres populations immunitaires. Enfin, la production d'Acs par les PC peut avoir de nombreux effets à la fois sur les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

Chapitre 2 : Impact des anticorps sur la croissance tumorale

1. Le développement du cancer est souvent associé à l'induction d'une réponse anticorps

1.1. Des immunoglobulines spécifiques d'antigènes tumoraux comme reflet de l'immunogénicité des tumeurs

Bien que l'intérêt porté aux LB dans la tumeur soit plus récent que pour les autres populations immunitaires, les Acs sont étudiés dans le sérum des patients depuis plusieurs décennies. Ils ont principalement été considérés comme de possibles biomarqueurs tumoraux accessibles de manière non-invasive, mais également comme une preuve de leur immunogénicité (Baseler et al., 1987). Les premières observations ont révélé une concentration plus importante d'Ig sériques chez les patients dans plusieurs types de cancers solides par rapport à des donneurs sains (Baseler et al., 1987; Guy et al., 1981). Par la suite, l'analyse de la spécificité de ces Acs dans le sérum des patients a permis de démontrer leur réactivité contre certains Ags tumoraux et de leur attribuer une valeur pronostique.

a. Méthodes d'identification des cibles des anticorps présents chez les patients atteints de cancers

Plusieurs techniques ont été utilisées pour identifier les cibles antigéniques des Acs présents chez les patients atteints de cancer. Les méthodes SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) (Sahin et al., 1995) et de phage display (Fosså et al., 2004) permettent d'identifier les protéines exprimées par les cellules tumorales et ciblées par les Acs présents dans le sérum. Pour cela, les ARN extraits du tissu tumoral subissent une étape de transcription inverse puis les protéines correspondantes sont exprimées soit dans *E. coli* (SEREX) soit à la surface de phages (Phage display) puis mises en présence du sérum des patients. Le séquençage de l'ADN des clones positifs permet ensuite d'identifier la protéine ciblée par l'Ac. Ces méthodes permettent de mesurer la présence d'Acs contre une grande quantité de protéines exprimées dans les cellules tumorales, mais ont tendance à favoriser les protéines fortement exprimées, et sans modification post-traductionnelle pour le phage display. De plus, certaines protéines ne peuvent être exprimées à la surface des phages.

D'autres méthodes utilisent les protéines extraites du tissu tumoral, sans passer par un système d'expression extérieur. La méthode SERPA (Serological proteome analysis) utilise l'extrait protéique en le faisant migrer en deux dimensions sur un gel de polyacrylamide, ensuite incubé avec le sérum des patients (Klade et al., 2001). Les protéines reconnues sont ensuite identifiées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Cette technique a cependant été peu efficace pour identifier des protéines reconnues uniquement chez les patients atteints de cancers et

pas chez les donneurs sains. Les protéines isolées de la tumeur peuvent également être purifiées pour réaliser différents ELISA avec le sérum des patients, éliminant la nécessité d'une méthode d'identification des protéines, mais la purification des protéines est une étape lourde à réaliser. Les cibles des Acs présents dans le sérum des patients peuvent également être identifiées en isolant directement les Acs, grâce à la méthode MAPPING (Multiple Affinity Protein Profiling) (Hardouin et al., 2007). Les protéines présentes dans les complexes immuns sont séparées des Acs par des étapes de chromatographie, puis sont identifiées par HPLC ou par spectroscopie de masse. Ces deux dernières méthodes ont l'avantage de prendre en compte les modifications post-traductionnelles et la conformation des protéines contrairement aux techniques précédentes.

Désormais, la plupart des études visant à identifier les cibles antigéniques des Acs présents chez les patients utilise des protéines recombinantes pour la réalisation d'ELISA (souvent limités aux Ag tumoraux déjà décrits) ou d'analyse par microarrays permettant de couvrir tout ou partie du protéome (Gnjatic et al., 2010).

b. Diversité des réponses anticorps entre les patients et les types de cancers

De nombreuses spécificités antigéniques ont été identifiées grâce à ces techniques, mais concernent principalement les IgG présents dans le sérum des patients. Une des premières informations importantes provenant de ces différentes données est que de nombreuses spécificités antigéniques observées dans le sérum des patients ne sont pas retrouvées chez des donneurs sains, et sont donc liées à la présence de la tumeur. Par ailleurs, une grande diversité existe, à la fois entre patients et d'un type de cancer à un autre, comme le montrent les études pionnières ainsi qu'une étude comparative de la présence d'Acs dirigés contre 22 Ags chez des patients atteints d'un cancer du pancréas ou de l'ovaire (Gnjatic et al., 2010). Le nombre d'Ags reconnus chez les patients atteints de cancers d'ovaire est nettement supérieur au pancréas, reflétant une différence d'immunogénicité entre ces deux cancers, et les Ags ciblés sont différents entre cancers et entre patients.

Les Acs spécifiques d'Ags tumoraux ont d'abord été considérés comme de possibles biomarqueurs permettant de prédire la présence d'une tumeur de manière précoce et par un test non-invasif (simple prise de sang). Cependant, l'utilisation de différents panels d'Acs n'a pas permis de distinguer de manière sensible et spécifique les personnes atteintes de cancer de donneurs sains (Fernández-Madrid and Maroun, 2014; Fortner et al., 2017). Néanmoins, la présence de certains Acs est associée à une valeur pronostique chez les patients atteints de cancer. Ainsi, dans les cancers du sein et de l'ovaire, une concentration sérique élevée en IgG dirigées contre MUC1 est associée à une meilleure survie des patients (Blixt et al., 2011; Richards et al., 1998). Au contraire, dans le cancer du sein, les IgG dirigées contre p53 sont associées à un mauvais pronostic (Kulić et al., 2010; Lenner et al., 1999). D'autres classes d'Ig peuvent être également détectées chez les patients. Des IgA et des IgG

anti-calréticuline sont observées dans plusieurs cancers solides, et il semble dans le carcinome mammaire que les IgA soit plus souvent associées à des stades métastatiques que les IgG (Erić-Nikolić et al., 2012; Pekáriková et al., 2010). Par ailleurs, une forte concentration d'IgG4 dans le sérum de patients atteints de mélanome est associée à une progression tumorale plus fréquente et à un mauvais pronostic (Karagiannis et al., 2015).

La réponse anticorps déclenchée par les Ags tumoraux est donc très hétérogène entre les patients, mais des cibles communes sont détectées chez de nombreux patients atteints de différents cancers.

c. Les différentes catégories d'antigènes ciblés par les anticorps sériques des patients

Différentes catégories d'Ags tumoraux ciblés par la réponse anticorps ont été identifiées. La majorité est composée de protéines du soi (Reuschenbach et al., 2009), exprimées de manière ectopique dans la tumeur ou surexprimées par rapport au tissu sain, ou mutées. Des Acs dirigés contre des Ags dérivés de protéines virales ou de séquences rétrovirales endogènes ont également été décrits.

c.1) Les antigènes exprimés de manière ectopique

Les premiers Ags ciblés par la réponse anticorps identifiés furent en grande partie découverts par la méthode SEREX et correspondent aux « Cancer Testis Antigens » (CTA) (Dong et al., 2003; Macdonald et al., 2017; Tan et al., 2009). Ces protéines sont normalement exclusivement exprimées dans les cellules germinales masculines et/ou au sein de tissus dits privilégiés immunologiquement. Ces Ags incluent entre autres des protéines de la famille MAGE et NY-ESO-1. Ces protéines sont exprimées dans la tumeur et peuvent jouer un rôle pro-tumoral en promouvant les capacités invasives des cellules tumorales et les métastases (Ghafouri-Fard et al., 2015). Les Ags exprimés de manière ectopique sont également décrits dans les patients atteints de cancers associés à un SNP, dans lesquels une forte réponse anticorps dirigée contre des protéines neuronales exprimées de manière aberrante par les cellules tumorales est détectée.

c.2) Les antigènes de différenciation surexprimés dans les cellules tumorales

Les Acs présents dans le sang des patients atteints de cancers peuvent également être dirigés contre des Ags dits de différenciation. Ceux-ci ont normalement une expression limitée au tissu dans lequel se développe la tumeur, mais se trouvent parfois surexprimés dans le tissu malin. Par exemple, la protéine HER2, exprimée en faible quantité dans les cellules mammaires normales, où elle régule la croissance cellulaire, peut se retrouver fortement surexprimée dans les cellules mammaires tumorales de certains patients. Il a été montré que la surexpression de cet Ag est associée à la production d'Acs

spécifiques (Goodell et al., 2008). Deux autres prototypes de ce type d'Ags sont MUC1 et PSA, normalement exprimés respectivement au pôle apical des cellules épithéliales sécrétoires ou dans les cellules normales de la prostate. Ces protéines sont surexprimées dans les cancers du sein et de l'ovaire (Agrawal et al., 1998) et de la prostate (Lokant and Naz, 2015) respectivement, et des IgG dirigées contre elles sont détectées dans le sérum de nombreux patients (Cramer et al., 2005; Fremd et al., 2016). De plus, des modifications post-traductionnelles peuvent également augmenter l'immunogénicité des Ags. MUC1 par exemple, est glycosylé différemment dans la plupart des tissus tumoraux comparés au tissu sain (Nath and Mukherjee, 2014).

c.3) Les néo-antigènes

Une source importante d'Ags tumoraux pour les LT provient des mutations somatiques survenant dans les cellules tumorales et créant des séquences protéiques mutées appelées néo-épitopes capables d'être présentées sur les molécules de CMH-I et de CMH-II avec une forte affinité, supérieure aux peptides non mutés. Il existe actuellement peu de données sur l'existence d'Acs contre ces Ags. Des descriptions d'Acs dirigés contre des versions mutées de P53 ont néanmoins été détectées chez les patients atteints de différents cancers, dont le cancer du sein. De nombreuses mutations de P53 sont connues, mais seules certaines sont associées à la présence d'Acs spécifiques (Winter et al., 1992).

c.4) Les antigènes viraux et dérivés de séquences rétrovirales endogènes

Des Acs dirigés contre des protéines de virus impliqués dans l'oncogenèse et de rétrovirus endogènes (HERV) du génome peuvent également être détectés chez certains patients. Une infection par le papillomavirus humain peut être à l'origine de cancers du col de l'utérus ou oropharyngiens, et les Ags viraux peuvent être exprimés par les cellules tumorales (Keskin et al., 2011; Syrjänen et al., 1987). Des Acs contre ces Ags, déjà présents au moment de l'infection, sont détectés chez les patients (Zhang et al., 2017). Les HERV sont des séquences qui ne sont pas exprimées dans les cellules normales, mais des modifications épigénétiques permettent leur expression dans les cellules tumorales et des Acs dirigés contre ces protéines sont observés dans le sérum de patients atteints de cancer de sein (Wang-Johanning et al., 2008) et d'ovaire (Wang-Johanning et al., 2007), mais pas dans le sérum de donneurs sains.

Ces différents types d'Ags peuvent induire des réponses Acs chez les patients et dans les modèles murins. Chez la souris, l'injection d'Ags ou leur expression par les cellules tumorales entraîne en effet la production d'Acs contre ces Ags (Brown et al., 2001). Les protéines ciblées par la réponse humorale sont en grande partie les mêmes que celles conduisant à l'induction des réponses T CD8⁺

cytotoxiques dirigées contre les cellules tumorales. Ainsi, plus de deux tiers des cibles antigéniques des Acs décrits à ce jour sont des protéines intracellulaires, cytoplasmiques ou intra-nucléaires (Reuschenbach et al., 2009). Les protéines intracellulaires peuvent être reconnues par les Acs lors de la mort des cellules, et les complexes immuns alors formés peuvent être reconnus par des cellules exprimant des récepteurs spécifiques des fragments Fc, et ainsi permettre la présentation des Ags. Cependant, si l'Ag n'est pas exprimé à la surface de la cellule, il ne peut pas être fixé par des Acs qui recruteraient d'autres cellules immunitaires pour tuer la cellule cible. Ainsi, on peut penser que les Ags tumoraux intracellulaires ne peuvent pas activer les voies telle que la cytotoxicité cellulaire dépendante des Acs ou du complément induisant la mort des cellules. Néanmoins, plusieurs démonstrations existent de la translocation d'Ags intracellulaires à la surface des cellules dans certaines conditions. Ainsi, des Ags nucléaires induisant des réponse Acs chez les patients atteints de lupus peuvent être relocalisés à la surface des cellules suite à différents signaux de stress en culture (Bachmann et al., 1991; Lawley et al., 2000), mais également suite à une infection par l'herpèsvirus de type 1 (Bbachmann et al., 1992). L'externalisation d'Ags à la membrane est également observée sur les cellules tumorales, c'est le cas de l'actine et de la calréticuline dans les cellules tumorales apoptotiques (Hansen et al., 2002; Pekáriková et al., 2010), ou encore la kératine 8 dans le cancer colorectal (Albaret et al., 2018), induisant une production d'Acs.

1.2. Des anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux sont produits dans l'environnement tumoral

La présence de PC dans les tumeurs suggère que des Acs sont également produits localement. Deux études se sont intéressées à la spécificité des Acs présents dans le MET. Dans le cancer du poumon, les LB de 34 patients triés par cytométrie en flux sur la base du marqueur CD19 ont été remis en culture et leur surnageant collecté tous les trois jours jusqu'au vingtième jour (Germain et al., 2014). Ces surnageants ont ensuite été testés par ELISA contre un panel de trente-trois Ags tumoraux connus, incluant entre autres plusieurs Ag MAGE, TP53 et des Ag de HERV. Des IgG ont été détectées pour 21 des 33 Ags dans au moins une tumeur, et 41% des tumeurs possédaient des Acs dirigés contre au moins un Ag. Jusqu'à sept Ags différents ont été détectés pour une même tumeur, les plus fréquents étant les CTA de la famille MAGE ainsi que NY-ESO-1 et TP53. Lorsqu'une réponse IgA a été observée, elle était dirigée contre les mêmes Ags que la réponse IgG, et cette réponse est corrélée à l'expression de l'Ag concerné dans la tumeur. Cependant, les Acs présents dans la tumeur ne se retrouvent pas systématiquement dans le sérum des patients, suggérant que certaines cellules productrices d'Acs ne sont présentes que dans la tumeur et se sont potentiellement différenciées localement. Enfin, la fréquence de tumeurs présentant au moins une spécificité antigénique parmi les 33 est augmentée parmi les tumeurs présentant des TLS. Cela suggère que ces structures peuvent potentiellement

favoriser l'expansion d'une réponse spécifique. Plus récemment dans les carcinomes invasifs mammaires, la spécificité d'Acs présents dans des surnageants issus de la dilacération mécanique de tumeurs a été testée à l'aide d'une puce contenant 91 protéines incluant des CTA et les principales protéines connues pour être surexprimées et induire des réponses anticorps dans les cancers, dont MUC1 (Garaud et al., 2018). 85% des 66 tumeurs testées présentent des réactivités contre au moins un des Acs étudiés. La plupart de ces réactivités sont également retrouvées dans le tissu mammaire sain à distance, même si les quantités d'Acs sont plus faibles. Comme dans l'étude concernant les cancers pulmonaires, les réactivités des Ig intra-tumorales sont généralement distinctes des réactivités dans le plasma des patientes. Les IgA et les IgG ciblent généralement les mêmes protéines, mais il semble ici que la quantité d'IgA spécifiques d'Ags tumoraux soit augmentée en présence de TLS, alors que ce n'est pas le cas pour les IgG. Cela suggérerait que la présence de TLS favorise la commutation vers IgA.

Les Acs produits ou présents dans la tumeur semblent donc être au moins en partie dirigés contre des Acs tumoraux. Néanmoins, le panel d'Ags utilisé étant souvent très limité, il est vraisemblable que le nombre de patients produisant des Acs dirigés contre des Acs tumoraux soit très largement sous-estimé. La présence de TLS semble permettre une plus forte réponse Acs. Les différentes études d'association entre l'existence d'Acs dirigés contre des Acs tumoraux suggèrent un rôle important de la réponse humorale endogène. Néanmoins, son impact sur la biologie des cellules tumorales et l'évolution clinique des patients, y compris sous immunothérapie, reste en grande partie à élucider.

1.3. Fonctions de la réponse anticorps endogène

Un certain nombre d'arguments suggère que les Acs produits chez les patients pourraient induire la mort des cellules tumorales. Il a été montré que le sérum de 65% des patients atteints de tumeurs astrocytaires malignes était capable d'entraîner la mort de lignées tumorales astrocytaires *in vitro* (Wood et al., 1979). Plus récemment, un Ac ayant une forte réactivité contre plusieurs lignées de mélanome, mais pas contre des mélanocytes sains, a été isolé à partir d'une culture de LB provenant du sang de patients atteints de mélanome. Cet Ac est capable d'induire la mort d'une lignée de mélanome *in vitro*, et ceci en l'absence de cellules immunitaires accessoires (Gilbert et al., 2011). L'étude du répertoire des plasmablastes de patients atteints de mélanome, d'adénocarcinome pulmonaire, et de carcinome du rein, au stade métastatique mais non-progressif, a permis de montrer l'existence de réponses anticorps persistantes et dirigées contre des Acs publics, c'est-à-dire des épitopes partagés par plusieurs patients voire plusieurs cancers (DeFalco et al., 2018). Des Acs monoclonaux isolés de ces plasmablastes sont ainsi capables de se fixer sur des tumeurs provenant de

patients différents, ainsi que sur différentes lignées tumorales y compris provenant de souris, mais faiblement sur du tissu non-tumoral. Enfin, l'injection d'un tel Ac chez la souris peut induire la régression d'une tumeur hétérologue syngénique et augmenter l'efficacité d'un traitement par anti-PD-L1. Une partie des Acs produits chez les patients et dirigés contre les Ags tumoraux est donc capable de tuer les cellules tumorales *in vitro* et vraisemblablement *in vivo*.

2. Mécanismes responsables de l'action anti-tumorale des anticorps

Chez l'Homme, il existe un récepteur aux fragments Fc (FcR) des IgA, le FcαR, des IgE, le FcεR, et des IgM, le FcμR. En ce qui concerne les IgG, il existe plusieurs récepteurs Fc : le FcγRI ayant une forte affinité pour les IgG1, IgG3, et IgG4, le FcγRIIA pouvant reconnaître les quatre sous-classes d'Ig, le FcγRIIB liant majoritairement les IgG3, le FcγRIIIA et B qui reconnaissent uniquement les IgG1 et 3. (Bruhns et al., 2009). Le FcγRIIB est un récepteur inhibiteur dont la signalisation passe par un motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosin-basef Inhibitory Motif), alors que les autres récepteurs sont activateurs avec un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosin-basef Activation Motif). L'engagement de ces récepteurs par les Ig peut induire différentes fonctions des cellules cibles, pouvant jouer un rôle dans la réponse anti-tumorale.

2.1. Activation des fonctions cytotoxiques et de phagocytose des cellules accessoires via l'engagement des récepteurs Fc

Les Acs peuvent induire la mort des cellules exprimant l'Ag cible à la surface cellulaire notamment en activant les fonctions cytotoxiques et/ou de phagocytose de cellules accessoires. Ces mécanismes consistent en l'opsonisation des cellules tumorales, c'est-à-dire la fixation des Acs sur les Ags cibles, suivie de l'activation de la fonction cytotoxique de cellules accessoires via l'engagement de leurs récepteurs aux fragments Fc des Ig par les Acs.

Des tests *in vitro* de co-culture de cellules de lignées tumorales avec des cellules accessoires et des Ig dirigées contre un Ag tumoral ou du sérum de patient ont permis de montrer qu'à la fois les cellules NK (Boyerinas et al., 2015; Jochems et al., 2017), les neutrophiles (Frontera et al., 2018), et les monocytes/macrophages (Gilbert et al., 2011; Shaw et al., 1978) sont capable d'induire la mort des cellules tumorales (figure 7). Cette mort des cellules tumorales passe au moins en partie par l'engagement des récepteurs aux fragments Fc (FcR) des Ig. En effet, le blocage du récepteur FcγRIII, ou CD16, sur les cellules NK (Jochems et al., 2017), ou l'utilisation d'un Ac possédant un fragment Fc non-fonctionnel en présence de macrophages (Kurdi et al., 2018), empêchent la mort des cellules tumorales. Par ailleurs, le cross-linking des FcγR et FcαR, le récepteur au fragment Fc des IgA, sur des neutrophiles induit également la mort des cellules tumorales (Otten et al., 2005). En réponse à l'engagement des FcR par des Ig, les cellules NK et les neutrophiles sont capables de tuer les cellules

par cytotoxicité cellulaire dépendante des Acs (ADCC), soit par libération de granules cytotoxiques par les cellules NK, soit par trogoptose pour les neutrophiles (Matlung et al., 2018; Valgardsdottir et al., 2017). Ce dernier mécanisme implique un contact étroit entre le neutrophile et la cellule cible, et la capture par le neutrophile de fragments de la cellule cible qui seront ensuite dégradés dans une structure appelée trogosome. Les monocytes/macrophages sont eux principalement connus pour tuer les cellules cibles par phagocytose (ADCP), mais il semble que les monocytes puissent également effectuer l'ADCC (Kramski et al., 2012; Shaw et al., 1978) via la production d'espèces réactives de l'oxygène (Koller and LoBuglio, 1981). Les monocytes/macrophages pourraient donc avoir une efficacité supérieure grâce à leur capacité à accomplir à la fois l'ADCC et l'ADCP suite à l'engagement des FcR, mais la différence de signaux provoquant l'un ou l'autre mécanisme par ces cellules n'est à notre connaissance pas déterminée.

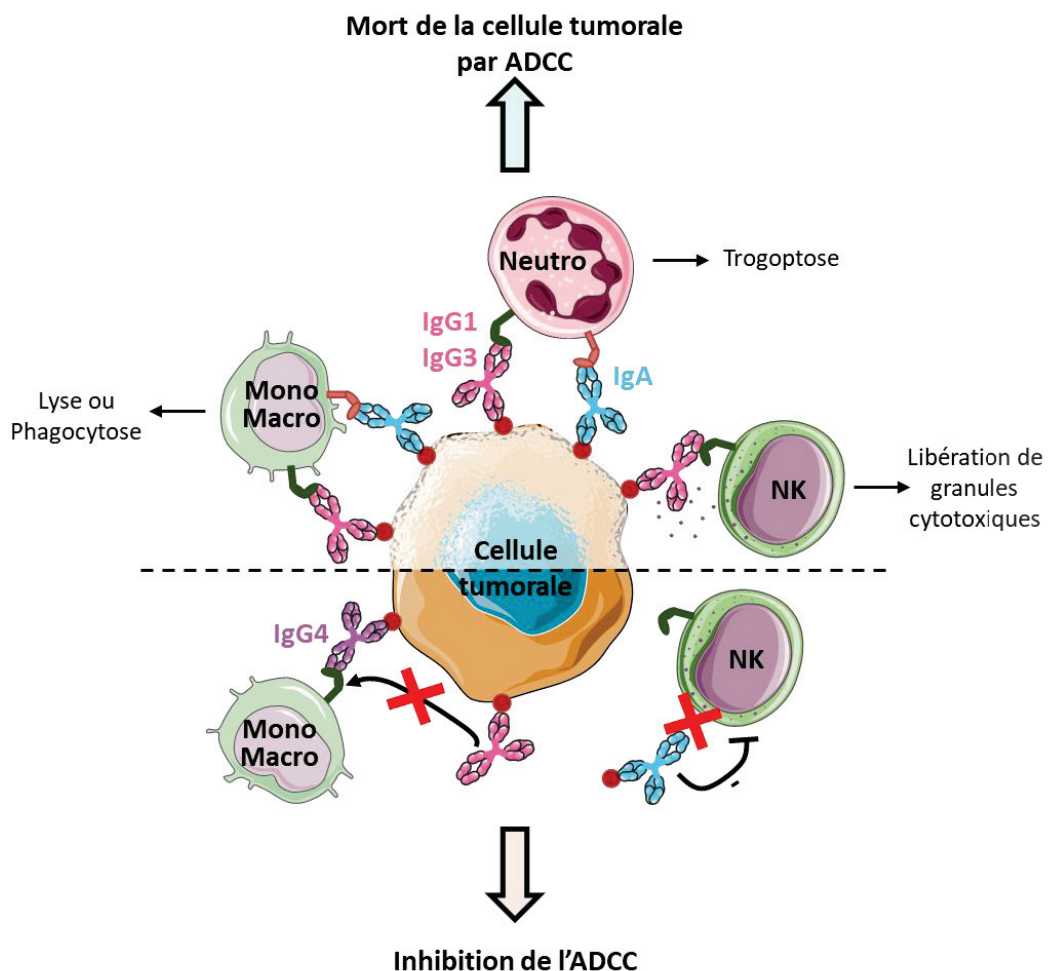


Figure 7 : Induction ou inhibition de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps par les différentes classes d'immunoglobulines. Les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les cellules NK sont capables de tuer les cellules tumorales par phagocytose, trogoptose, ou par la libération de granules cytotoxiques, respectivement. Les IgG et les IgA peuvent induire l'ADCC/ADCP par les monocytes/macrophages et les neutrophiles, alors que seuls les IgG peuvent induire l'ADCC par les cellules NK. Cependant, les IgA peuvent également inhiber l'ADCC médiée par les cellules NK par un mécanisme non connu, et les IgG4 entrent en compétition avec les IgG1 pour la fixation des récepteurs Fc, ce qui empêche l'ADCC/ADCP par les cellules NK et les macrophages respectivement.

Les sous-classes d'IgG possèdent des affinités différentes pour leurs récepteurs : chez l'Homme, les IgG1 et IgG3 ont la plus forte affinité pour les FcγR, en particulier les FcγRI et FcγRIII, alors que les IgG2 ont une plus faible affinité globale et lient principalement le FcγRIIa. Les IgG4 ont la même affinité que les IgG1 et IgG3 pour le FcγRI, mais une plus faible affinité pour les autres récepteurs (Bruhns et al., 2009). Ces variations d'affinité influencent la capacité des IgG à induire l'ADCC par les différentes cellules accessoires, en fonction des récepteurs qu'elles expriment. Chez la souris, il a été montré que les IgG2a et b sont majoritairement responsables de l'ADCC conduisant à une diminution du nombre de métastases lors d'un traitement par Acs dans un modèle de mélanome, et que cela dépend du FcγRIV, orthologue du FcγRIIIa (Nimmerjahn and Ravetch, 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Ce récepteur joue également un rôle important dans l'ADCP par les macrophages, induite par le Trastuzumab, un anti-HER2 utilisé en immunothérapie (Shi et al., 2015). Le profil d'expression des récepteurs étant dépendant du type cellulaire, chez l'Homme les IgG1 induisent l'ADCC par les cellules NK et les cellules myéloïdes qui expriment les FcγRI ou FcγRIII, alors que les IgG2 n'induisent l'ADCC que par les cellules myéloïdes, car elles expriment le FcγRIIa (Schneider-Merck et al., 2010). Ceci est confirmé par le fait que le FcγRIIa est le principal récepteur impliqué dans l'ADCC par les neutrophiles, qui est le récepteur pour lequel les IgG2 ont la plus forte affinité (Treffers et al., 2018). L'expression différentielle des FcR explique aussi les différences entre les IgG et les IgA, pour lesquelles un seul récepteur spécifique de leur fragment Fc existe. En effet, les IgA peuvent induire l'ADCC ou ADCP par les neutrophiles (Lohse et al., 2011; Pascal et al., 2012) et les monocytes/macrophages, mais pas par les cellules NK qui n'expriment pas le FcαRI. L'ADCC par les neutrophiles immatures n'est induite que par les IgA et pas par les IgG, ce qui peut être dû à une différence d'expression des FcR en fonction du stade de maturation des neutrophiles (Otten et al., 2005). De plus, les IgA induisent la production d'IL8 par les neutrophiles et ainsi le recrutement d'autres neutrophiles, pouvant amplifier l'activation de l'ADCC par ces cellules par les IgA (van der Steen et al., 2009).

Les neutrophiles et les monocytes/macrophages présentent donc un avantage sur les cellules NK, car à la fois les IgA et les IgG peuvent induire l'ADCC/ADCP sur ces cellules myéloïdes alors que les cellules NK ne répondent qu'aux IgG. De plus, les monocytes/macrophages présentent également l'avantage de pouvoir accomplir à la fois l'ADCC et l'ADCP.

2.2. Mort des cellules tumorales grâce à la cytotoxicité dépendante du complément

Les Acs peuvent également activer la cytotoxicité dépendante du complément conduisant à la formation du complexe d'attaque membranaire provoquant la lyse des cellules. L'opsonisation des cellules par des Acs peut activer soit la voie classique soit la voie alternative du complément en fixant sur les fragments Fc soit la molécule C1q, soit la molécule C3, respectivement (**figure 8**). Les différentes IgG ont des affinités différentes pour C1q à cause de différences de structure dans leur chaîne

constante (Sensel et al., 1997; Xu et al., 1994), leur conférant différentes capacités à activer la voie classique, suivant le schéma suivant $IgG3 > IgG1 > IgG2 \gg IgG4$ (Garred et al., 1989), et elles peuvent également activer la voie alternative du complément permettant le recrutement de C3. Les IgA quant à elles activent principalement la voie alternative du complément (Hiemstra et al., 1987), avec une efficacité supérieure des IgA dimériques et sécrétoires par rapport aux monomères (Fasching et al., 2007).

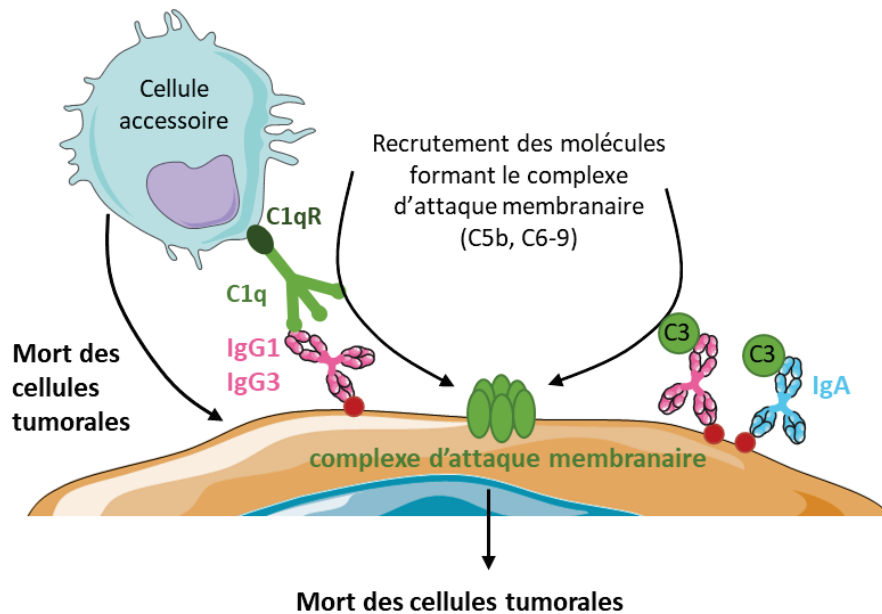


Figure 8 : Induction de la cytotoxicité/phagocytose (cellulaire) dépendante du complément. L'activation des voies classiques et alternatives du complément permet le recrutement de C1q et de C3 respectivement, aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire, qui forme un pore à la surface de la cellule conduisant à sa lyse. La voie classique peut également induire le recrutement de cellules effectrices exprimant le récepteur au C1q conduisant à la phagocytose de la cellule cible. Les IgG peuvent ainsi induire la mort des cellules tumorales en activant la voie classique du complément ou la voie alternative, tandis que les IgA ne peuvent activer que la voie alternative du complément.

Peu d'éléments sont connus sur la contribution du complément à l'effet de la réponse Ac endogène dans les cancers. Néanmoins, des composants du complément recouvrent des cellules tumorales, notamment dans les ascites associées à des cancers de l'ovaire (Bjørge et al., 2005), et la quantité de molécules C3 et C4 est élevée dans le sang de patients atteints de cancers solides par rapport à des donneurs sains (Matsutani et al., 1984; Oner et al., 2004). Cependant, il a été prouvé que le complément jouait un rôle indispensable dans l'efficacité anti-tumorale du Rituximab, un anti-CD20 utilisé comme immunothérapie dans les lymphomes B. En effet, le Rituximab et son équivalent murin permettent une régression tumorale de manière efficace chez la souris, mais cet effet n'est pas observé dans des souris déficientes en C1q (Gaetano et al., 2003). De plus, l'injection de Rituximab chez les patients atteints de leucémie est suivie d'une diminution de CH50, une mesure reflétant la quantité totale des différentes molécules du complément, suggérant que le complément a été fixé par les Acs injectés (Kennedy et al., 2004). Enfin, la déplétion des molécules inhibitrices du complément

chez la souris, CD55 et CD59, permet une meilleure réponse au Rituximab (Macor et al., 2007; Mamidi et al., 2013). L'importance de C1q, à la fois dans la réponse à des Acs exogènes et dans la réponse endogène, est également illustrée par le fait qu'un polymorphisme particulier de C1q est associé à une meilleure réponse au Rituximab chez la souris (Racila et al., 2008), et les différents polymorphismes de gènes du complément seraient associés à des temps de survie différents chez les patients atteints de lymphome (Charbonneau et al., 2012). Une version du Rituximab transformé en IgA a également été utilisée *in vitro* pour déterminer les différences avec les IgG. Ainsi, les IgG recrutent C1q et activent ainsi la voie classique du complément, tandis que les IgA sont capables d'activer la voie alternative du complément, mais recrutent tardivement C1q (Pascal et al., 2012).

Le recrutement de C1q permet la mise en place du complexe d'attaque membranaire, mais peut également permettre la cytotoxicité (CDCC) ou la phagocytose (CDCP) cellulaire en engageant le récepteur au C1q des cellules NK et les macrophages, respectivement (Lee et al., 2017). Il est difficile de distinguer l'ADCC/ADCP de la CDCC/CDCP dans les expériences et *in vivo*, particulièrement car les sites de liaison aux FcγR et au C1q sur les Acs sont proches, et les mêmes Acs peuvent donc lier les deux types de molécules. Cependant, l'utilisation d'un Ac anti-CD20 modifié à partir du Rituxan pour se lier uniquement à C1q met en évidence que celui-ci permet l'élimination des tumeurs de manière indépendante à la fixation des fragments Fc, alors que le Rituxan non modifié n'induit l'élimination de la tumeur qu'en présence des FcR, activant donc l'ADCC/ADCP. L'utilisation de tels Acs peut donc permettre d'étudier séparément les rôles de l'ADCC/ADCP et de la CDCC/CDCP dans les tumeurs.

La cytotoxicité dépendante du complément permet donc également de tuer les cellules tumorales par l'intermédiaire des Acs, mais le rôle du complément dans la surveillance des tumeurs est peu connu aujourd'hui. Il semble par ailleurs que les cellules tumorales acquièrent des mécanismes de résistance à la lyse par le complément (pour revue (Markiewski and Lambris, 2009)), et que le complément puisse également jouer un rôle pro-tumoral dans certaines circonstances (Mamidi et al., 2017). Cependant, la CDC semble cruciale à prendre en compte dans les immunothérapies utilisant des Acs.

En plus de l'induction de la mort des cellules tumorales par le recrutement de cellules accessoires pour induire l'ADCC/ADCP ou CDCC/CDCP, ou par le recrutement de C1q pour induire la CDC, les Acs pourraient induire la mort directe des cellules par un mécanisme encore peu compris (Glennie et al., 2007). Les Acs jouent donc un rôle important dans l'activation de mécanismes permettant la mort des cellules tumorales.

2.3. Présentation croisée des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8⁺ grâce aux complexes immuns

Les complexes Acs-Ags peuvent également être internalisés par les CPA exprimant des récepteurs pour la partie Fc des Ac, afin de faciliter la présentation de ces Ags aux LT (**figure 9**). Les CPA telles que les DC et les macrophages sont capables de capter les Ags par pinocytose, endocytose, ou phagocytose selon leur taille. Cependant, la reconnaissance d'Ags sous la forme de complexes immuns à IgG par les FcγR entraîne une meilleure présentation d'Ag aux LT CD4⁺ en augmentant l'expression du CMH-II (Hamano et al., 2000; Regnault et al., 1999; Simitsek et al., 1995), permet la présentation croisée aux LT CD8⁺ et conduit à une activation des LT bien supérieure. En effet, plusieurs expériences ont permis de mettre en évidence la meilleure capacité des complexes immuns à induire la présentation croisée d'Ags tumoraux aux LT CD8⁺ par rapport à des Ags solubles. L'activation de DC par des cellules tumorales apoptotiques recouvertes d'Acs anti-tumoraux conduit à une meilleure présentation d'Ags que sans Acs, et à la génération de LT CD8⁺ spécifiques de la tumeur dans un modèle murin de myélome (Dhodapkar et al., 2002). Des DC chargées avec des Ags solubles ou avec des complexes immuns ont été comparées dans un contexte de vaccination anti-tumorale dans un modèle murin de mélanome. Il apparaît que les complexes immuns sont significativement plus efficaces que des Ags solubles pour entraîner leur présentation croisée et l'activation de LT CD8⁺ lors de cette vaccination. La même expérience réalisée chez des souris déficientes pour les récepteurs FcγRI et FcγRIII met en évidence que la présentation d'Ag passe par ces récepteurs (Schuurhuis et al., 2006). Le rôle de la réponse anticorps endogène dans le rejet des tumeurs a été montré en implantant des tumeurs allogéniques chez la souris. Il a été observé dans ce cas que l'activation des LT spécifiques des Ags tumoraux est induite par des DC ayant capté les Ags tumoraux complexés avec des Acs présents dans la tumeur (Carmi et al., 2015).

L'internalisation des complexes immuns induit plusieurs phénomènes permettant une présentation des Ags conduisant à une forte activation, prolifération, et différenciation des LT naïfs en LT effecteurs. Tout d'abord, le récepteur intracellulaire FcRn (récepteur Fc néonatal), permet l'adressage des Ags vers la machinerie de présentation sur les molécules de CMH et les détourne d'une dégradation dans les lysosomes (Qiao et al., 2008). L'engagement de ce récepteur est notamment indispensable pour permettre la présentation croisée d'Ags par les DC CD8^{neg} chez la souris, qui à l'inverse des DC CD8⁺ ne sont pas spécialisées dans cette fonction (Baker et al., 2011). Par ailleurs, l'engagement des FcγR augmente la maturation des DC et ainsi la sécrétion d'IL-12 et l'expression de molécules de co-stimulation, telle CD86 (Regnault et al., 1999) nécessaires à l'activation des LT. Ainsi, les souris déficientes pour le FcRn montrent une croissance tumorale plus importante due au fait que ce récepteur permet à la fois la présentation croisée des Ags internalisés par les FcγR aux LT CD8⁺ et

l'activation des DC sécrétant alors de l'IL-12 induisant la différenciation des LT CD8⁺ en LT effecteurs cytotoxiques (Baker et al., 2013).

La reconnaissance de complexes immuns par le récepteur FcγRIIB dont la signalisation dépend d'un motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosin-basef Inhibitory Motif) au contraire inhibe la maturation des DC ainsi que la présentation croisée de l'Ag induite par l'engagement des autres FcγR, empêchant ainsi la réponse des LT CD8⁺ (Desai et al., 2007). L'induction de la présentation d'Ags grâce aux complexes immuns dans les tumeurs dépend donc fortement des récepteurs FcγR exprimés par les cellules immunitaires infiltrant la tumeur. Concernant les IgA et le FcαR, leur liaison peut également activer certaines populations de DC dont les cDC1 spécialisées dans la présentation croisée des Ags aux LT CD8⁺ (Hansen et al., 2018). Cet engagement du FcαR entraîne la production des cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL-18, alors qu'il diminue la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Cependant, même si peu de données sont disponibles, l'internalisation des IgA par le FcαR n'induit qu'une faible présentation des Ags par des DC dérivées de monocytes générées *in vitro* (Otten et al., 2006).

Les Acs peuvent donc reconnaître des Ags et faciliter leur présentation, jouant ainsi un rôle important dans la réponse immunitaire médiée par les LT. Ils peuvent ainsi être cruciaux dans l'immunité anti-tumorale en favorisant la présentation croisée d'Ags tumoraux et en activant ainsi les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ capables de tuer les cellules tumorales. Cependant, la nature des Ig présentes dans la tumeur ainsi que le type de FcR exprimé par les CPA infiltrant les tumeurs conditionnent cette présentation d'Ags.

Les Acs peuvent donc permettre l'élimination des tumeurs par différents moyens : en induisant directement la mort des cellules, en activant la cytotoxicité et la phagocytose dépendantes de cellules accessoires ou de l'activation du complément, ou en induisant la présentation d'Ags aux LT CD8⁺. Il est également envisageable que les Acs modulent la fonction de leurs protéines cibles dans les cellules tumorales.

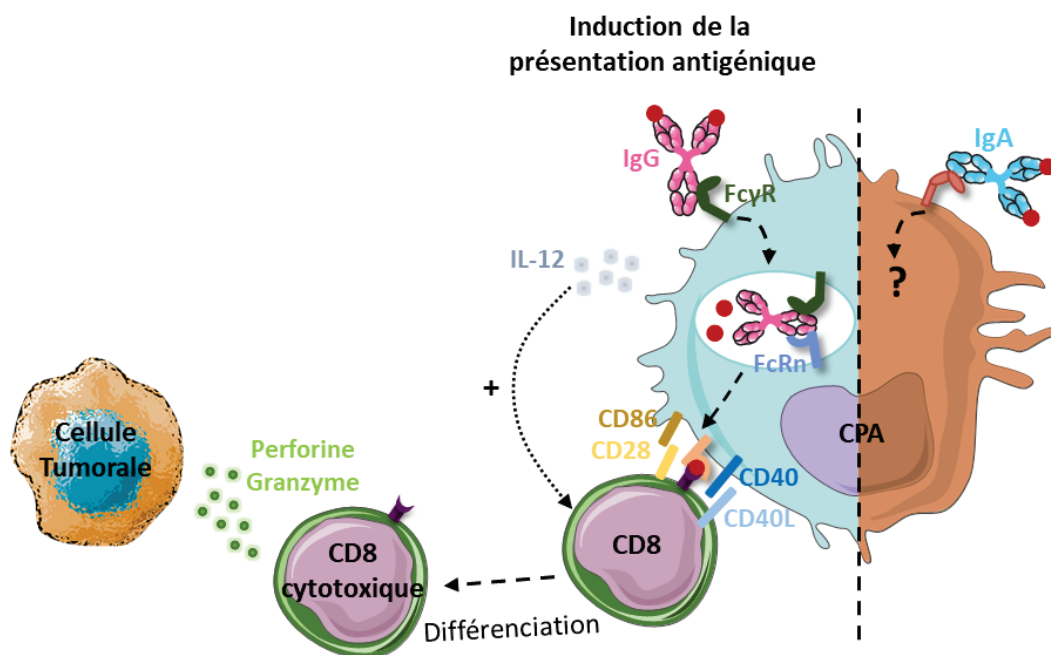


Figure 9 : Induction de la présentation et de la présentation croisée d'antigènes tumoraux aux LT CD8 par les IgG. Les IgG complexées avec des Ags peuvent être internalisées par les cellules présentatrices d'Ag suite à l'engagement des FcγR, puis interagir avec le FcR, qui permet aux Ags d'être apprêtés sur le CMH-I ou le CMH-II au lieu d'être dégradés dans des lysosomes. L'engagement des FcγR augmente l'expression de molécules de co-stimulation par les CPA et la production de cytokines telle l'IL-12, permettant l'activation de LT CD4⁺ et CD8⁺. Cette présentation d'Ag induite par les complexes immuns permet ainsi l'expansion et la différenciation des LT CD8⁺ en cellules effectrices cytotoxiques capables de tuer les cellules tumorales. Il semble que les complexes à IgA soient au contraire des faibles inducteurs de la présentation d'Ag.

3. Mécanismes responsables de l'action pro-tumorale des anticorps

3.1. Inhibition de l'ADCC par les IgA et par les IgG4

Les IgG et les IgA peuvent induire la mort des cellules tumorales, notamment via des mécanismes d'ADCC ou d'ADCP, cependant, certaines sous-classes d'Ig sont capables d'inhiber cette voie cytotoxique (**figure 7**). L'ADCC induite par les IgG est essentiellement une propriété des IgG1 et des IgG3 tandis que les IgG4 en sont dépourvues. De manière intéressante, il a été montré que des cellules productrices d'IgG4 peuvent infiltrer les tumeurs, comme décrit dans le mélanome et dans le cholangio-carcinome (Harada et al., 2012; Karagiannis et al., 2013). L'utilisation de deux Acs dirigés contre un même Ag tumoral, mais de sous-classe IgG1 ou IgG4, dans un modèle de co-culture de lignées de mélanocytes et de monocytes a montré que les IgG1 sont capables de tuer les cellules tumorales par ADCC/ADCP alors que les IgG4 n'activent que très faiblement cette fonction. De plus, il est documenté que les IgG4 inhibent la mort induite par les IgG1 en entrant en compétition pour la fixation de FcγRI sur les monocytes, comme le montrent des expériences de blocage des récepteurs (Karagiannis et al., 2013). Dans ce cas, l'inhibition par les IgG4 ne semble pas passer par une interaction avec le FcγRIIB, le Fcγ récepteur inhibiteur, car son blocage ne modifie pas l'inhibition observée.

Cependant, il a été montré que les IgG4 ont une plus forte affinité pour ce récepteur que les autres Ig, ce qui pourrait également expliquer sa fonction inhibitrice dans d'autres contextes (Bruhns et al., 2009). La prise en compte de ce récepteur inhibiteur est importante pour étudier l'ADCC *in vivo*, mais aussi pour concevoir des Acs thérapeutiques, qui devraient avoir une faible affinité pour le FcγRIIB (Clynes et al., 2000).

Les IgA sont également capables d'inhiber l'ADCC dans certains contextes. Une étude dans le carcinome nasopharyngé a également mis en évidence que les IgA issues de sérum de patients n'induisent pas d'ADCC en présence de lymphocytes, mais également qu'elles inhibent la cytotoxicité induite par les IgG (Mathew et al., 1981). Dans cette étude, le mécanisme d'inhibition et la population effectrice inhibée ne sont pas clairement définis. Une autre étude démontre spécifiquement l'inhibition des cellules NK par les IgA, plus exactement les IgA2 polymériques et les IgA sécrétoires. L'incubation des cellules NK avec ces IgA conduit à une inhibition de leur fonction cytotoxique. Le mécanisme précis d'inhibition n'est pas élucidé, mais il semble que les IgA n'empêchent pas l'interaction des cellules NK avec leur cellule cible, mais entraînent plutôt des changements morphologiques, dont la diminution du nombre de granules cytotoxiques intracellulaires (Komiya et al., 1986). Il est montré ici que les IgG et les IgM n'inhibent pas les cellules NK, mais l'action inhibitrice des IgA sur les IgG n'est pas étudiée. Une comparaison entre l'effet des IgA et des IgG sur l'activation de la cytotoxicité des cellules NK a également été conduite en contexte d'infection par HIV. Il est montré à nouveau que les IgA n'induisent pas d'ADCC et inhibent l'ADCC induite par les IgG, ici spécifiquement par les cellules NK (Tomaras et al., 2013).

Les sous-classes d'IgG semblent donc jouer des rôles différents dans l'activation de l'ADCC : les IgG1 l'activent alors que les IgG4 sont inhibiteurs. En ce qui concerne les IgA, nous avons pu constater un rôle activateur de l'ADCC, principalement en présence de neutrophiles et de monocytes, ou inhibiteur, en présence de cellules NK. Il semble donc que l'élément important dans cette dualité fonctionnelle soit la nature des cellules effectrices présentes au contact des cellules tumorales qui pourrait s'expliquer par une différence d'expression des Fc récepteurs sur les deux types de cellules. Les cellules NK n'expriment pas le FcαR, ce qui explique que les IgA n'activent pas l'ADCC sur ces cellules. Le mécanisme exact de l'inhibition par les IgA de l'ADCC induite par les IgG n'est cependant pas connu, mais elle serait plutôt due à une compétition pour l'Ag, étant donné que les récepteurs sont différents.

3.2. Induction d'une réponse inflammatoire pro-tumorale

Les Ig peuvent induire la mort des cellules tumorales et activer une réponse des LT CD8⁺ cytotoxiques contre celles-ci. Cependant, la présence d'Ig dans le MET peut également conduire à une

inflammation pro-tumorale. Les Ig ont un rôle important dans l'entretien de pathologies auto-inflammatoires pouvant évoluer en cancer, comme la maladie de Crohn par exemple. Dans ces pathologies, l'inflammation chronique est à l'origine de la transformation maligne du tissu et il semble que les Ig puissent participer à ce processus. Dans un modèle murin de carcinome épidermoïde induit par l'expression de gènes de l'herpesvirus 16 sous le contrôle du promoteur K14 spécifique des kératinocytes (K14-HPV16), des IgG se déposent sur la peau tumorale et une déficience en LB abroge ces dépôts et réduit la croissance tumorale (de Visser et al., 2005). Par ailleurs, le transfert répété de sérum d'une souris porteuse de tumeur à une souris K14-HPV16 sans LB et sans LT induit la transformation maligne de l'épiderme. Il a été montré que le rôle pro-tumoral observé des Ig passe par le recrutement de granulocytes et de mastocytes, possiblement en produisant des métalloprotéases matricielles (MMP) favorisant l'angiogenèse (de Visser et al., 2005). De plus, l'engagement des FcγR sur les macrophages résidents et recrutés dans les tumeurs de ce même modèle augmente leur sécrétion de chimiokines permettant la néoformation de vaisseaux et jouant ainsi un rôle pro-tumoral (Andreu et al., 2010). Par ailleurs, l'interaction entre les IgG et les FcγR des macrophages et des neutrophiles conduit à une augmentation des capacités de migration des cellules tumorales dans différents modèles murins, suggérant que les Ig promeuvent un phénotype pro-tumoral de ces populations immunitaires, peut-être en induisant la production de myéloperoxydase (Barbera-Guillem et al., 1999).

Les Ig peuvent donc provoquer une inflammation favorisant la croissance tumorale.

3.3. Induction d'un phénotype tolérogène des cellules présentatrices d'antigènes par les IgA

Les IgA sont principalement connues pour participer au maintien de l'homéostasie dans les muqueuses, en particulier dans l'intestin. Si ce rôle dépend principalement d'un contrôle de la flore commensale, des effets indépendants de la cible antigénique semblent également impliqués. Les IgA peuvent en effet conférer des fonctions tolérogènes aux cellules immunitaires exprimant des récepteurs capables de fixer ces IgA.

Les IgA peuvent inhiber les CPA suite à l'engagement du FcαR, exprimé notamment par les DC et les macrophages. Il a été montré que l'interaction entre les IgA et ce récepteur peut conduire soit à un signal activateur, soit à un signal inhibiteur en fonction de la nature moléculaire des IgA (Pasquier et al., 2005). Les IgA existent en effet principalement sous trois formes : monomériques, dimériques, et sécrétoires. Les IgA monomériques entraînent un signal inhibiteur, alors que les IgA polymériques, en agrégeant plusieurs récepteurs, induisent un signal activateur, les deux signaux impliquant le motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosin Activating Motif) de la chaîne γ associée au FcαR. Ainsi, la liaison entre les IgA et le FcαR peut induire un phénotype tolérogène des monocytes et des DC dérivées de monocytes *in vitro*. Cela se traduit à la fois par une diminution de production de cytokines pro-

inflammatoires telles le TNF α , l'IL-6, et l'IL-12 (Lecocq et al., 2013; Wolf et al., 1994, 1996), mais aussi par une augmentation de production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Pilette et al., 2010). D'autres études montrent que la fixation de complexes immuns à IgA par des DC générées *ex vivo* entraîne la maturation de ces cellules en induisant l'expression du CMH-II et de molécules de co-stimulation comme CD86, mais conduit à un phénotype tolérogène des DC en favorisant leur sécrétion d'IL-10 (Geissmann et al., 2001; Pasquier et al., 2004).

Les IgA peuvent également interagir avec des récepteurs dits accessoires, comme le récepteur DC-SIGN (CD209), qui ne reconnaissent pas le fragment Fc, mais des résidus sur l'Ac (Baumann et al., 2010). Ce récepteur reconnaît par ailleurs des glycanes et des résidus mannose sur différentes protéines, notamment issues de pathogènes. DC-SIGN est principalement exprimé par des cellules myéloïdes, dont des DC et des macrophages. Chez la souris, l'engagement de SIGNR1, l'équivalent murin de DC-SIGN, par des IgA sécrétoires sur des DC les oriente vers une fonction tolérogène, caractérisée par la production d'IL-10 et la capacité à induire des LTreg (Diana et al., 2013). Chez l'Homme, l'engagement de DC-SIGN par des Acs agonistes sur des monocytes lors de leur différenciation donne naissance à des DC immatures produisant plus d'IL-10 et moins d'IL12, exprimant moins de molécules co-stimulatrices, et ayant des capacités moindres à induire des LT CD4⁺ producteurs d'IFN γ (Švajger et al., 2011). L'expression de DC-SIGN a également été observée dans le stroma de différentes tumeurs solides, en particulier sur les macrophages, et son blocage *ex vivo* conduit à une diminution de la production d'IL-10 par les macrophages (Domínguez-Soto et al., 2011). Ces données suggèrent que l'engagement de DC-SIGN oriente les macrophages vers un phénotype tolérogène de type M2. Cependant, l'impact de DC-SIGN n'est pas dû ici à un engagement du récepteur par des IgA, mais par d'autres motifs glycosylés. L'ensemble de ces données suggère néanmoins qu'une interaction entre DC-SIGN et les IgA pourrait conduire à un phénotype similaire.

Les IgA peuvent donc exercer un rôle immunosuppresseur en conditionnant les CPA à exercer une fonction tolérogène *via* l'engagement de récepteurs comme le Fc α R ou DC-SIGN.

4. Utiliser les connaissances des rôles pro- et anti-tumoraux des anticorps pour concevoir des anticorps thérapeutiques plus efficaces

Tout d'abord, des modifications de résidus des chaînes constantes des Ig peuvent être réalisées pour augmenter leurs capacités à recruter des effecteurs cytotoxiques et activer les voies de l'ADCC et la CDC simultanément (Idusogie et al., 2001; Moore et al., 2010; Nimmerjahn and Ravetch, 2005). Les IgG1 et la majorité des Fc γ R favorisent l'induction de l'ADCC, tandis que les IgG4 et le Fc γ RIIb l'inhibent. Il en est de même pour la présentation d'Ag. Les IgA quant à eux peuvent induire ou inhiber l'ADCC/ADCP en fonction de l'identité des cellules effectrices présentes, et ne semblent pas favoriser

la présentation d'Ags. Ces connaissances peuvent être exploitées pour concevoir des Acs thérapeutiques présentant des parties Fc les plus à même d'exercer une action anti-tumorale. Plusieurs stratégies ont déjà été explorées. Tout d'abord, le traitement combiné de lignées cellulaires de tumeur mammaire par des IgG et des IgA dirigées contre des Ags tumoraux, HER2 et EGFR, permettant l'engagement simultané des FcγR et du FcαRI, augmente la mort des cellules tumorales *in vitro* en présence des différents leucocytes du sang, et *in vivo* (Brandsma et al., 2015). De manière intéressante, des Acs tandems capables de lier à la fois FcαR et les FcγR et combinant des fragments constants IgG1, IgA2 et éventuellement IgA1 permettent de recruter à la fois des neutrophiles, des cellules NK et des macrophages, et apparaissent plus efficaces que des Acs simples IgA ou IgG pour tuer les cellules tumorales *in vivo*. Ils permettent en effet de limiter de manière optimale la croissance tumorale à la fois dans un modèle de lymphome non Hodgkinien avec des anti-CD20 (Li et al., 2017), dans un modèle de lymphome avec des anti-HLA (Dechant et al., 2002), et dans un modèle de cancer du sein avec des anti-HER2 (Borrok et al., 2015). Le bénéfice d'un Ac mixte IgG1/IgG3 pour activer l'ADCC et la CDC a également été décrit (Natsume et al., 2008).

Les Acs peuvent donc induire à la fois des réponses pro- et anti-tumorales en fonction des classes et sous-classes d'Ig ainsi que de l'identité des cellules infiltrant les tumeurs. La notion couramment admise que les IgG sont pro-inflammatoires et donc anti-tumorales tandis que les IgA du fait de leurs propriétés non/anti-inflammatoires exerceraient un rôle pro-tumoral est donc à relativiser.

Chapitre 3 : Rôles de la présentation d'antigènes et de la production de cytokines par les lymphocytes B dans les tumeurs

Au-delà de la production d'Ig, les LB pourraient également influencer la croissance des tumeurs par leurs fonctions de présentation d'Ags et de sécrétion de cytokines.

1. Impact de la présentation d'antigènes par les lymphocytes B sur la réponse T anti-tumorale

1.1. Les lymphocytes B comme cellules présentatrices d'antigènes

Les LB sont des cellules présentatrices d'Ags professionnelles exprimant de manière constitutive le CMH-II et la machinerie de présentation des Ags, et sont donc capables de présenter des Ags aux LT CD4⁺ (**figure 10**). Les LB sont également capables d'effectuer une présentation croisée des Ags aux LT CD8⁺ sur le CMH-I (Robson et al., 2008). Une particularité des LB est qu'ils peuvent non seulement capter les Ags de manière aspécifique par endocytose ou phagocytose comme les autres CPA, mais ils peuvent également fixer les Ags de manière spécifique par leur BCR avec une grande affinité, permettant une forte accumulation de l'Ag (Lanzavecchia, 1990). Les LB sont donc capables de capter un Ag et de le présenter sur le CMH afin qu'il soit reconnu par le TCR d'un LT, et cette capture de l'Ag par le BCR permet notamment la présentation croisée d'Ags au LT CD8⁺ (Wit et al., 2010). Afin de présenter efficacement l'Ag au LT et d'activer celui-ci, les LB expriment également des molécules de co-stimulation après avoir été activés, notamment suite à un engagement des récepteurs de type TLR (Barr et al., 2007). Les LB peuvent exprimer CD80 et CD86 liant CD28 sur les LT, mais également CD70 et OX40L (Akiba et al., 1999). Les LB activés, exprimant donc des molécules de co-stimulation, peuvent activer des LT (Metlay et al., 1989), tandis que les LB naïfs ne peuvent pas délivrer de signal de co-stimulation et induisent ainsi une tolérisation des LT (Fuchs and Matzinger, 1992). Les LB peuvent également exprimer des molécules de co-inhibition, telle que PD-L1. Ce ligand est notamment exprimé par les LB du CG chez la souris pour inhiber les LT_{fh} et limiter leur expansion (Crotty, 2014), mais également par les PC à IgA dans l'intestin où ils permettent l'induction de LTreg (Doi et al., 2012). Ainsi, l'équilibre entre l'expression de molécules de co-activation et co-inhibition par les LB, comme les autres CPA, détermine s'ils vont activer ou inhiber les LT suite à la présentation d'un Ag.

Des différences sont cependant observées entre les LB mémoires capables d'activer les LT en leur présentant des Ags et les autres CPA telles que les DC. Les LB sont moins efficaces que les DC pour présenter les Ags aux LT CD4⁺ (Cassel and Schwartz, 1994), et sont souvent considérés comme non-suffisants pour la primo-activation des LT suite à une infection bactérienne (Epstein et al., 1995) ou virale (Topham et al., 1996). Les LB sont cependant considérés comme capables de restimuler des LT mémoires, et des LT différenciés en l'absence de LB et transférés dans une souris hôte semblent être

incapables d'apporter l'aide nécessaire aux LB pour leur différenciation (Macaulay et al., 1998). Par ailleurs, la présentation d'Ags par les LB au LT CD4⁺ oriente préférentiellement leur polarisation vers des LTh2 producteurs d'IL-4 (Macaulay et al., 1997; Stockinger et al., 1996).

Les LB ne seraient donc pas les cellules principalement impliquées dans la primo-activation des LT, qui serait plutôt la fonction des DC, mais les LB peuvent réactiver les LT et influencer leur polarisation en leur présentant des Ags, ce qui peut jouer un rôle important en contexte pathologique.

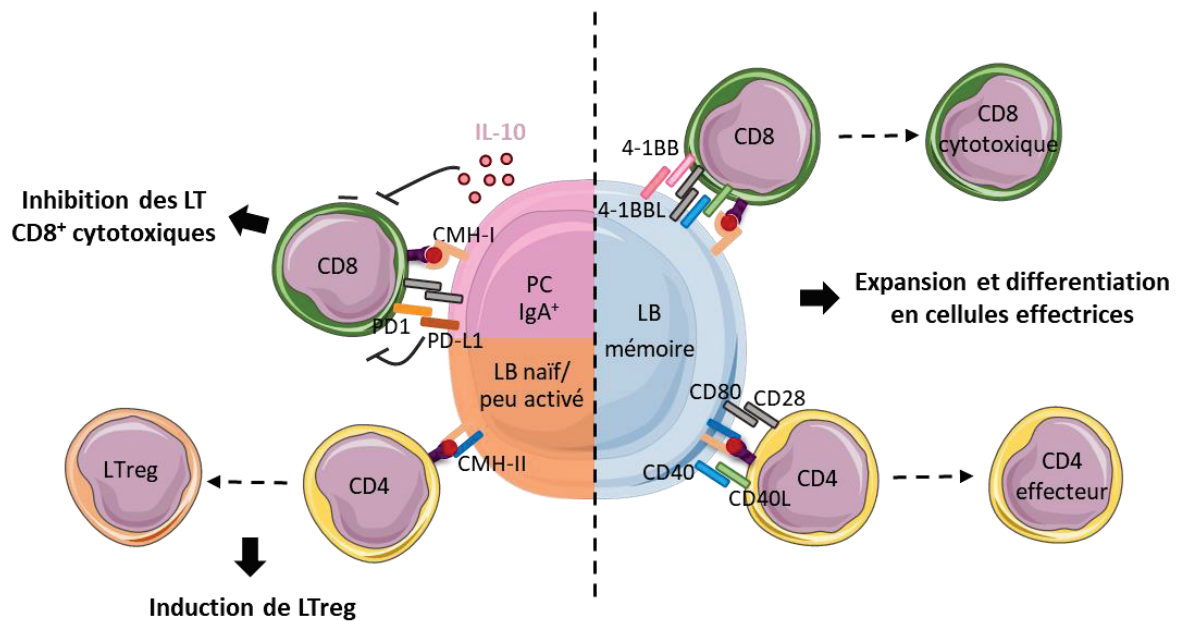


Figure 10 : Présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ par les lymphocytes B. Les LB peuvent présenter des Ags à la fois aux LT CD4⁺ et CD8⁺, et en fonction de leur stade d'activation et des molécules co-activatrices et co-inhibitrices qu'ils expriment, induire leur activation ou leur inhibition. Les LB mémoires expriment différentes molécules co-stimulatrices permettant l'activation des LB CD4⁺ et CD8⁺ et leur différenciation en cellules effectrices, tandis que les LB naïfs et les PC à IgA induisent des LTreg et inhibent les fonctions des LT CD8⁺ cytotoxiques.

1.2. La présentation d'antigènes par les lymphocytes B permet l'induction d'une réponse anti-tumorale

La fonction des LB en tant que CPA dans la réponse anti-tumorale a été majoritairement documentée lors de leur utilisation dans des protocoles d'immunothérapie, mais quelques corrélations ont été établies concernant les LB endogènes. Dans le cancer du poumon, les LB isolés de la plupart des tumeurs sont capables de présenter des Ags aux LT issus de cette tumeur *in vitro*, induisant leur prolifération que ce soit en présence d'Ag d'EBV, de l'Ag XAGE-1b ou de lysat de tumeur (Bruno et al., 2017). Par ailleurs, deux populations de LB observées dans les tumeurs de poumon sont associées à des phénotypes de LT intra-tumoraux différents : une forte densité de LB activés CD27⁺CD21⁺ est associée à une forte densité de LT CD4⁺ productrice d'IFN γ , tandis que les LB épuisés CD27^{neg}CD21^{neg} sont associés à des LTreg Foxp3⁺. Cela pourrait être expliqué par une balance différente de molécules

de co-activation et de co-inhibition sur les LB activés et les LB épuisés. Par ailleurs, les patients ayant des tumeurs dans lesquelles les LB n'étaient pas capables de présenter les Ags dans un essai *ex vivo* présentaient une fréquence plus importante de rechute et une mortalité plus élevée, suggérant que la présentation d'Ags par les LB est nécessaire à une bonne réponse anti-tumorale dans ce cancer. Les LB pourraient également jouer un rôle important dans la présentation croisée des Ags aux LT CD8⁺. En effet, dans le cancer de l'ovaire chez la femme, les LT CD8⁺ et les LB sont co-localisés et souvent en contact, et l'association de la densité des LT CD8⁺ avec un meilleur pronostic est renforcée par la présence de LB (Nielsen et al., 2012). De plus, dans un modèle murin de mélanome, une forte densité de LB exprimant 4-1BBL est associée à une plus forte densité de LT CD8⁺ cytotoxiques sécrétant du Granzyme B (GrB) (Lee-Chang et al., 2014).

Il a été montré dans un modèle de glioblastome que l'injection de vecteurs adénoviraux codant un Ag et la cytokine FLT3L permet d'induire une réponse anti-tumorale et ainsi de diminuer la croissance tumorale. Cet effet est abrogé en absence de LB, mais pas en absence de PC uniquement, suggérant que l'activation de la réponse anti-tumorale par les LB ne dépend pas de la sécrétion d'Acs, mais plutôt de la fonction de présentation d'Ag des LB (Candolfi et al., 2011). Par ailleurs, le rôle des LB, en comparaison aux DC, isolés de ganglions ou de rates de souris porteuses de tumeurs a été étudié en co-injectant un des types de CPA avec des LT issus des mêmes souris, dans des souris déficientes en LT et LB porteuses de tumeurs similaires (Rossetti et al., 2018). Les LB activées par le CD40L permettent une diminution de la croissance tumorale accompagnée d'une diminution de l'infiltration par les LTreg en comparaison avec les autres LT CD4⁺, alors que les DC activées de la même manière n'ont pas cet effet, probablement car elles sont tolérogènes dans ce modèle. L'utilisation de LB isolés de rate de souris non-porteuses de tumeurs ou de DC générées à partir de cellules CD34⁺ de souris, chargées avec un Ag et injectés dans des souris porteuses de tumeurs met également en évidence un avantage des LB sur les DC pour présenter les Ags tumoraux aux LT infiltrant la tumeur (Wennhold et al., 2016). En effet, l'injection de LB activés avec du CD40L et chargés avec le peptide OVA dans des modèles de mélanome ou de lymphome présentant cet Ag permet une augmentation de la production d'IFN γ par les LT CD8⁺ et une plus faible croissance tumorale, et les LB sont plus efficaces que des DC chargées avec le même Ag pour activer et induire la prolifération des LT CD4⁺ et CD8⁺ *in vitro*. De même, des LB isolés de PBMC chez l'Homme et transfectés avec un plasmide codant un Ag conservent l'expression du plasmide plus longtemps et sont plus efficaces pour induire l'expansion des LT que des DC. Chez la souris, des LB traités de la même manière sont capables d'induire une réponse anti-tumorale, alors que les DC n'en sont capables que si elles sont chargées avec un peptide (Colluru and McNeel, 2016). Cependant, les DC sont capables de présenter l'Ag plus longtemps que les autres CPA (Zehn et al., 2006).

1.3. La présentation d'antigènes par les lymphocytes B peut inhiber la réponse T anti-tumorale

La présentation d'Ags tumoraux par les LB pourrait également inhiber les LT dans la tumeur. En effet, la présentation d'Ags par les LB naïfs induit la différenciation des LT CD4⁺ en LTreg (Fuchs and Matzinger, 1992; Reichardt et al., 2007), probablement à cause de la faible expression de molécules co-activatrices. De plus, la présence de LB épuisés dans les tumeurs de poumons est associée à une forte densité de LTreg (Bruno et al., 2017), possiblement car ces LB expriment plus de molécules co-inhibitrices. Les LB infiltrant les tumeurs peuvent en effet exprimer PD-L1, ligand inhibiteur. Chez les patients atteints de cancer du sein, l'expression de PD-L1 par les LB circulants est supérieure à ceux de donneurs sains, et une forte densité de LB PD-L1⁺ est associée à une plus forte densité de LTreg (Guan et al., 2016). Dans un modèle de tumeurs mammaires murin, les LB infiltrant la tumeur expriment PD-L1 et la culture de LB naïfs purifiés de rate de souris non-porteuses de tumeurs avec des cellules tumorales induit l'expression de PD-L1 sur ces LB et ces deux populations de LB inhibent la prolifération des LT CD4⁺ *in vitro* ainsi que la sécrétion de cytokines des LTh1 (Zhang et al., 2016). De plus, l'injection de LB naïfs exprimant PD-L1 activés *ex vivo* dans un modèle murin de tumeurs pleurales favorise la polarisation en LTh17 et la dissémination des cellules tumorales dans les effusions pleurales (Wu et al., 2018). Ainsi, les LB naïfs infiltrant les tumeurs semblent exprimer des ICPI et ainsi empêcher la différenciation des LT en LT effecteurs et favoriser la croissance tumorale. Enfin, PD-L1 est également exprimé par les PC à IgA infiltrant les tumeurs de la prostate et du foie, et cette expression de PD-L1 induit une diminution de l'infiltration par des LT CD8⁺ et de leurs fonctions cytotoxiques et de sécrétion d'IFN γ (Shalapour et al., 2015, 2017). Cela suggère que les PC sont capables de présenter des Ags aux LT CD8⁺. Les PC à IgA et IgM expriment en effet un BCR fonctionnel à leur surface leur permettant d'internaliser les Ags (Pinto et al., 2013), et il a été montré que les PC peuvent présenter des Ags aux LTfh CD4⁺ (Pelletier et al., 2010). Ils pourraient donc également être capables de présenter des Ags aux LT CD8⁺ en leur délivrant un signal de co-activation ou co-inhibition.

Ainsi, les LB pourraient présenter des avantages en tant que CPA dans les tumeurs bien que moins efficaces que les DC pour présenter des Ags en contexte physiologique, tout d'abord parce que les DC sont souvent inhibées ou tolérogènes dans les tumeurs, mais également parce que les LB sont généralement plus nombreux que les DC dans les tumeurs, ce qui pourrait faciliter leur interaction avec des LT. De plus, les LB infiltrant la tumeur peuvent être spécifiques d'Ags tumoraux, particulièrement s'ils sont différenciés localement dans des TLS, leur conférant un avantage pour capter les Ags tumoraux et les présenter. Cependant, les LB sont moins efficaces que les DC pour activer des LT naïfs et peuvent favoriser la polarisation des LTh2, généralement associés à une réponse

pro-tumorale. De plus, les DC ont des capacités de migration supérieures et expriment des ligands de CCR7 leur permettant d'être co-localisées avec les LT dans les ganglions.

2. Impact des cytokines produites par les lymphocytes B sur la croissance tumorale

2.1. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes B pouvant jouer un rôle anti-tumoral

Les LB peuvent produire de nombreuses cytokines dont le rôle a été décrit principalement dans les maladies auto-immunes, et qui peuvent tout d'abord influencer la polarisation des LT (**figure 11**). En effet, les LTh1 peuvent être induits par la production d'IL-12 principalement, tandis que les LTh2 sont favorisés par la sécrétion d'IL-4 et les LTh17 par l'IL-6 et le TGF β , cytokines pouvant être produites par les LB (Shen and Fillatreau, 2015) qui pourraient donc influencer la balance LTh1/LTh2 et ainsi la réponse anti-tumorale. Ainsi, dans un modèle murin de mélanome, les LB sécrétant de l'IFN γ , également identifiés par leur expression de TIM-4 à la membrane, permettent une polarisation des LT en LTh1 et un rejet des tumeurs lorsqu'ils sont injectés (Ding et al., 2017). Les LB peuvent également produire des cytokines agissant sur d'autres cellules immunitaires : le GM-CSF permettant l'accumulation de DC productrices d'IL-12, nécessaire à la différenciation des LT (Shen and Fillatreau, 2015), et le recrutement de neutrophiles (Bao and Cao, 2014), et l'IL-12 pouvant activer les cellules NK par exemple. Par ailleurs, les LB peuvent exprimer LT α 1 β 2 qui permet le maintien des TLS dans les tumeurs, qui pourraient jouer un rôle anti-tumoral (McDonald et al., 2005). Enfin, les cytokines produites par les LB pourraient agir directement sur les cellules tumorales. Chez l'Homme, des LB isolés de carcinomes hépatocellulaires seraient capables de tuer des cellules tumorales *ex vivo* potentiellement par la production d'IFN γ et de GrB et l'expression du ligand de mort TRAIL à leur surface (Shi et al., 2013).

2.2. Les cytokines pro-tumorales produites par les lymphocytes B : un rôle central de l'IL-10 et de l'IL-35

Les cytokines immunorégulatrices produites par les LB, en particulier l'IL-10 (Kalampokis et al., 2013) et le TGF β (Yang et al., 2013), permettent une amélioration des pathologies auto-immunes, à la fois chez la souris et chez l'homme, principalement en induisant des LTreg et en inhibant les polarisations en LTh17 et LTh1. Dans les tumeurs, il a été montré que l'expression de CD40L par les cellules tumorales induit la sécrétion d'IL-10 par les LB suite à l'engagement du CD40, mettant en évidence que le MET peut influencer la sécrétion de cytokines par les LB (Inoue et al., 2006). Cette sécrétion d'IL-10 favorise la croissance tumorale (Tao et al., 2015), en inhibant les fonctions cytotoxiques de cellules NK et des LT CD8 $^{+}$, ainsi que leur production d'IFN γ (Inoue et al., 2006;

Shalapour et al., 2015, 2017). Dans le mélanome chez la souris, un équilibre existe entre les LB TIM-4⁺ produisant de l'IFN γ et les LB TIM-1⁺ produisant de l'IL-10 : en l'absence de LB TIM-4⁺, la production d'IL-10 et la croissance tumorale sont augmentées (Ding et al., 2017). Chez l'Homme, des LB producteurs d'IL-10 sont détectés dans le sang et la tumeur de patients atteints d'un cancer de l'ovaire métastatique ou d'un cancer rénal et sont associés à une inhibition de la sécrétion d'IFN γ par les LT CD8⁺ ainsi qu'à une augmentation de la densité de LTreg (Cai et al., 2015; Wei et al., 2015).

L'IL-35, une cytokine de la famille IL-12, constituée d'une chaîne EBI3 et de la chaîne p35 de l'IL-12, produit par les LB permet également le contrôle des pathologies auto-immunes en diminuant la proportion de LTh1 et les LTh17 (Shen et al., 2014). Dans un modèle murin de cancer du pancréas, les LB infiltrent les tumeurs dès les stades pré-invasifs et sécrètent de l'IL-35 qui augmente la croissance tumorale en induisant la prolifération des cellules tumorales (Pylayeva-Gupta et al., 2016), comme cela avait été montré précédemment *in vitro* (Nicholl et al., 2014). Chez l'Homme, des LB sécréteurs d'IL-35 sont détectés dans le sang de patients atteints de cancers gastriques et colorectaux et leur présence est corrélée à la présence de LTreg, de cellules myéloïdes suppressives, et de monocytes (Wang et al., 2018a, 2018b).

Par ailleurs, les LB peuvent également sécréter du TGF β et du GrB qui favorise la croissance tumorale et les métastases, en induisant des LTreg (Olkhanud et al., 2011) ou en empêchant la prolifération des LT effecteurs (Lindner et al., 2013). Le TGF β promeut également la croissance tumorale en induisant la prolifération des cellules tumorales ovariennes par l'augmentation de l'expression d'IGF1R (Alsina-Sanchis et al., 2016). Des LB en présence du facteur de croissance FGF-2 peuvent eux-mêmes sécréter de l'IGF1, ligand d'IGF1R, responsable de la résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome (Somasundaram et al., 2017).

Les cytokines produites par les LB pourraient donc favoriser la croissance tumorale en inhibant la fonction cytotoxique des LT et en induisant les LTreg, mais également en induisant directement la prolifération des cellules tumorales.

2.3. Diverses populations de lymphocytes B produisent des cytokines immunorégulatrices

Les LTreg sont une population définie par différents marqueurs comme l'expression du facteur de transcription Foxp3 et de CD25. Un équivalent a été recherché pour les LB ayant des propriétés inhibitrices. On pensait tout d'abord que les LBreg étaient les LB dits transitionnels exprimant CD24 et CD38, décrits initialement comme inhibant la sécrétion d'IFN γ et de TNF α par des LT dans le lupus systémique érythémateux (Blair et al., 2010). Ces LBreg possèdent des capacités régulatrices variables en fonction de leur expression d'IgM, IgD, et CD27 (Iwata et al., 2011; Simon et al., 2016), et les marqueurs CD25, CD1d et CD5 peuvent également être utilisés pour les définir (Kessel et al., 2012; Mehdipour et al., 2015).

Cependant, de nombreuses observations mettent en évidence que les propriétés régulatrices des LB ne se réduisent pas à une seule population. Tout d'abord, le stade de différenciation des LB pourrait également influencer leur production de cytokines. Une étude dans la sclérose en plaque montre que les cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-10, sont produites principalement par les LB naïfs, alors que les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α sont sécrétées en majorité par les LB mémoires (Duddy et al., 2007). D'autre part, les PC sont d'importants producteurs de cytokines, particulièrement immunosuppressives. De manière intéressante, on observe que les PC sont les principaux producteurs d'IL-10 et IL-35, à la fois lors d'une infection (Shen et al., 2014), mais également en contexte tumoral (Cai et al., 2015; Pylayeva-Gupta et al., 2016). Pour l'IL-10, cela pourrait s'expliquer par le fait que l'expression de cette cytokine et la différenciation en PC dépendent de l'expression du facteur de transcription IRF4 (Rangaswamy and Speck, 2014). Par ailleurs, un rôle particulier des PC à IgA est décrit pour la sécrétion d'IL-10. Dans le carcinome rénal, une corrélation entre la densité de PC à IgA et celle de PC producteur d'IL-10 est établie, même si la production préférentielle d'IL-10 par les PC à IgA n'est pas clairement démontrée (Cai et al., 2015). De plus, il a été démontré dans les cancers du foie et de la prostate que l'IL-10 est produite par les PC à IgA (Shalapour et al., 2015, 2017). Les PC à IgM peuvent également sécréter de l'IL-10 et la chimiokine CCL5, entre autres (Blanc et al., 2016; Fillatreau, 2015). La sécrétion de cytokines préférentiellement par les PC à IgA et IgM au sein des PC pourrait s'expliquer par le fait que seules ces deux sous-classes de PC expriment un BCR fonctionnel en surface et sont capables de présenter les Ags, ce qui pourrait induire leur production de cytokines. Par ailleurs, les PC sont des cellules ayant une machinerie de sécrétion très développée afin de pouvoir sécréter les Acs, ce qui pourrait permettre une production de cytokines plus efficace que dans les autres cellules.

Différentes populations de LB sont donc capables de sécréter des cytokines immunosuppressives ou pro-inflammatoires et l'environnement tumoral pourrait conditionner la balance entre les deux. En effet, le TGF β produit par les myofibroblastes dans les tumeurs de la prostate et du foie permet la commutation de classe des PC vers IgA et la sécrétion d'IL-10 (Shalapour et al., 2015, 2017), et le facteur de croissance FGF-2 sécrété dans le mélanome induit la sécrétion d'IGF1 par les LB, qui peut jouer un rôle pro-tumoral (Somasundaram et al., 2017).

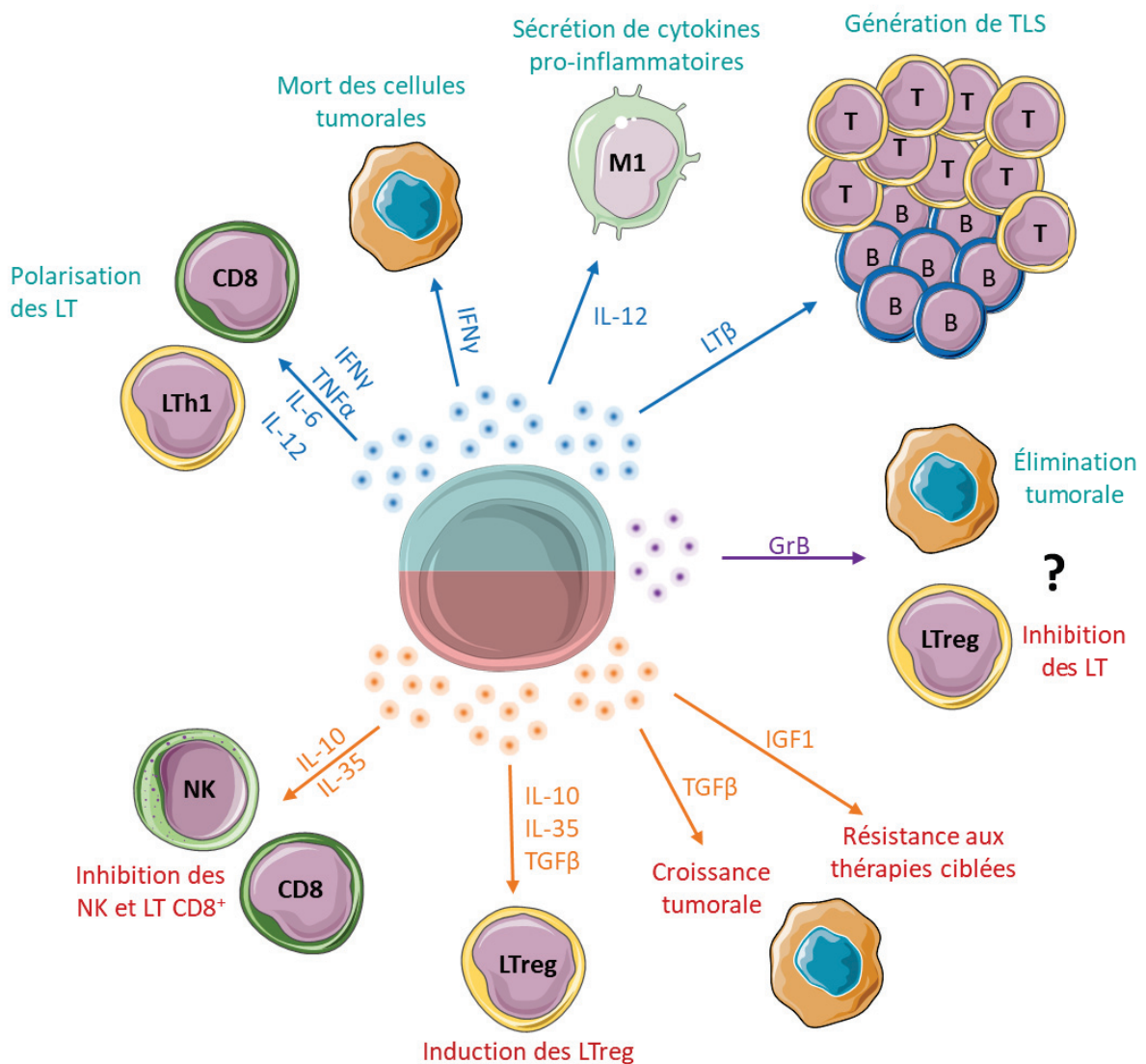


Figure 11 : Rôles pro- versus anti-tumoraux des cytokines produites par les lymphocytes B. Les LB peuvent produire une diversité de cytokines pro- ou anti-inflammatoires permettant l'élimination ou la croissance des cellules tumorales en agissant directement sur les cellules tumorales ou en modulant les fonctions d'autres cellules du MET.

Objectifs de la thèse

De nombreuses démonstrations de l'importance des LB dans le MET existent dans la littérature, montrant que les LB peuvent jouer un rôle pro- ou anti-tumoral à la fois par leurs fonctions de production d'Acs, de présentation d'Ags, ou de sécrétions de cytokines (figure 12). Cependant, la diversité des LB dans les tumeurs reste largement méconnue, et il est également nécessaire de mieux comprendre le rôle pro- ou anti-tumoral des LB naïfs, des LB mémoires et des PC à IgG ou à IgA afin de pouvoir utiliser ces connaissances pour identifier de nouveaux éléments à cibler en thérapie.

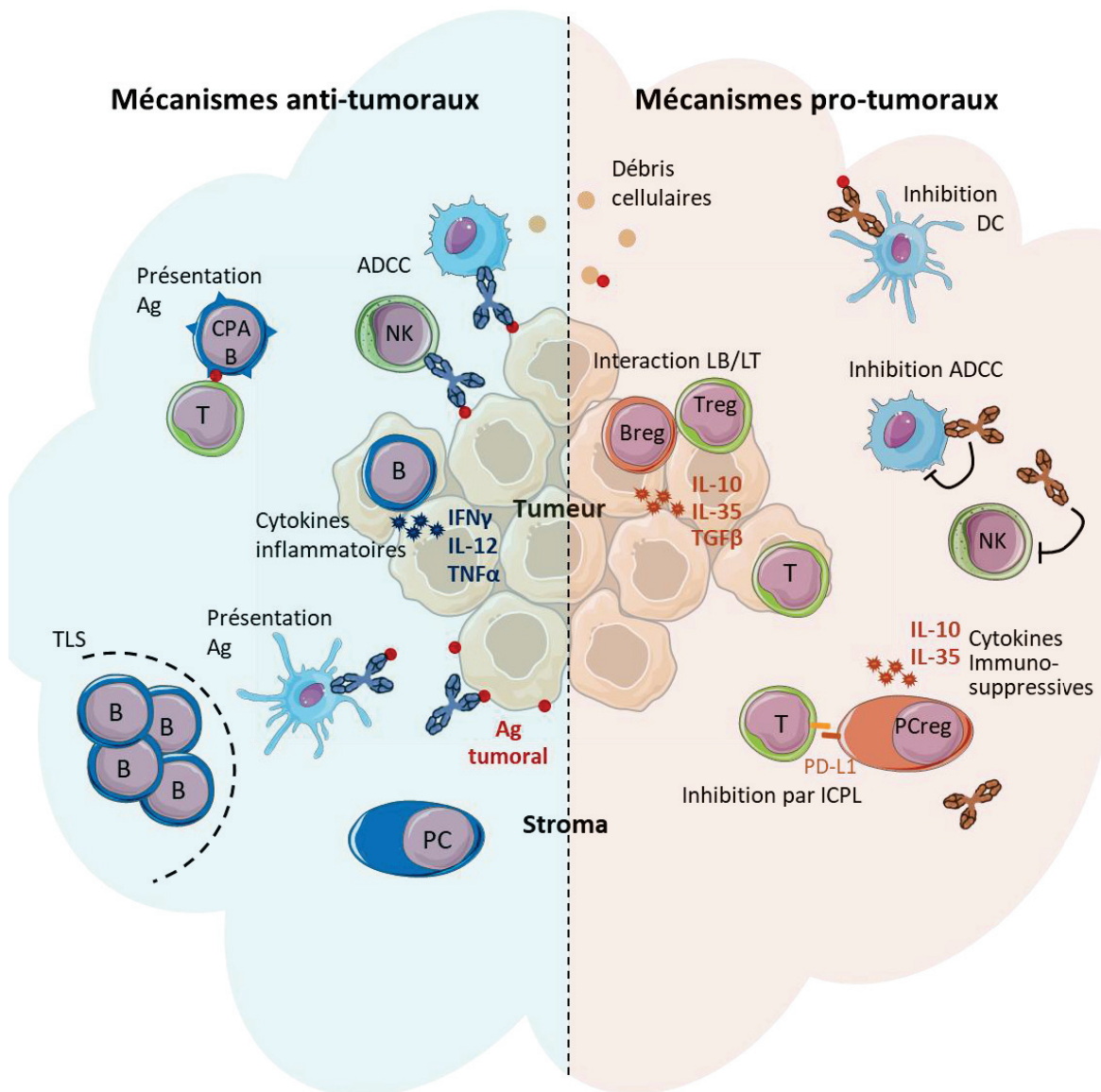


Figure 12 : Les lymphocytes B peuvent jouer des rôles pro- et anti-tumoraux à la fois par la production d'anticorps, la présentation d'antigènes, ou la sécrétion de cytokines

Les objectifs de ma thèse étaient donc i) de caractériser l'hétérogénéité du contingent de LB infiltrant les tumeurs du sein et de l'ovaire en terme de sous-populations, de

structuration fonctionnelle, d'isotypes d'Ac sécrétés et d'Ags ciblés par ces Acs ii) d'en définir l'impact sur la progression tumorale et la survie des patientes ; et iii) d'étudier les mécanismes d'induction d'une réponse anticorps dans les tumeurs au travers de l'exploration de syndromes neurologiques paranéoplasiques.

Pour cela, j'ai analysé des prélèvements de patiente (sang et tumeurs primaires), principalement par cytométrie de flux, ELISA, et immunofluorescence. Nous avons également mené une étude de l'infiltrat immunitaire et en particulier des PC dans des tumeurs ovariennes associées à des dégénérescences cérébelleuses à Acs anti-Yo, dans le but de déterminer les mécanismes permettant l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale. Les résultats sont présentés sous la forme d'un manuscrit en cours d'écriture intitulé « **Heterogeneity and clinical impact of the plasma cell infiltrate in breast tumors** », d'un article publié dans Acta Neuropathologica en 2018 « **Genetic alterations and tumor immune attack in Yo paraneoplastic cerebellar degeneration** », et de résultats complémentaires.

Résultats

Hétérogénéité des lymphocytes B et de la réponse humorale dans les tumeurs de sein et d'ovaire

Nous avons caractérisé l'infiltrat en LB et la réponse humorale dans les tumeurs de sein et d'ovaire afin de mieux comprendre leur rôle dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Pour cela, nous avons utilisé des fragments de pièces opératoires, frais ou fixés, de ces deux types de tumeurs, ainsi que des cohortes rétrospectives de patientes, et combiné des analyses par cytométrie en flux (CMF), des marquages multiplexes par immunofluorescence (IF), et des techniques biochimiques pour i) identifier et caractériser les sous-populations de LB infiltrant les tumeurs, ii) étudier la diversité des Acs produits localement en termes de classes et sous-classes et de cibles antigéniques, et iii) déterminer l'impact clinique de ces différents éléments.

1. Hétérogénéité et impact clinique des plasmocytes infiltrant les tumeurs de sein

Résumé de l'article

Les démonstrations d'un rôle important des LB et des Acs dans l'immunité anti-tumorale sont de plus en plus nombreuses dans la littérature, mais restent assez contradictoires. Dans ce contexte, une caractérisation fine de la diversité de la réponse humorale et des populations de LB infiltrant les tumeurs solides chez l'Homme est nécessaire pour mieux comprendre les bases mécanistiques de leur rôle pro- versus anti-tumoral. Nous avons caractérisé cet infiltrat dans les tumeurs de sein chez l'Homme, dans lesquelles les LB et les PC ont précédemment été observés et sont généralement associés à un meilleur pronostic, particulièrement en présence de TLS.

Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé des marquages multiparamétriques par CMF sur des prélèvements frais de tumeurs de sein afin d'identifier les différentes sous-populations de LB, ainsi que les Ig exprimées et produites par les cellules différenciées. Une illustration et une quantification de la présence de ces cellules et de leur localisation dans les tumeurs ont été réalisées grâce à des marquages IF multiparamétriques analysés grâce au logiciel HALO™. Enfin, des études par ELISA et Western Blot nous ont permis de caractériser les Acs solubles présents dans le MET. Cette étude a été réalisée sur des carcinomes invasifs de différents sous-types moléculaires et de différents grades afin d'étudier l'impact des caractéristiques cliniques sur la réponse humorale. Par ailleurs, nous avons également comparé des carcinomes invasifs avancés et des carcinomes *in situ*, souvent considérés comme des tumeurs de sein précoces, afin de déterminer l'impact des différentes populations sur la progression tumorale.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence de LB à de nombreux stades de différenciation dans les tumeurs de sein, avec des proportions plus importante de LB mémoires et

naïfs, mais également un contingent significatif de PC. Ces populations sont parfois accompagnées de LB du CG et de la présence de TLS, suggérant une possible différenciation locale des LB, mais aussi leur recrutement à différents stades. Les PC infiltrant dans les tumeurs invasives sécrètent principalement des IgG, mais également des IgA et des IgM. Les IgA du MET peuvent être monomériques ou dimériques, et de sous-classe IgA1 ou IgA2, suggérant la possibilité d'induction de signaux variés par ces Acs. De manière intéressante, environ un cinquième des carcinomes invasifs présentent un ratio de PC à IgA par rapport aux PC à IgG élevé, alors que les carcinomes *in situ* présentant des PC sont systématiquement infiltrés par une densité plus élevée de PC à IgA que de PC à IgG. Cette différence soulève la possibilité d'un rôle protecteur des IgA qui préviendraient la progression tumorale, hypothèse renforcée par l'étude d'une cohorte rétrospective de patients.

La réponse humorale pourrait donc jouer un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale et la progression des tumeurs de sein.

Heterogeneity and clinical impact of the plasma cell infiltrate in breast tumors

Coline Couillault^{1,2}, Justine Berthet^{1,2}, Yasmine Lounici^{1,2}, Priscillia Rébus^{1,2}, Pauline Wajda^{1,2}, Gaëlle Quiniou^{1,2}, Julie Mazet^{1,2}, Franceline Guillot^{1,2}, Amélie Colombe-Vermorelle³, Laetitia Odeyer³, Sylvie Chabaud⁴, Mario Campone^{5†}, Fabrice André^{6†}, Jerome Lemonnier^{7†}, Émilie Lardenois^{1,2}, Nathalie Bendriss-Vermare^{1,2}, Isabelle Treilleux³, Christophe Caux^{1,2‡}, Bertrand Dubois^{1,2‡*}

¹Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS 5286, 69008 Lyon, France

²Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

³Department of Biopathology, Centre Leon Bérard, 69008 Lyon, France

⁴Department of clinical research and innovation, Centre Leon Bérard, 69008 Lyon, France

⁵ICO Rene' Gauducheau, Saint-Herblain, France

⁶Université Paris-Saclay, Villejuif, France

⁷R&D UNICANCER, UCBG, Paris, France

Footnotes

*To whom correspondence should be addressed: Bertrand Dubois, Phone (+33) 4 78 78 28 53; email Bertrand.dubois@lyon.unicancer.fr

†Co-senior authorship

‡Authorships related to the use of the Unicancer PACS08 cohort is likely to be the subject of adjustments

Keywords

Invasive breast cancer, ductal carcinoma *in situ*, B cells, antibody-producing plasma cells, IgG, IgA

Abbreviations

Ab	Antibody	HEV	High Endothelial Venules
ADCC/ADCP	Antibody-Dependant Cell Cytotoxicity/Phagocytosis	IF	ImmunoFluorescence
Ag	Antigen	Ig	Immunoglobulin
BC	Breast Cancer	IHC	ImmunoHistoChemistry
CK	Cytokeratins	OS	Overall Survival
CLB	Centre Léon Bérard	PC	Plasma Cells
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ	PR	Progesterone Receptor
DFS	Disease-Free Survival	SBR	Scarff-Bloom a d Richardson
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	STM	Soluble Tumor Milieu
ER	Estrogen Receptor	Tfh	Follicular Helper T cell
FCM	Flow Cytometry	Ti	Tumor infiltrating
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded	TLS	Tertiary Lymphoid Structures
HER2	Human Epithelial growth factor Receptor 2	TMA	Tissue MicroArray
		TME	Tumor MicroEnvironment
		TNBC	Triple Negative Breast Cancer
		Treg	Regulatory T cell

Abstract

B cells appear to have an important but still debated role in breast tumors, and a comprehensive analysis of the B cell infiltrate and local humoral response remains necessary to better apprehend their pro- or anti-tumor roles. By analyzing different cohorts of breast cancer patients using flow cytometry, *in situ* tissue imaging and analysis of locally produced antibodies, we demonstrated that multiple B cell differentiation stages infiltrate invasive breast tumors, with a dominance of memory B cells, naïve B cells and antibody-producing plasma cells whether or not tertiary lymphoid structures were present. Importantly, plasma cells not only consisted of IgG-, but also of IgA-, and to a lesser extent IgM-, producing cells and localized in both the stromal and tumor areas. Locally produced IgA consisted of both monomeric and dimeric entities and of IgA1 and IgA2 subclasses. Moreover, *in situ* breast carcinomas, considered as early tumors, had a plasma cell contingent over-dominated by IgA PC while invasive carcinomas presented a dramatic shift of local humoral immunity toward IgG production, except for a minor fraction of patients, suggesting a protective role of IgA PC in tumor progression. This was indeed strengthened by the association, albeit not statistically significant, of a high density of IgA PC with a better survival of patients with invasive breast cancer. This data demonstrate a high diversity of the B cell infiltrate and humoral response in breast tumors and highlight the differential role of IgA and IgG plasma cells on tumor progression and patient survival.

Introduction

Breast cancer (BC) is a highly complex disease not only due to the existence of various histological and molecular subtypes, but also because of complex immune cell networks operating inside the tumor microenvironment. Tumor subtype identification at diagnosis, based on the differential expression of estrogen (ER), progesterone (PR) and/or Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) receptors, has tremendously improve disease management with possibility of targeted treatment, but it is noteworthy that ER⁻PR⁻HER2⁺ triple negative breast tumors remains difficult to treat¹ and that current immunotherapy has not proven to be as efficient in BC² as it is in other types of solid cancers³. This underlies the critical need to improve our understanding of the breast tumor immune microenvironment. BC patient prognosis strongly relies on the cellular composition, density, local structuration and function of tumor-infiltrating (Ti) immune cells⁴. As in many other malignancies, a high density of cytotoxic CD8⁺ T cells and Th1 cells is associated with a favorable clinical outcome in terms of overall and disease-free patient survival⁵. Yet, invasive BC harbor a dominant immunosuppressive microenvironment, typified by the presence of regulatory T cells, tolerogenic dendritic cells and suppressive macrophages, which all concur to dampen anti-tumor immunity and are associated with a poor clinical outcome⁶⁻⁹.

In contrast, the role played by B cells in solid cancers, and in BC in particular, remains more controversial and still poorly understood. Many studies have shown that a high tumor infiltration by CD20⁺ B cells at the time of diagnosis is associated with an increased overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) of breast cancer patients¹⁰⁻¹² and can even predict pathological complete responses after neo-adjuvant chemotherapy^{13,14}. In addition, functional organization of the B and T lymphocytic infiltrate in so-called tertiary lymphoid structures (TLS) is a predictive factor in breast cancer for both improved survival¹⁵ and response to neo-adjuvant chemotherapy¹⁴. In contrast, a recent study revealed that ductal carcinomas *in situ* with high numbers of Ti B cells had significant higher tumor size and shorter DFS¹⁶. In addition, two studies reported that high plasma cell (PC) counts were associated with worse prognosis in patients with invasive breast cancer^{10,17}, while others argues for an exact opposite clinical impact^{18,19}. That B cells can exert pro-tumor roles was further revealed in mouse models of mammary tumors where B cells with regulatory features were shown to promote metastasis, induce regulatory T cells and suppress CD8⁺ antitumor immunity²⁰⁻²³. B cells with such a regulatory phenotype have also been described in human BC^{24,25}. The reason for these controversial observations might rely on the phenotypic and functional heterogeneity of the B cells and PC infiltrate in breast tumors, which so far remain poorly documented.

Recent studies have documented that the B cell infiltrate of invasive BC consist of about 80% of naïve and memory B cells in roughly equal proportions, some antibody-producing PC, and minor amounts of cells with intermediate stages of differentiation^{26,27}, as was previously shown in other types of tumors, including non-small cell lung cancer²⁸ and ovarian carcinomas^{29,30}. Limited information is

currently available regarding the respective role of naïve and memory B cells¹⁸, but CD4⁺ follicular helper T cells that may promote local B cell differentiation predicts improved breast cancer survival³¹. Tumor infiltration by PC is reminiscent of the early descriptions in cancer patients of serum IgG directed against tumor-associated antigens (Ags)³², which can be associated either with a good or bad prognosis depending on the targeted proteins^{33,34}. It is also likely that the class and subclass of antibodies (Abs) produced by Ti plasma cells also critically conditions their local functions. Although, Ti PC were initially thought to express/produce mostly IgG^{30,35}, there is some scarce evidence for IgA and even IgG4 producing cells in certain cancers^{36–39} and both IgG and IgA against tumor Ags were recently reported in breast tumor supernatant²⁷. These various Ab isotypes strikingly differ for their capacity i) to kill tumor cells, either directly or by activation of the complement pathway or cytotoxic cells^{40–43}, ii) to promote dendritic cell mediated Ag cross-presentation to CD8⁺ cells⁴⁴, iii) to activate or suppress Ag presenting cells^{45,46} and iv) to trigger local tumor-promoting inflammation⁴⁷.

Besides these canonical functions, B cells and PC are also an important source of cytokines and other immune modulators⁴⁸ that may affect anti-tumor immunity. They can indeed secrete pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IFN γ , GM-CSF, and IL-17, as well immune-suppressive cytokines, with PC being major producers of IL-10 and IL-35⁴⁹ that both promote tumor development^{37,50,51}. The PD-L1 inhibitory immune checkpoint ligand can also be expressed by B cell subsets and dampen T cell immunity⁵². In this respect, Shalapour et al. have recently identified, in mouse models of prostate cancer and hepatocellular carcinoma, a suppressive role of IgA PC on CD8⁺ T-cell-mediated anti-tumor immunity that relies on expression of PD-L1 and production of IL-10^{37,51}.

There is thus increasing evidence that B cells and especially PC are critical actors of the tumor immune microenvironment but the cellular and molecular basis of their pro- versus anti-tumoral roles remains incompletely understood. The present study was aimed to disentangle heterogeneity of the B cell infiltrate in breast tumors and diversity of locally produced antibodies, and their consequences on patient prognosis.

Material and method

Patient cohorts

For the prospective cohort of patients used for flow cytometry, tissue immunofluorescence and Ig titration, fresh and fixed tissue specimen were collected from 92 primary breast cancer patients diagnosed and treated at the Centre Léon Bérard (CLB) between 2012 and 2018. Inclusion criteria included a size estimated at diagnosis greater than 2.5 cm and an SBR grade (which considers the density of tubules, nuclear features and mitotic activity) of I-III and included all histological subtypes. The characteristics of patients are provided in Table 1. All samples were prepared from surgical pieces by a pathologist and provided by the CLB tissue bank within the frame of a protocol approved by the Institutional review board and ethics committee (L-06-36 and L-11-26) and following patients' written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. A series of 15 ductal *in situ*

carcinomas (FFPE samples) was also used for immunofluorescence analysis and their characteristics are described in Table 2.

	Flow Cytometry n (%)	ELISA n (%)	Tissue multi-IF n (%)
Total	42 (100)	72 (100)	39 (100)
Age (median and range)	63 (35-90)	61,5 (32-91)	57 (39-88)
Histology			
Ductal	26 (62)	43 (60)	24 (62)
Lobular	11 (26)	23 (32)	9 (23)
Others	5 (12)	6 (8)	6 (15)
Histological grade (SBR)			
1	2 (5)	1 (1)	1 (3)
2	17 (40)	28 (39)	13 (33)
3	23 (55)	43 (60)	25 (64)
Size			
T1	2 (5)	1 (1)	2 (5)
T2	28 (66)	45 (63)	28 (72)
T3	10 (24)	23 (32)	8 (20)
ND	2 (5)	3 (4)	1 (3)
Node status			
negative	23 (55)	37 (51)	23 (59)
Positive	19 (45)	33 (46)	16 (41)
ND	0 (0)	2 (3)	0 (0)
Metastasis			
Yes	5 (12)	15 (21)	7 (18)
No	37 (88)	57 (79)	32 (82)
Lymphovascular Embolism			
Absent	26 (62)	43 (60)	24 (62)
Present	12 (28)	25 (35)	13 (33)
ND	4 (10)	4 (5)	2 (5)
HR			
ER-	8 (19)	21 (29)	13 (33)
ER+	34 (81)	51 (71)	26 (67)
PR-	11 (26)	26 (36)	18 (46)
PR+	31 (74)	46 (64)	21 (54)
HER2			
HER-	36 (86)	62 (86)	32 (82)
HER+	4 (9)	9 (13)	6 (15)
ND	2 (5)	1 (1)	1 (3)
Triple negative			
Yes	7 (17)	18 (25)	10 (26)
No	35 (83)	54 (75)	29 (74)
Neoadjuvant treatment			
Yes	0 (0)	11 (15)	4 (10)
No	42 (100)	61 (85)	35 (90)

Table 1: Characteristics of the prospective cohorts of breast cancer patients used for flow cytometry, ELISA, and tissue multi-IF analysis

	n (%)
Total	15 (100)
Histological grade (SBR)	
1	3 (20)
2	2 (13)
3	10 (67)
Size	
<40mm	10 (67)
>40mm	5 (33)
Necrosis	
Yes	10 (67)
No	5 (33)

Table 2: Characteristics of the in situ ductal carcinoma samples used for immunofluorescence studies.

The prognostic study was performed on a retrospective cohort of patients and is ancillary to the PACS08 trial⁵³, which, between October 2007 and September 2010, included 592 patients with triple negative breast cancer (TNBC, negative for ER, PR, and HER2) and 170 patients with ER⁺PR⁺HER2⁻ luminal tumors. This trial, performed with a total 762 patients, was aimed to compare two different adjuvant chemotherapies but did not reveal major differences between the two arms of the study⁵³. All tumors were thus considered equally to analyze the prognostic impact of B cells and PC densities determined by IHC staining of the available Tissue MicroArrays (TMA)⁵⁴.

Preparation of tumor cell suspensions and supernatants

Tumor pieces were first mechanically dissociated into small fragments, with 1 mL of RPMI 1640 supplemented with antibiotics per 500 mg of tumor, and tissue supernatant was collected, clarified by centrifugation and 0.22 µm filtered to obtain Soluble Tumor Milieu (STM) containing the soluble factors of the tumor microenvironment. Tumor fragments were then incubated for 45 minutes at 37°C with collagenase IA (1 µg/mL, Sigma) and DNase I (100 µg/mL, Sigma) in medium with antibiotics under gentle magnetic shaking. The resulting cell suspensions was filtered over a 70 µm cell strainer,

washed and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) until use for further analysis.

Flow Cytometry

Single cell suspensions from primary breast tumors were incubated with various combinations of fluorescently labeled Ab. The Ab panel used to characterize B cell subsets included Ab to human CD45 (HI30), CD20 (L27), CD19 (HIB19), CD38 (HIT2), IgD (IA6-2.), IgG (G18-145), all from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), CD27 (O323), CD24 (ML5), IgM (NHM-88), all three from Biolegend (Saint Quentin, France) and IgA (Southern Biotech, Clinisciences, Nanterre, France). Both a surface and intra-cytoplasmic staining was performed for IgG, IgA and IgM to ensure detection of both memory and plasma cell subsets. The T cell panel contained Ab against CD3 (SK7), CD4 (SK3), PD1 (EH12.1), from BD Biosciences, ICOS (REA192), CXCR5 (REA103), from Miltenyi Biotech (Paris, France) and Foxp3 (PCH101, eBiosciences, Paris, France). After cell surface staining, cells were fixed with a fixation/permeabilization kit (eBiosciences) and analyzed within 5 days on a LSR-Fortessa (BD Biosciences). An intracellular staining was performed for Foxp3, IgG, IgA and IgM using the fixation/permeabilization kit right before analysis on the flow cytometer. Data were processed using the FlowJo Software (Tree Star) by first gating on live infiltrating immune cells based on the expression of CD45 and the absence of the fixable viability marker (Zombie Fixable Viability Dyes, Biolegend). The density of each immune population (number of cells per mg of tumor) was calculated by multiplying the total number of viable cells (determined by manual counting using Trypan blue dye exclusion) by the percentage of each population among total viable cells (determined by Flow cytometry (FCM)) and dividing by the tumor weight in mg.

IF and IHC staining of FFPE sections

Multiplex immunofluorescence staining. After deparaffinization and antigen retrieval, 4 μ m-thick formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections were incubated with various combinations of 3 primary antibodies (Sup. Table 1) directed against IgG, IgD (Southern Biotech), IgA, IgM, CD20 (L26), CD3, Pan-cytokeratins (AE1/AE3), IRF4 (MUM1p), all from DAKO, PNAd (BD Biosciences), IgJ (Biolegend), and IgA1 (B2506B4) and IgA2 (RM125) from Abcam (Paris, France). After washing, sections were then incubated with Alexa-Fluor (-488, -555 and -647, ThermoFischer Scientific, Saint Aubin, France) coupled secondary Abs specific for primary Ab species and/or subclass. DAPI was then added to stain nuclei and slides were mounted with Prolong Gold Medium (ThermoFischer Scientific). Most multi-IF staining were performed manually except pan-CK/IgG/IgA and CD3/CD20/PNAd, which were performed on the Discovery XT autostainer (Roche Ventana, Meylan, France). All IF stained slides were scanned with the Panoramic Scan II device (3D Histech, Sysmex, Villepinte, France).

Analysis of multi-IF staining. Digital images were used to evaluate the presence of TLS and to quantify various immune cell populations. Based on CD3/CD20/PNAd or CD3/CD20/IgD staining, tumors were manually scored TLS positive if they contained at least one area harboring dense and segregated B cell and T cell aggregates. TLS with a B cell area composed of CD20⁺IgD⁻ cells surrounded by CD20⁺IgD⁺ naïve B cells were considered as harboring a germinal center. IgA and IgG PC were quantified in the stroma versus the tumor area by using the Halo Image analysis software (Indica labs) based on the pan-CK/IgG/IgA staining. >10 square regions of 1 mm², representing about one-tenth of the entire tissue section, were defined and tissue segmentation was performed according to pan-CK staining (Sup. Fig. 1A). An algorithm was then set to exclude zones with artifacts, necrosis or fibrous areas, and to identify IgG and IgA PC based on a strong intracytoplasmic staining. Cells positive for pan-CK or displaying a membrane IgG or IgA staining were not counted. The number of cells was then calculated by mm² of tissue.

IHC. Single IHC staining of 4 µm thick plain or TMA (PACS08 cohort) tumor sections was performed with Ab (Sup. Table 1) to IgA, IgG, and CD20 (DAKO) using a Discovery XT autostainer (Roche Ventana). Sections were deparaffinized, heated in an antigen retrieval solution, incubated with the primary antibody for 30 to 60 minutes, and were then revealed with a biotinylated secondary Ab bound to streptavidin peroxidase conjugate (Ultratech HRP DAB kit, Coulter Immunotech) followed by DAB substrate. Sections were then counterstained with hematoxylin and mounted. For TMA, a trained pathologist manually counted the number of positive cells per spot and the mean value of the three independent spots per patient was calculated.

Quantification and analysis of immunoglobulins

ELISA and multiplex Ab quantification. Ab classes were quantified in STM from breast tumors with IgA, IgG, and IgM ELISA kits from Invitrogen (ThermoFischer Scientific) according to the manufacturer's instructions. The four subclasses of IgG were measured in the same fluids with the Bio-Plex Pro™ Human Isotyping Panel (Bio-Rad).

Western Blot. Soluble tumor milieu, previously titrated by ELISA for their IgA content, were loaded at an equivalent IgA quantity on Mini-PROTEAN TGX Precast 4%–15% Gels (Bio-Rad) and transferred after migration to a Trans-Blot Turbo Mini PVDF membrane (Bio-Rad). IgA were detected using a goat anti-human IgA (1/5 000, Southern Biotech) and J-Chain with a rabbit anti-human IgJ (1/125, Atlas Antibodies). The J chain WB was performed in denaturing conditions by addition of β-mercaptoethanol and prior heating of STM samples at 95°C for 5 minutes. Serum IgA and colostrum IgA (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, France), and recombinant dimeric IgA (a kind gift of S. Paul, IMAP Saint Etienne) were used as positive controls. Membranes were then incubated with HRP-coupled antibodies, respectively a rabbit anti-goat antibody for IgA (1/10 000, DAKO) or a goat anti-rabbit antibody for Ig-J (1/10 000, Millipore) followed by Luminata™ Crescendo Reagent (Millipore), and developed on a film with a Curix 60 developer (Agfa).

Fluorescent ELISPOT. IgG, IgA, and IgM producing cells were quantified with a three-color fluorospot kit (Immunospot©, Cellular Technology Limited, Cleveland, USA). Serial 2-fold dilutions of cells (starting at $4 \cdot 10^5$ cells per well) prepared from breast tumors were incubated in already coated ELISPOT plates overnight without any stimulus. The remaining steps were performed according to the manufacturer's instructions and spots were counted using the ImmunoSpot® S6 ULTRA-V.

Results

B cells at different stages of differentiation infiltrate invasive breast tumors

B cells have been extensively shown to infiltrate breast tumors (BT) but their phenotypic and functional diversity remains so far poorly characterized. To identify the various B cell subpopulations present within the tumor microenvironment (TME), we analyzed by flow cytometry tumor cell suspensions prepared by enzymatic digestion of fresh BT samples resected from treatment-naïve patients (n=42). B cells, identified as CD19⁺ cells, were detected in all patients, albeit at highly variable frequencies among immune cells, with a median value of 5.8% and an interquartile range of 2.6 to 14.18% (Fig.1A), in accordance with other studies⁵⁵. Interestingly, the number of B cells per mg of tissue correlated with that of total immune cells ($r^2=0.74$, $p<0.0001$, data not shown) and of T cells (Fig.1B). On the basis of surface expression of CD20, CD38, IgD and IgM, 3 major B cell subpopulations (constituting >95% of B cells) were identified: memory B cells (CD20⁺CD38⁻IgD⁻), naïve B cells (CD20⁺CD38⁻IgD⁺IgM⁺) and PC (CD20⁻CD38^{hi}) (Fig.1C), which accounted on average for about 6.2, 2.7 and 0.9 % of the total immune infiltrate, respectively (Fig.1D). A majority of PC and memory B cells expressed CD27 (Fig.1C), as expected, but this marker was not used for subset identification because of its downregulation during enzymatic tumor disaggregation (data not shown). A minor population of CD20⁺CD38^{int} cells was also detected in more than half of the tumors and consisted of germinal center like B cells (GC, IgD⁻IgM⁻) and IgD⁺IgM⁺ cells, most likely corresponding to pre-GC B cells and/or transitional (Ti) B cells (Fig.1C). Thus, BT were heterogeneously infiltrated by B cells at various stages of differentiation including, by decreasing cell densities, memory B cells, naïve B cells, PC, and occasionally Pre-GC/Ti B cells (Fig.1D & E).

Coexistence of both naïve and differentiated B cells in the majority of tumors suggests a possible local B cell differentiation process. We therefore tested for the presence of T follicular helper cells (Tfh), the subset of CD4⁺ T helper cells instrumental for development of antigen-specific B cell immunity. Tfh are usually identified as CD4⁺PD1^{hi}CXCR5⁺ cells, but preliminary experiments on tonsil cell suspensions revealed that CXCR5 expression was highly sensitive to enzymatic digestion, and although it can be recovered to some extent by incubating the cells at 37°C, Tfh were best identified as CD4⁺PD1^{hi}ICOS⁺ cells (Sup. Fig. 2A). Cells with such a phenotype and low surface expression of CXCR5 (Sup. Fig. 2B) were detected in a majority of patients, and, in about half of the tumors, Tfh accounted for about 0.1% or more of the immune infiltrate (Sup. Fig. 2C). No correlation was detected between the number of GC B cells and the number of Tfh (data not shown).

In aggregate, these data indicate that the B cell infiltrate of breast tumors mostly consisted of memory B cells, naïve B cells, and PC and was usually associated with the presence of Tfh cells.

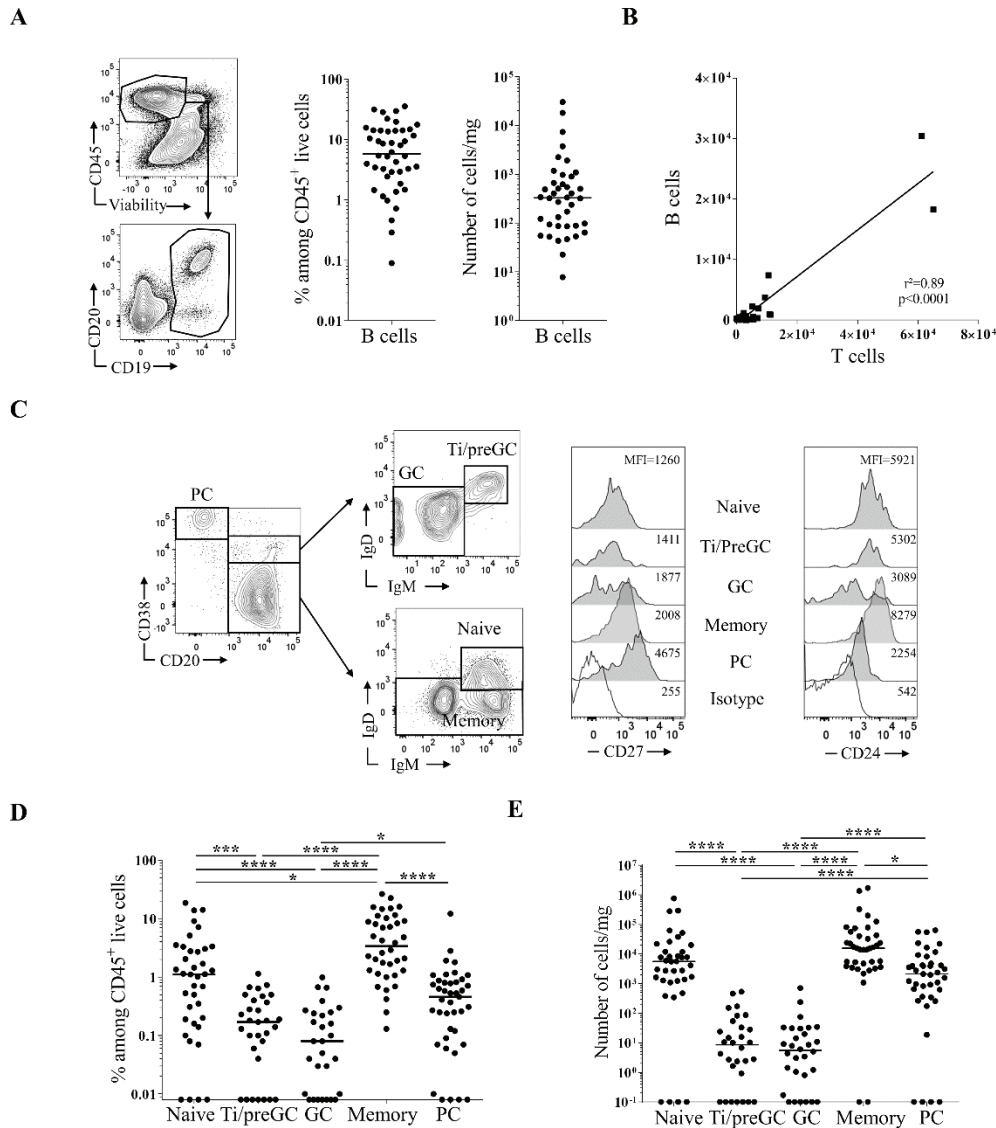


Figure 1. B cells at different stages of differentiation infiltrate invasive breast tumors. (A) Illustration of the flow cytometry gating strategy to identify total B cells among viable CD45⁺ cells in invasive breast tumor cell suspensions and graphs representing their frequency among CD45⁺ cells and their number per mg of tissue (n=42 tumors). (B) Graph representing the correlation between the number of total B cells and T cells (Deming linear regression). (C) Representative FACS scatter-plots allowing to distinguish the different B cell maturation stages among viable CD45⁺CD19⁺ cells, e.g. naïve B cells (CD38⁺IgD⁺IgM⁺), transitional/pre-GC B cells (Ti/Pre-GC, CD38⁺IgD⁺), GC B cells (CD38⁺IgD⁺), memory B cells (CD38⁺IgD⁺) and PC (CD38^{hi}CD20⁺). Right histograms depict CD27 and CD24 expression by the different populations and numbers correspond to the mean fluorescence intensity. (D-E) Percentage among CD45⁺ cells (D) and number/mg (E) of each subset in all analyzed tumors. Horizontal bars represent the median and the statistical analysis was performed with a Kruskal-Wallis test. Due to the logarithmic scales, null values were arbitrarily replaced by 0.01 (D) and 0.1 (E).

Naïve and memory B cells infiltrate breast tumors with or without tertiary lymphoid structures and mostly localize in the stroma

Multiplex IF staining of FFPE breast tumor sections with antibodies to CD3, CD20, and PNAd revealed that B cells mostly localized in the stroma either dispersed in lymphoid aggregates (Fig. 2A left) or functionally organized with T cells in so-called TLS, consisting of B cell follicles adjacent to T cell areas usually containing high endothelial venules (HEV) (Fig. 2A right). Staining for CD3, CD20, and IgD further distinguished TLS without GC (*i.e.* with follicles containing mostly IgD⁺ naïve B cells), from TLS with GC characterized by a ring of naïve B cells surrounding antigen-experienced IgD^{neg} B cells (Fig. 2B). TLS were detected in about two thirds of the patients, in accordance with recent

published data⁵⁶, and harbored at least one GC in 41% of tumors (Fig. 2C). Importantly, naïve ($CD20^+IgD^+$ cells) and memory (non-follicular $CD20^+IgD^{neg}$ cells) B cells were found in both TLS^+ and TLS^{neg} tumors, often in contact with T cells (Fig. 2D). Indeed, for the 25 tumors with both flow cytometry and *in situ* staining data available, there was no significant difference of infiltration by B cell subpopulations between TLS^+ and TLS^{neg} tumors, with the noticeable exception of cells harboring a GC-like phenotype that were found at higher frequencies in tumors with a structured lymphocytic infiltrate (Fig. 2E). Thus, the B cell infiltrate organize in TLS in the stroma of a major proportion of tumors but the presence of the various B cell differentiation stages is not conditioned by such functional immune structuration.

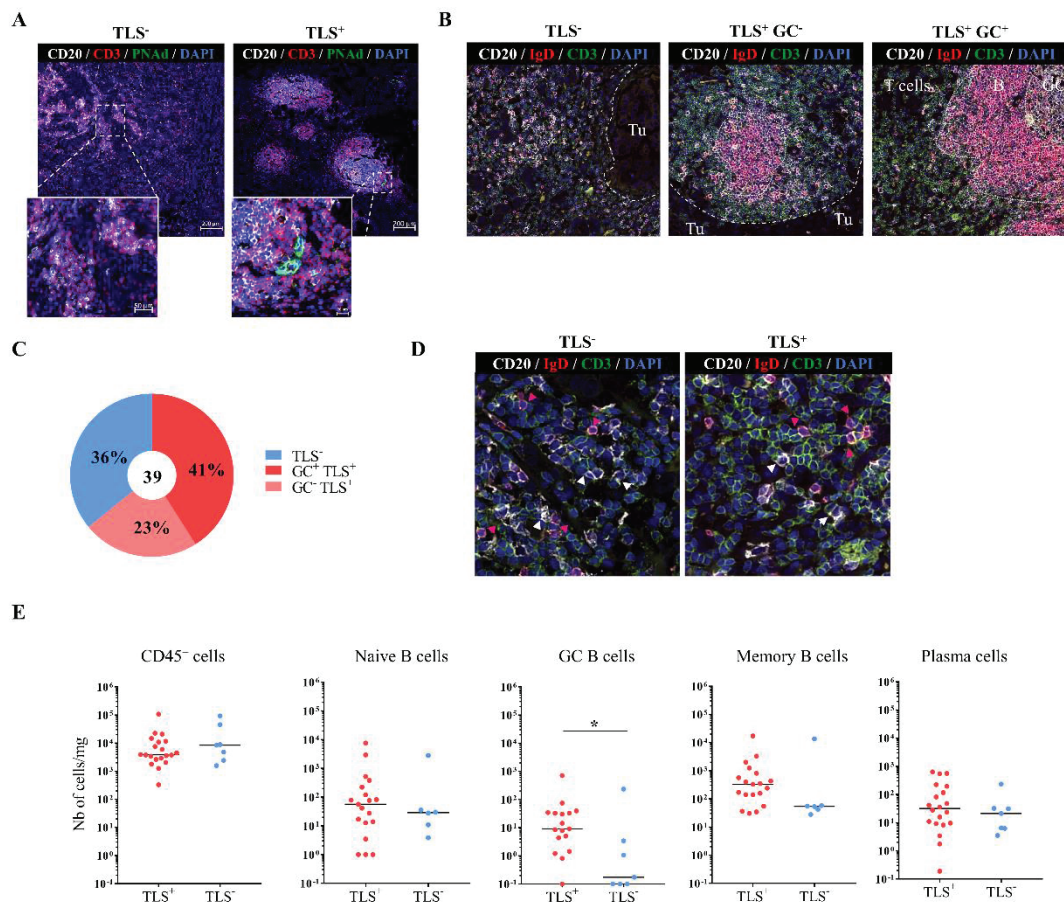


Figure 2. Naive and memory B cells infiltrate invasive breast tumors with or without tertiary lymphoid structures and mostly localize in the stroma. (A-B) Multiplex immunofluorescence staining of FFPE sections of invasive breast tumors for CD20 (B cells), CD3 (T cells), DAPI to denote nuclei and either PNAAd (HEV, A) or IgD (naïve/pre-GC B cells, B). (A) Pictures are representative of a tumor without TLS (left) and a tumor with TLS (right). (B) Pictures illustrate the localization of naïve and memory B cells in tumors without TLS (left), with TLS and no GC (middle) and with TLS harboring a GC (right). (C) Graph showing the percentage of each TLS-related phenotype in the 39 analyzed invasive breast tumors. (D) Representative high-magnification images of the CD20/CD3/IgD IF staining highlighting frequent contacts between T cells and naïve B cells (red arrowheads) or memory B cells (white arrowheads) in tumors with (right) or without (left) TLS. (E) Association of the density of the different B cell subsets in tumors, determined by FCM, with the presence (n=21) or absence (n=7) of TLS assessed by CD3/CD20 IF staining of companion tumor sections. Due to the logarithmic scale, null values were arbitrarily replaced by 0.1. Horizontal bars represent the median and statistical significance was determined by a Mann-Whitney test (* $p < 0.05$).

Tumor-infiltrating memory B cells and plasma cells consist of IgG, IgA, and IgM expressing/producing cells

To characterize further tumor-infiltrating B cell heterogeneity, IgG, IgA, and IgM expression was analyzed by flow cytometry on memory B cells and PC after dual membrane and intracytoplasmic

staining. Memory B cells expressing surface IgG, IgA, or IgM were detected in virtually all tumors, IgG⁺ and IgM⁺ cells accounting each for about 40% of the total memory B cell pool and IgA⁺ memory B cells for the remaining 20% (Fig. 3A). On the contrary, the PC compartment was usually dominated by IgG⁺ cells (72% of PC on average). Yet IgA⁺ PC and, to a lesser extent, IgM⁺ PC, were present at significant proportions and numbers in most tumors accounting for up to 10% and 1% of the tumor infiltrating immune cells, respectively (Fig. 3B).

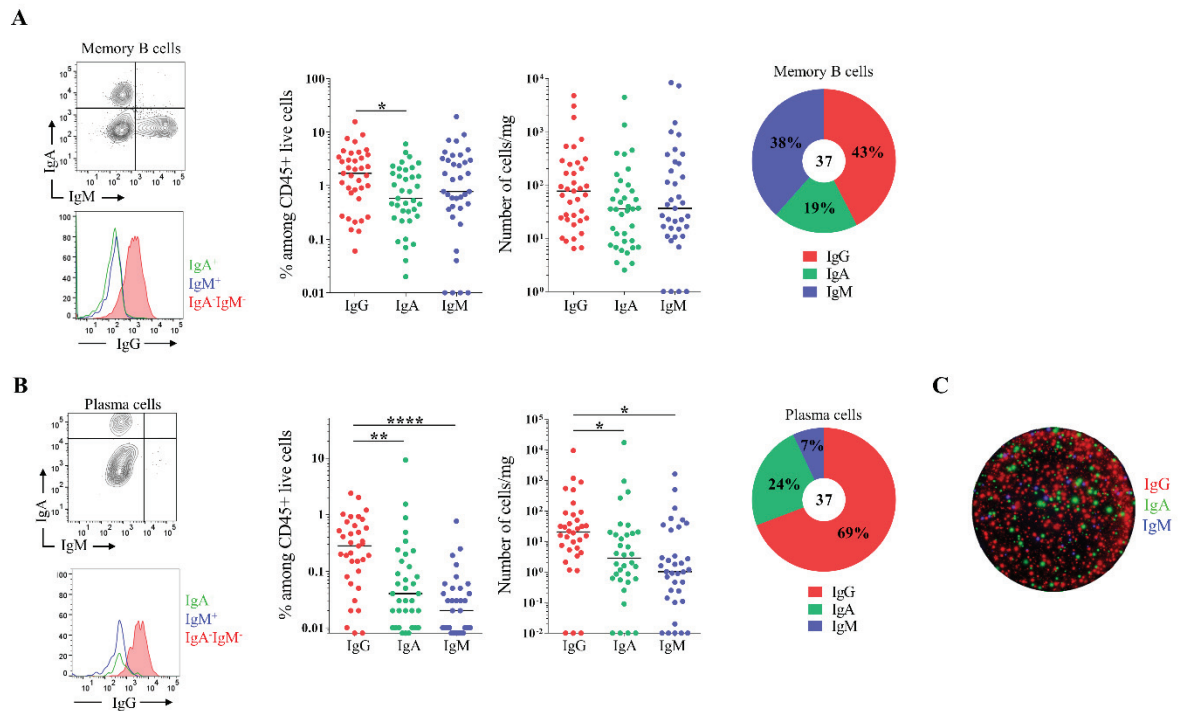


Figure 3. Tumor-infiltrating memory B cells and plasma cells not only express IgG but also IgA and IgM. (A-B) Illustration of the strategy to analyze by flow cytometry expression of IgA, IgG and IgM by tumor-infiltrating memory B cells (CD19⁺CD20⁺CD38^{neg}IgD^{neg}) (A) and PC (CD19⁺CD20^{neg}CD38^{HI}IgD^{neg}) (B). Due to the low intensity of IgG staining, IgG-expressing cells were gated as IgA⁺IgM⁺ cells. Graphs in the middle depict the percentage among CD45⁺ cells (middle) and the number per milligram of tissue (right) of each subtype of memory B cells (A) and PC (B) in the 42 analyzed breast tumors infiltrated by these populations. Due to the logarithmic scales, null values were arbitrarily replaced and displayed on the x-axis. Pie charts on the right show the mean proportion of memory B cells (A) and PC (B) expressing IgG, IgA or IgM. (C) Representative image of a fluorescent ELISPOT assay performed with cells isolated from breast tumors and allowing to visualize IgG, IgA, and IgM producing cells as spot-forming cells.

Infiltration of breast tumors by bona fide antibody producing PC was further documented by a fluorescent ELISPOT assay, which in most instances revealed a dominant population of IgG producing cells, significant numbers of IgA PC and few to very few IgM secreting cells (Fig. 3C), a distribution consistent with the FCM analysis (*data not shown*). Multiplex IF staining of FFPE tumor tissue sections with combinations of Ab to IgG, IgA and pan-cytokeratins (CK) or IgM and pan-CK further revealed tumor infiltration by cells with a high intracytoplasmic concentration of IgG or IgA and few IgM⁺ cells (Fig. 4A). Consistent with these cells being *bona fide* Ab producing cells, most exhibited an eccentric nucleus and virtually all cells with high Ig content were positive for IRF4 in the nucleus (Fig. 4B), the transcription factor that critically controls B cell differentiation into plasmablasts and PC. A diffuse positive staining for IgG and/or IgA was also observed in a fraction of CK-expressing cells, most likely revealing Ab deposits in tumor cells (Fig. 4C & Sup. Fig. 1B). Independently of the Ab isotype they

produce, the majority of PC localized in the stroma in between tumor nests and were only occasionally excluded in the peri-tumor area, but IgG and IgA PC were also often present in tumor nests in close contact with tumor cells (Fig. 4A), as confirmed by a quantitative analysis (Fig. 4D). Such PC densities and diversity were not observed in surrounding healthy mammary tissue, where only a few PC, all producing IgA, were detected beneath the mono-stratified duct epithelium of (Fig. 4E), strongly suggesting that the PC detected in tumor tissues were not resident PC but newly recruited immune cells. Thus, invasive breast tumors are not only infiltrated by IgG PC, but also IgA producing cells, which localize both in the stroma and inside the tumor area.

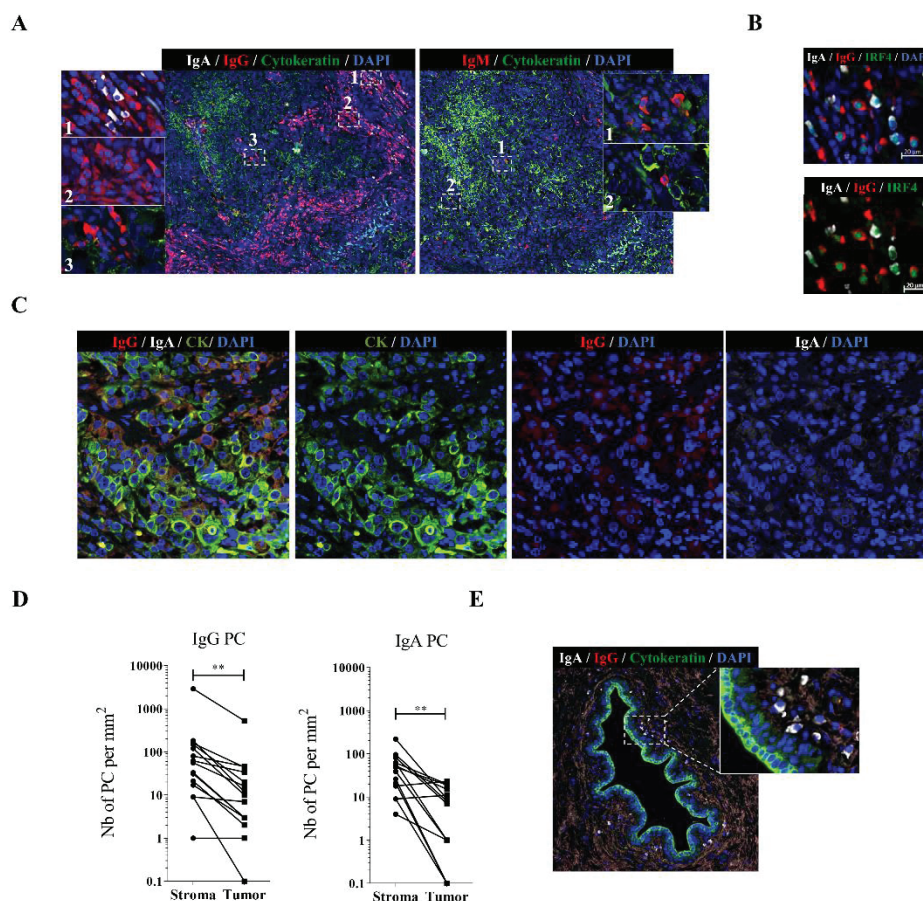


Figure 4. Plasma cells localize both in the stroma and in the tumor areas. (A) Representative images of pan-CK/IgG/IgA and Pan-CK/IgM IF staining of serial FFPE tissue sections showing tumor infiltration by cells with typical features of plasma, e.g. high cytoplasmic Ig content and eccentric nucleus and their location relative to CK⁺ tumor cells. High-magnification images show IgA and IgG PC in the stroma (1 and 2) and in tumor nests (3). (B) Representative immunofluorescence analysis showing that virtually all IgA^{hi} and IgG^{hi} express the plasmablast/PC IRF4 transcription factor in the nucleus. (C) Same IF staining as in (A) showing low IgG and/or IgA staining of CK⁺ tumor cells likely reflecting Ab deposits. (D) Graphs depicting the density of IgG^{hi} (left) and IgA^{hi} (right) PC in tumor versus stromal areas in invasive breast tumors (n=15) using the Halo software. **p<0.01 by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test (E) Illustration of a pan-CK/IgG/IgA IF staining of a tumor-distant normal mammary tissue area showing IgA PC beneath the ductal epithelium.

IgG and both monomeric and dimeric IgA1 and IgA2 are produced in the tumor microenvironment

IgG, IgA, and IgM were quantified by ELISA in a collection of 69 STM recovered during mechanical dissociation of fresh tumors. The three classes of Ab were detected in the majority of tumors and IgG was by far the most represented isotype (Fig. 5A), with a dominance of IgG1, followed by IgG2, IgG3, and IgG4 (Fig. 5B). Although ten times less abundant on average, IgA and IgM were also detected in significant amounts in most patients (Fig. 5A). IgA present in the tumor consisted of both

IgA1 and IgA2, an observation that is in line with tumor infiltration by both IgA1 PC and IgA2 PC detected by immunofluorescence (Fig. 5C). The mean ratio of IgA1 PC to IgA2 PC was 4, close to the serum in which the ratio of soluble IgA1 to IgA2 is around 6.3⁵⁷. IgA exist either as monomers or polymers (mostly dimers) containing the 15 kDa Ig-joining chain (IgJ) and these different molecular entities can exert specific, sometimes opposite, functions through engagement of specific or accessory receptors⁴⁵. Western blot analysis in non-denaturing conditions of a series of eight STM samples with high IgA titers revealed the presence of both monomeric and dimeric IgA in roughly equivalent proportions (Fig. 5D and *data not shown*). On the contrary, mostly monomeric IgA were detected in the serum of the two patients for which matched frozen serum was available (Fig. 5E). Production of dimeric IgA in breast tumor microenvironment was further evidenced by the detection of the Ig-J chain in STM by western blot (Fig. 5D) and Ig-J⁺ IgA plasma cells in tissue sections by multi-IF staining, the latter accounting for about one third of the total IgA plasma cell pool (Fig. 5F). IgA in BT thus display various molecular forms that could elicit different responses.

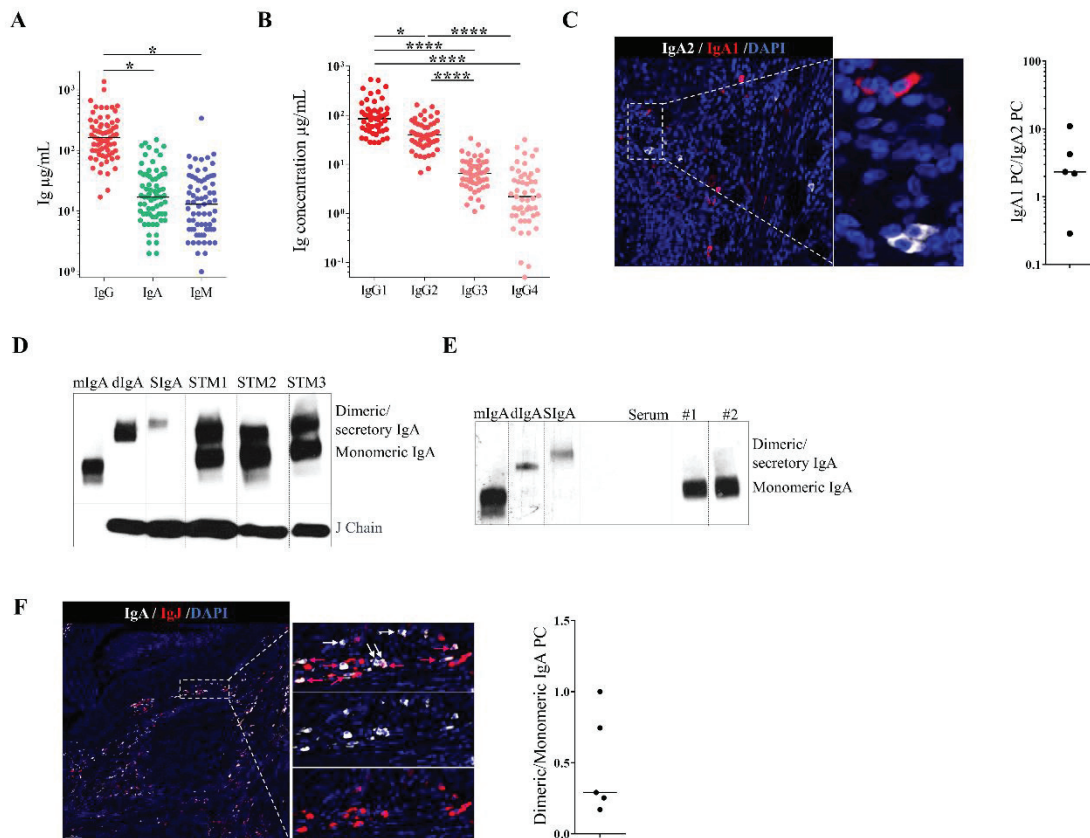


Figure 5 IgG and both monomeric and dimeric IgA and IgA1 and IgA2 are produced in the tumor microenvironment. (A) IgG, IgA, and IgM quantification by ELISA in n=72 soluble tumor milieu (STM) obtained during mechanical dissociation of breast tumors. (B) IgG subclasses quantification by a multiplex electro-chemoluminescence assay in n=51 STM. (C) Representative image of IgA₁/IgA₂ immunofluorescence staining and ratio IgA₁-PC/IgA₂-PC in n=5 breast tumors. (D-E) Western-blot analysis of patient STM (D) and serum (E) to distinguish monomeric IgA from dimeric/secretory IgA based on their molecular weight (D-E) and to reveal the Ig-J chain (D). (F) Immunofluorescence analysis IgA and Ig-J in a representative invasive breast tumor (left) and graph depicting the ratio of IgJ⁺IgA⁺ PC to IgJ⁻IgA⁺ PC (n=5). For all graphs, horizontal bars correspond to the median.

In situ breast carcinomas displayed an elevated IgA PC to IgG PC ratio compared to invasive carcinomas

Because IgG PC and IgA PC may differentially affect tumor progression, we analyzed the ratio of IgA to IgG PC. Calculation of this ratio from the FCM data revealed a strong domination of IgG PC over IgA PC (ratio <0.5) in a majority of invasive tumors. However, seven out the 30 tumors (23%) with a PC contingent were strikingly enriched in IgA PC (ratio ≥ 0.5) (Fig. 6A). Four-color IF staining of tissue sections confirmed that the quality of the PC infiltrate can differ in-between breast tumors, but showed a majority of tumors infiltrated by a similar quantity of IgA and IgG PC, while others are enriched in IgG or in IgA PC (Fig. 6B-C). To get insight into the evolution of the PC compartment during breast cancer progression, we also analyzed ductal carcinomas *in situ* (DCIS), an early form of breast tumor that remains confined to the duct but can evolve into invasive cancer. Analysis of a series of 15 samples revealed that all tumors but one were infiltrated by PC that localized exclusively in the periphery of the tumor near other immune cells (Fig. 6D). Interestingly, compared to low grade tumors, high grade tumors displayed increased infiltration by both IgG and IgA PC, although statistical significance was only reached for the latter PC population ($p=0.0047$) (Fig. 6E). Strikingly, in all PC-containing tumors, whatever the grade, IgA PC density was significantly higher than IgG PC density leading to IgA/IgG PC ratio ranging from 1.6 to 21.8 with a mean of 9.7 (Fig. 6F). *In situ* breast carcinomas are thus enriched in IgA PC compared to more aggressive invasive tumors.

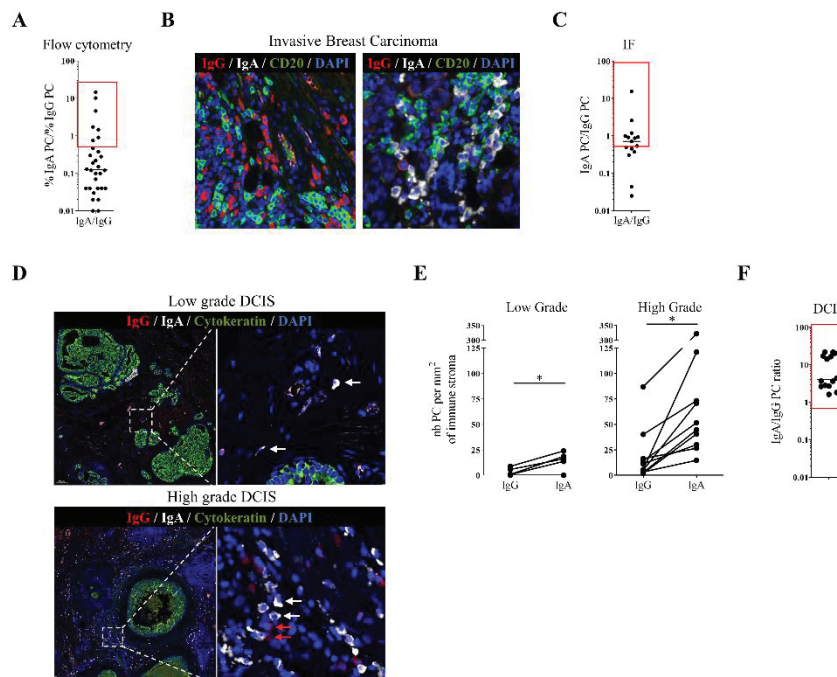


Figure 6. *In situ* breast carcinomas displayed an elevated IgA PC to IgG PC ratio compared to invasive carcinomas. (A) IgA/IgG PC ratios calculated using the percentages of each subset determined by FCM in invasive breast tumors infiltrated by PC. Due to the logarithmic scale, null values were arbitrarily replaced by 0.01. (B) Representative images of invasive tumors with a PC contingent dominated by IgG- (left) versus IgA- (right) producing cells revealed by immunofluorescence tissue analysis of IgA, IgG and CD20. (C) IgA-PC to IgG-PC ratios determined by quantification of IgG^{hi} and IgA^{hi} cells on FFPE sections of invasive ductal carcinomas (n=15) using the HALO™ software. (D) Representative illustrations of pan-CK/IgG/IgA IF staining of low grade versus high-grade DCIS showing IgA (white arrows) and IgG (red arrow) PC exclusively localized in the peri-tumor stroma next to cytokeratin⁺ tumor cells. (E) Graphs depicting the number of IgA and IgG PC per mm² of tissue in low grade (n=5) versus high grade (n=10) DCIS. Statistical significance was determined using a Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (F) Graphs representing the ratio of IgA to IgG PC in all DCIS samples studied. Horizontal bars represent the median.

Impact of B cells and plasma cell subsets densities on patient prognosis

In order to analyze the impact of the quality of the B cell infiltrate on the prognosis of patients, we took advantage of the UNICANCER-PACS08 multi-centric phase-III trial, which included 762 patients with localized triple negative (n=592) or ER⁺PR⁺HER2⁻ (n=170) breast cancer. Single IHC staining of TMA for CD20, IgG and IgA (Fig. 7A) revealed heterogeneous infiltration by B cells and PC and confirmed, in a large cohort of patients, that IgG PC usually outnumbered IgA PC in invasive breast cancer (Fig. 7B). Analysis of the relationships with patient clinico-pathological characteristics indicate that all 3 immune cell subsets were associated with the hormonal status (increased in TNBC), B cells with age, and B cells and IgG PC with the SBR grade (Sup. Table 2). Patients were stratified according to their low versus high density of tumor-infiltrating B cells, IgG PC and IgA PC using the third quartile as the cut-off (Fig. 7 C-E) and a Kaplan-Meier analysis was performed to determine the impact of each individual cell subset on patient survival. Compared to patients with limited B cell infiltration, CD20^{Hi} patients had improved disease free survival (DFS) and increased overall survival (OS), although statistical significance was only reached for DFS (Fig. 7C). Although, no significant association was detected for PC, it is worth mentioning that IgA^{Hi}, but not IgG^{Hi}, patients displayed a tendency for an increased DFS and OS, with a clear dissociation of the curves for DFS (Fig. 7D-E). Since both additive and antagonistic functions have been reported for IgG and IgA, we also stratified the patients according the high or low density of each PC subsets (IgG^{Hi}/IgA^{Hi}, IgG^{Hi}/IgA^{Lo}, IgG^{Lo}/IgA^{Hi}, and IgG^{Lo}/IgA^{Lo}). Intriguingly, only the IgG^{Hi}/IgA^{Lo} group had a tendency for a reduced OS (Sup. Fig. S3). Altogether, these results confirmed the good prognosis value of B cells and revealed that IgA PC rather than IgG PC may have a positive impact on patient survival.

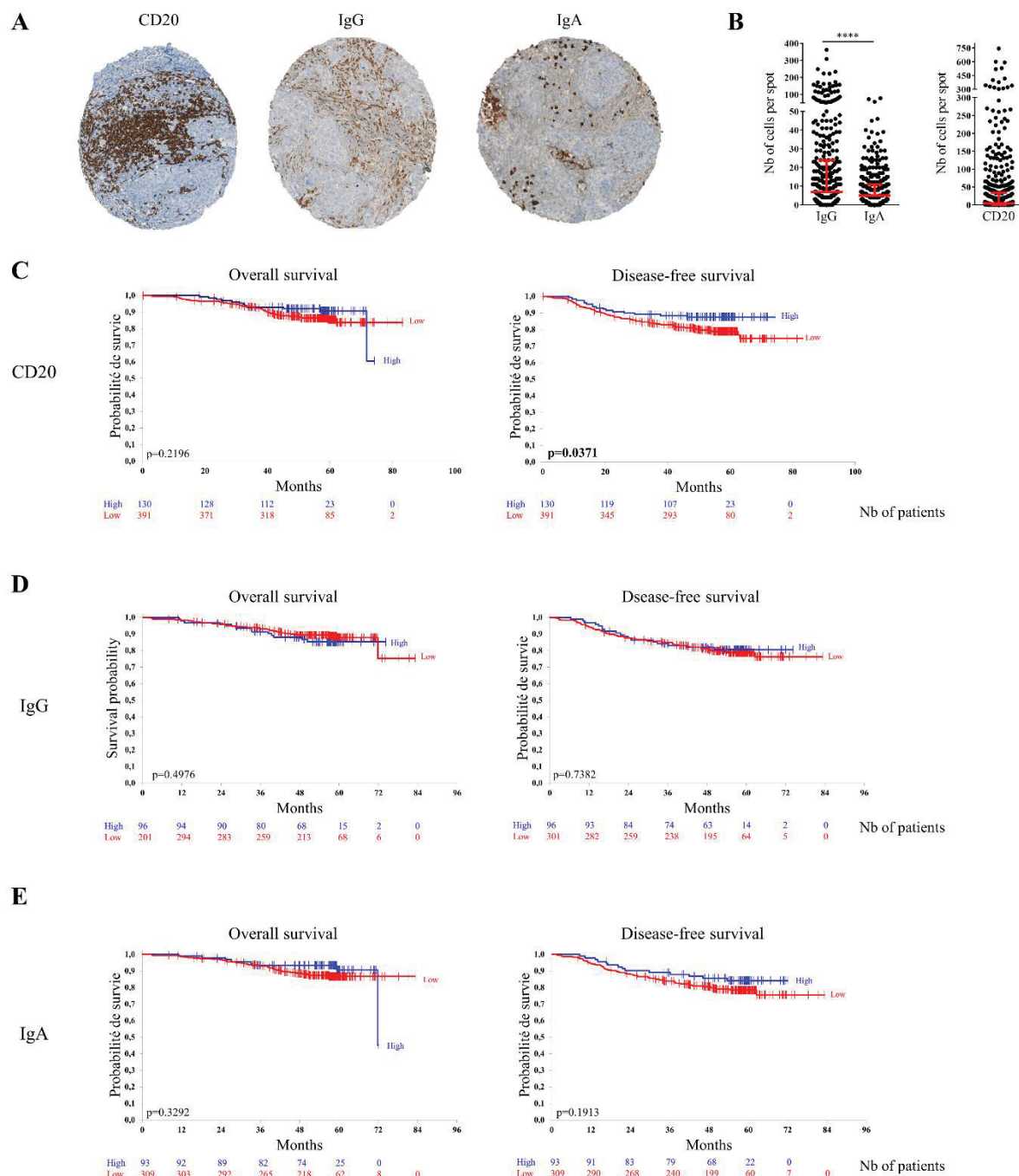


Figure 7. Impact of B cells and plasma cell subsets on patient prognosis. (A) Illustration of the staining of CD20⁺ B cells, IgG PC and IgA PC on TMA of the PACS08 Unicancer cohort using single color IHC. (B) Graphs representing the number of CD20⁺ B cells, IgG PC and IgA PC per spot (mean of three spots counted manually for each patient). Horizontal bars represent the median and the third quartile. ****p<0.0001 by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (C-E) Kaplan-Meier analysis of the prognostic impact of CD20⁺ B cells (C), IgG PC (D), and IgA PC (E) density on patients OS (left) and DFS (right), comparing the 25% of patients with the highest density of cells (High) to the 75% with the lowest density of cells (Low). Statistical significance was evaluated by the log-rank test.

Discussion

B cells and humoral immunity have recently gained renewed interest in breast cancers since it was demonstrated that the density, quality and structuration of the B cell infiltrate have important impacts on patient prognosis⁵⁸. Yet, the so far reported associations between tumor B cell infiltration at the time of surgery and risk of cancer recurrence and overall patient survival are to some extent controversial⁵⁹. One possible explanation lies in the fact that, compared to other immune cells like T lymphocytes and macrophages, our understanding of B cell phenotypic and functional heterogeneity in tumors is still rather limited. Here, using multiplex -FCM and -IF tumor tissue imaging, we show that most breast tumors are infiltrated by virtually all stages of B cell differentiation, with a dominance of memory B cells, naïve B cells and PC, the latter producing not only IgG but also monomeric and dimeric IgA. Importantly, we reveal that while only a minor proportion of invasive breast tumors has a PC compartment dominated by IgA producing cells, virtually all *in situ* breast carcinomas are highly enriched in IgA PC, suggesting a differential role of the two PC subsets in anti-tumor immunity.

To our knowledge, the present study is the first to provide a deep and comprehensive analysis of the heterogeneity of the B cell infiltrate in breast tumors. Our FCM analysis of cell suspension prepared from more than 40 surgical tumor fragments by mechanical and enzymatic digestion, combining antibodies to both surface subset markers and four classes of immunoglobulins show that B cells accounted for about 10% of immune cells. They mostly consisted of memory B cells (CD19⁺CD20⁺CD38^{neg}CD27⁺IgD^{neg} cells), naïve B cells (CD19⁺CD20⁺CD38^{neg}IgD⁺IgM⁺ cells), and plasma cells (CD19⁺CD20^{neg}CD38^{hi}CD27^{hi}IgD^{neg} cells), representing on average 68, 21, and 11% of total B cells, respectively. These results appear a bit different from those of two recent reports, indicating presence of naïve and memory B cells in equal proportions (about 40-45% of the B cell infiltrate, each) and minor quantities of PC^{26,27}. This is most likely explained by the use of a more restricted set of markers in these studies. Memory B cells have been intriguingly reported to harbor an atypical CD27 negative phenotype in high grade ovarian carcinomas²⁹. Although this marker was part of our flow cytometry Ab panel and was detected to some extent on memory B cells infiltrating breast tumors, we obtained evidence that its expression was decreased by the enzymes used to prepare single cell suspensions, preventing any definitive conclusion. Besides these 3 major B cell subsets, which have also been characterized in non-small cell lung tumors as well²⁸, breast tumors can also be infiltrated by Germinal Center B cells and by a population of IgD⁺IgM⁺CD38⁺ cells, which could not be further deconvoluted due their scarcity, but likely corresponded to Ti B cells and/or pre-GC B cells⁶⁰.

The presence of B cells at virtually all stages of differentiation suggest a local differentiation or amplification process. This hypothesis is supported by the detection by FCM of CD4⁺ T cells with the phenotype of Tfh (PD1^{hi}ICOS⁺) and the fact that TLS with segregated T and B cell zones, containing sometimes GC, were detected on companion FFPE tissues by multiplex IF staining in about two thirds of the breast tumors, in accordance with previous studies^{31,61}. Such structuration of the lymphocytic

infiltrate in breast tumors, resembling that of secondary lymphoid organs, has been previously shown to be associated to oligoclonal B cell expansion and differentiation^{62,63}. Although representing a minor population among B cell subsets, only GC B cell frequency was significantly correlated to the TLS status of the tumor. *In situ* IF staining of tumor tissue sections with antibodies to CD3, CD20 and IgD further revealed that naive B cells not only localized in aggregates in B cell follicles of TLS positive tumors but were also found dispersed in the immune stroma, often in contact with T cells - as were memory B cells - whether or not TLS were present. This, together with the fact that our FCM analysis revealed that Tfh cells can infiltrate tumors with no detectable TLS, could indicate that a T-cell/B-cell crosstalk favoring induction or amplification of humoral immunity in tumors does not require prior functional structuration of immune cells in TLS.

At least part of B cell functions in tumors is thought to be mediated by the antibodies they produce. Although the capacity of Ab to kill tumor cells strikingly varies depending on the classes and subclasses of Ab, due to their differential ability to activate the complement pathway and to trigger the cytotoxic and/or phagocytic potential of accessory cells through Fc receptors, it is worth mentioning that the diversity of Ab present/produced in the TME is so far poorly appreciated. Studies in ovarian cancer indicate that TI antigen-experienced memory B cells and plasma cells consisted virtually exclusively of IgG expressing cells^{29,30}. In addition, several recent reports indicate that besides IgG producing, IgA PC can be occasionally detected in the TME of several solid tumors, including melanomas³⁶, hepatocellular carcinomas⁵² and prostate cancers³⁷. Furthermore, TI PC producing IgG4, a subclass of IgG known to inhibit ADCC/ADCP, have been described in melanomas³⁸ and cholangio-carcinomas³⁹. Our FCM data revealed that about 10% of the B cells infiltrating invasive breast tumors harbored the phenotype of PC and consisted not only of a majority of IgG positive cells, but also of a significant contingent of IgA, and to a lesser extend of IgM, producing cells. Such a diversity of Ab expression also applied to memory B cells. Tumor infiltration by bona fide IgG, IgA and IgM producing cells was further evidenced by an ELISPOT assay on tumor cell suspensions. In addition, using multi-IF tumor tissue imaging, we showed that cells with a high IgG, IgA or IgM intracytoplasmic content indeed harbored the typical morphology and features of PC, *i.e.* an eccentric nucleus, no detectable expression of surface CD20, but nuclear expression of the IRF4 transcription factor essential for PC generation⁶⁴. Importantly, PC were particularly abundant in the immune stroma, but about 15-20% of IgG and IgA producing cells also localized at the stroma/tumor interface and inside the tumor itself. This indicates that at least part of the PC likely release their Ab in the close vicinity of tumor cells. Intriguingly, although IgG and IgA PC generally had no differential distribution and usually coexisted inside tumors albeit at different relative ratios in-between patients, distinct IgG PC-rich and IgA PC-rich areas can be detected in some tumors (Sup. Fig. 1C), suggesting the possible existence inside tumors of discrete niches favoring the specific recruitment, differentiation and/or survival of IgG PC versus IgA PC. Ab titration of a series of breast tumor supernatants, collected after initial tumor mincing, further confirmed production in the TME of the different Ab classes, with again a dominance of IgG, over IgA

and IgM. The four IgG subclasses could be detected in the TME with a dominance of IgG1 and IgG2 over IgG3 and IgG4, a distribution similar to that in serum of healthy individuals. Altogether, these data in breast tumors highlight for the first time the extreme heterogeneity of the tumor-infiltrating PC compartment that results in the local production of the four IgG subclasses, IgA and IgM.

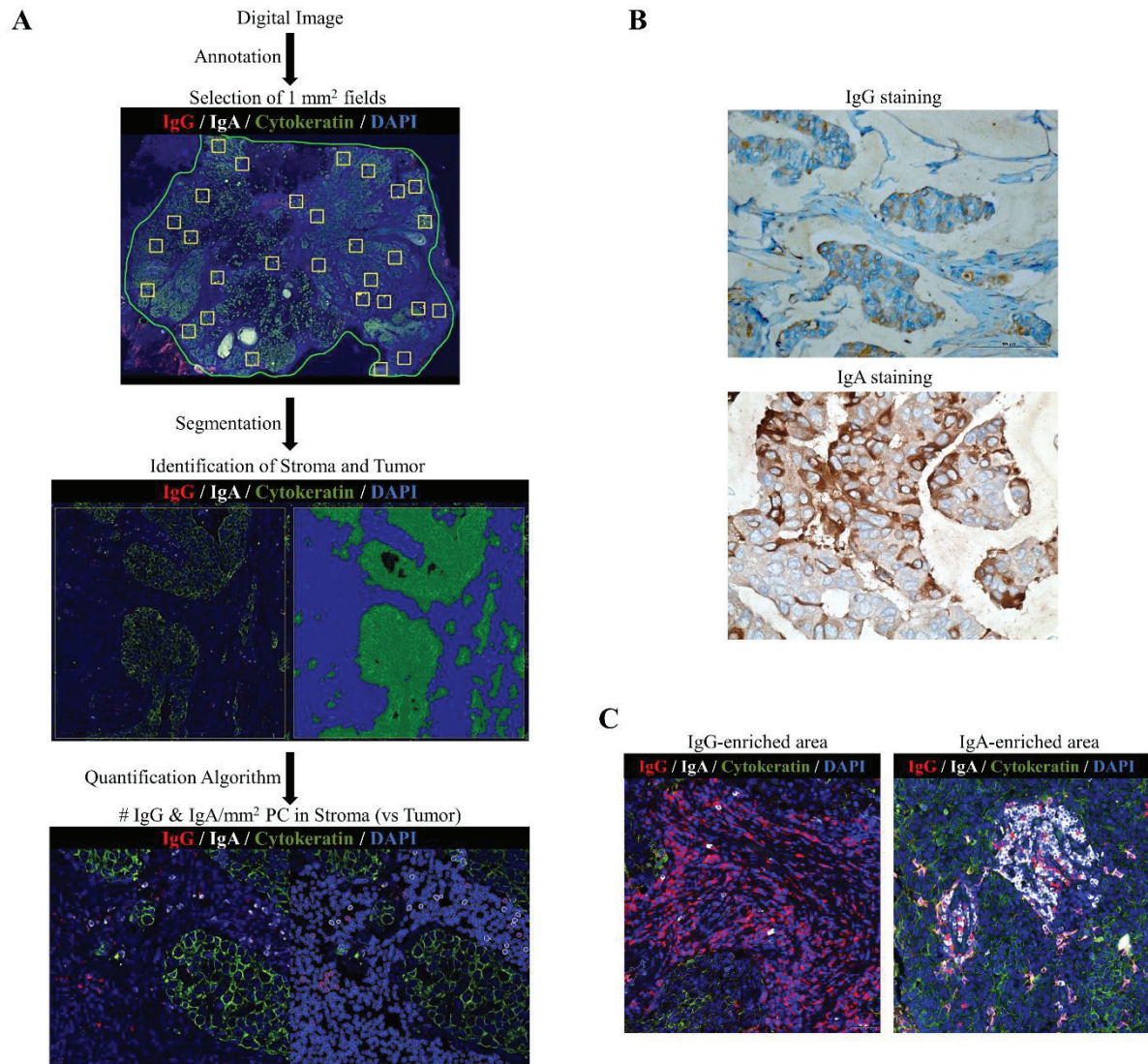
IgA are constituted by 2 subclasses in Human, with IgA1 being predominant in serum while IgA2 is enriched in mucosal tissues⁶⁵. They mostly differ by the hinge region linking the two Fab arms, which is larger in IgA1 and confers an increased potential to bind to bivalent distant epitopes with higher affinity than IgA2, but also an increased sensitivity to bacterial proteases. In addition, IgA2 display an increased number of glycosylations in its Fc part and has been reported to display superior capacity to elicit ADCC by neutrophils *via* CD89 compared to IgA1 and IgG⁶⁶. In this context, it is worth mentioning that we could detect both IgA1 PC and IgA2 PC in breast tumors. IgA exist as several molecular entities, mostly monomers and dimers, which can exert pro- or anti-inflammatory functions through their capacity to engage distinct receptors⁶⁷ or to trigger opposite signaling pathways after binding to the Fc α receptor CD89^{31,68}. By analyzing a series of breast tumor supernatants by western blot, we showed that IgA produced in the TME consisted of both monomeric IgA and dimeric IgA in roughly equal proportions, while IgA in the serum of patients and of healthy donors were mostly monomeric. Together with the detection of PC co-expressing IgA and the Ig-J chain as well as IgA-single positive cells, this demonstrates that both mIgA and dIgA are produced in the TME. In aggregate, our data demonstrate production of both monomeric and dimeric, as well as both IgA1 and IgA2 in breast tumors and suggest that such strong molecular diversity of the IgA response in the TME should be considered, in addition to IgG subclasses, to decipher the pro- or anti-tumor role of humoral immunity in tumors.

PC infiltration has been documented in most cancer types and a high density of PC in tumors at the time of diagnosis is usually associated with better patient overall and disease-free survival^{18,56}, with the noticeable exception of kidney cancers⁶⁹. In breast cancer however, the impact of PC infiltration, measured by IHC staining for CD138 or by expression of a PC gene signature or even the sole Ig kappa light chain, remains controversial. Indeed, several reports showed a positive association between a high PC density and OS and DFS^{18,35}, while others revealed the exact opposite association^{10,17,70}. One possible explanation might rely on the heterogeneity of the PC compartment with the potential existence of pro- and anti-tumor entities, as this is the case for virtually all other immune populations. To determine whether the class of Ab produced by PC may dictate their function, we first compared the quality of the PC infiltrate in early versus advanced invasive tumors. Ductal carcinoma *in situ* is a non-invasive form of breast cancer characterized by the confinement of proliferating malignant ductal cells by the basement membrane lining the mammary ducts. Whereas the majority of lesions are thought to remain non-progressive, others can evolved to invasive carcinoma, justifying quasi-systematic surgery. Compared to their invasive counterparts, such early tumors usually present with higher densities of immune cells in the stroma⁷¹ and frequent organization of the stromal lymphocytic infiltrate in TLS⁷², known to favor

Th1 and cytotoxic CD8⁺ T cell immunity^{15,73}, suggesting more efficient immune surveillance of breast tumors at the *in situ* stage. This is consistent with the recent study of Gil del Alcazar et al., revealing a switch to a less active immune environment during *in situ* to invasive transition, characterized by reduced density of activated cytotoxic CD8⁺ T cells⁷⁴. Our own series of multi-IF tissue staining indicated that both types of tumors displayed comparable densities of PC but revealed a striking predominance of IgA PC over IgG PC in the 15 tested pure DCIS with a mean IgA/IgG ratio around 10. Such predominance of IgA PC was only observed in less than 20% of patients with invasive breast cancer. It is most likely that this imbalance in PC populations is the consequence of tumor development and not the reflect of the persistence of normal mammary tissue resident PC, which mostly consist of IgA producing cells lining the duct epithelium⁷⁵. Indeed, IgA PC almost exclusively localized in the immune stroma surrounding malignant lesions and their density was significantly increased in high-grade compared to low-grade tumors. Whether such local IgA-biased immunity contribute to efficient control of early tumors is currently unknown but it is worth mentioning that, despite IgA cannot activate the conventional complement pathway, they are highly efficient to induce monocyte/macrophage phagocytosis and tumor cell killing by neutrophils^{76,77}, which are known to infiltrate DCIS⁷⁴ (and *data not shown*).

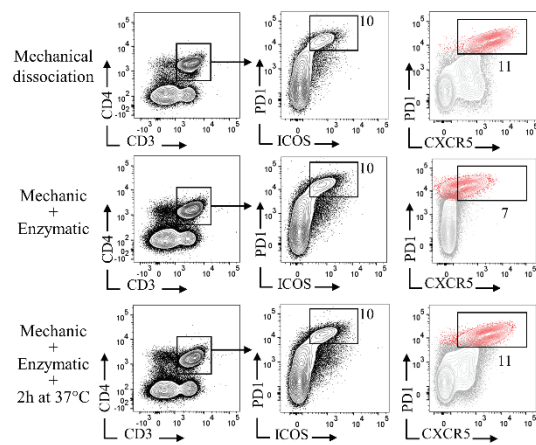
We also took advantage of the phase III randomized Unicancer-PACS08 clinical trial aimed to compare two adjuvant treatments in more than 750 patients with localized triple negative or ER⁺PR^{neg} breast cancer⁷⁸ to analyze the respective clinical impact of CD20⁺ B cells, IgG and IgA PC. After stratifying tumors as High or Low for each of these markers, Kaplan-Meier curves revealed that patients with a high B cell infiltrate had increased DFS and OS, in accordance with other reports^{11,35}, although statistical significance was only reached for DFS. For PC, a tendency toward increased OS and DFS was only seen for IgA^{Hi} tumors, although it did not reach statistical significance. This indicate that IgA, but not IgG, producing cells might play a prime role in tumor control and could constitute the best predictor of prognosis within the PC compartment. Analysis of the combined prognostic value of IgG and IgA PC only revealed a non-significant tendency of IgA^{Lo}IgG^{Hi} patients for reduced survival, which may indicate a deleterious effect of IgG PC when not balanced by IgA PC. A revised statistical analysis incorporating the recently released cohort clinical update with more than 40 additional events should determine whether such tendencies can be confirmed. Yet, in face of the heterogeneity of the PC infiltrate that we have documented, the present study suffers from the important limitation that PC density was evaluated from TMA and thus needs to be reproduced on a cohort of patients with plain tissue sections. If confirmed, such a protective role of IgA PC in breast tumors would contrast with their deleterious role in prostate and liver cancer proposed by Shalapour and colleagues^{37,52}. They indeed showed, in mouse models, that TI IgA PC suppress anti-tumor CD8⁺ cytotoxic T cells through expression of PD-L1 and production of IL-10. It should be mentioned however that although IgA PC expressing these two suppressive molecules have been documented in human liver and prostate tumors

whether they negatively affect patient clinical outcome remains to be determined. In addition, the absence of a high affinity receptor for Fc α in mice may mask the potential anti-tumor function of IgA.

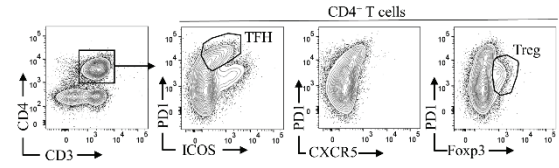


Supplementary figure 1. Ab deposits in tumor cells and strategy to quantify PC in tumor tissue sections. (A) IgG and IgA single IHC staining of an invasive breast tumor FFPE section showing deposition of IgG or IgA in tumor cells. (B) Illustration of the strategy used to quantify IgA and IgG PC in invasive breast tumors based on pan-CK/IgG/IgA/DAPI IF staining using the HALO quantitative digital image analysis software. (C) Illustration of a tumor with distinct IgG-PC-rich and IgA-PC-rich areas.

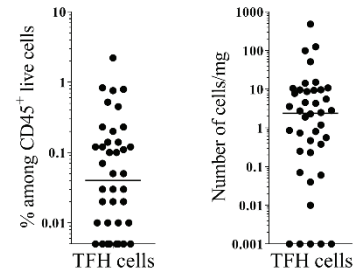
A



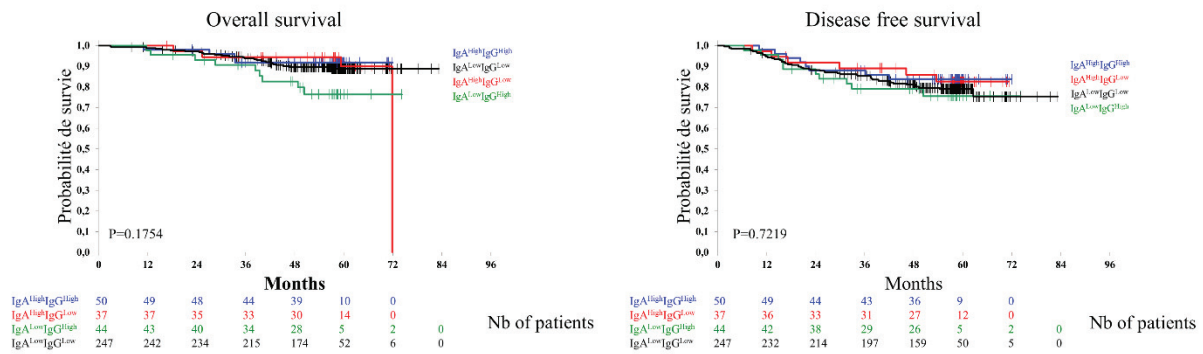
B



C



Supplementary figure 2. Identification of Tfh cells by flow cytometry. (A) Comparison of PD1, ICOS and CXCR5 expression on tonsil CD3⁺CD4⁺ T cells stained after mechanical dissociation (upper panels) or combined mechanical/enzymatic dissociation either immediately (middle panels) or followed a 2.5 hours incubation at 37°C (lower panels). (B) Illustration of the strategy used to identify Tfh and Treg cells in breast tumor cell suspensions. (C) Graphs representing the percentages (left) and the number per mg of tumor (right) of Tfh cells in n=42 breast tumors.



Supplementary figure 3. Combined prognostic value of IgG and IgA PC. A Kaplan-Meier analysis was performed to analyze the combined prognostic values of IgA and IgG PC on patient OS and DFS using the PACS08 cohort. Ig^{hi} patients were selected as the 25% of patients with the highest density of Ig producing cells. Statistical significance was evaluated by the log-rank test.

Antibody	Provider	Clone	Isotype	Dilution	Incubation time	IHC/IF	Staining method
CD20	DAKO	L26	Mouse IgG2a	200	32 minutes	IHC	Autostainer
CD20	DAKO	L26	Mouse IgG2a	400	1 hour	IF	Autostainer/Manual
CD3	DAKO	Polyclonal	Rabbit IgG	300	1 hour	IF	Autostainer/Manual
IgA	DAKO	Polyclonal	Rabbit IgG	1500	1 hour	IHC	Autostainer
IgA	DAKO	Polyclonal	Rabbit IgG	500	1 hour	IF	Autostainer/Manual
IgA1	Abcam	B2506B4	Mouse IgG1	25	1 hour	IF	Manual
IgA2	Abcam	RM125	Rabbit IgG	100	1 hour	IF	Manual
IgD	Southern Biotech	Polyclonal	Goat IgG	200	1 hour	IF	Autostainer
IgG	DAKO	Polyclonal	Rabbit IgG	20 000	1 hour	IHC	Autostainer
IgG	Southern Biotech	Polyclonal	Goat IgG	500	1 hour	IF	Autostainer/Manual
IgJ	Biologend (Atlas)	Polyclonal	Rabbit IgG	200	1 hour	IF	Manual
IgM	DAKO	Polyclonal	Rabbit IgG	300	1 hour	IF	Autostainer
IRF4	DAKO	MUM1p	Mouse IgG1	25	1 hour	IF	Manual
Pan-Cytokeratins	DAKO	AE1-AE3	Mouse IgG1	50	1 hour	IF	Autostainer
PNAd	BD Biosciences	MECA-79	Rat IgM	100	1 hour	IF	Manual

Supplementary table 1: Antibodies used for in situ staining

Supplementary table 2: Association of tumor-infiltrating B cells, IgG PC and IgA PC with clinico-pathological parameters in the PACS08 cohort.

	IgA plasma cells				IgG plasma cells				CD20 B cells			
	Low (n=309)	High (n=93)	All (n=402)	P-value	Low (n=301)	High (n=96)	All (n=397)	P-value	Low (n=391)	High (n=130)	All (n=521)	P-value
Age												
Mean (SD)	52.6(10.4)	50.9(9.9)	52.2(10.3)	<i>0.103</i>	52.8(10.2)	52.7(9.3)	52.8(10.0)	<i>0.700</i>	53.1(10.1)	49.7(10.2)	52.2(10.2)	<0.001
Median (min; max)	53.8(24; 71)	49.0(32; 72)	53.2(24; 72)	<i>Wilcoxon</i>	53.8(26; 72)	54.5(29; 69)	53.9(26; 72)	<i>Wilcoxon</i>	54.2(26; 71)	48.9(24; 72)	53.0(24; 72)	<i>Wilcoxon</i>
Tumor size												
≤ 20mm	102(33%)	33(35.5%)	135(33.6%)	<i>0.658</i>	98(32.6%)	36(37.5%)	134(33.8%)	<i>0.373</i>	126(32.2%)	48(36.9%)	174(33.4%)	<i>0.325</i>
> 20mm	207(67%)	60(64.5%)	267(66.4%)	<i>Chi-2</i>	203(67.4%)	60(62.5%)	263(66.2%)	<i>Chi-2</i>	265(67.8%)	82(63.1%)	347(66.6%)	<i>Chi-2</i>
Stage pt												
1	101(32.7%)	33(35.5%)	134(33.3%)	<i>0.659</i>	97(32.2%)	36(37.5%)	133(33.5%)	<i>0.728</i>	124(31.7%)	48(36.9%)	172(33.0%)	<i>0.343</i>
2	192(62.1%)	58(62.4%)	250(62.2%)		190(63.1%)	57(59.4%)	247(62.2%)		244(62.4%)	79(60.8%)	323(62.0%)	
3	15(4.9%)	2(2.2%)	17(4.2%)	<i>Fisher Exact</i>	13(4.3%)	3(3.1%)	16(4.0%)	<i>Fisher Exact</i>	22(5.6%)	3(2.3%)	25(4.8%)	<i>Fisher Exact</i>
4	1(0.3%)	0(0.0%)	1(0.2%)		1(0.3%)	0(0.0%)	1(0.3%)		1(0.3%)	0(0.0%)	1(0.2%)	
Histological type												
Ductal	272(88.0%)	87(93.5%)	359(89.3%)	<i>0.565</i>	265(88.0%)	86(89.6%)	351(88.4%)	<i>0.085</i>	341(87.2%)	117(90.0%)	458(87.9%)	<i>0.52</i>
Lobular	17(5.5%)	3(3.2%)	20(5.0%)		20(6.6%)	2(2.1%)	22(5.5%)		22(5.6%)	4(3.1%)	26(5.0%)	
Both	5(1.6%)	0(0.0%)	5(1.2%)	<i>Fisher Exact</i>	4(1.3%)	0(0.0%)	4(1.0%)	<i>Fisher Exact</i>	5(1.3%)	3(2.3%)	8(1.5%)	<i>Fisher Exact</i>
Other	15(4.9%)	3(3.2%)	18(4.5%)		12(4.0%)	8(8.3%)	20(5.0%)		23(5.9%)	6(4.6%)	29(5.6%)	
SBR grade												
1	4(1.3%)	1(1.1%)	5(1.3%)	<i>0.167</i>	5(1.7%)	0(0.0%)	5(1.3%)	<i>0.005</i>	5(1.3%)	0(0.0%)	5(1.0%)	<0.001
2	62(20.2%)	11(11.8%)	73(18.3%)	<i>Fisher Exact</i>	67(22.4%)	9(9.4%)	76(19.2%)	<i>Fisher Exact</i>	88(22.6%)	7(5.4%)	95(18.3%)	<i>Fisher Exact</i>
3	241(78.5%)	81(87.1%)	322(80.5%)		227(75.9%)	87(90.6%)	314(79.5%)		297(76.2%)	123(94.6%)	420(80.8%)	
In situ component												
No	123(39.8%)	48(51.6%)	171(42.5%)	<i>0.075</i>	120(39.9%)	48(50.0%)	168(42.3%)	<i>0.215</i>	168(43.0%)	64(49.2%)	232(44.5%)	<i>0.459</i>
Yes	168(54.4%)	43(46.2%)	211(52.5%)	<i>Chi-2</i>	165(54.8%)	44(45.8%)	209(52.6%)	<i>Chi-2</i>	202(51.7%)	60(46.2%)	262(50.3%)	<i>Chi-2</i>
Unknown	18(5.8%)	2(2.2%)	20(5.0%)		16(5.3%)	4(4.2%)	20(5.0%)		21(5.4%)	6(4.6%)	27(5.2%)	
#involved nodes												
Mean (sd)	2.2(4.1)	2.3(4.4)	2.2(4.2)	<i>0.764</i>	2.2(3.9)	2.6(5.3)	2.3(4.3)	<i>0.656</i>	2.2(4.5)	2.1(3.9)	2.2(4.3)	<i>0.948</i>
Median (min; max)	1.0(0; 39)	1.0(0; 27)	1.0(0; 39)	<i>Wilcoxon</i>	1.0(0; 29)	1.0(0; 39)	1.0(0; 39)	<i>Wilcoxon</i>	1.0(0; 39)	1.0(0; 27)	1.0(0; 39)	<i>Wilcoxon</i>
Capsular rupture												
No	205(66.6%)	71(76.3%)	276(68.8%)	<i>0.157</i>	197(65.7%)	71(74.0%)	268(67.7%)	<i>0.267</i>	267(68.6%)	90(69.2%)	357(68.8%)	<i>0.014</i>
Yes	76(24.7%)	18(19.4%)	94(23.4%)	<i>Chi-2</i>	76(25.3%)	20(20.8%)	96(24.2%)	<i>Chi-2</i>	96(24.7%)	22(16.9%)	118(22.7%)	<i>Chi-2</i>
Unknown	27(8.8%)	4(4.3%)	31(7.7%)		27(9.0%)	5(5.2%)	32(8.1%)		26(6.7%)	18(13.8%)	44(8.5%)	
Stage pn												
0	123(39.9%)	39(41.9%)	162(40.4%)	<i>0.957</i>	114(38.0%)	44(45.8%)	158(39.9%)	<i>0.266</i>	165(42.3%)	52(40.0%)	217(41.7%)	<i>0.955</i>
1	133(43.2%)	38(40.9%)	171(42.6%)		137(45.7%)	33(34.4%)	170(42.9%)		163(41.8%)	58(44.6%)	221(42.5%)	
2	33(10.7%)	11(11.8%)	44(11.0%)	<i>Chi-2</i>	31(10.3%)	13(13.5%)	44(11.1%)	<i>Chi-2</i>	40(10.3%)	13(10.0%)	53(10.2%)	<i>Chi-2</i>
3	19(6.2%)	5(5.4%)	24(6.0%)		18(6.0%)	6(6.3%)	24(6.1%)		22(5.6%)	7(5.4%)	29(5.6%)	
Tumor subtype												
ER status												
ER-	224(72.5%)	84(90.3%)	308(76.6%)	<0.001	212(70.4%)	90(93.8%)	302(76.1%)	<0.001	289(73.9%)	121(93.1%)	410(78.7%)	<0.001
ER+	85(27.5%)	9(9.7%)	94(23.4%)	<i>Chi-2</i>	89(29.6%)	6(6.3%)	95(23.9%)	<i>Chi-2</i>	102(26.1%)	9(6.9%)	111(21.3%)	<i>Chi-2</i>
PR status												
PR-	308(99.7%)	93(100.0%)	401(99.8%)	<i>0.029</i>	299(99.3%)	96(100.0%)	395(99.5%)	<i>0.050</i>	389(99.5%)	130(100.0%)	519(99.6%)	<i>0.049</i>
PR+	1(0.3%)	0(0.0%)	1(0.2%)		2(0.7%)	0(0.0%)	2(0.5%)		2(0.5%)	0(0.0%)	2(0.4%)	
ER-PR-HER2-												
No	85(27.5%)	9(9.7%)	94(23.4%)	<0.001	89(29.6%)	6(6.3%)	95(23.9%)	<0.001	102(26.1%)	9(6.9%)	111(21.3%)	<0.001
Yes	224(72.5%)	84(90.3%)	308(76.6%)	<i>Chi-2</i>	212(70.4%)	90(93.8%)	302(76.1%)	<i>Chi-2</i>	289(73.9%)	121(93.1%)	410(78.7%)	<i>Chi-2</i>

The cut-off used to stratify the cohort into High and Low patients was the third quartile for all parameters. The statistical tests that were realized for each parameter is indicated in the table. Statistically significant findings are highlighted in bold.

Acknowledgements

We are grateful to Marion Bossennec, Margaux Hubert, Nicolas Gourdin, Rodrigo Nalio-Ramos, Morgane Denis and Emilie Bourgea for technical assistance, Jenny Valladeau-Guilemont for helpful discussion and advice on statistical analyses, and Christine Caux for collecting tumor characteristics. We wish also to thank clinicians and the Biological Resources Centre of the Centre Léon Bérard for providing us patient samples, the biopathology department of CLB, the Flow Cytometry Core Facility and the Imaging Platform of the CRCL.

Financial supports

This work has been supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, Ligue Nationale Contre le Cancer comité du Rhône and comité de Savoie, Institut National contre le Cancer (INCa PRT-K 16-023 grant and Pair Sein), LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of the University of Lyon and the SIRIC projects LYRICAN (INCa-DGOS-Inserm_12563). Coline Couillault was supported by a 4th year PhD fellowship from La Ligue Nationale Contre le Cancer. We also benefited from access to equipments funded by ANR (ANR-11-EQPX-0035 PHENOCAN) and Region Rhône-Alpes-Auvergne (LICL).

References

1. Yao, H. *et al.* Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? *Oncotarget* **8**, 1913–1924 (2016).
2. Dua, I. Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: A Focus on Immune Checkpoint Inhibitors. *Am. J. Hematol. Oncol.* **13**, (2017).
3. Drake, C. G., Lipson, E. J. & Brahmer, J. R. Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 24–37 (2014).
4. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
5. Ali, H. R. *et al.* Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann. Oncol.* **25**, 1536–1543 (2014).
6. Gobert, M. *et al.* Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* **69**, 2000–2009 (2009).
7. 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 Res.* **72**, 6130–6141 (2012).
8. Sisirak, V. *et al.* 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 (2012).
9. Chen, Y., Zhang, S., Wang, Q. & Zhang, X. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **10**, (2017).
10. Mohammed, Z. M. *et al.* The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* **107**, 864–873 (2012).
11. Mahmoud, S. M. A. *et al.* The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 545–553 (2012).

12. Arias-Pulido, H. *et al.* The combined presence of CD20 + B cells and PD-L1 + tumor-infiltrating lymphocytes in inflammatory breast cancer is prognostic of improved patient outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* **171**, 273–282 (2018).
13. Brown, S. D. *et al.* Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* **24**, 743–750 (2014).
14. Song, I. H. *et al.* Predictive Value of Tertiary Lymphoid Structures Assessed by High Endothelial Venule Counts in the Neoadjuvant Setting of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* **49**, 399–407 (2017).
15. Martinet, L. *et al.* Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 5678–5687 (2011).
16. Miligy, I. *et al.* Prognostic significance of tumour infiltrating B lymphocytes in breast ductal carcinoma in situ. *Histopathology* **71**, 258–268 (2017).
17. Mohammed, Z. M. A., Goings, J. J., Edwards, J., Elsberger, B. & McMillan, D. C. The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* **109**, 1676–1684 (2013).
18. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **21**, 938–945 (2015).
19. Yeong, J. *et al.* High Densities of Tumor-Associated Plasma Cells Predict Improved Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
20. Rowley, D. A. & Stach, R. M. B lymphocytes secreting IgG linked to latent transforming growth factor-beta prevent primary cytolytic T lymphocyte responses. *Int. Immunol.* **10**, 355–363 (1998).
21. Olkhanud, P. B. *et al.* Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* **71**, 3505–3515 (2011).
22. Zhang, Y. *et al.* B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 87–99 (2013).
23. Zhang, Y. *et al.* Mammary Tumor Educated B cells Acquire LAP/TGF- and PD-L1 expression and Suppress Anti-Tumor Immune Response. *Int. Immunol.* dxw007 (2016). doi:10.1093/intimm/dxw007
24. Lindner, S. *et al.* Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* **73**, 2468–2479 (2013).
25. Guan, H. *et al.* PD-L1 mediated the differentiation of tumor-infiltrating CD19(+) B lymphocytes and T cells in Invasive breast cancer. *Oncoimmunology* **5**, e1075112 (2016).
26. Buisseret, L. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology* **6**, e1257452 (2017).
27. Garaud, S. *et al.* Antigen Specificity and Clinical Significance of IgG and IgA Autoantibodies Produced in situ by Tumor-Infiltrating B Cells in Breast Cancer. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
28. Germain, C. *et al.* Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 832–844 (2014).
29. Nielsen, J. S. *et al.* CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 3281–3292 (2012).
30. Kroeger, D. R., Milne, K. & Nelson, B. H. Tumor infiltrating plasma cells are associated with tertiary lymphoid structures, cytolytic T cell responses, and superior prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* clincanres.2762.2015 (2016). doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2762
31. Gu-Trantien, C. *et al.* CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* **123**, 2873–2892 (2013).
32. Guy, K. *et al.* Circulating immune complexes and autoantibodies in lung cancer. *Br. J. Cancer* **43**, 276–283 (1981).
33. Blixt, O. *et al.* Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Res. BCR* **13**, R25 (2011).
34. Kulić, A. *et al.* Anti-p53 antibodies in serum: relationship to tumor biology and prognosis of breast cancer patients. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **27**, 887–893 (2010).

35. Schmidt, M. *et al.* A Comprehensive Analysis of Human Gene Expression Profiles Identifies Stromal Immunoglobulin κ C as a Compatible Prognostic Marker in Human Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2695–2703 (2012).
36. Bosisio, F. M. *et al.* Plasma cells in primary melanoma. Prognostic significance and possible role of IgA. *Mod. Pathol.* (2016). doi:10.1038/modpathol.2016.28
37. Shalapour, S. *et al.* Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature* **521**, 94–98 (2015).
38. Karagiannis, P., Gilbert, A. E., Nestle, F. O. & Karagiannis, S. N. IgG4 antibodies and cancer-associated inflammation: Insights into a novel mechanism of immune escape. *Oncoimmunology* **2**, e24889 (2013).
39. Harada, K. *et al.* Significance of immunoglobulin G4 (IgG4)-positive cells in extrahepatic cholangiocarcinoma: molecular mechanism of IgG4 reaction in cancer tissue. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 157–164 (2012).
40. Boyerinas, B. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 1148–1157 (2015).
41. Frontera, E. D. *et al.* IgA Fc-folate conjugate activates and recruits neutrophils to directly target triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **172**, 551–560 (2018).
42. Gilbert, A. E. *et al.* Monitoring the Systemic Human Memory B Cell Compartment of Melanoma Patients for Anti-Tumor IgG Antibodies. *PLoS ONE* **6**, (2011).
43. Sensel, M. G., Kane, L. M. & Morrison, S. L. Amino acid differences in the n-terminus of CH2 influence the relative abilities of IgG2 AND IgG3 to activate complement. *Mol. Immunol.* **34**, 1019–1029 (1997).
44. Simitsek, P., Campbell, David, Lanzavecchia, A., Fairweather, N. & Watts, C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J. Exp. Med.* **181**, 1957–1963 (1995).
45. Pasquier, B. *et al.* Identification of Fc α RI as an Inhibitory Receptor that Controls Inflammation: Dual Role of Fc γ ITAM. *Immunity* **22**, 31–42 (2005).
46. Diana, J. *et al.* Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 2335–2343 (2013).
47. de Visser, K. E., Korets, L. V. & Coussens, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* **7**, 411–423 (2005).
48. Fillatreau, S. B cells and their cytokine activities implications in human diseases. *Clin. Immunol.* **186**, 26–31 (2018).
49. Dang, V. D., Hilgenberg, E., Ries, S., Shen, P. & Fillatreau, S. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **28**, 77–83 (2014).
50. Pylyayeva-Gupta, Y. *et al.* IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discov.* **6**, 247–255 (2016).
51. Shalapour, S. *et al.* Inflammation-induced IgA⁺ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature* **551**, 340 (2017).
52. Khan, A. R. *et al.* PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat. Commun.* **6**, 5997 (2015).
53. Campone, M. *et al.* UCBG 2-08: 5-year efficacy results from the UNICANCER-PACS08 randomised phase III trial of adjuvant treatment with FEC100 and then either docetaxel or ixabepilone in patients with early-stage, poor prognosis breast cancer. *Eur. J. Cancer* **103**, 184–194 (2018).
54. Guiu, S. *et al.* Coexpression of androgen receptor and FOXA1 in nonmetastatic triple-negative breast cancer: ancillary study from PACS08 trial. *Future Oncol.* **11**, 2283–2297 (2015).
55. Nelson, B. H. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 4977–4982 (2010).
56. Siliņa, K., Rulle, U., Kalniņa, Z. & Linē, A. Manipulation of tumour-infiltrating B cells and tertiary lymphoid structures: a novel anti-cancer treatment avenue? *Cancer Immunol. Immunother.* 1–20 doi:10.1007/s00262-014-1544-9

57. Zhigis, L. S. *et al.* A new methodological approach to estimation of IgA1 and IgA2 content in human serum using recombinant IgA1 protease from *Neisseria meningitidis*. *Biotechnol. Lett.* **37**, 2289–2293 (2015).
58. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 717–734 (2017).
59. Shen, M., Wang, J. & Ren, X. New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
60. Liu, Y. J. & Arpin, C. Germinal center development. *Immunol. Rev.* **156**, 111–126 (1997).
61. Buisseret, L. *et al.* Reliability of tumor-infiltrating lymphocyte and tertiary lymphoid structure assessment in human breast cancer. *Mod. Pathol.* **30**, 1204–1212 (2017).
62. Coronella, J. A. *et al.* Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 7889–7899 (2001).
63. Coronella, J. A. *et al.* Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 1829–1836 (2002).
64. Klein, U. *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **7**, 773–782 (2006).
65. Woof, J. M. & Russell, M. W. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol.* **4**, 590–597 (2011).
66. Dechant, M. *et al.* Effector Mechanisms of Recombinant IgA Antibodies against Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Immunol.* **179**, 2936–2943 (2007).
67. Mkaddem, S. B. *et al.* IgA, IgA Receptors, and Their Anti-inflammatory Properties. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **382**, 221–235 (2014).
68. Ben Mkaddem, S., Rossato, E., Heming, N. & Monteiro, R. C. Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): From autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun. Rev.* **12**, 666–669 (2013).
69. Iglesia, M. D. *et al.* Genomic Analysis of Immune Cell Infiltrates Across 11 Tumor Types. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **108**, (2016).
70. Parkes, H. *et al.* In situ hybridisation and S1 mapping show that the presence of infiltrating plasma cells is associated with poor prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* **58**, 715–722 (1988).
71. Ben-Hur, H. *et al.* The role of lymphocytes and macrophages in human breast tumorigenesis: an immunohistochemical and morphometric study. *Anticancer Res.* **22**, 1231–1238 (2002).
72. Martinet, L. *et al.* High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β -producing dendritic cells in human breast cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 2001–2008 (2013).
73. Goc, J. *et al.* Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells. *Cancer Res.* **74**, 705–715 (2014).
74. Gil Del Alcazar, C. R. *et al.* Immune Escape in Breast Cancer During In Situ to Invasive Carcinoma Transition. *Cancer Discov.* (2017). doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0222
75. Hsu, S. M., Raine, L. & Nayak, R. N. Medullary carcinoma of breast: an immunohistochemical study of its lymphoid stroma. *Cancer* **48**, 1368–1376 (1981).
76. Brandsma, A. M. *et al.* Simultaneous targeting of Fc γ Rs and Fc α RI enhances tumor cell killing. *Cancer Immunol. Res.* (2015). doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0099-T
77. Huls, G. *et al.* Antitumor Immune Effector Mechanisms Recruited by Phage Display-derived Fully Human IgG1 and IgA1 Monoclonal Antibodies. *Cancer Res.* **59**, 5778–5784 (1999).
78. Verma, S. *et al.* Health-related quality of life of postmenopausal women with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer treated with ribociclib + letrozole: results from MONALEESA-2. *Breast Cancer Res. Treat.* **170**, 535–545 (2018).

2. Diversité des lymphocytes B et de la réponse humorale dans les tumeurs d'ovaire

À l'instar de l'étude sur les tumeurs mammaires, nous avons caractérisé les populations de LB et les Acs produits dans des tumeurs primaires d'ovaire à l'aide d'une cohorte prospective de 27 patientes atteintes d'un cancer ovarien sévère de haut grade, opérées au Centre Léon Bérard avant tout traitement ou après une chimiothérapie néo adjuvante. Les méthodologies utilisées sont détaillées dans le manuscrit sur les tumeurs du sein.

2.1. L'infiltrat B des tumeurs ovariennes est souvent organisé en structures lymphoïdes tertiaires et principalement constitué de plasmocytes et de LB à mémoire

Grâce à une analyse par CMF, nous avons observé un infiltrat en LB (cellules CD19⁺) très variable suivant les tumeurs et représentant en moyenne 9,6% des cellules d'origine hématopoïétiques (CD45⁺) (figure 13A). Le nombre de LB par milligramme de tissu est corrélé avec celui des LT (figure 13B). Nous avons également identifié les différentes sous-populations de LB grâce aux marqueurs de surface CD20, CD38, IgD, et IgM (figure 13C) et montré que la quasi-totalité des tumeurs d'ovaire est majoritairement infiltrées par des PC (CD20⁺CD38^{Hi}) et des LB mémoires (CD20⁺CD38⁺IgD⁻) qui représentent en moyenne 4,9% et 3,3% de l'infiltrat immunitaire total, respectivement (figure 13D et E). Les 15 % restant de l'infiltrat B sont constitués de LB naïfs (CD20⁺CD38⁻IgD⁺IgM⁺) et, dans une moindre mesure, de cellules CD20⁺CD38⁺ correspondant à des LB du CG, des cellules pre-CG et/ou des LB transitionnels. Ces populations minoritaires ne sont détectées que dans environ deux tiers des tumeurs. Nous n'avons pas noté d'impact majeur d'un traitement néo-adjuvant sur l'infiltrat en LB ou en LT, à l'exception d'une augmentation significative de la proportion de LB mémoires parmi les cellules CD45⁺ (Figure 13F et données non représentées).

Un marquage multiparamétrique par IF avec des Acs dirigés contre CD3, CD20, et IgD sur des coupes de 14 tumeurs d'ovaire montre que les LB sont principalement localisés dans le stroma tumoral, dispersés au voisinage de LT (Figure 14A image TLS⁻) ou organisés en follicules proches de zone riches en LT au sein de TLS (Figure 14A, images TLS⁺). Ce marquage permet également de distinguer les TLS contenant des follicules primaires constitués uniquement de LB naïfs (CD20⁺IgD⁺) de ceux avec des centres germinatifs (comprenant des agrégats de cellules CD20⁺IgD^{neg} et des LB naïfs) (Figure 14A), observés dans 21% et 43% des tumeurs, respectivement (figure 14B). De manière intéressante, nous montrons également que des LB naïfs et des LB CD20⁺IgD^{neg} sont retrouvés dans ces tumeurs, même en l'absence de TLS (figure 14C). Des cellules LTfh, identifiées sur la base d'une forte expression de PD1 et d'une co-expression d'ICOS comme explicité pour les tumeurs de sein, sont également souvent détectées et représentent en moyenne 0,86% de l'infiltrat immunitaire total (Figure 14D). La confrontation des données obtenues par IF et par CMF montre une corrélation positive et

statistiquement significative entre l'existence TLS et l'importance de l'infiltrat immunitaire (Figure 14E). Cette augmentation concerne toutes les sous-populations B, les LT totaux et les LTfh, même si la différence n'est statistiquement significative que pour les LB mémoires ($p=0,029$) et les LT totaux ($p=0,007$), possiblement à cause du nombre relativement faible d'échantillons. Les différentes populations peuvent donc être recrutées en absence ou en présence de TLS, mais la présence de ces structures est associée à une quantité d'infiltrat plus importante.

2.2. Diversité des anticorps produits dans le microenvironnement des tumeurs de l'ovaire

Le peu de données existantes sur la nature des Ig exprimées par les LB infiltrant les tumeurs de l'ovaire indiquent une expression quasi-exclusive d'IgG par les LB mémoires et les PC (Kroeger et al., 2016; Nielsen et al., 2012). La réalisation de marquages pour IgG, IgA, et IgM, simultanément en surface et en intracellulaire, montre de manière contradictoire la présence de LB mémoires à IgG, représentant la moitié des LB mémoires, et à IgA et IgM en proportion quasi-égale dans la majorité des tumeurs étudiées (figure 15A). Le contingent plasmocytaire est constitué d'une majorité de cellules productrices IgG (représentant 69% en moyenne des PC), mais contient également des PC à IgA et, dans une moindre mesure, des PC à IgM, qui représentent respectivement 11% et 2% de l'infiltrat plasmocytaire (figure 15B). L'existence d'une proportion importante de cellules productrices d'IgG, d'IgA ou d'IgM dans ces tumeurs est également confirmée par un test ELISPOT et par des marquages multi-IF sur coupes de tissus (données non présentées). L'analyse du ratio de PC à IgA versus IgG, à l'aide des pourcentages déterminés pour chacune des populations par CMF, confirme une très forte prédominance des PC à IgG chez la majorité de patients, mais révèle également que 15% (3 tumeurs sur les 20 contenant des PC) présentent un net enrichissement en cellules productrices d'IgA (ratio IgA/IgG > 0,5) (figure 15C). Cette proportion relative des PC à IgA vs IgG n'est pas affectée par l'utilisation d'un traitement néo-adjuvant (données non montrées).

Afin de quantifier les Acs produits dans le MET, nous avons réalisé des ELISA sur une collection de 42 surnageants obtenus lors de la dilacération des tumeurs fraîches. Les trois classes d'Ig sont détectées dans ces surnageants, avec une large prédominance des IgG (figure 15D), en accord avec les proportions de chacune des populations de PC détectées par CF. Les quatre sous-classes d'IgG sont détectées, avec par ordre décroissant de concentration IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 (figure 15E). Un western blot sur huit surnageants de tumeur parmi les plus riches en IgA et révélé avec un Ac anti-IgA dans des conditions non-dénaturantes a démontré la présence majoritaire d'IgA monomériques dans la moitié échantillons testés et la coexistence d'IgA sous forme monomérique et dimérique dans l'autre moitié (figure 15F).

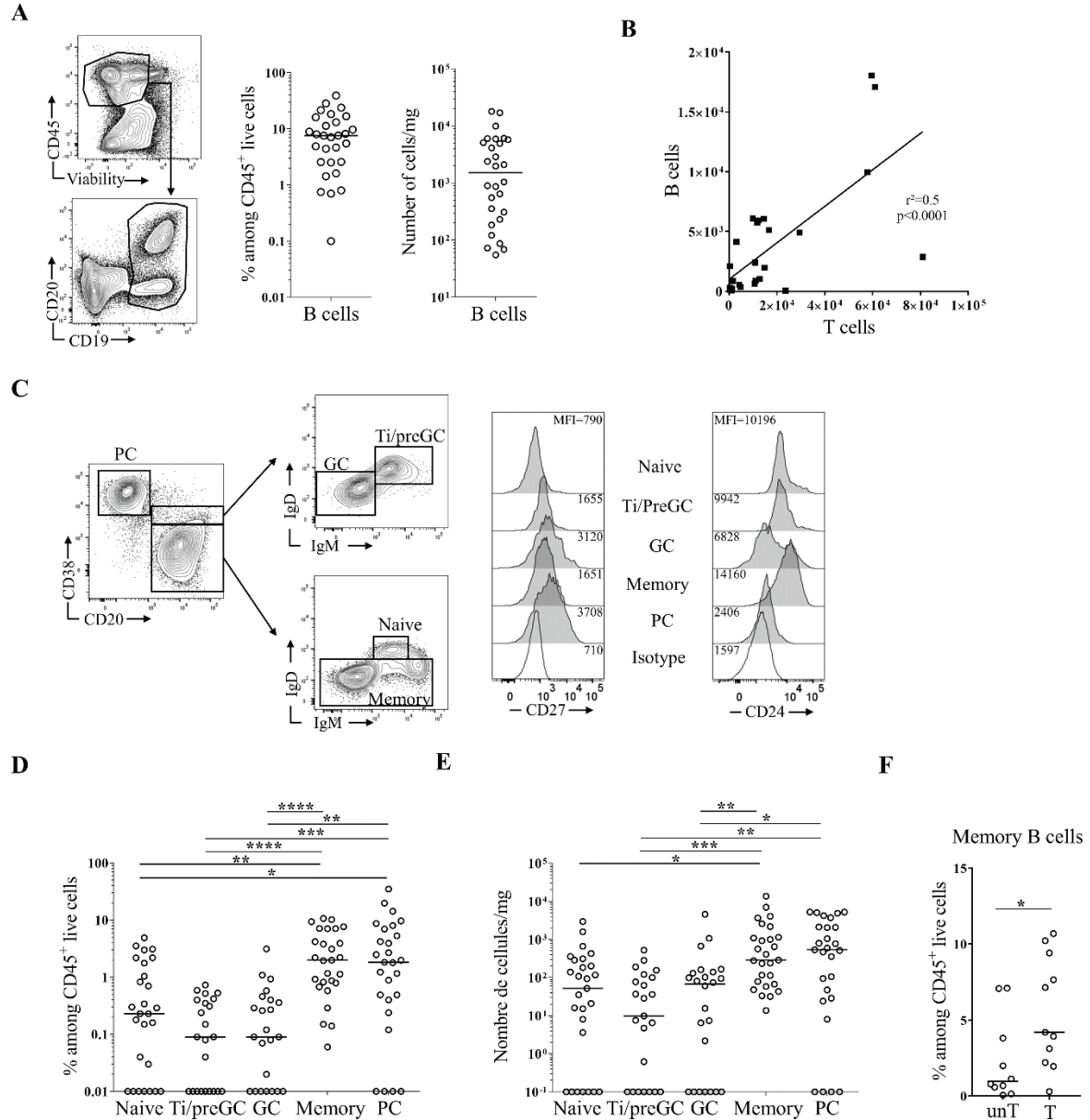


Figure 13 : Les tumeurs de l’ovaire sont infiltrées par des LB à différents stades de différenciation. (A) Des suspensions cellulaires de tumeurs d’ovaire (n=27), préparées par digestion enzymatique, ont été marquées avec des Acs fluorescents dirigés contre CD45, CD19, CD20, CD24, CD27, CD38, IgD, IgM, IgG et IgA, et analysées par CMF. A) Illustration de la stratégie de fenêtrage sur les LB totaux viables (cellules CD45⁺CD19⁺ Viability^{Neg}) et graphiques représentant leur fréquence parmi les cellules CD45⁺ (milieu) et leur nombre par milligramme de tissu dans toutes les tumeurs analysées (droite). (B) Courbe de corrélation entre le nombre de LB totaux et le nombre de LT (régression linéaire de Deming). (C) Illustration de la stratégie d’identification des sous-populations de LB basée sur l’expression de CD20, CD38, IgM et IgD et niveau d’expression de CD24 et CD27 sur les LB naïfs (CD38⁺IgM⁺), transitionnels/pré-CG (Ti/pre-CG, CD38⁺IgD⁺), du centre germinatif (CG, CD38⁺IgD⁺), mémoires (memory, CD38⁺IgD⁺), et les PC (CD38⁺CD20⁺). (D-E) Fréquence parmi les cellules CD45⁺ (D) et nombre (E) de chacune des sous-populations B dans les différentes tumeurs. L’analyse statistique a été réalisée par un test de Kruskal-Wallis. L’échelle étant logarithmique, les valeurs nulles ont été arbitrairement remplacées par 0.01 (D) et 0.1 (E). (F) Pourcentage de LB mémoires parmi les cellules immunitaires des tumeurs de patientes ayant reçu (T) ou non (unT) une chimiothérapie néo-adjuvante. Un test de Mann-Whitney a été réalisé. Pour les différents graphiques, les traits horizontaux correspondent à la médiane.

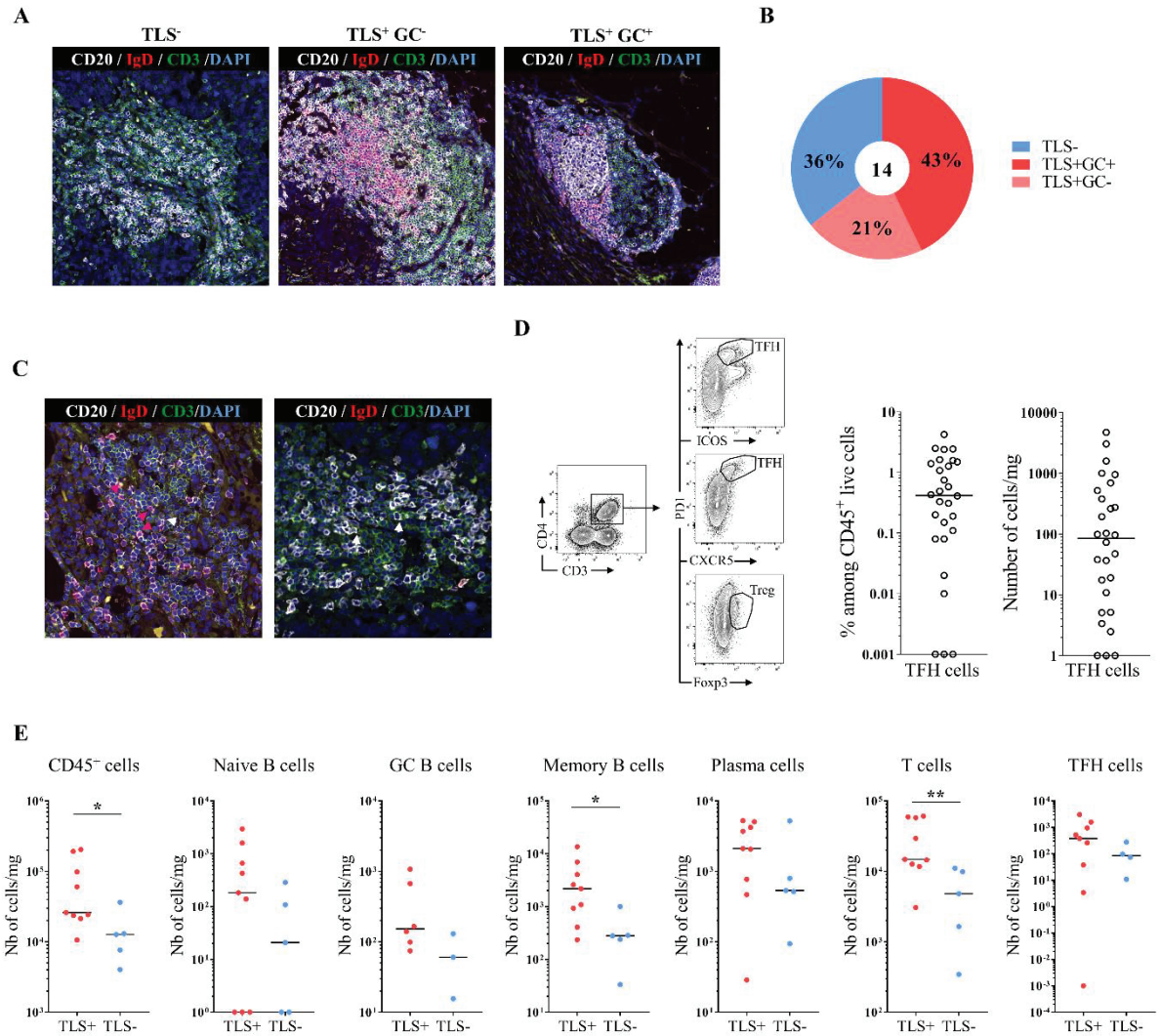


Figure 14 : La présence de TLS dans les tumeurs ovariennes est associée à une augmentation de l'infiltrat T et
B. (A) Illustrations de marquages IF de coupes de tumeurs ovariennes FFPE pour CD20 (LB), IgD (LB naïfs) et CD3 (LT) permettant de distinguer les tumeurs sans TLS (gauche), avec TLS sans CG (centre), ou avec TLS et CG (droite). (B) Proportions des tumeurs avec et sans TLS. (C) Illustrations des contacts entre LB naïfs (flèches roses) ou LB mémoires (flèches blanches) et LT à partir du même marquage. (D) Stratégie d'identification en CMF parmi les LT CD4 (CD3⁺CD4⁺) des LTfh (PD1^{hi}ICOS⁺) et des Treg (PD1⁺Foxp3⁺). Les graphiques représentent la fréquence de LTfh dans l'infiltrat immunitaire des tumeurs de l'ovaire (n=27) et leur nombre. (E) Fréquence des différentes sous-populations de LB et LT déterminée par CMF dans les tumeurs avec (n=9) ou sans (n=5) TLS. Les traits horizontaux représentent la médiane et un test de Mann Whitney a été réalisé pour l'analyse statistique. L'échelle étant logarithmique pour les différents graphiques, les valeurs nulles ont été arbitrairement remplacées par 0.001 et 1 (D et E).

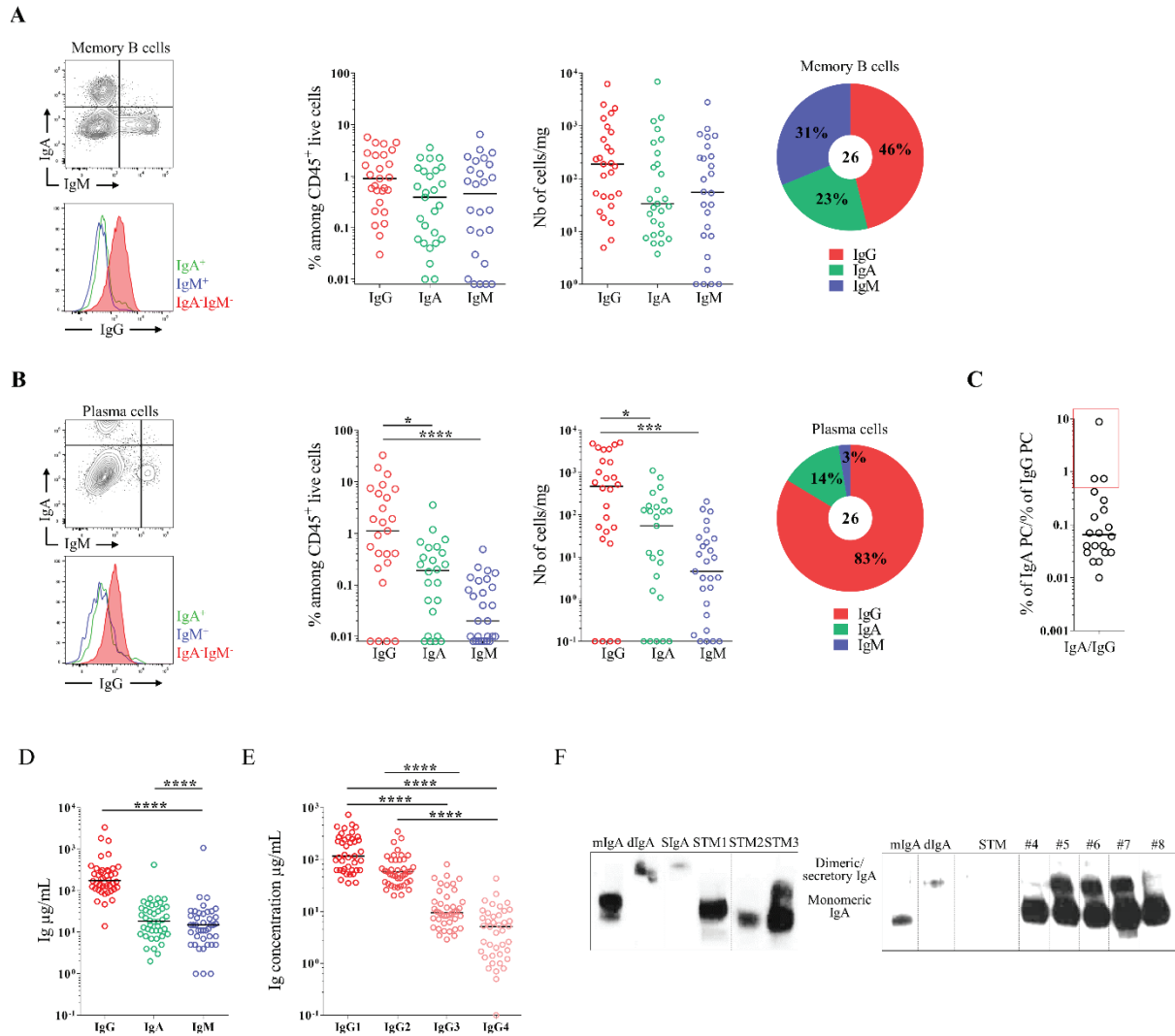


Figure 15 : Les LB mémoires et les plasmocytes infiltrant les tumeurs d'ovaire expriment/produisent principalement des IgG, mais également des IgA ou des IgM. (A-B) Stratégie d'identification par CMF de la classe d'Acs exprimée par les LB mémoires (CD19⁺CD20⁺CD38^{hi}IgD⁻) (A) et les PC (CD19⁺CD20⁺CD38^{hi}IgD⁻) (B) à l'aide du panel d'Acs décrit dans la légende de la Figure 13A. Du fait de la détection non-optimale du marquage IgG, les cellules IgG⁺ ont été identifiées sur la base d'une non-expression d'IgM et IgA. Les graphiques représentent, pour l'ensemble des tumeurs analysées (n=27) les fréquences parmi les cellules CD45⁺ et le nombre par milligramme de tumeur de chacune de ces sous-populations. Les camemberts représentent les pourcentages moyens de chaque sous-population. (C) Ratio entre fréquences de PC à IgA et de PC à IgG déterminés par CMF pour les tumeurs présentant un contingent plasmocytaire significatif. (D-E) Concentration des IgG, IgA, IgM (D) et des différentes sous-classes d'IgG (E) déterminées par ELISA (D) ou dosage multiplexe (E) dans des surnageants obtenus lors de la dilacération des tumeurs (n=42). L'analyse statistique a été réalisée grâce à un test de Kruskal-Wallis. (F) Western blot en conditions non dénaturantes réalisés sur 8 surnageant de tumeur (STM 1-8) et permettant de distinguer les IgA monomériques des IgA dimériques sur la base de leur poids moléculaire.

3. Résultats complémentaires

3.1. Certaines populations immunitaires infiltrant les tumeurs expriment CD89 et CD209

La démonstration que des IgA peuvent être produites dans les tumeurs mammaires et ovariennes nous a conduit à rechercher les populations de cellules immunitaires dont la fonction pourrait être modulée par les IgA via l'engagement de récepteurs. Pour ce faire, nous avons analysé par CMF l'expression du récepteur de haute affinité pour la partie Fc des IgA (Fc α R ou CD89) et du récepteur accessoire DC-SIGN (CD209) à l'aide d'un panel d'Acs permettant d'identifier les LB, les LT, les DC conventionnelles et plasmacytoïdes, les macrophages/DC inflammatoires (Mo-DC) et les cellules HLA-DR^{neg}CD14^{neg} (composées notamment de neutrophiles) sur la base de leur expression différentielle de CMH-II (HLA-DR) et de CD14 (figure 16A). Nous avons tout d'abord observé que le pourcentage de cellules immunitaires exprimant CD89 ($14,2 \pm 16,9$ dans les tumeurs du sein et $14,2 \pm 15,2$ dans les tumeurs d'ovaire, figure 16B) et CD209 ($8,8 \pm 13,5$ dans les tumeurs de sein et $3,4 \pm 3,5$ dans les tumeurs d'ovaire, figure 16C) est très variable d'un prélèvement à l'autre. Comme attendu, les LB et LT sont très minoritaires parmi les cellules CD89⁺ ou CD209⁺. Les cellules exprimant CD89 sont majoritairement constituées de macrophages/Mo-DC et de cellules HLA-DR^{neg}CD14^{neg}, vraisemblablement des granulocytes neutrophiles, connus pour exprimer des niveaux élevés de CD89 (Monteiro and Van De Winkel, 2003). Une partie des cDC contenues dans le compartiment HLA-DR⁺CD14^{neg}, principalement les DC BDCA1⁺, expriment également CD89 (données non représentées). L'identité des cellules CD209⁺ est sensiblement identique à celles des cellules CD89⁺ avec une majorité de macrophages/Mo-DC, des DC et de cellules HLA-DR^{neg}CD14^{neg}. Les tumeurs avec une fréquence importante de cellules CD89⁺ ou CD209⁺ correspondent, pour l'essentiel, aux tumeurs présentant un fort infiltrat macrophagique (données non présentées). L'expression de CD89 et CD209 sur les cellules CD45⁺ est exclusive dans la majorité des prélèvements, mais certaines tumeurs contiennent des macrophages/Mo-DC et des cellules HLA-DR^{neg}CD14^{neg} co-exprimant les deux récepteurs aux IgA (non montré).

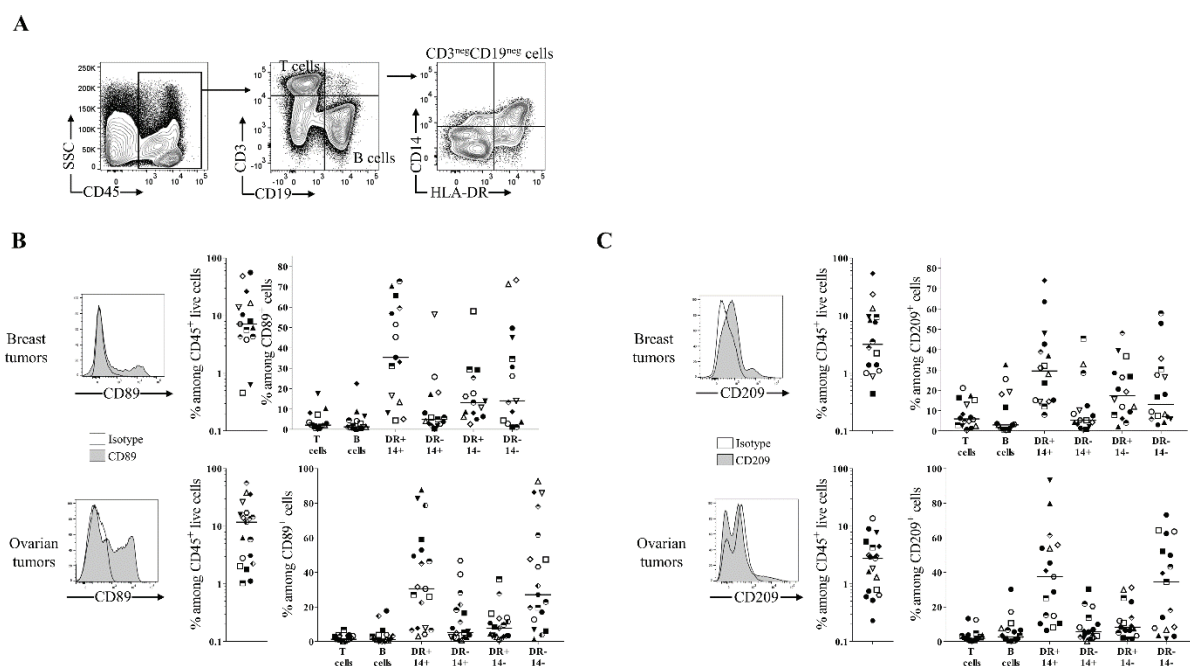


Figure 16 : Identification des cellules immunitaires exprimant les récepteurs aux IgA CD89 et CD209 dans les carcinomes mammaires et ovariens. Des suspensions cellulaires préparées par digestion enzymatique de de tumeurs du sein (n=15) ou de l’ovaire (n=19) ont été marquées et analysées par CMF à l’aide d’Acs anti-CD45, -CD3, -CD19, -HLA-DR et -CD14. (A) Illustration de la stratégie d’identification des LB (CD19⁺), LT (CD3⁺), macrophages/DC inflammatoires (CD3⁺CD19⁺DR⁺CD14⁺), monocytes (CD3⁺CD19⁺DR⁺CD14⁺), cDC/pDC (CD3⁺CD19⁺DR⁺CD14⁺) et cellules CD3⁺CD19⁺DR⁺CD14⁺. (B-C) Les histogrammes illustrent l’expression de CD89 (B) et CD209 (C) comparativement au contrôle isotypique sur les cellules immunitaires (CD45⁺) d’une tumeur mammaire et d’une tumeur ovarienne représentative. Les graphiques représentent la fréquence de cellules CD89⁺ ou CD209⁺ parmi l’infiltrat immunitaire total (milieu) et le pourcentage de chaque population parmi les cellules immunitaires CD89⁺ ou CD209⁺ (droite). Chaque point correspond à une tumeur et les traits horizontaux représentent les médianes.

3.2. Les lymphocytes B et les plasmocytes expriment différents ligands de points de contrôle immunitaires

La balance d'expression d'ICP-L inhibiteurs versus activateurs par les CPA conditionne la différenciation et la fonctionnalité des LT lors de la présentation d'Ag. Nous avons donc étudié l'expression de certains de ces ligands, PD-L1, CD137L, CD80, et HVEM, sur les sous-populations de LB infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire (Figure 17A). PD-L1 est exprimé par 11,8%, CD137L par 32,2%, HVEM par 33,4%, et CD80 par 12,8% des LB totaux dans les 11 tumeurs de sein et d'ovaire étudiées (figure 17B). Les cellules PD-L1⁺ sont majoritairement constituées de PC, tandis que deux tiers des cellules CD137L⁺ sont composées à part égale de PC et de LB mémoires, tandis que les cellules HVEM⁺ et CD80⁺ sont composées majoritairement de LB mémoires (figure 17C).

Le motif d'expression des différents ICP-L varie donc entre les LB mémoires et les PC infiltrant la tumeur, ce qui pourrait influencer leur rôle inhibiteur ou activateur sur les autres cellules immunitaires présentes. Le faible nombre tumeur ne nous permet pas pour l'instant d'établir des différences claires entre les cellules à IgA et à IgG, mais nous continuerons d'analyser des tumeurs pour analyser ce paramètre.

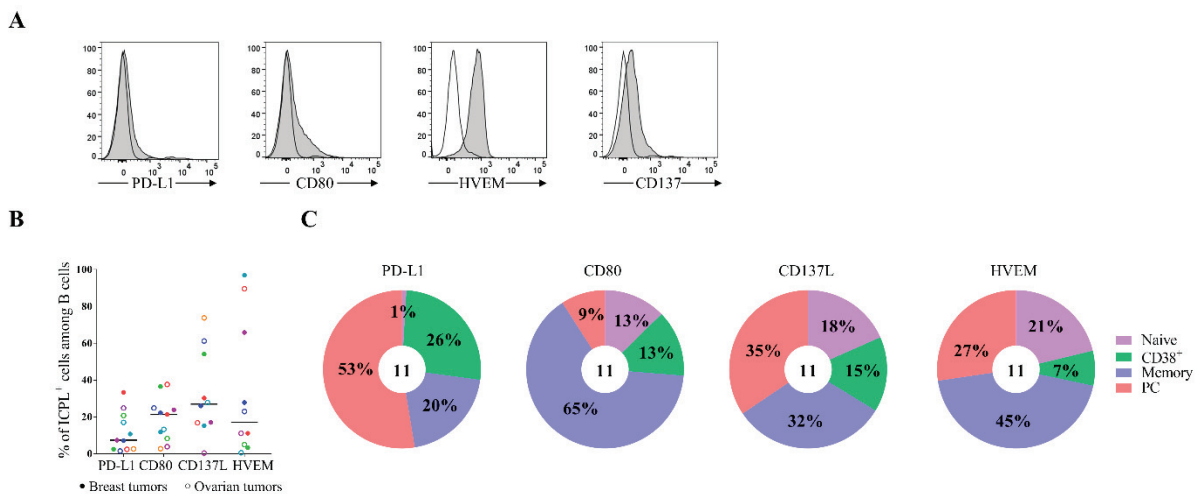


Figure 17 : Les LB mémoires et les plasmocytes infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire expriment préférentiellement différents ligands de points de contrôle immunitaire. Des suspensions cellulaires de tumeurs de sein (n=5) et d'ovaire (n=6) ont été marquées et analysées par CMF pour l'expression de PD-L1, CD80, CD137L, et HVEM sur les différentes sous-populations de LB. (A) Histogrammes montrant l'expression des différents ICP-L par les LB totaux infiltrant une tumeur d'ovaire (B) Graphique représentant le pourcentage de LB totaux et positifs pour les différents ICP-L dans les 11 tumeurs. (C) Camemberts représentant la proportion de chaque sous-population de LB parmi les LB exprimant les différents ICP-L.

Diversité des antigènes cibles des IgG et des IgA produits dans les tumeurs du sein et de l’ovaire

1. Détermination des antigènes reconnus par les immunoglobulines présentes dans la tumeur

Dans le cadre d’une collaboration avec la société Roche, nous avons analysé la diversité des cibles antigéniques des Acs produits dans le MET des tumeurs du sein et de l’ovaire. Pour ce faire, une série de surnageants issus de la dilacération de tumeurs du sein (n=71) et de l’ovaires (n=42) a été utilisée pour effectuer un profilage des réactivités des IgG, IgA et IgM à l’aide de puces à peptides chevauchants (peptides de 16 acides aminés avec un recouvrement de 14 acides aminés) et couvrant l’entièreté du protéome ainsi que les principales mutations décrites dans les cancers. La phase expérimentale, effectuée par Roche Sequencing Solutions (Madison, USA), a consisté à incuber les échantillons dilués au 1/500 sur les puces, puis à détecter les Acs fixés aux différents peptides grâce à des Acs secondaires anti-IgG, -IgA et -IgM couplés à des sondes fluorescentes (figure 18A). Pour chaque échantillon, l’intensité du signal est mesurée pour chaque peptide. Un peptide est considéré comme cible d’un Ac sur la base d’un seuil de signal de fluorescence (>12 (log2)) et d’une valeur $p < 0,005$ déterminée par un test de Kolmogorov-Smirnov comparant les signaux de plusieurs peptides chevauchant avec ceux de peptides sélectionnés de manière aléatoire (et considérés comme du bruit de fond) (figure 18B). Plusieurs peptides cibles d’une même protéine sont considérés comme constituant un même épitope s’ils sont consécutifs, la Figure 18C montrant ainsi la présence de 4 épitopes reconnus dans une protéine chez une patiente d’ovaire (Figure 18C haut). La reconnaissance de ces peptides par des Acs du surnageant de cette tumeur a été vérifiée grâce à un ELISA spécifique utilisant les peptides déterminés par l’essai pan-protéomique et le surnageant de la tumeur, révélé avec un anti-IgG humain. Les Acs de ce surnageant se fixent en effet sur les peptides de la protéine d’intérêt, alors que le peptide aléatoire n’est pas reconnu.

2. Plusieurs centaines de cibles parfois partagées entre les patientes sont reconnues par les IgG et/ou les IgA intra-tumoraux

Les IgG et IgA présents dans les tumeurs reconnaissent plusieurs centaines de cibles peptidiques par tumeur en moyenne, que ce soit dans les tumeurs de sein (571,5 pour IgG et 257,3 pour IgA) ou dans les tumeurs d’ovaire (586,8 pour IgG et 423, pour IgA). Ces peptides correspondent à plusieurs centaines d’épitopes et de protéines (analyses en cours). En revanche, très peu de cibles ont été détectées pour les IgM (moins de 5 en moyenne à la fois dans le sein et l’ovaire). Aucune influence notable d’un traitement préalable des patientes n’est observée, tandis que le nombre de cibles augmentent avec le grade dans les tumeurs du sein (statistiquement significatif pour les IgA,

données non présentées). De manière intrigante, au sein d'une même tumeur, seule une minorité des cibles peptidiques identifiées (15% pour le sein et 20% pour l'ovaire) est commune à la fois aux IgG et aux IgA (figure 18D). 68% et 55% des peptides identifiés respectivement dans les tumeurs de sein et de l'ovaire sont reconnus uniquement par les IgG tandis que 19 et 25% le sont par les IgA uniquement.

De manière intéressante, certaines réactivités peptidiques, pour la majorité, spécifiques des IgG, sont communes à plusieurs patients. Ainsi, plusieurs dizaines de peptides, correspondant à 0.28-0.30% de la totalité des réactivités identifiées, sont reconnus par les IgG des tumeurs de sein (figure 18E) ou de l'ovaire (figure 18F) chez plus de 15% des patients. Ces peptides partagés ne représentent que 0,01 et 0,04% des peptides reconnus par les IgA dans les tumeurs du sein et de l'ovaire, respectivement. Ces 87 et 63 peptides IgG partagés constituent en fait 13 et 20 épitopes correspondant à 9 et 17 protéines dans les tumeurs de sein et d'ovaire, respectivement. Parmi ces protéines, 6 sont partagées entre les deux types de cancers, résultant en 21 protéines partagées entre les patients atteints de cancers de sein et/ou d'ovaire. Une analyse préliminaire de ces protéines ciblées par les Acs chez plusieurs patients, grâce à la base de données GeneCards®, révèle qu'elles sont principalement impliquées dans l'embryogenèse ou le développement des tissus et la régulation de processus relatifs aux acides nucléiques comme la transcription ou la réparation de l'ADN. La majorité des Acs mis en évidence sont des protéines intracellulaires ou sécrétées, seules 5 sur les 21 sont exprimées en membrane. Certaines de ces protéines sont exprimées de manière ubiquitaire en contexte physiologique, alors que d'autres sont restreintes à certains tissus, présentant ou non un privilège immun comme le cerveau ou les testicules (données obtenues sur The Human Protein Atlas).

La majorité des protéines ciblées chez plusieurs patients sont décrites comme étant exprimées dans plusieurs types de cancers dans le TCGA. La forte expression au niveau ARN de sept d'entre elles est associée à un mauvais pronostic, alors que la forte expression de trois est associée à un bon pronostic. Des Acs contre une des protéines, EID3, ont déjà été décrits dans le sérum des patients atteints de tumeurs pancréatique neuroendocriniennes (Hontani et al., 2017).

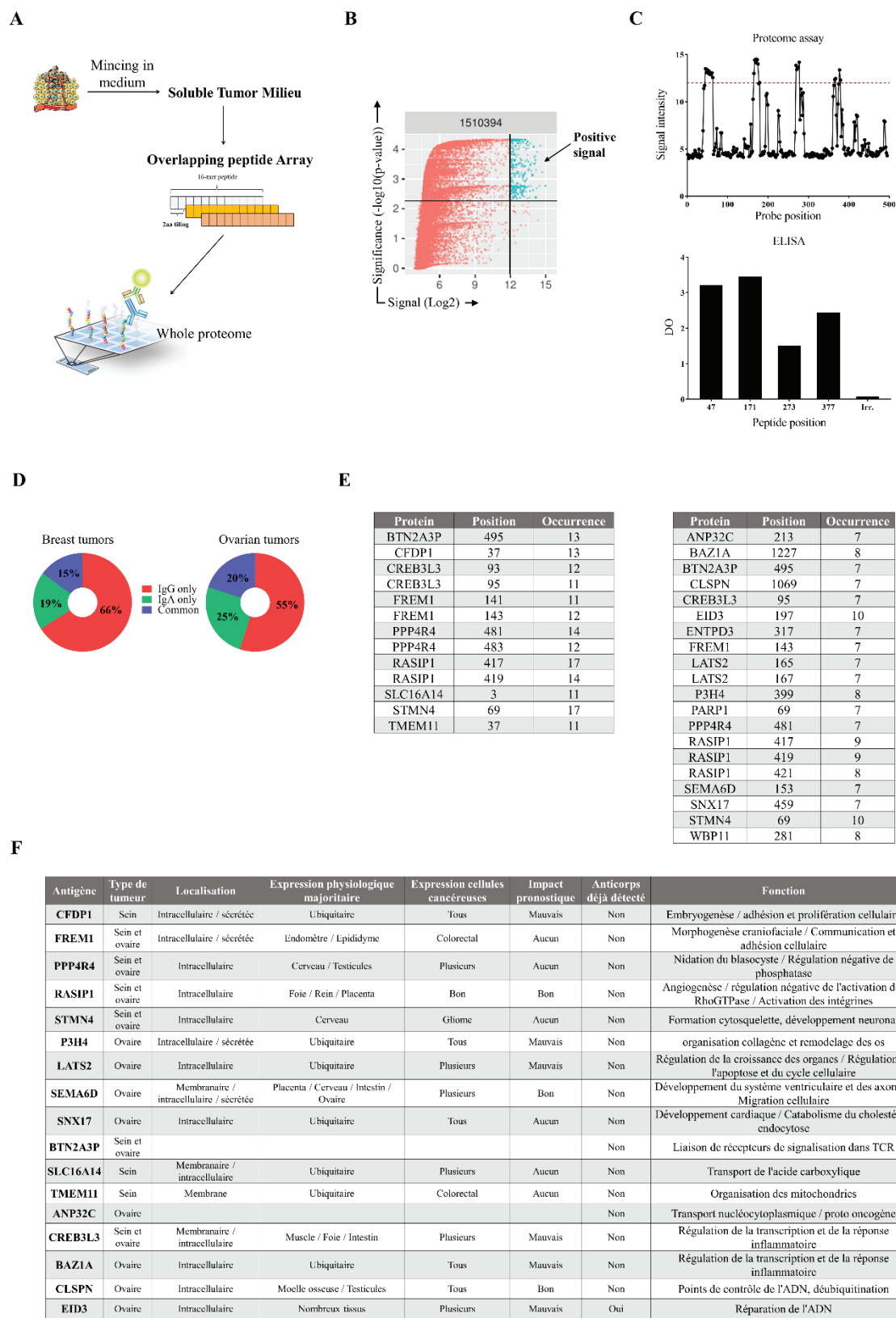


Figure 18 : Les anticorps du microenvironnement tumoral sont dirigés contre de nombreuses cibles différent entre les IgA et les IgG mais parfois partagées par entre les patients.

Figure 18 : Les anticorps du microenvironnement tumoral sont dirigés contre de nombreuses cibles différenciant entre les IgA et les IgG mais parfois partagées par entre les patients. (A) Les surnageants de tumeurs isolés lors de la dilacération mécanique des tumeurs ont été étudiés grâce à un essai pan-protéomique pour déterminer les protéines ciblées par les Acs du MET. (B) Pour chaque peptide, une intensité de signal considérée comme positive au-delà de 12 (log2) est attribuée, et une valeur p est déterminée par un test de Kolmogorov-Smirnov comparant le signal du peptide avec ceux de peptides sélectionnés de manière aléatoire (et considérés comme du bruit de fond), afin de déterminer les peptides en effet reconnus par des Acs contenus dans les surnageants de tumeur. Le graphique représente l'ensemble des valeurs obtenues pour les peptides testés chez un patient. (C) Haut : exemple de graphique obtenu pour une protéine dans un échantillon d'ovaire permettant de mettre en évidence les positions de la protéine reconnues par des Acs. L'abscisse représente la position des acides aminés sur la protéine et l'ordonnée représente l'intensité du signal, la valeur seuil de 12 étant indiquée par la ligne en pointillé rouge. Bas : valeurs en unités arbitraires obtenues par ELISA pour vérifier la fixation des Acs du surnageant de la tumeur d'ovaire sur les peptides déterminés au-dessus. (D) Proportion des protéines reconnues par les IgG uniquement, les IgA uniquement, ou à la fois les IgG et les IgA dans les tumeurs de sein (gauche) et d'ovaire (droite). (E) Tableaux récapitulatifs des protéines reconnues par les Acs des surnageants de tumeur de plus de 15% des patients atteints de cancer du sein (gauche) ou de l'ovaire (droite). Le nom de la protéine, la position de l'épitope sur la protéine, ainsi que le nombre de patients chez qui cet épitope est reconnu sont indiqués. (F) Tableau récapitulant les caractéristiques des protéines partagées entre les patients, dans les tumeurs de sein et/ou d'ovaire étudiées, indiquant leur localisation cellulaire, les tissus sains et tumoraux dans lesquels ils sont exprimés, leur valeur pronostique potentielle dans les tumeurs, si des Acs contre cette protéine ont déjà été détectés chez les patients atteints de cancer, et leurs fonctions. Les fonctions surlignées en bleu correspondent aux protéines impliquées dans le développement tissulaire et les fonctions surlignées en gris correspondent aux protéines impliquées dans des fonctions dépendantes de l'ADN.

Exploration des tumeurs associées aux syndromes neurologiques paranéoplasiques pour l'étude des caractéristiques et des mécanismes d'induction de la réponse humorale dirigée contre des antigènes tumoraux

Les DCP sont des syndromes rares qui se manifestent par l'installation subaiguë d'un syndrome cérébelleux sévère affectant des patients présentant principalement des cancers du sein, de l'ovaire ou du poumon. Il s'agit de pathologies auto-immunitaires rares, satellites du cancer, et déclenchées par une réponse immunitaire anti-tumorale dirigée contre un (auto-)Ag exprimé à la fois par les cellules neuronales et les cellules tumorales, appelé Ag onco-neuronaux. Ces pathologies se caractérisent par la présence dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (LCR) d'auto-anticorps (auto-Ac) spécifiques de ces Ags, qui sont souvent utilisés pour le diagnostic. Il existe de nombreuses DCP, chacune caractérisée par l'identité de l'Ag ciblé par les auto-Ac. Des arguments expérimentaux suggèrent de plus que ces tumeurs ont une croissance lente et qu'elles sont contrôlées de manière efficace par le système immunitaire. L'existence d'une réponse immunitaire spécifique d'Ags onco-neuronaux, capable de détruire les cellules du cervelet chez les patients souffrant de DCP, suggère l'existence chez ces patients d'un MET favorable à une levée de tolérance immunitaire vis-à-vis de certains Ags tumoraux permettant l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Les DCP sont donc un modèle pathologique unique de réponse immunitaire anti-tumorale pour laquelle les Ags tumoraux ciblés sont connus. Cette particularité ouvre des perspectives expérimentales exceptionnelles pour identifier chez l'Homme les caractéristiques et les mécanismes d'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

1. Des altérations génétiques des antigènes onco-neuronaux et une contexture immunitaire anti-tumorale caractérisent les tumeurs ovariennes associées aux dégénérescences cérébelleuses à anticorps Yo

Résumé de l'article

Les DCP à Acs Yo (Yo-DCP) sont quasi-systématiquement associées à des tumeurs de sein et d'ovaire et impliquent les Ags onco-neuronaux CDR2 (Cerebellar Degeneration Related protein 2) et son paralogue CDR2L (CDR2 like). Dans ces syndromes, des Acs et des LT CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de ces Ag sont détectés dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien des patients. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. J. Honnorat (Institut NeuroMyogène, Lyon), nous avons analysé une cohorte de 26 patientes souffrant d'Yo-DCP associées à un carcinome ovarien afin de caractériser la contexture immunitaire des tumeurs et l'expression des Ags onco-neuronaux. Pour ce faire, nous

avons réalisé des marquages IF sur coupes de tumeurs FFPE afin de caractériser l'infiltrat immunitaire et le niveau d'expression de CDR2 et CDR2L comparativement à des tumeurs ovariennes contrôles. L'accès à une tumeur Yo-DCP fraîchement réséquée nous a permis de compléter ces données par une analyse de l'infiltrat immunitaire en CMF. Par ailleurs, l'existence d'éventuelles altérations génétiques de ces Ags dans la tumeur a été étudiée par Next Generation Sequencing (NGS) pour déterminer la variation du nombre de copies et identifier les mutations.

Les tumeurs de l'ovaire associées à des Yo-DCP présentent une texture immunitaire très différente de celle de tumeurs contrôles (non associées à un SNP), caractérisée par une densité de cellules immunitaires bien plus importante avec, en particulier, un contingent de PC produisant majoritairement des IgG et pouvant représenter jusqu'à x% de l'infiltrat, de nombreux LT CD8⁺ cytotoxiques au contact de cellules tumorales apoptotiques. Dans ces tumeurs, des DC matures sont également retrouvées au contact des cellules tumorales, ce qui est extrêmement rare dans les tumeurs contrôles. Cet environnement immunitaire particulièrement riche en cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale et cellulaire est associé à une surexpression de l'Ag CDR2L dans les cellules tumorales et l'existence systématique d'une augmentation du nombre de copies des gènes *CDR2* ou *CDR2L*, ou de mutations dans ces gènes pouvant créer de potentiels néo-épitopes T. Ces données démontrent une association entre l'infiltrat massif des tumeurs Yo-DCP par des PC à IgG et des LT CD8⁺ cytotoxiques activés et des gains et/ou des mutations récurrentes des gènes codant pour les Ags onco-neuronaux, suggérant que ces altérations génétiques dans les cellules tumorales pourraient être à l'origine de la rupture de tolérance immunitaire et de l'initiation de la pathologie auto-immunitaire.



Genetic alterations and tumor immune attack in Yo paraneoplastic cerebellar degeneration

Mathilde Small^{1,2,3} · Isabelle Treilleux⁴ · Coline Couillault^{3,5} · Daniel Pissaloux^{4,6} · Géraldine Picard² · Sandrine Paindavoine^{4,6} · Valéry Attignon⁶ · Qing Wang⁶ · Véronique Rogemond^{1,2} · Stéphanie Lay² · Isabelle Ray-Coquard⁷ · Jacobus Pfisterer⁸ · Florence Joly⁹ · Andreas Du Bois¹⁰ · Dimitri Psimaras² · Nathalie Bendriss-Vermare^{3,5} · Christophe Caux^{3,5} · Bertrand Dubois^{3,5} · Jérôme Honnorat^{1,2,3} · Virginie Desestret^{1,2,3}

Received: 8 November 2017 / Revised: 22 December 2017 / Accepted: 23 December 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Paraneoplastic cerebellar degenerations with anti-Yo antibodies (Yo-PCD) are rare syndromes caused by an auto-immune response against neuronal antigens (Ags) expressed by tumor cells. However, the mechanisms responsible for such immune tolerance breakdown are unknown. We characterized 26 ovarian carcinomas associated with Yo-PCD for their tumor immune contexture and genetic status of the 2 onconeural Yo-Ags, *CDR2* and *CDR2L*. Yo-PCD tumors differed from the 116 control tumors by more abundant T and B cells infiltration occasionally organized in tertiary lymphoid structures harboring *CDR2L* protein deposits. Immune cells are mainly in the vicinity of apoptotic tumor cells, revealing tumor immune attack. Moreover, contrary to un-selected ovarian carcinomas, 65% of our Yo-PCD tumors presented at least one somatic mutation in Yo-Ags, with a predominance of missense mutations. Recurrent gains of the *CDR2L* gene with tumor protein overexpression were also present in 59% of Yo-PCD patients. Overall, each Yo-PCD ovarian carcinomas carried at least one genetic alteration of Yo-Ags. These data demonstrate an association between massive infiltration of Yo-PCD tumors by activated immune effector cells and recurrent gains and/or mutations in autoantigen-encoding genes, suggesting that genetic alterations in tumor cells trigger immune tolerance breakdown and initiation of the auto-immune disease.

Keywords Paraneoplastic cerebellar degeneration · Ovarian cancer · Autoantigen-encoding gene mutations · Anti-tumor immunity

Mathilde Small, Isabelle Treilleux, Coline Couillault, Bertrand Dubois, Jérôme Honnorat and Virginie Desestret contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1802-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jérôme Honnorat
jerome.honnorat@chu-lyon.fr

- ¹ Institut NeuroMyogène, Equipe Synaptopathies et Autoanticorps (SynatAc), INSERM U1217/UMR CRS 5310, Lyon, France
- ² French Reference Center on Paraneoplastic Neurological Syndrome, Hospices civils de Lyon, Lyon, France
- ³ University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France
- ⁴ Department of Biopathology, Centre Leon Berard, Lyon, France

Introduction

Paraneoplastic neurological syndromes (PNS) are rare auto-immune diseases triggered by an anti-cancer immune response [7]. Paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD),

- ⁵ INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Leon Berard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France
- ⁶ Cancer Genomics Platform, Department of Translational Research, Centre Leon Berard, Lyon, France
- ⁷ Department of Oncology, Groupe GINECO, Centre Leon Berard, Lyon, France
- ⁸ Gynecologic Oncology Center, Kiel, Germany
- ⁹ Centre Francois Baclesse, Groupe GINECO, Caen, France
- ¹⁰ Kliniken Essen Mitte, Essen, Germany

the most common PNS, is a subacute ataxia caused by an extensive and selective Purkinje cell death associated with specific circulating autoantibodies (Abs). The most frequent PCD is associated with Yo-Abs (Yo-PCD) and ovarian or breast carcinoma [12]. Yo-Abs are directed against cerebellar-degeneration-related protein 2 (CDR2) and its paralog CDR2L, two onconeural antigens (Ags) physiologically expressed by Purkinje cells but also by tumor cells [6, 9, 40]. Yo-PCD is very rare (around 10 diagnosed cases per year in France) and the pathophysiological hypothesis is a cross-immune reaction between tumor-Ags and Purkinje cells [43]. However, the exact mechanisms are totally unknown. Sparse studies performed on a very limited number of cases indicate that one hallmark of PCD-associated tumors is the presence of frequent inflammatory infiltrates, usually dominated by T cells or plasma cells [28, 42]. This, together with the presence of onconeural-Ag-specific CD8⁺ T cells in the blood of PCD patients, argues for the existence of naturally-occurring anti-tumor immunity in these patients [1, 4, 32]. However, expression of Yo-Ags by tumor cells seems not sufficient to trigger autoimmunity against Purkinje cells and mechanisms responsible for immune tolerance breakdown to onconeural Ags remain unclear [38, 39]. In the present study, we analyzed the salient features of ovarian tumors associated with Yo-PCD, namely their histological and immune cell infiltrate characteristics, their genomic profiles, and the mutational status of onconeural Ags.

Methods

Clinicopathological cohort

To be included, patients had to meet the following criteria: (1) presence of Yo-Abs in serum or cerebrospinal fluid detected using immunohistochemistry on rat brain sections and by dot-blot using commercial tests (RAVO diagnostika and Euroimmun); (2) histologically proven ovarian cancer with available tumor sample; (3) PCD diagnosis according to the international guidelines [14]. With standard protocol approval and patient consent, we collected 25 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples and one fresh surgical specimen of tumors sampled before any systemic treatment, and 19 constitutional DNA of Yo-PCD patients. Detailed clinical data on cancer and PCD were collected and are summarized in Table 1 and detailed in the Supplementary Table S1 in Online Resource.

Control specimens

Histological data and microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) profiles were compared to a control cohort of 116 FFPE ovarian carcinomas,

Table 1 Clinico-pathological description of the Yo patient cohort

	Cohort population, <i>n</i> = 26
Mean age at tumor diagnosis, years (SD)	64.1 (9.8)
Median time between PCD and tumor diagnosis, months [range]	1.27 [– 72.4 to 11.2]
Staging at tumor diagnosis—stage, <i>n</i> (%)	
I	3 (11.5)
II	4 (15.4)
III	15 (57.7)
IV	4 (15.4)
Histological subtypes, <i>n</i> (%)	
HGSC	24 (92.3)
Other	2 (7.7)

SD standard deviation, PCD paraneoplastic cerebellar degeneration, HGSC high-grade serous carcinoma

studied by the bio-pathology department of the Centre Léon Bérard (Lyon, France), as part of the ARCAGY-GINECO/Boehringer Ingelheim AGO-OVAR12 ancillary molecular study. For immunohistochemical studies, tissue microarrays (TMAs) were constructed from control tumors with triplicate cores for each case, including immune infiltrates when present.

Tumor pathological study

Four µm-thick FFPE tissue sections were stained with hematoxylin–phloxine–safran (HPS). A referent pathologist (IT) assessed the histological subtype of ovarian cancer according to the WHO classification [20]. HPS-stained whole slides of Yo-PCD and control tumors were examined at low magnification and the inflammatory infiltrates were scored semi-quantitatively as low, moderate, or high.

Immunohistochemical and immunofluorescence study

Detailed chromogen immunohistochemistry and immunofluorescence protocols and antibodies are described in the Supplemental methods in Online Resource. Briefly, classical diagnostic markers and immune cell immunostainings were obtained by routine automated protocols. CDR2L and CDR2 expressions were assessed using an automated or a manual IHC protocol, respectively. A staining intensity value from 0 (no staining) to 3 (high staining) was given by manual quantification with two blinded evaluators. Immunohistochemistry for immune cell populations and CDR2L/CDR2 was performed on TMAs for control tumors and whole tissue sections for Yo-PCD ovarian carcinomas. Manual multiparametric immunofluorescence staining was performed to analyze the functional structuration level of intratumoral

immune cells, to characterize and localize CD8⁺ T cells, Ab-producing cells and mature DC-LAMP⁺ dendritic cells, and to identify cells expressing CDR2L.

Multiparametric flow cytometry (MFC)

Tumor infiltrating immune cells were analyzed in a freshly resected Yo-PCD tumor (#26) by MFC as detailed in the Supplemental methods in Online Resource.

Array CGH

aCGH (accession number in NCBI's Gene Expression Omnibus: GSE96039) was performed on 17 Yo-PCD ovarian tumors and compared to the control cohort of 116 ovarian cancers without Yo-PCD. Fragmentation, labeling, co-hybridization on 4 × 180 K Agilent SurePrint G3 Human whole-genome oligonucleotide arrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA #G4449A), scanning and analysis are fully described in Online Resource.

DNA sequencing

CDR2 and *CDR2L* genes were sequenced using the Miseq next-generation sequencing (NGS) platform (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions described in Supplemental methods in Online Resource. Sequence data generated was aligned using Next-GENe (Softgenetics, State College, PA, USA) upon human reference sequences hg38 for *CDR2* (NM_001802.1) and *CDR2L* (NM_014603.2).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R software version 3.1.1 (<http://www.r-project.org/>). The *p* values for demographic data, stages and inflammatory infiltrates comparison were obtained using Chi-squared test, two-sample *T* test and Fisher's exact test for count data. Pearson correlation coefficient was used to analyze the association between histological parameters.

Results

Yo-PCD ovarian tumors are classical high-grade carcinomas

Twenty-four out of the 26 analyzed Yo-PCD ovarian tumors were high-grade serous carcinomas (HGSC) and this proportion (92.3%) was similar to that found in the control group (96/116 HGSC, 82.7%; *p* = 0.37). The remaining tumors were a clear cell carcinoma and a carcinosarcoma. Yo-PCD

ovarian carcinomas expressed the diagnostic markers of their histological subtype (Table S1 in Online Resource).

Recurrent 17q gains carrying *CDR2L* gene and *CDR2L* overexpression in Yo-PCD tumors

aCGH was performed on 17 ovarian carcinomas (including 15 HGSC) associated with Yo-PCD and compared to the control group of 116 ovarian tumors (96 HGSC). Penetration plots (sum of copy number imbalances of all aCGH profiles) were built for each group (Fig. 1a). Despite strong similarities between the genomic profiles of Yo-PCD and control tumors, the chromosome 17q gain was significantly more frequent in Yo-PCD tumors, with a telomeric minimal overlapping region containing the *CDR2L* gene locus at 17q25. The *CDR2L* gene was recurrently gained in 10/17 (58.8%) of Yo-PCD ovarian tumors, with a high-level gain in 29.4% of cases, while it was gained in only 35/116 (30.1%) control tumors, including a high-level gain only in 6% of them (*p* = 0.002). No significant differential copy number variations were detected for the *CDR2* gene locus at 16p12 between the 2 groups of tumors [low-level gain in 5/17 (29%) Yo-PCD ovarian tumors versus 31/116 (26.2%) control tumors, *p* = 0.82]. Overall, 70.5% Yo-PCD tumors (12/17) were found to have gains in at least one Yo-PCD Ag gene while only 40.5% of control tumors (47/116) did so (*p* = 0.02).

At the protein level, CDR2L was detected in tumor cells of all Yo-PCD patients versus 94/116 control patients (*p* = 0.04) and the expression level was higher than in controls (mean ± SD intensity score: 1.97±0.44 versus 0.93±0.63 in control tumors, *p* < 0.0001, Fig. 1b, c). A weak expression of CDR2 was detected in 10/25 Yo-PCD (Fig. 1d).

Yo-PCD patients frequently harbor tumoral *CDR2L* and/or *CDR2* mutations

Mutations in *CDR2L* and *CDR2* genes were screened by targeted NGS in tumors (*n* = 17) and blood (*n* = 19) of Yo-PCD patients, including five matched tumor/blood DNA. As summarized in Table 2, 11 Yo-PCD tumors (65%) carried at least one mutation in either *CDR2* or *CDR2L* gene and 4 of them harbored mutations in both genes. Five tumors presented multiple mutations (up to 5) in the *CDR2L* gene. Overall, 19 variants in the *CDR2L* gene and 7 variants in the *CDR2* gene were detected. All but two variants (*CDR2L* c.595G>A in patient 6, and *CDR2* c.192+5T>TA in patient 1) have not been reported in SNP databases so far. This, together with the absence of mutations in the matched constitutional counterpart (available for patients 2 and 10) and in the blood DNA of 16/17 Yo-PCD patients without evaluable tumor tissue, indicated that they were somatic

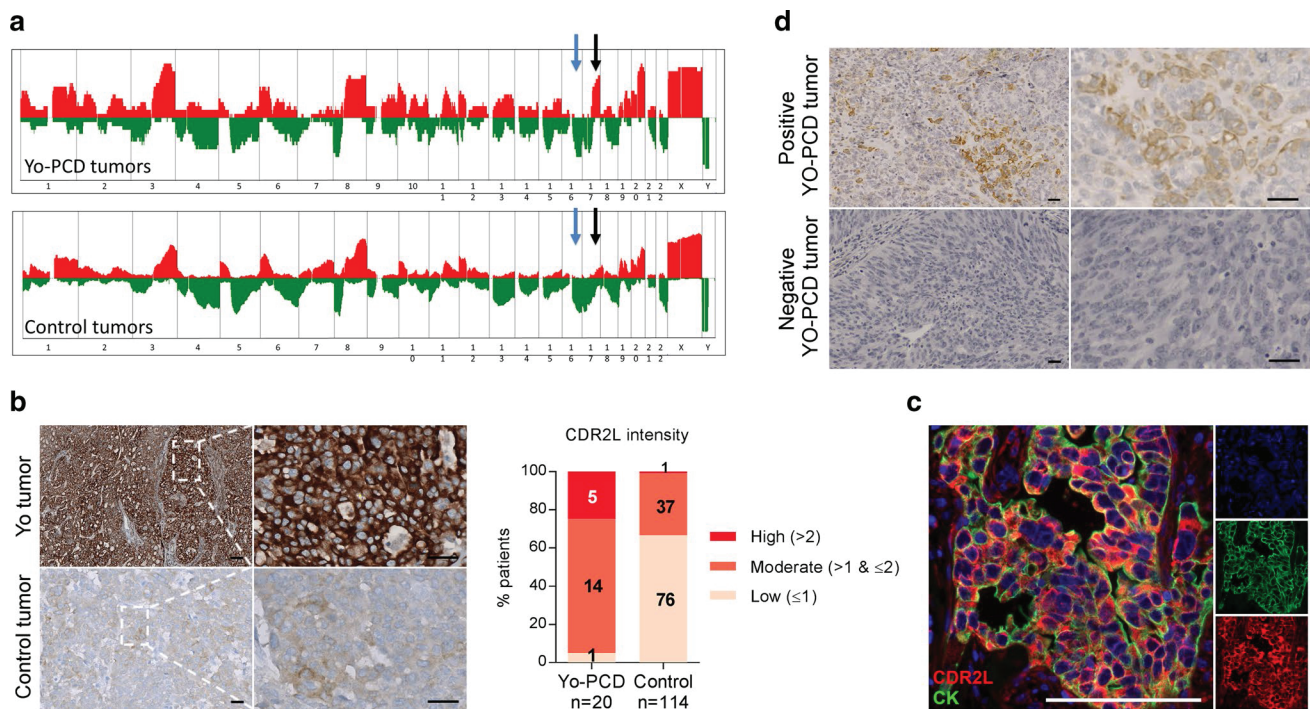


Fig. 1 Recurrent gain in chromosome 17q and CDR2L overexpression in Yo-PCD ovarian tumors. **a** Penetrance plots of Yo-PCD and control ovarian tumors showing more frequent recurrent gains in the chromosome 17q carrying *CDR2L* locus (black arrow) in Yo-PCD tumors compared to control tumors. No significant recurrent gains were observed in the *CDR2* gene area in the 16p12 locus (blue arrow). **b** Representative CDR2L IHC staining of Yo-PCD tumors (top pictures) versus control ovarian tumors (bottom pictures). The right histogram indicates the proportion of Yo-PCD tumors versus

control ovarian tumors harboring high, moderate and low CDR2L IHC staining. **c** Representative IF staining of Yo-PCD ovarian tumors with antibodies to cytokeratins (CK, green) and CDR2L (red). Hoechst was used to visualize nuclei (blue) and pictures in the left correspond to individual channels. **d** Representative CDR2 IHC staining of Yo-PCD ovarian tumors showing a weak expression by tumor cells (top pictures) or no expression at all (bottom pictures). Scale bars: 100 μ m

mutations. Missense mutations were predominant (13/19 in *CDR2L* and 5/7 in *CDR2*) and might increase the immunogenicity of the onconeural Ags. Indeed, for the sole patient with mutations and for which its MHC genotype could be determined (patient #2), each of the 4 detected mutations (2 on *CDR2* and 2 on *CDR2L*) was predicted to significantly increase the affinity of the onconeural Ags for at least 1 MHC-class-I allele (Fig S6). In particular, 2 peptides encompassing the mutated residue were predicted as high-affinity MHC-class-I binders, whereas their wild-type counterpart had very limited affinity. This was particularly striking for HLA-A*29:02, where the predicted median inhibitory concentration (IC_{50}) was 19 nM for the mutant (MLQSEHPFVY) peptide versus > 20,000 nM for the wild-type peptide (MLQSEHPFVN). Truncating mutations (frameshift, nonsense), in-frame deletion and intronic variant close to splicing site were found in seven patients. None of these mutations was reported among the 841 ovarian carcinomas studied in the COSMIC and TCGA public somatic mutation databases; only one mutation was reported for *CDR2L* that was different to those found herein, and no mutation for *CDR2*. Every Yo-PCD patient presented at least one

abnormality in *CDR2* or *CDR2L* (gene CNV, protein overexpression or gene mutation), but the patients with gains in *CDR2L* gene and protein overexpression were not always the same patients as those with *CDR2L* or *CDR2* mutations. Indeed, four patients (no. 7, 13, 20, 25) presented *CDR2L* gene gains and protein overexpression but did not display Yo gene mutations (see Table S2 in Online Resource).

Yo-PCD ovarian tumors are highly infiltrated by T and B cells that can organize in tertiary lymphoid structures

Yo-PCD tumors differed from control tumors by a more frequent and a higher immune cell infiltration. Indeed, 72% of Yo-PCD tumors (18/25) displayed moderate to high inflammatory infiltrates (score of 2 or 3), versus only 10% of control tumors (12/116, $p < 0.0001$; Fig. 2a). Such high inflammatory infiltrates were detected both in tumors diagnosed before (3.5–72.4 months, $n = 12$) or after (1.2–11.2 months, $n = 13$) the onset of PCD. Tumors preceding PCD were significantly less infiltrated than those diagnosed after the onset of PCD ($p < 0.05$), but in both cases the immune

Table 2 Genetic alterations and immune infiltrates in Yo ovarian tumors

Patient no.	PCD-cancer delay, months	Histo-logical subtype	<i>CDR2L</i> CNV	<i>CDR2L</i> mutations, amino acid changes	<i>CDR2</i> CNV	<i>CDR2</i> mutations, amino acid changes	TILs score
1	1.4	HGSC	Gain	c.487G>C-p.E163Q	Diploid	c.192+5T>TA	+++
2	1.6	HGSC	Diploid	c.394C>T-p.Q132X c.628C>T-p.R210W c.1180C>T-p.R394W	Diploid	c.805A>T-p.N269Y c.263A>C-p.D88A	+++ ^a
4	11.2	HGSC	High-level gain	WT	Gain	WT	++
6	2.5	HGSC	Diploid	p.V199M-c.595G>A	Diploid	WT	+++ ^a
7	5.1	HGSC	High-level gain	WT	Gain	WT	++
8	2.5	HGSC	Gain	WT	Heterozygous deletion	c.1342_1343delinsAA-p.R448 K	+++ ^a
9	1.6	HGSC	Diploid	c.242C>T-p.A81V c.11C>T-p.A4V	Diploid	WT	++
10	1.2	HGSC	High-level gain	c.235C>T-p.Q79X	Diploid	WT	+
11	2.6	HGSC	High-level gain	WT	Gain	c.1280A>G-p.K427R	++
13	5.6	HGSC	Diploid	WT	Gain	WT	++
14	- 8.4	HGSC	High-level gain	c.1140_1154delAGT GCGGCACGC CGG-p.V381_ G385del c.862C>T-p.P288S c.1370C>T-p.T457I	Diploid	c.1218_1219insC-p. S407delinsLCfs	++
16	- 54.8	HGSC	Diploid	c.341+1G>AG c.388C>T-p.Q130X c.506G>A-p.R169Q c.733C>T-p.Q245X c.934G>A-p.V312M	Diploid	WT	0
18	- 16.3	HGSC	Gain	c.796G>A-p.G266S c.772A>T-p.K258X	Diploid	c.325C>GC-p.Q109EQ	++
20	- 28.4	HGSC	Gain	WT	Diploid	WT	++ ^a
21	- 72.4	CCC	Diploid	c.1253T>A-p.L418Q	Diploid	WT	0
24	- 3.5	CC	Diploid	WT	Gain	WT	+
25	- 25.6	HGSC	Gain	WT	Diploid	WT	+

CNV copy number variation, TILs tumor infiltrating lymphocytes, HGSC high-grade serous carcinoma, CCC clear cell carcinoma, CC carcinosarcoma, WT wild-type sequence

^aPresence of tertiary lymphoid structures (TLS)

infiltration was higher than in control samples (Fig. S1 in Online Resource). In Yo-PCD tumors, the density of inflammatory infiltrates is almost significantly correlated with the intensity of *CDR2L* expression (Pearson's correlation coefficient: $r = 0.49$, $p = 0.06$).

IHC and IF revealed that 92% (23/25) of these immune infiltrates contained moderate to very high densities of T cells, and B cells in 84% (21/25) of the cases (Fig. 2b, Figs. S2 and S3 in Online Resource). Four patients harbored tertiary lymphoid structures (TLS) defined by segregated T and B cell zones and high endothelial venules (Fig. 2b). Mature dendritic cells (DC) identified by

DC-LAMP expression, which are an essential component of TLS [8, 24], were more frequently observed in Yo-PCD tumors than in control ovarian tumors (76 versus 4.1%, $p < 0.001$). They were detected at moderate to high densities in a substantial fraction of Yo tumors without TLS and often localized close to tumor cells (Fig. 2c). High *CDR2L* expression was detected in germinal centers of all tumors with TLS, but not in surrounding normal lymphoid structures (Fig. 2d), suggesting existence of immune-complex deposits and an ongoing humoral immune response against *CDR2L*.

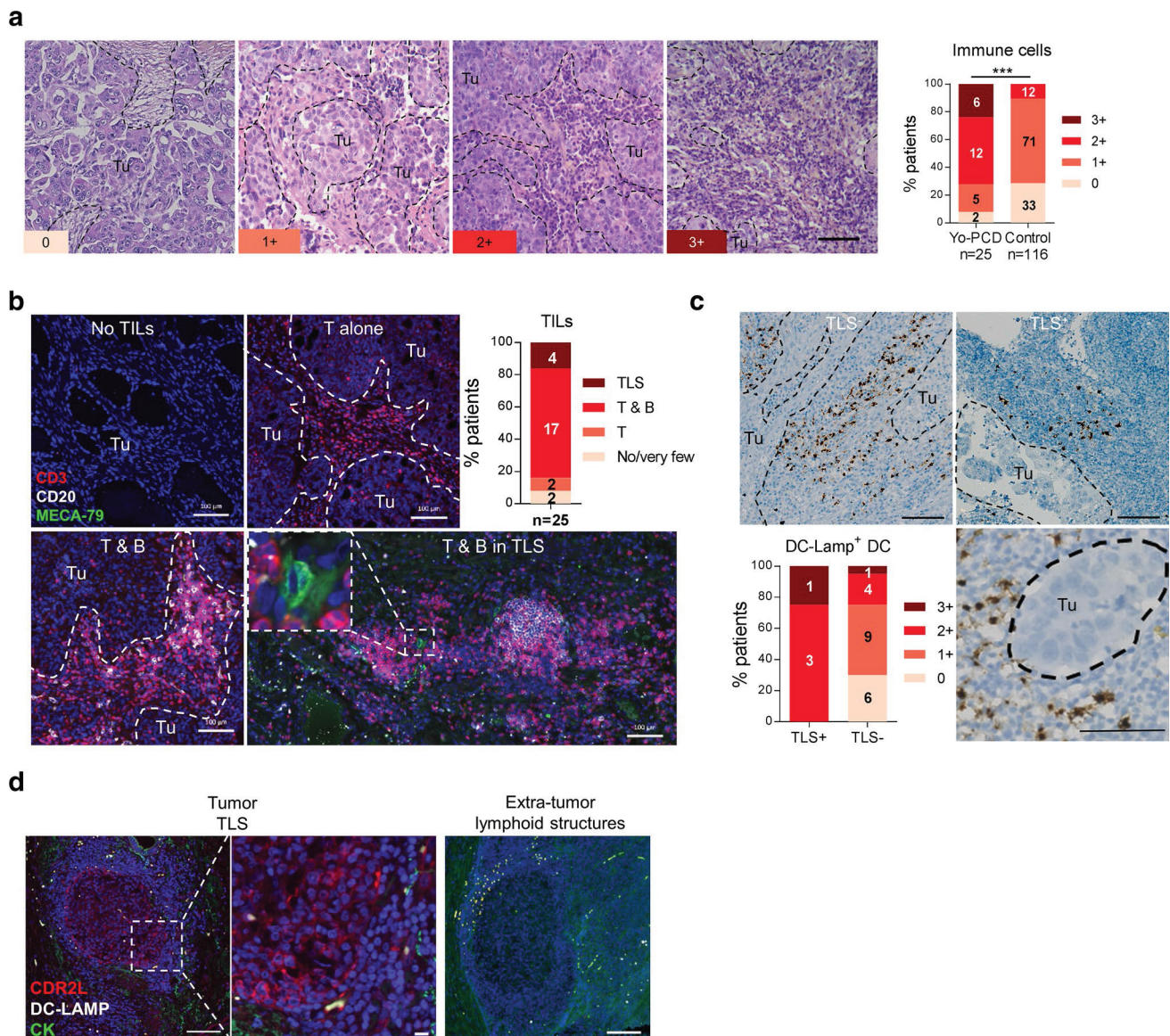


Fig. 2 Characterization of the immune contexture of Yo-PCD ovarian tumors. **a** Representative HPS staining of Yo-PCD ovarian tumors with no (score 0), weak (score 1+), moderate (score 2+) or high (score 3+) immune cell infiltration, and comparison of immune cell infiltrates between Yo-PCD ($n = 25$) and control ($n = 116$) ovarian tumors. **b** Representative IF staining for CD3 (red), CD20 (white) and MECA-79 (green) of Yo-PCD ovarian tumors showing samples with no tumor infiltrating lymphocytes (no TILs), only T cells (T alone), un-structured B and T cells (T and B) or with tertiary lymphoid structure (TLS) harboring segregated T and B cell clusters (T and B in TLS) and high endothelial venules, based on MECA79 staining. The upper right histogram represents the semi-quantitative analysis of the nature and structuration of TILs among the 25 analyzed tumors.

Yo-PCD ovarian tumors display signs of immune attack borne by IgG-producing cells and cytotoxic CD8⁺ T cells

Twenty-three out of the 25 Yo-PCD tumors were infiltrated

by effector cells, including Ab-producing cells and CD8⁺ T cells (Fig. 3a). Plasma cells (PC) were present at high to very high densities in 80% of tumors (Fig. 3b). Interestingly, IgG producing CD138⁺IRF4⁺ plasma blasts (PB) always outnumbered mature CD138⁺IRF4⁺ PC, suggesting local

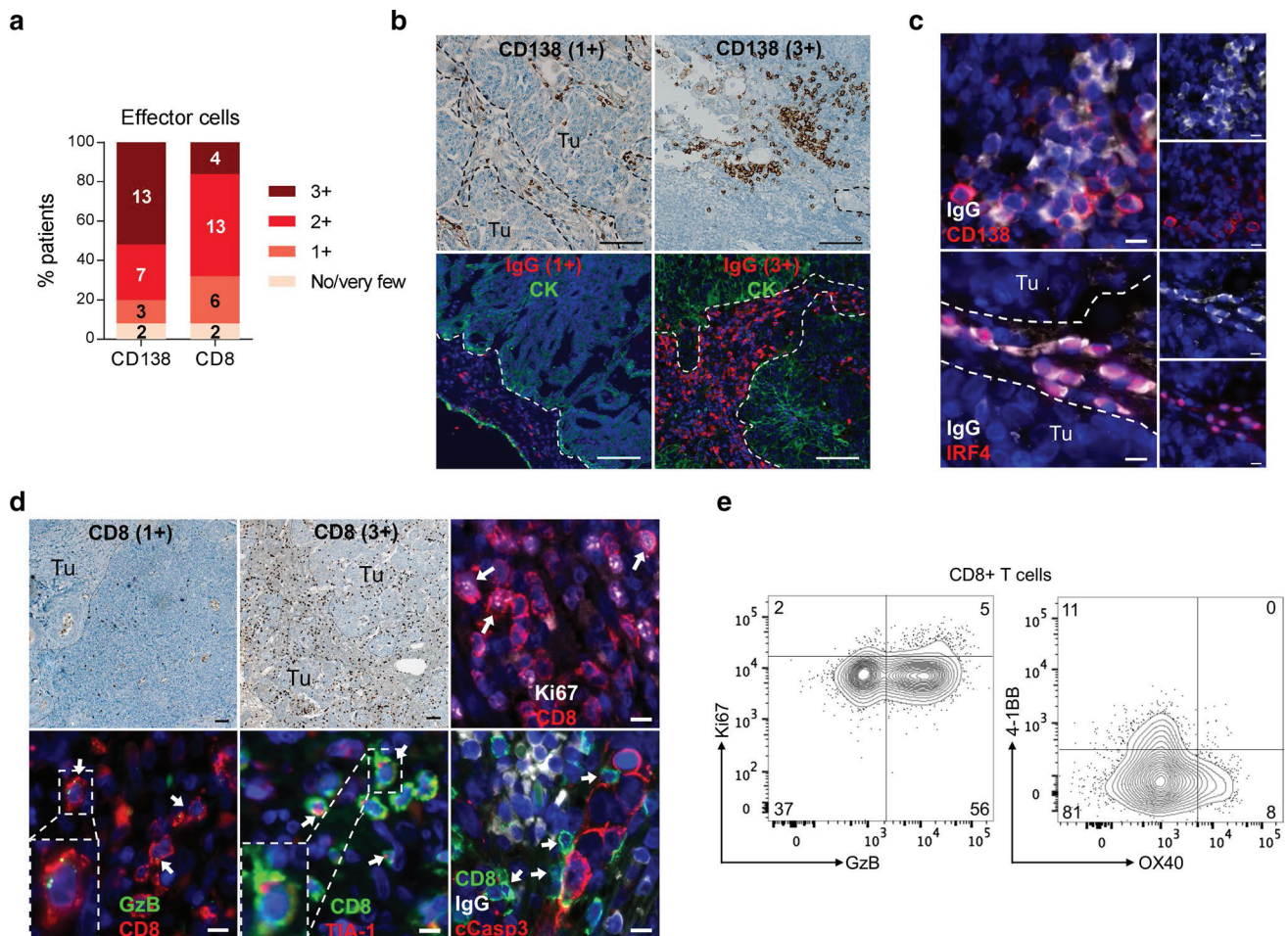


Fig. 3 Massive infiltration of Yo-PCD ovarian tumors by cytotoxic CD8⁺ T cells and Ab-producing cells. **a** Graph representing the scoring of PC (based on CD138 staining) and CD8⁺ T cell (based on CD8 staining) infiltration in ovarian tumors of the entire cohort of Yo-PCD patients ($n = 25$). **b** Representative CD138 IHC (top) and IgG/CK IF (bottom) staining of Yo-PCD ovarian tumors showing a weak (score 1+) or high (score 3+) infiltration by PC (CD138⁺) and IgG producing cells. Scale bars 100 μ m. The frontier between the tumor area (Tu) and the stroma is indicated by a dotted line. **c** IF staining of Yo-PCD ovarian tumor sections with antibodies against IgG and CD138 or IgG and IRF4. DNA was stained with Hoechst. Right inserts correspond to individual channels. Scale bars 10 μ m. **d** IHC detection of

CD8 in Yo-PCD ovarian tumor sections containing either few (score 1+) or very abundant (score 3+) CD8⁺ cells. Representative IF staining of CD8 and Ki67, CD8 and GzB, CD8 and TIA-1 and CD8, IgG and cleaved Caspase 3. DNA was stained with Hoechst. Arrows highlight CD8⁺ T cells expressing, respectively, Ki67, GzB, TIA-1 or in contact with tumor cells expressing activated caspase 3. Scale bars 100 μ m (upper row) or 10 μ m (lower row). **e** FCM analysis of cell suspensions obtained by enzymatic digestion of a fresh Yo-PCD ovarian tumor. Dot plots show the staining with Ab to Granzyme B, Ki67, OX40 and 4-1BB on viable CD8⁺ T cells (CD45⁺CD3⁺CD8⁺ cells). Numbers indicate percentages of positive cells in each quadrant

differentiation (Fig. 3c). Flow cytometry analysis of the only available fresh Yo-PCD ovarian tumor confirmed a massive infiltration by IgG-producing cells compared to control ovarian tumors and revealed that the remaining tumor infiltrating B cells essentially consisted of memory B cells (Figs. S4 and S5 in Online Resource). CD8⁺ T cells were found both in the stroma and the tumor nests of 23/25 Yo-PCD carcinomas. Their cytotoxic potential was revealed by Granzyme B and Cytotoxic Granule-Associated RNA-Binding Protein TIA-1 expression (Fig. 3d). FCM data further indicated that a major proportion of CD8⁺ T cells produced Granzyme B and that some expressed activation markers (OX40, 4-1BB, or the

nuclear proliferation Ag Ki67; Fig. 3e). Furthermore, CD8⁺ T cells can be found in contact with apoptotic tumor cells positive for cleaved caspase 3, revealing, at least focally, an anti-tumor immune attack (Fig. 3d).

Discussion

Mechanisms leading to immune tolerance breakdown and autoimmunity in paraneoplastic diseases remain poorly understood. We demonstrate herein that ovarian carcinomas associated with Yo-PCD strikingly differ from conventional

tumors, not by histological subtype, but by genetic alterations of onconeural Ags and high level of cytotoxic CD8⁺ T and IgG plasma cell infiltration [23]. Tumor cells from all analyzed Yo-PCD patients indeed exhibit mutations and/or gains in *CDR2* and/or *CDR2L* genes. These very high rates of genetic alterations are original and specific to Yo-PCD tumors as they have not been previously reported in more than 800 other ovarian carcinomas.

Somatic Yo-Ag mutations in Yo-PCD tumor cells were detected herein in two-thirds of patients. These mutations might increase the immunogenicity of onconeural proteins by creating neoepitopes, which are now recognized as an important component of human tumor immunogenicity and have been associated with the therapeutic efficacy of inhibitory immune checkpoint (ICP) blockers [21, 41]. For the sole patient with mutations and available MHC genotype, each of the 4 non-synonymous mutations were indeed predicted to generate CD8 T cell neoepitopes with high-affinity binding properties to at least 1 MHC-class-I allele. Induction of neoepitope-specific effector T cells could limit tumor growth, but also trigger the auto-immune reaction by cross-recognition of un-mutated epitopes on neuronal cells. Such a hypothesis is consistent with a recent report in paraneoplastic scleroderma with anti-RCP1 autoantibodies in which patients harbored a missense mutation in the Ab targeted *POLR3A* gene and T cells reactive to the neoepitopes [16]. Frameshift or nonsense mutations leading to protein truncation in 5 of the tumors analyzed in the present study could also contribute to the breakdown of tolerance against onconeural Ags. Indeed, it has been recently shown that truncating mutations in self-antigens can simultaneously generate autoimmunity and anti-tumor immunity against normally silent epitopes [10, 18]. Several active mechanisms normally limit the production of truncated proteins, via nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and degradation of abnormal proteins through the ubiquitin–proteasome system [11, 17]. Since these pathways enhance tumor immunity, it would therefore be interesting to analyze if Yo-PCD tumors harbor deficient NMD or proteasome function [27].

Tumor amplification of Yo-Ags is also clearly an important clue, as gains in *CDR2*, *CDR2L* or both genes were observed in 12 out of the 17 tumors. Interestingly, gene amplification has been previously suggested as a mechanism of paraneoplastic disease in membranous nephropathy [15]. Intriguingly, besides Yo-Ags, the recurrent telomeric and segmentary gains observed in Yo-PCD ovarian carcinomas in the 17q region also concerns *TOP2A*, *RPTOR*, *SOX9*, *NME1* and *PPM1D* genes, which are all involved in ovarian oncogenesis [22, 29, 31]. Moreover, the chromosome 17q also carries *ERB2*, the gene coding for the human epidermal growth factor receptor 2 (Her2). A previous work has revealed an original overexpression of Her2 in Yo-PCD breast cancers [30], which could be linked to *ERB2* gene

amplification. Deciphering the potential roles of these genes in PCD will require further dedicated studies.”

If *CDR2* is commonly expressed in ovarian carcinomatous cells [5], we demonstrated that *CDR2L* is overexpressed in the majority of Yo-PCD ovarian carcinomas, including those without gene copy number variations, suggesting that additional mechanisms besides gene amplification might account for high tumor protein expression. Protein overexpression seems to play a major role to elicit an auto-immune response since 6 tumors out of 12 with *CDR2* or *CDR2L* gene amplification had no mutation. Mechanisms of immune tolerance breakdown may be different from patient to patient since all patients do not necessarily present similar individual or combination of abnormalities in *CDR2* and/or *CDR2L*. However, every Yo-PCD patient presented at least Yo gene amplification/protein overexpression or Yo gene mutation, suggesting that each of these alterations might be sufficient per se to break tolerance and trigger Yo disorders.

These tumor genetic alterations more often targeted *CDR2L* than *CDR2* and only *CDR2L* was found overexpressed in tumor cells of most Yo-PCD patients, suggesting that *CDR2L* could be the major antigen in Yo-PCD, as already suggested elsewhere [34]. In addition, *CDR2L* was systematically detected in germinal centers of all tumors with TLS, revealing an ongoing local immune response against this onconeural Ag. The two proteins share 45% sequence identity and the identified mutations are disseminated in the respective sequences without evident focus in a localized and common domain (data not shown). Further studies are needed to assess whether the MHC-restricted-T cell responses in Yo-PCD patients discriminate between the mutant and the WT versions of Yo antigens.

As other authors have done [28, 35, 37, 42], we observed a massive infiltration of Yo-PCD tumors by immune cells. We further revealed that the immune infiltrate mostly consisted of both T and B cells, which occasionally organized in TLS. These immune infiltrates are present long before the onset of Yo-PCD when cancer antedates the neurological syndrome and increase with PCD development, suggesting a tumor-dependent triggering of this immune response. Most tumors are highly infiltrated by IgG-producing plasma cells and plasmablasts, and to a lesser extent by memory B cells. The presence of B cells at different stages of differentiation, including a dominant contingent of antibody producing cells, together with the presence of TLS with *CDR2L* deposits in germinal centers strongly suggest that these tumors constitute an active site of initiation or amplification of humoral immunity to onconeural Ags. In this context, treatments aimed to deplete plasma cells or their precursors (B cells) could provide some clinical benefit in Yo-PCD. The important contingent of CD8⁺ T cells expressing cytolytic markers, in the vicinity of activated caspase 3⁺ apoptotic tumor

cells, also indicates a potential efficient ongoing cellular anti-tumor immunity. High densities of intra-epithelial CD8⁺ T cells have been extensively shown to be associated with improved survival of ovarian cancer patients [33, 36, 44], but recent studies revealed that their prognostic value is restrained to the presence of other TILs, especially B cell [26] and PC [19]. The high infiltration of Yo-PCD ovarian tumors by CD8⁺ T, B and IgG-producing cells might thus account for the tumor control that is thought to occur in PCD patients [2, 13]. Another particular feature is the frequent infiltration by mature DC, which are present at high densities even in tumors with no detectable TLS. Even more intriguingly, mature DC-LAMP⁺ DC were often located in contact with tumor cells, while they are usually located at distance from tumor nests in cancer patients without PCD [3]. Accumulation of mature DC clustered with tumor cells may trigger local expansion of Ag-specific memory cytotoxic CD8⁺ T cells as reported in melanoma patients [25]. The characterization of such DC and whether they contribute to presentation of onconeural Ags remain to be determined.

These new data add credence to the idea that genetic alteration of onconeural Ags, including gains and mutations, play a major role in the induction of the immune response associated to PCD. Besides offering novel insights into the pathogenesis of PCD, this study highlights that they constitute an exceptional model to decipher the mechanisms of tumor immune surveillance.

Acknowledgements This work was supported by the LYric Grant INCa-DGOS-4664, by the Ligue Contre le Cancer Comité du Rhône and Comité de Savoie, and by a grant from Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. The funding sources had no role in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of data and in the writing of the manuscript. We thank NeuroBioTec Hospices Civils de Lyon BRC (France, AC-2013-1867, NFS96-900) for banking blood DNA samples. We thank Boehringer Ingelheim and the investigators of the AGO/GINECO group for providing control ovarian cancer specimens from the AGO-OVAR12 ancillary study. We thank M. Aguera for collecting samples and the PHENOCAN platform (ANR-11-EQPX-0035 PHENOCAN) for access to the Zeiss Axio San.Z1 slide scanner. We also thank D. Meyronet from the Pathology Department of Hospices Civils de Lyon for his expertise and for providing cerebellum samples, and M.-E. Mayeur, L. Odeyer, A. Colombe, A.-L. Pinto and J. Berthet for expert technical assistance in IHC/IF staining. We thank Doctor N. Chopin (Centre Leon Berard, Lyon) for his collaboration. We gratefully acknowledge Philip Robinson for English language editing (Direction de la Recherche Clinique, Hospices civils de Lyon).

Compliance with ethical standards

Ethical approval Patients had died or given their written consent for the use of their tumor and blood samples for research purposes. For genetic analysis, DNA from blood lymphocytes was obtained from NeuroBioTec Hospices Civils de Lyon BRC (France, AC-2013-1867, NFS96-900) with an approval from an independent review board (Comité de Protection des Personnes Sud-Est IV).

Conflict of interest The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

1. Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB (1998) Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 4:1321–1324. <https://doi.org/10.1038/3315>
2. Albert ML, Darnell RB (2004) Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 4:36–44. <https://doi.org/10.1038/nrc1255>
3. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J (1999) In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190:1417–1426
4. Carpenter EL, Vance BA, Klein RS, Voloschin A, Dalmau J, Vonderheide RH (2008) Functional analysis of CD8⁺ T cell responses to the onconeural self protein cdr2 in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol* 193:173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.10.014>
5. Corradi JP, Yang C, Darnell JC, Dalmau J, Darnell RB (1997) A post-transcriptional regulatory mechanism restricts expression of the paraneoplastic cerebellar degeneration antigen cdr2 to immune privileged tissues. *J Neurosci* 17:1406–1415
6. Darnell JC, Albert ML, Darnell RB (2000) Cdr2, a target antigen of naturally occurring human tumor immunity, is widely expressed in gynecological tumors. *Can Res* 60:2136–2139
7. Darnell RB, Posner JB (2003) Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 349:1543–1554. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023009>
8. Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman W-H, Cadranet J (2008) Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 26:4410–4417. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0284>
9. Eichler TW, Totland C, Haugen M, Qvale TH, Mazengia K, Storstein A, Haukanes BI, Vedeler CA (2013) CDR2L antibodies: a new player in paraneoplastic cerebellar degeneration. *PLoS One* 8:e66002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066002>
10. Engelhorn ME, Guevara-Patiño JA, Noffz G, Hooper AT, Lou O, Gold JS, Kappel BJ, Houghton AN (2006) Autoimmunity and tumor immunity induced by immune responses to mutations in self. *Nat Med* 12:198–206. <https://doi.org/10.1038/nm1363>
11. Frischmeyer PA, Dietz HC (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8:1893–1900
12. Furneaux HF, Reich L, Posner JB (1990) Autoantibody synthesis in the central nervous system of patients with paraneoplastic syndromes. *Neurology* 40:1085–1091
13. Graus F, Dalmau J, René R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Viñolas N, Garcia del Muro J, Vadalá C, Mason WP, Rosell R, Posner JB, Real FX (1997) Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 15:2866–2872. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.8.2866>
14. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler C, Verschuuren JJGM, Vincent A, Voltz R (2004) Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1135–1140. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.034447>
15. Hoxha E, Wiech T, Stahl PR, Zahner G, Tomas NM, Meyer-Schwesinger C, Wenzel U, Janneck M, Steinmetz OM, Panzer U,

- Harendza S, Stahl RAK (2016) A mechanism for cancer-associated membranous nephropathy. *N Engl J Med* 374:1995–1996. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1511702>
16. Joseph CG, Darrah E, Shah AA, Skora AD, Casciola-Rosen LA, Wigley FM, Boin F, Fava A, Thoburn C, Kinde I, Jiao Y, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Rosen A (2014) Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. *Science* 343:152–157. <https://doi.org/10.1126/science.1246886>
 17. Kim WK, Park M, Park M, Kim YJ, Shin N, Kim HK, You KT, Kim H (2013) Identification and selective degradation of neopeptide-containing truncated mutant proteins in the tumors with high microsatellite instability. *Clin Cancer Res* 19:3369–3382. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0684>
 18. Kottke T, Shim KG, Alonso-Camino V, Zaidi S, Maria Diaz R, Pulido J, Thompson J, Rajani KR, Evgin L, Ilett E, Pandha H, Harrington K, Selby P, Melcher A, Vile R (2016) Immunogenicity of self tumor associated proteins is enhanced through protein truncation. *Mol Ther Oncolytics* 3:16030. <https://doi.org/10.1038/mto.2016.30>
 19. Kroeger DR, Milne K, Nelson BH (2016) Tumor-infiltrating plasma cells are associated with tertiary lymphoid structures, cytolytic T-cell responses, and superior prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 22:3005–3015. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2762>
 20. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH (2014) WHO classification of tumours of female reproductive organs, 4th edn. World Health Organization, Geneva
 21. Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D, Welters MJP, van der Burg S, Kapiteijn E, Michielin O, Romano E, Linnemann C, Speiser D, Blank C, Haanen JB, Schumacher TN (2014) Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Sci Transl Med* 6:254ra128–254ra128. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008918>
 22. Leary JA, Kerr J, Chenevix-Trench G, Doris CP, Hurst T, Houghton CR, Friedlander ML (1995) Increased expression of the NME1 gene is associated with metastasis in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 64:189–195
 23. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C, ESMO Guidelines Working Group (2013) Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24(Suppl 6):vi24–vi32. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt333>
 24. Martinet L, Filleron T, Le Guellec S, Rochaix P, Garrido I, Girard J-P (2013) High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β -producing dendritic cells in human breast cancer. *J Immunol* 191:2001–2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300872>
 25. Movassagh M, Spatz A, Davoust J, Lebecque S, Romero P, Pittet M, Rimoldi D, Liénard D, Gugerli O, Ferradini L, Robert C, Avril M-F, Zitvogel L, Angevin E (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. *Can Res* 64:2192–2198
 26. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslering NJ, Watson PH, Nelson BH (2012) CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27– memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 18:3281–3292. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0234>
 27. Pastor F, Kolonias D, Giangrande PH, Gilboa E (2010) Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 465:227–230. <https://doi.org/10.1038/nature08999>
 28. Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB (1992) Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology* 42:1931–1937
 29. Raspaglio G, Petrillo M, Martinelli E, Li Puma DD, Mariani M, De Donato M, Filippetti F, Mozzetti S, Prislei S, Zannoni GF, Scambia G, Ferlini C (2014) Sox9 and Hif-2 α regulate TUBB3 gene expression and affect ovarian cancer aggressiveness. *Gene* 542:173–181. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.037>
 30. Rojas-Marcos I, Picard G, Chinchón D, Gelpi E, Psimaras D, Giometto B, Delattre JY, Honnorat J, Gaus F (2012) Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in breast cancer of patients with anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neuro-oncology* 14:506–510. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos006>
 31. Ruark E, Snape K, Humburg P, Loveday C, Bajrami I, Brough R, Rodrigues DN, Renwick A, Seal S, Ramsay E, Duarte SDV, Rivas MA, Warren-Perry M, Zachariou A, Campion-Flora A, Hanks S, Murray A, Ansari Pour N, Douglas J, Gregory L, Rimmer A, Walker NM, Yang T-P, Adlard JW, Barwell J, Berg J, Brady AF, Brewer C, Brice G, Chapman C, Cook J, Davidson R, Donaldson A, Douglas F, Eccles D, Evans DG, Greenhalgh L, Henderson A, Izatt L, Kumar A, Laloo F, Miedzybrodzka Z, Morrison PJ, Paterson J, Porteous M, Rogers MT, Shanley S, Walker L, Gore M, Houlston R, Brown MA, Caufield MJ, Deloukas P, McCarthy MI, Todd JA, Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Collaboration, Wellcome Trust Case Control Consortium, Turnbull C, Reis-Filho JS, Ashworth A, Antoniou AC, Lord CJ, Donnelly P, Rahman N (2013) Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* 493:406–410. <https://doi.org/10.1038/nature11725>
 32. Santomasso BD, Roberts WK, Thomas A, Williams T, Blachère NE, Dudley ME, Houghton AN, Posner JB, Darnell RB (2007) A T-cell receptor associated with naturally occurring human tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19073–19078
 33. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnajatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen Y-T, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8 +/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18538–18543. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509182102>
 34. Schubert M, Panja D, Haugen M, Bramham CR, Vedeler CA (2014) Paraneoplastic CDR2 and CDR2L antibodies affect Purkinje cell calcium homeostasis. *Acta Neuropathol* 128:835–852. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1351-6>
 35. Storstein A, Krossnes BK, Vedeler CA (2009) Morphological and immunohistochemical characterization of paraneoplastic cerebellar degeneration associated with Yo antibodies. *Acta Neurol Scand* 120:64–67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01138.x>
 36. Stumpf M, Hasenburger A, Riener M-O, Jütting U, Wang C, Shen Y, Orłowska-Volk M, Fisch P, Wang Z, Gitsch G, Werner M, Lassmann S (2009) Intraepithelial CD8-positive T lymphocytes predict survival for patients with serous stage III ovarian carcinomas: relevance of clonal selection of T lymphocytes. *Br J Cancer* 101:1513–1521. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605274>
 37. Sutton IJ, Steele J, Savage CO, Winer JB, Young LS (2004) An interferon-gamma ELISPOT and immunohistochemical investigation of cytotoxic T lymphocyte-mediated tumour immunity in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *J Neuroimmunol* 150:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.12.026>
 38. Tanaka K, Tanaka M, Onodera O, Tsuji S (1995) Paraneoplastic cerebellar degeneration—characterization of anti-Yo antibody and underlying cancer. *Rinsho Shinkeigaku* 35:770–774

39. Tanaka M, Tanaka K, Onodera O, Tsuji S (1995) Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. 1. Mouse strains bearing different MHC molecules produce antibodies on immunization with recombinant Yo protein, but do not cause Purkinje cell loss. *Clin Neurol Neurosurg* 97:95–100
40. Totland C, Aarskog NK, Eichler TW, Haugen M, Nøstbakken JK, Monstad SE, Salvesen HB, Mørk S, Haukanes BI, Vedeler CA (2011) CDR2 antigen and Yo antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 60:283–289. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0943-9>
41. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Geukes Foppen MH, Goldinger SM, Utikal J, Hassel JC, Weide B, Kaehler KC, Loquai C, Mohr P, Gutzmer R, Dummer R, Gabriel S, Wu CJ, Schadendorf D, Garraway LA (2015) Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 350:207–211. <https://doi.org/10.1126/science.aad0095>
42. Verschuuren J, Chuang L, Rosenblum MK, Lieberman F, Pryor A, Posner JB, Dalmau J (1996) Inflammatory infiltrates and complete absence of Purkinje cells in anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Acta Neuropathol* 91:519–525
43. Zaborowski MP, Spaczynski M, Nowak-Markwitz E, Michalak S (2015) Paraneoplastic neurological syndromes associated with ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 141:99–108. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1745-9>
44. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203–213. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020177>

2. Caractérisation de l'infiltrat immunitaire d'une tumeur ovarienne associée à une dégénérescence cérébelleuse paranéoplasique avec une nouvelle spécificité antigénique

En 2015, l'équipe du Pr. J. Honnorat a pris en charge une patiente atteinte d'une ataxie cérébelleuse associée à un cancer ovarien et présentant le tableau clinique classique d'une DCP à Acs anti-Yo. Néanmoins, un test de fixation sur des coupes de cerveau de rat des Acs contenus dans le liquide céphalo-rachidien de cette patiente a révélé un profil de marquage bien différent de celui attendu pour des Acs Yo. Ainsi, un faible signal à la fois dans l'hippocampe et dans les cellules de Purkinje a été observé, alors que les Acs Yo marquent uniquement et fortement les cellules de Purkinje (figure 19A). Un test d'immuno-précipitation à l'aide d'un Acs anti-IgG humaines d'un broyat du cerveau de rat préalablement incubé avec les Acs du LCR de cette patiente, suivi d'une analyse par spectrophotométrie de masse a par la suite révélé que l'Ag ciblé chez cette patiente n'est ni CDR2 ni CDR2L, mais ARHGAP5 (Rho GTPase-activating protein 5). Cette protéine, exprimée dans le cytosol, régule négativement les Rho GTPases (figure 19B).

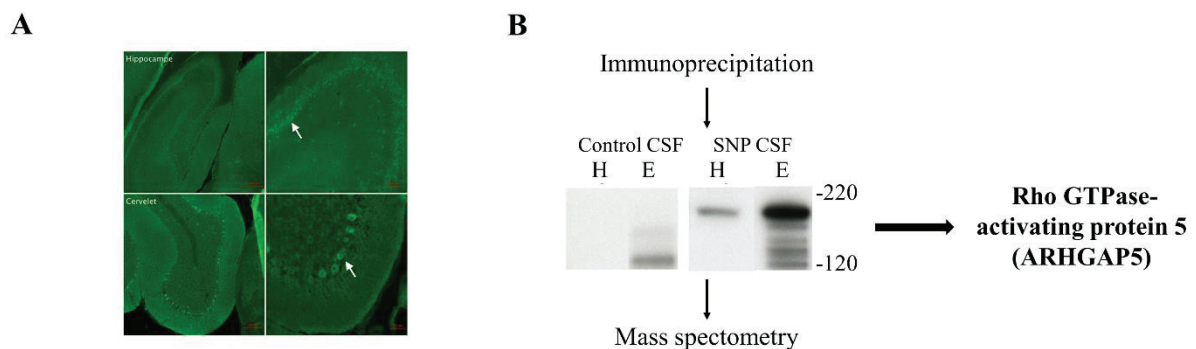


Figure 19 : Identification d'ARHGAP5 comme nouvel Ag associé à une dégénérescence cérébelleuse paranéoplasique. (A) Illustration du marquage observé après fixation des IgG du liquide céphalo-rachidien d'une patiente DCP non-Yo sur des sections de cerveau de rat et incubation avec un Acs secondaire fluorescent anti-IgG humaines. Un marquage faible est observé dans l'hippocampe et le cervelet. (B) Identification de la protéine reconnue par les Acs du liquide céphalo-rachidien de cette patiente par immuno-précipitation des IgG fixés sur les protéines d'un broyat de cerveau de rat, puis analyse par spectrométrie de masse.

Cette patiente a été opérée au Centre Léon Bérard et nous avons pu avoir accès à des fragments de tumeur fraîche ou fixés afin de caractériser l'infiltrat immunitaire et les Acs produits dans le MET. Un marquage par CMF à l'aide d'Ac dirigés contre CD45, CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgM, IgG et IgA montre que les LB CD19⁺ représentent 10% de l'infiltrat immunitaire de cette tumeur et sont constitués en grande majorité (83%) de PC (CD20⁻CD38^{Hi}) (figure 20A). Une telle prédominance de PC n'est que très exceptionnellement observée dans les tumeurs ovariennes contrôles (figure 20B). Les LB non plasmocytaires sont constitués en majorité de LB mémoires (80%) exprimant principalement IgG et de LB naïfs (figure 20A). Trois quarts des PC infiltrant cette tumeur sont des cellules productrices d'IgG, ce qui a également été vérifié grâce à un test ELISPOT (figure 20C). L'analyse par CMF des LT, qui constituent 44% de l'infiltrat immunitaire, montre i) que la majorité des LT CD8⁺ sont PD1^{Hi}, suggérant qu'ils sont activés et ii) que les LT CD4 sont constitués pour 19% de LTreg exprimant Foxp3 et de 42% de cellules PD1^{Hi} correspondant probablement à des LTfh (figure 20D).

La réalisation de marquages multi-IF sur coupes FFPE a permis de montrer l'existence de nombreuses TLS en périphérie de la tumeur, avec des zones T et B ségréguées et la présence d'HEV (PNAd⁺), en accord avec la détection d'une proportion importante de LTfh par CMF (figure 20E haut). Un marquage CD20/IgG/IgA confirme la présence d'un contingent important de PC, présentant une dominance de cellules productrices d'IgG (figure 20E bas). Ces cellules se distribuent à la fois dans le stroma et dans la zone tumorale et sont également fréquemment retrouvées à proximité des follicules B des TLS, suggérant une différenciation locale.

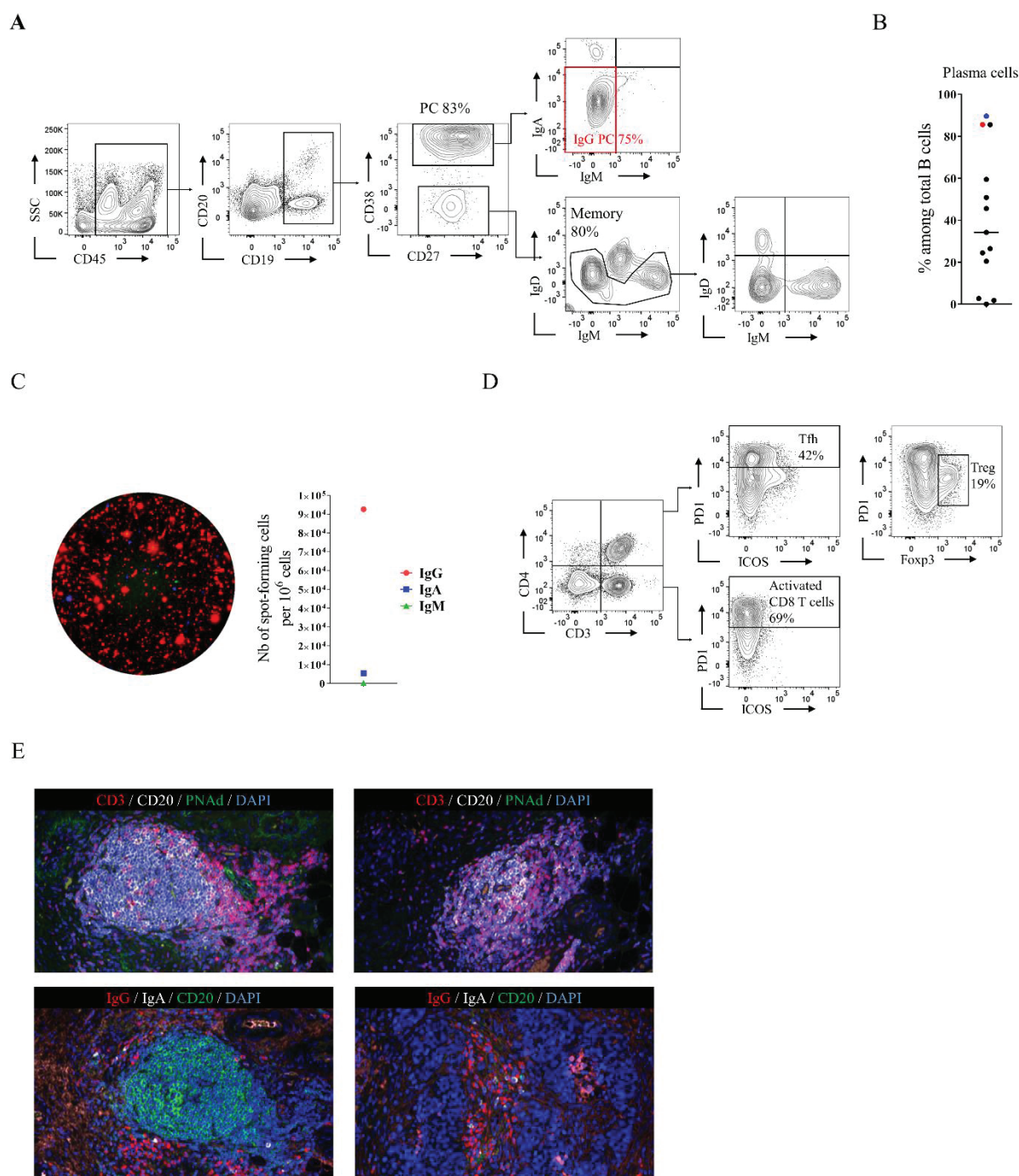


Figure 20 : La tumeur ovarienne associée à une DCP ARHGAP5 présente une texture immunitaire similaire aux tumeurs Yo et caractérisée par un infiltrat dense en plasmocytes. (A) Analyse par CMF d'une suspension cellulaire préparée par digestion enzymatique de la tumeur permettant d'identifier parmi les cellules immunitaires viables $CD45^+$ les LB totaux ($CD19^+$), les LB naïfs ($CD38^+IgD^+IgM^+$), les LB mémoires ($CD38^+IgD^-$) et les plasmocytes (PC, $CD38^{hi}CD20^+$), et déterminer la classe d'Ig exprimée/produite par les LB mémoires et PC. Les cellules IgA^+IgM^- sont considérées comme exprimant IgG. (B) Graphique mettant en évidence la proportion de PC parmi les LB totaux dans la tumeur ARHGAP5 (en rouge), une tumeur Yo-DCP (en bleu), et des tumeurs de l'ovaire non associées à des DCP (en noir). (C) Quantification par ELISPOT fluorescent des cellules productrices d'IgG, IgA, et IgM présentes dans la tumeur. (D) Illustration de l'expression de PD1, ICOS et Foxp3 sur les LT $CD4^+$ ($CD3^+CD4^+$), $CD8^+$ ($CD3^+CD4^-$) permettant de distinguer les LTfh ($CD3^+CD4^+PD1^{hi}$), les Treg ($CD3^+CD4^+PD1^+Foxp3^+$) et les LT $CD8^+$ activés ($CD3^+CD4^{neg}PD1^+$), analysée par CMF. (E) Marquages multiparamétriques par IF sur coupes FFPE mettant en évidence en haut les LB ($CD20$), les LT ($CD3$), et les vaisseaux HEV (PNA), et en bas les PC à IgG, à IgA, et les LB ($CD20$).

Un dosage des Ig dans le surnageant obtenu lors de la dilacération de la tumeur a révélé des concentrations de 314 $\mu\text{g/mL}$ d'IgG, 37 $\mu\text{g/mL}$ d'IgA et 15 $\mu\text{g/mL}$ d'IgM, en accord avec la forte infiltration de la tumeur par des PC à IgG. Cet échantillon était inclus dans la série de surnageants de tumeur d'ovaire testés sur puces à peptides couvrant le protéome, ce qui a permis de déterminer la présence d'Acs dirigés contre ARHGAP5 et les Acs Yo. Parmi les centaines de réactivités détectées, un épitope IgG composé de trois peptides contigus a été identifié dans ARHGAP5, alors qu'aucune réactivité n'est observée contre CDR2 et CDR2L (figure 21A). Aucune réactivité des IgG contre ARHGAP5 n'est détectée chez les 41 autres tumeurs ovariennes. Un ELISA réalisé à l'aide d'un peptide biotinylé (figure 21B) a permis de confirmer l'existence d'IgG dans la tumeur de la patiente et de révéler ce même type de réactivité dans le liquide céphalo-rachidien et le sérum, la différence d'intensité de signal étant à modérer par la dilution cent fois supérieure du sérum (1/1000) par rapport aux autres fluides (1/10) (figure 21C).

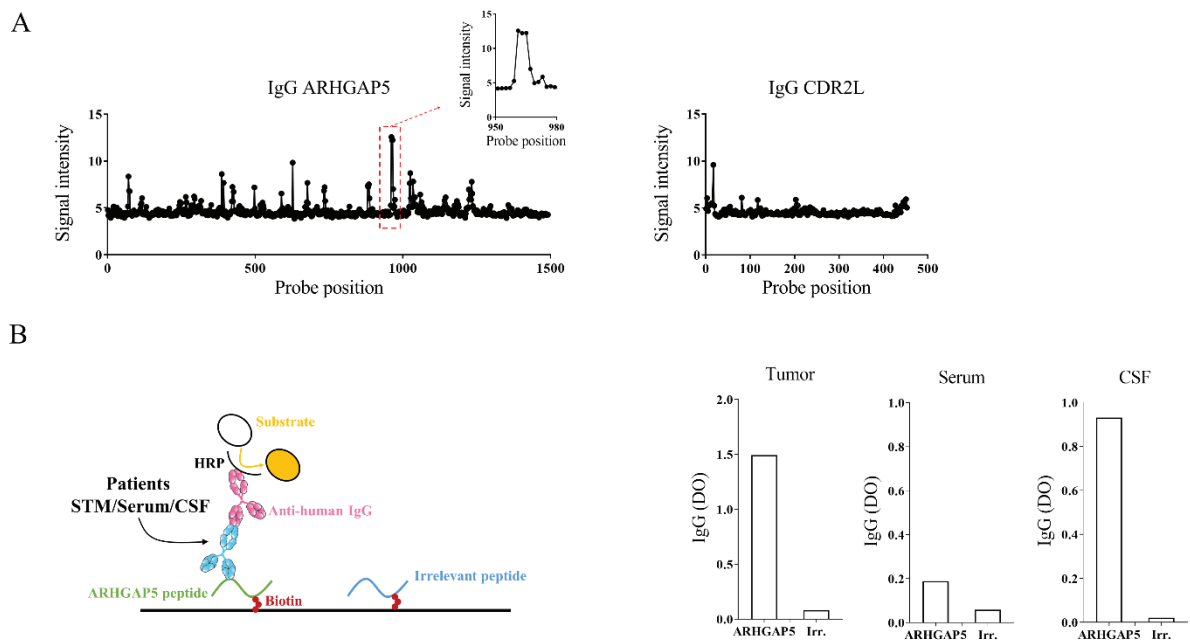


Figure 21: Des IgG dirigées contre le nouvel Ag onco-neuronal ARHGAP5 sont produites dans le microenvironnement tumoral et détectées dans le liquide céphalo-rachidien. (A) Profil de réactivité des IgG présents dans le surnageant de la tumeur d'ovaire contre ARHGAP5, CDR2 et CDR2L déterminé par l'utilisation de puce à peptides chevauchants (Roche Sequencing Solutions). (B-C) Illustration de la technique ELISA (A) permettant de mesurer la présence d'IgG dirigée contre un peptide ARHGAP5 versus un peptide contrôle (Irr.) dans le surnageant de la tumeur, le sérum et liquide céphalo-rachidien (CSF) de la patiente (B). Le surnageant de tumeur et le liquide céphalo-rachidien ont été testés à une dilution de 1/10, alors que le sérum a été testé à une dilution de 1/1000. Les graphiques de droite représentent la densité optique obtenue pour chaque fluide et chaque peptide.

Discussion

Discussion et perspectives

1. Des lymphocytes B à différents stades de différenciation infiltrent les tumeurs du sein et de l'ovaire : reflet d'une induction et/ou amplification locale de la réponse humorale ?

1.1. Diversité des lymphocytes B présents dans les tumeurs de sein et d'ovaire

Nous mettons ici en évidence la présence de LB à des pourcentages similaires dans les tumeurs de sein et d'ovaire, mais avec un nombre de cellules par milligramme de tissu bien supérieur dans ces dernières, démontrant un infiltrat plus dense dans les tumeurs d'ovaire que dans les tumeurs de sein. L'expression différentielle de CD20, CD38, CD27, IgD et IgM par CMF nous a permis de démontrer à la fois la présence majoritaire de LB mémoires et d'une proportion importante de LB naïfs dans les tumeurs de sein, et une majorité de LB mémoires et de PC dans les tumeurs d'ovaire, mais aussi, à une beaucoup plus faible fréquence, de LB du CG et des LB transitionnels/pré-CG. Globalement, ces données sont similaires à ce qui a été démontré dans les tumeurs du poumon grâce aux marqueurs CD38 et IgD (Germain et al., 2014), mais diffèrent légèrement des rapports récents pour les tumeurs de sein, qui montrent une proportion égale de LB mémoires et naïfs, représentant chacun environ 40-45% de l'infiltrat en LB (Buisseret et al., 2017; Garaud et al., 2018). Les LB CD38⁺CD24⁺, correspondant aux LB transitionnels, ont été décrits comme ayant des propriétés suppressives via la production d'IL10 (Blair et al., 2010) et contiennent différentes sous-populations distinguables en fonction de l'expression d'IgD, IgM et CD27 et possédant des profils régulateurs spécifiques (Simon et al., 2016). Ces marqueurs sont exprimés de manière différentielle par les LB transitionnels infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire analysées, suggérant la présence de différentes populations de LB possédant des propriétés régulatrices. Il serait intéressant d'identifier les cytokines secrétées par ces populations et de les trier pour analyser leurs fonctions suppressives sur les LT *ex vivo*, mais cela est difficile à cause de leur rareté. Nous observons également des LB mémoires, sur lesquels le marqueur CD27 n'est que faiblement détecté, comme il a été montré précédemment dans les tumeurs de l'ovaire et du foie (Nielsen et al., 2012; Shi et al., 2013). Cependant, à la fois dans les études publiées et la nôtre, les suspensions cellulaires de tumeurs sont obtenues par une dissociation mécanique combinée à l'utilisation d'enzymes, et nous avons démontré que cette procédure de digestion diminue la détection du CD27, ce qui pourrait expliquer ce phénotype atypique. Avec le développement de l'IF multiparamétrique permettant de combiner jusqu'à 9 marqueurs, nous pourrions essayer de déterminer l'expression de CD27 par les LB mémoires (CD20⁺IgD⁻) infiltrant les tumeurs, et, si des cellules CD27⁺ et CD27^{neg} sont observées, explorer la différence de phénotype et de fonctions entre ces deux types de cellules.

1.2. Les structures lymphoïdes tertiaires pourraient permettre une induction et/ou une amplification locale de la réponse humorale

La détection par CMF de LB à tous les stades de différenciation, y compris dans certaines tumeurs de LB du CG, suggère une possible différenciation locale des LB. Cela est renforcé par la présence de TLS dans deux tiers des tumeurs, localisées majoritairement en périphérie de la tumeur à la frontière avec le tissu sain, ou parfois dans le stroma entre les nids tumoraux, et contenant dans la moitié des cas des centres germinatifs objectivés par la présence dans les follicules de LB IgD^{neg}. Nous observons en effet une corrélation entre la densité de LB du CG mesurée par CMF et la présence de TLS déterminée par IF. Cependant, la proportion de CG détectée sur coupes de tissus semble élevée par rapport à la quantité de LB du CG mesurée par CMF, ce qui pourrait être dû à la propension de ces cellules à mourir très rapidement après isolement et à une difficulté d'observer les marqueurs spécifiques de cette population par CMF. Nous souhaitons par la suite caractériser plus précisément ces cellules sur coupes de tissus grâce aux marqueurs utilisés par Germain et collaborateurs, permettant de mettre en évidence leur état prolifératif (Ki67) et activé (CD23), et l'expression du facteur de transcription Bcl6 et de l'enzyme AID nécessaires aux hypermutations somatiques et à la commutation de classe des Ac (Germain et al., 2014). Ces centres germinatifs contiennent également des LT, probablement des LTfh, que nous observons également par CMF. Ces cellules jouent un rôle essentiel pour la différenciation des LB et sont associées à un bon pronostic dans les cancers du sein (Gu-Trantien et al., 2013), suggérant l'importance de la différenciation locale des LB dépendante des LT dans la réponse anti-tumorale. Nous observons également, dans une partie des tumeurs contenant des TLS, des vaisseaux sanguins de type HEV, connus pour permettre le recrutement de cellules immunitaires, grâce à leur paroi favorisant l'extravasation des cellules dans le tissu (Girard and Springer, 1995). La non-détection de ces HEV dans certaines tumeurs ayant des TLS pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de l'environnement tumoral et l'absence d'HEV spécifiquement dans la coupe sélectionnée pour l'analyse par IF, ou pourrait signifier que la structuration des LB et des LT peut se mettre en place avant la différenciation des HEV, du fait que le signal nécessaire à cette différenciation peut être fourni par les composants des TLS (Martinet et al., 2013; McDonald et al., 2005). Nous analyserons par la suite la présence des molécules nécessaires à l'établissement de TLS et à la différenciation des HEV en quantifiant la lymphotoxine, CXCL13, CCL19, et CCL21 dans les surnageants de tumeurs avec et sans TLS. Pour compléter cette étude, nous analyserons la présence de cellules dendritiques folliculaires nécessaires à la présentation des Ags sous forme natives aux LB dans les CG, grâce à l'expression de CD21, ainsi que de cellules dendritiques matures DC-LAMP⁺ dans les zones T des TLS, dont la densité est fortement associée à un bon pronostic des patients dans les cancers du poumon (Goc et al., 2013). La différenciation locale de ces LB pourrait favoriser la génération de LB

mémoires et de PC exprimant/produisant des Ac dirigés contre des Ags tumoraux, comme cela a été suggéré dans les cancers du sein médullaires (Coronella et al., 2001) et du poumon (Germain et al., 2014). Cependant, nous n'observons pas de différence majeure d'infiltration par les différentes populations de LB entre tumeurs TLS⁺ et TLS⁻, suggérant que les LB peuvent se différencier de manière extra-folliculaire dans les tumeurs et/ou être recrutés directement dans la tumeur à différents stades de leur différenciation. De manière intéressante, nous avons observé de fréquents contacts entre les LB naïfs ou les LB mémoires et les LT. Même si très peu de données sont disponibles quant à l'impact clinique respectif de ces deux populations de LB (Gentles et al., 2015), il est vraisemblable qu'elles exercent des rôles différents voir opposés dans le MET. Les LB naïfs expriment moins de molécules co-stimulatrices et sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires que les LB mémoires, conduisant à l'induction de LTreg (Reichardt et al., 2007) alors que les LB mémoires peuvent permettre d'induire ou d'amplifier des réponses T effectrices (Chesnut et al., 1982). Même si nous n'observons pas de lien entre les densités de LB naïfs et de LTreg mesurées par CMF, il serait intéressant d'étudier d'autres éléments immuno-régulateurs du MET en fonction du ratio de LB naïfs et de LB mémoires.

Si la valeur pronostique des TLS est désormais établie dans la plupart des cancers, leur lien avec l'immunogénicité des tumeurs et la qualité de la réponse immunitaire dans les cancers du sein restent à établir. Pour ce faire, nous envisageons d'utiliser une cohorte de tumeurs du sein triple négatives, qui comptent parmi les tumeurs du sein les plus hautement infiltrées par les cellules immunitaires, afin de mesurer l'association entre l'existence d'une organisation en TLS, la charge mutationnelle et l'expression de rétro-éléments, le nombre de néo-épitopes T potentiels, ainsi que la qualité des réponses T, B et plasmocytaire. Enfin, nous déterminerons l'impact de la présence de TLS i) sur la survie des patientes grâce à cette cohorte rétrospective disposant de plus de 5 ans de recul clinique (n=150) et ii) sur la réponse aux immunothérapies bloquant l'axe PD-1/PD-L1 grâce à des cohortes de patientes atteintes d'un cancer du sein ou de l'ovaire (recrutement en cours).

2. Diversité et spécificité des anticorps produits dans le microenvironnement tumoral

2.1. Hétérogénéité des classes d'anticorps exprimés par les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes infiltrant les tumeurs du sein et de l'ovaire

Nous montrons que les tumeurs du sein et de l'ovaire sont infiltrées par des LB mémoires et par des PC producteurs non seulement d'IgG (qui sont majoritaires), mais également d'IgA et d'IgM, et que ces Acs sont produits dans le MET comme démontré par des analyses en CMF, IF, ELISA et ELISPOT. Cette démonstration de l'hétérogénéité du compartiment plasmocytaire complète d'anciennes études sur un nombre très limité de tumeurs du sein de sous-type médullaire, connues pour présenter un fort infiltrat lympho-plasmocytaire (Coronella et al., 2001; Ito et al., 1986), même si les IgG semblent être

majoritaires dans les tumeurs non-médullaires (Wang et al., 2007). Nos résultats sur le cancer de l'ovaire sont par contre discordants avec deux études d'un même laboratoire montrant que les LB mémoires et les PC expriment quasi-exclusivement des IgG (Kroeger et al., 2016; Nielsen et al., 2012). Ceci pourrait être dû au fait que, dans ces études, seul un marquage IgG a été réalisé par CMF et que nous avons montré que ce marquage est difficile à interpréter en l'absence de l'analyse des autres classes d'Ig pouvant conduire à sous-estimer la fréquence de cellules IgG⁺.

La présence de LB mémoires et de PC à IgM, cellules pouvant être différenciées de manière extra-folliculaire et précoce, pourrait permettre une réponse anti-tumorale rapide. Par ailleurs, les LB mémoires à IgM sont souvent comparés aux LB de la zone marginale chez la souris (Weller et al., 2004), mais présentent des mutations du BCR, contrairement à leur équivalent murin. L'expression de CD27 (Wei et al., 2007), d'IgD, et d'autres marqueurs comme CD21 ou CD23 peuvent permettre de distinguer les cellules mémoires à IgM et les cellules dites de la zone marginale. Une caractérisation plus approfondie des cellules IgM⁺ et l'étude de leur répertoire de BCR en comparaison avec les cellules ayant subi la commutation isotypique vers IgG ou IgA pourraient nous permettre de mieux comprendre si elles jouent un rôle particulier, possiblement en permettant une réponse plus précoce dans la tumeur. De plus, afin de savoir si les IgM peuvent être produites localement de manière précoce, des marquages IF seront réalisés pour détecter les PC à IgM dans les CCIS comparativement aux tumeurs invasives.

Le tissu ovarien sain n'étant pas infiltré par des PC, et le sein normal ne contenant que des PC à IgA spécifiquement localisés sous la lame basale des canaux galactophores, nous pouvons conclure que les PC détectés dans les zones stromales et tumorales sont majoritairement des cellules recrutées ou différenciées localement au cours du processus de tumorigenèse. Les proportions de PC à IgG et à IgA dans les tumeurs sont très variables, avec un ratio de PC à IgA par rapport aux IgG élevé uniquement observé dans une proportion mineure des tumeurs invasives. Les tumeurs d'ovaires présentent en moyenne des proportions plus élevées de PC avec au contraire une prédominance de cellules productrices d'IgG accrue par rapport aux carcinomes mammaires. Cet enrichissement en PC à IgA dans certaines tumeurs pourrait être lié à la présence locale de cytokines favorisant la commutation isotypique soit vers IgA, comme le TGFβ (Cerutti, 2008), pouvant être produit par des LTreg (Palomares et al., 2014), LBreg (Olkhanud et al., 2011) et/ou des cellules stromales du MET (Shalapour et al., 2015), soit vers IgG, comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-21, et l'IFNγ (Vercelli and Geha, 1992). Alternativement, des chimiokines et des cytokines spécifiquement impliquées dans le recrutement et la survie des PC à IgG *versus* à IgA pourraient expliquer ces différences dans la composition du compartiment plasmocytaire entre différents patients voire entre différentes zones d'une même tumeur.

Le dosage des Ig dans les surnageants de tumeur révèlent des quantités d'Ac similaires dans le MET des tumeurs de sein et d'ovaire, alors que la fréquence de PC est souvent bien supérieure dans ces dernières. Par ailleurs, la concentration d'IgA solubles semble faible par rapport à celle des IgG lorsque l'on considère la proportion relative de PC producteurs de chacun de ces isotypes. Cela pourrait être lié à une contamination des surnageants par les Ac du sang, où la concentration en IgG est près de 10 fois supérieure à celle des IgA, mais ceci est peu probable du fait que des IgA polymériques constituent près de 50% des IgA dans les surnageants de tumeurs de sein, alors qu'elles sont quasi indétectables dans le sérum. Ces résultats discordants pourraient aussi s'expliquer par des capacités sécrétoires différentes par les PC à IgG et à IgA, ou par la rétention préférentielle d'une classe d'Acs dans le tissu tumoral. Cette dernière hypothèse est compatible avec la détection de dépôts d'Ac, préférentiellement d'IgA, dans les cellules tumorales, que nous avons observés dans les tumeurs de sein en accord avec les données de la littérature (Welinder et al., 2013).

2.2. Différentes formes moléculaires d'IgA sont produites dans les tumeurs

Des western blots réalisés à l'aide de surnageants de tumeurs, ainsi que des analyses par IF de l'expression de la chaîne Ig-J par les PC à IgA, ont permis de démontrer qu'à la fois des IgA monomériques (mIgA) et des IgA dimériques (dIgA) étaient produites dans le MET des tumeurs de sein. Par ailleurs, les deux sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2) sont détectées, avec néanmoins une dominance d'IgA1 dans la plupart des tumeurs. Cette diversité moléculaire est vraisemblablement à prendre en compte pour mieux cerner le rôle potentiel des IgA dans le cancer. En effet, l'engagement du FcαR par les dIgA et les mIgA engendre respectivement des signaux inhibiteurs et activateurs (Pasquier et al., 2005). De plus, en se fixant au récepteur aux Ig polymériques (pIgR), exprimé par les cellules épithéliales mammaires normales ou transformées (Hunziker and Kraehenbuhl, 1998), les IgA dimériques pourraient pénétrer dans les cellules tumorales et interagir avec des Ags intracellulaires. Par ailleurs, les IgA1 fixent majoritairement les Ags protéiques, tandis que les IgA2 interagissent plus fortement avec les polysaccharides (Brown and Mestecky, 1985; Ladjeva et al., 1989), et les IgA2 sécrétoires sont capables d'effectuer la transcytose inverse impliquant le récepteur Dectin1, pour franchir les cellules M de l'intestin de l'extérieur vers l'intérieur de l'organisme, alors que les IgA1 ne le font pas (Rochereau et al., 2013). Enfin, les IgA2 ont des capacités supérieures aux IgA1 pour activer l'ADCC par les neutrophiles en engageant le FcαR (Dechant et al., 2007).

2.3. Les IgG et les IgA du microenvironnement tumoral ciblent majoritairement des antigènes différents

Afin d'identifier les Ags ciblés par les Ig du MET, nous avons analysé une série de 113 surnageants de tumeur grâce à des puces à peptides chevauchants couvrant tout le protéome. Bien

que limitée à l'analyse d'épitopes linéaires de petite taille, cette stratégie a révélé l'existence de plusieurs centaines de cibles en moyenne pour les IgG et les IgA de chaque patient. À l'inverse, très peu de cibles ont été mises en évidence pour les IgM, ce qui pourrait s'expliquer par la faible concentration d'IgM dans les surnageants, une faible affinité des IgM pour leurs Ags, ou la reconnaissance préférentielle d'épitopes conformationnels par les IgM. De manière intéressante, une cinquantaine de cibles IgG est partagée par plus de 15 % des patients et certaines d'entre elles sont communes aux cancers du sein et de l'ovaire, alors que les épitopes IgA partagés sont très peu nombreux. Il sera important de déterminer si ces réactivités sont spécifiques des patients cancéreux (l'analyse de sérum de donneurs sains est en cours). Si tel était le cas, cela mettrait en évidence des Ags pouvant déclencher une réponse Acs dans des environnements indépendants, suggérant qu'ils sont fortement immunogènes et pourraient jouer un rôle important dans la réponse anti-tumorale. Une analyse préliminaire des caractéristiques des protéines ciblées par la réponse IgG chez plusieurs patients (à l'aide de la base de données GeneCards®) indique majoritairement des fonctions en relation soit avec l'embryogenèse et le développement des tissus, soit avec la régulation de la transcription et des dommages à l'ADN. Une autre étape consistera à déterminer si ces protéines sont exprimées par les cellules tumorales. Ces fonctions étant importantes pour la croissance tumorale, la fixation des Acs sur ces protéines pourrait modifier leur fonction et jouer un rôle délétère pour la cellule tumorale. De manière surprenante, pour les tumeurs de sein présentant une surexpression de HER2, aucun Acs dirigé contre HER2 n'a été détecté, et de la même manière, aucune réactivité contre la MUC1 n'est mesurée dans les différentes tumeurs de sein, possiblement parce que les épitopes normalement reconnus dans HER2 ou MUC1 sont conformationnels. Cependant, de nombreuses tumeurs présentent des Acs contre les protéines MUC16 et MUC12 de la même famille. Aucune des protéines identifiées comme communément ciblées dans notre analyse ne fait partie du panel utilisé dans l'étude récente dans le cancer du sein (Garaud et al., 2018), ne nous permettant pas de confronter directement l'ensemble des données. Concernant les réactivités mises en évidence dans le sérum de patients atteints de cancer de l'ovaire, les Ags les plus souvent observés dans cette étude ne correspondent pas aux Ags partagés par les surnageants de tumeur des patients de notre cohorte (Gnjatic et al., 2010). À l'inverse, nous n'avons pas observé de réactivités partagées chez plus de 15 % des patients de notre cohorte contre les protéines mises en évidence dans ces deux études, ce qui pourrait à nouveau être dû au fait que seule une faible fraction des patients de notre cohorte présente ces réactivités ou que les épitopes reconnus dans les études publiées sont majoritairement conformationnels. Nous regarderons par la suite si ces protéines sont des cibles des Acs intra-tumoraux chez certains patients que nous avons étudiés.

La plupart des réactivités identifiées concernent des Ags intracellulaires (cytoplasmiques ou nucléaires), en accord avec de nombreuses autres études de profilage de la réactivité des IgG sériques

des patients (Järås and Anderson, 2011). Ces Acs pourraient reconnaître ce type d'Ags lors de la mort des cellules tumorales, rendant les protéines intracellulaires accessibles, et favoriser la présentation de ces Ags aux LT après capture des complexes immuns par les DC. À l'inverse, un rôle de ces Ac pour induire l'ADCC/ADCP ou la CDCC/CDCP est difficilement envisageable. Cependant, il a été montré que certaines protéines sont externalisées à la surface des cellules tumorales, soit lorsque les cellules reçoivent un signal de danger comme un stress oncogénique, soit quand elles entrent en apoptose. Ainsi, l'actine et la calréticuline peuvent être externalisées lorsque les cellules entrent en apoptose et des réponses Acs contre ces protéines sont détectées dans les patients atteints de cancer du sein (Hansen et al., 2001) et gastro-intestinaux (Pekáriková et al., 2010), respectivement. D'autres protéines sont externalisées indépendamment de l'apoptose, comme gp75 dans le mélanome (Takechi et al., 1996), PRL3 dans de nombreux cancers (Thura et al.), ainsi que HSP70, HSP90, GRP78, ER- α 6 et FAPP dans différents cancers (Weidle et al., 2011). Une analyse par microscopie confocale de l'expression et de la localisation des protéines dans les tumeurs étudiées nous permettrait de savoir si elles sont exprimées et externalisées chez les patients avec une réponse Ac contre ces protéines. Pour cela, nous souhaitons nous concentrer sur les réactivités partagées par un grand nombre de patients, et pour lesquelles l'Ac n'est observé que dans la tumeur de patients atteints de cancer, et non pas dans le sérum de patients ou de donneurs sains. Les Acs pourraient également être capables de modifier la fonction de protéines intracellulaires en pénétrant dans les cellules tumorales, comme cela a été décrit dans le lupus systémique érythémateux (Vlahakos et al., 1992). Les IgA dimériques, qui sont présentes dans le MET des cancers du sein comme démontré dans notre étude, ont, à la différence des IgG, la capacité de pénétrer dans les cellules épithéliales polarisées par un phénomène de transcytose, après fixation au récepteur des Ig polymériques (plgR) du pôle baso-latéral, ce qui pourrait leur permettre d'entrer dans les cellules tumorales.

Un autre élément surprenant issu de cette analyse est que les IgA et les IgG reconnaissent en majorité des cibles exclusives, puisque seuls 15 à 20 % des épitopes en moyenne sont reconnus à la fois par des IgG et des IgA. Récemment, une association a été identifiée entre l'existence dans les MET des carcinomes mammaires d'IgA spécifiques d'Ags tumoraux et la présence de LB du CG et de TLS (Garaud et al., 2018). Cela suggère que les PC à IgA pourraient être générés de manière préférentielle lorsque l'infiltrat immunitaire est organisé en TLS possiblement au travers d'un environnement cytokinique favorisant une commutation isotypique préférentielle vers IgA. Ce scénario, dans lequel une fraction majeure des PC à IgA serait issue d'une différenciation locale alors que les PC à IgG seraient recrutés une fois générés en dehors de la tumeur, pourrait expliquer que les PC à IgA pourraient être dirigés plus souvent contre des Ags tumoraux. Une étude de l'expression dans la tumeur des cibles reconnues par les IgA et les IgG pourra permettre de tester cette hypothèse. Dans notre étude, nous n'observons pas de lien entre la présence de TLS et la densité de PC à IgA, mais une

analyse quantitative des TLS (nombre, surface occupée par les agrégats de LB CD20⁺, densité de DC matures) est en cours pour tirer un enseignement définitif.

Pour compléter et valoriser ces résultats, nous comparons actuellement les réactivités détectées dans le MET *versus* le sérum des patients et celles présentes chez des donneurs sains, afin d'identifier les protéines à l'origine d'une réponse humorale spécifiquement chez les patients cancéreux et déterminer si cette réponse est systémique ou principalement restreinte au MET. De plus, nous déterminerons si les Ags reconnus sont spécifiquement exprimés par les cellules tumorales en étudiant l'expression des Ag au niveau ARN dans les cancers de sein ou d'ovaire comparativement au tissu sain correspondant et d'autres tissus, grâce à l'analyse de banque de données (TCGA). Nous confirmerons également une partie des réactivités antigéniques identifiées par un test ELISA, comme nous l'avons déjà fait pour des peptides localisés dans ARHGAP5 et Makorin3 pour une tumeur de l'ovaire d'une patiente atteinte d'une dégénérescence cérébelleuse paranéoplasique. Pour cela, nous nous concentrerons sur une dizaine de protéines sélectionnées sur la base de i) la présence d'Acs contre cet Ag uniquement dans la tumeur, ii) l'existence d'un signal positif pour au moins 2 peptides contigus révélés lors du microarray et iii) d'une réactivité IgG/IgA différentielle.

3. Un rôle différentiel des plasmocytes à IgG et des plasmocytes à IgA dans les tumeurs ?

Le ratio de PC à IgA par rapport au PC à IgG est beaucoup plus élevé dans les carcinomes canauxiaux *in situ* que dans les tumeurs invasives, avec des PC à IgA bien plus nombreux que les PC à IgG dans toutes les tumeurs CCIS analysées (ratio IgA/IgG=10), ce qui est rare dans les tumeurs invasives. Les CCIS étant des tumeurs mammaires précoces généralement de bon pronostic et avec un faible taux de rechute, cette observation suggère que les PC à IgA pourraient jouer un rôle protecteur lors de la progression tumorale. Dans ce sens, l'analyse d'une cohorte rétrospective de 762 tumeurs du sein (cohorte Unicancer PACS08, (Campone et al., 2018)) tend à montrer un impact positif sur la survie des patientes d'une forte densité de PC à IgA, bien que la différence ne soit pas significative. L'analyse de l'infiltrat plasmocytaire ayant été réalisée à l'aide TMA (Tissue Microarray) qui ne représentent qu'une surface mineure de la tumeur, une étude sur lames entières est indispensable pour consolider ces données. Cette étude sera réalisée grâce à des marquages multi-IF pour IgG, IgA et CD20 sur des lames entières et sera restreinte au cancer triple négatif, le sous-type tumoral le plus fréquemment et fortement infiltré par des PC, comme nous l'avons mis en évidence lors de l'étude de la cohorte Unicancer PACS08. Par ailleurs, nous étudierons l'impact des deux populations de PC sur la réponse aux immunothérapies bloquant l'axe PD1/PD-L1 dans les cancers du sein ou de l'ovaire, grâce à différentes cohortes de patientes sous traitement en cours de constitution.

Les IgA peuvent tuer les cellules tumorales en activant l'ADCC par les neutrophiles grâce à l'engagement du FcαR, de manière plus efficace que les IgG (Brandsma et al., 2015; Otten et al., 2005).

Les neutrophiles sont des cellules de l'immunité innée recrutées rapidement sur les sites anormaux et infiltrant les tumeurs dès les stades précoces, comme le démontrent des données non publiées de l'équipe sur les CCIS. La concomitance des neutrophiles et des IgA pourrait alors conférer à ces derniers des capacités à tuer les cellules tumorales, permettant une élimination efficace des tumeurs précoces. De plus, les IgA étant des Acs principalement non-inflammatoires, leur présence pourrait permettre d'activer l'ADCC sur des cellules effectrices et ainsi tuer les cellules tumorales, sans activer la sécrétion de cytokines inflammatoires pro-tumorales par les granulocytes et les mastocytes par exemple, à l'inverse des IgG, qui certes peuvent induire la mort des cellules tumorales, mais aussi favoriser la croissance tumorale par leur activité pro-inflammatoire comme démontré dans des modèles murins de cancer cutanés (Andreu et al., 2010; de Visser et al., 2005).

Les IgA pourraient cependant également avoir un rôle pro-tumoral, notamment en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10, et en diminuant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-12 et le TNF α , par les cellules myéloïdes, lors de l'engagement des récepteurs Fc α R ou DC-SIGN (Diana et al., 2013; Pasquier et al., 2005). Les macrophages infiltrant les tumeurs de sein et d'ovaire sont majoritairement des cellules tolérogènes avec un phénotype de type M2 (Tariq et al., 2017), et nos résultats démontrent qu'une partie de ces macrophages expriment Fc α R et/ou DC-SIGN, confirmant des données publiées (Monteiro and Van De Winkel, 2003), dont l'engagement par les IgA produites dans le MET pourrait contribuer à induire ou maintenir la fonction tolérogène des macrophages. Au cours de cette thèse, j'ai essayé de déterminer si les IgA influençaient la différenciation des monocytes en cellules dendritiques et en macrophages à l'aide d'un modèle *in vitro* de culture. J'ai pu observer que les dIgA et dans une moindre mesure les mIgA orientaient la différenciation vers des M2 au détriment des M1, mais ces effets se sont avérés largement dus à la présence d'endotoxines dans la plupart des préparations d'IgA commerciales ou obtenues au travers de collaborations. Ce type d'expériences mériterait d'être reproduit avec des IgA purifiées des tumeurs comparativement à des IgG.

Les LB et notamment les PC pourraient également influencer la réponse anti-tumorale par la sécrétion de cytokines ou l'expression de molécules immuno-régulatrices à leur surface, comme décrit pour les PC à IgA qui participent à l'homéostasie intestinale par la sécrétion de TNF α et l'expression d'iNOS (Fritz et al., 2011) ainsi que par l'expression de PD-L1 favorisant la génération de LTreg (Doi et al., 2012). Dans les tumeurs de la prostate et du foie, des PC à IgA sécrétant de l'IL-10 et exprimant PD-L1 inhibent les fonctions cytotoxiques des LT CD8 $^{+}$ et favorisent la présence de LTreg (Shalapour et al., 2015, 2017). Cependant, ces résultats ont été obtenus chez la souris, qui, au contraire de l'Homme, n'exprime pas le récepteur de haute affinité pour la partie Fc des IgA Fc α R, suggérant que ce modèle pourrait minimiser l'effet potentiel des IgA produit par les PC. Dans les cancers de l'ovaire chez l'Homme, des LB produisant de l'IL-10 capables d'inhiber la production d'IFN γ par des LT CD8 $^{+}$ *ex vivo*

sont détectés dans les ascites associées à des tumeurs d’ovaire (Wei et al., 2015). Nos propres données montrent que PD-L1 est, en effet, exprimé par les PC dans certaines tumeurs, plus faiblement que par les macrophages et à des niveaux similaires par les PC à IgG et les PC à IgA dans la majorité des cas. De plus, nous observons également une expression de certains ligands d’ICP activateurs sur les PC, en particulier 4-1BBL, dont l’expression sur les LB a été associée à l’induction de LT CD8⁺ cytotoxiques capables de tuer des cellules tumorales (Lee-Chang et al., 2014). Via l’expression d’ICP-L et la production de cytokines, les PC pourraient ainsi modifier l’activation d’autres cellules immunitaires infiltrant les tumeurs avec lesquelles ils sont en contact. Afin d’identifier de manière non biaisée d’éventuelles capacités immuno-modulatrices différentes entre les PC à IgG, à IgA et à IgM, ces différentes populations seront purifiées par tri en CMF à partir de suspensions cellulaires de tumeur et un séquençage d’ARN sera réalisé afin de déterminer les gènes exprimés de manière différentielle et les grandes voies fonctionnelles spécifiques de chacune des populations.

4. Un aperçu des mécanismes responsables d’une réponse anticorps anti-tumorale grâce à l’étude des syndromes paranéoplasiques

4.1. Les tumeurs de l’ovaire associées à des syndromes neurologiques paranéoplasiques présentent une texture immunitaire particulière

L’étude de 26 tumeurs de l’ovaire associées à des dégénérescences cérébelleuses paranéoplasiques a démontré que ces tumeurs présentent un infiltrat massif concomitant de PC à IgG et de LT CD8⁺ cytotoxiques exprimant des molécules cytotoxiques, souvent localisés au contact de cellules tumorales apoptotiques, suggérant l’existence d’un microenvironnement immunitaire tourné vers l’élimination des cellules tumorales. Dans les tumeurs de l’ovaire en général, c’est la présence des LT CD8⁺ au contact des cellules tumorales qui est associée à un bon pronostic, renforçant le fait que ces LT jouent un rôle anti-tumoral efficace. Dans les tumeurs associées à un SNP, ces LT CD8⁺ sont non seulement au contact des cellules tumorales, mais également plus nombreux et plus actifs avec une sécrétion massive de molécules cytotoxiques que dans les tumeurs contrôles. Un infiltrat similaire a été également observé dans une tumeur de l’ovaire associée à la dégénérescence cérébelleuse associée à un nouvel Ag (ARHGAP5), montrant que cette texture immunitaire n’est pas dépendante d’un Ag unique. Une telle densité de PC et de LT cytotoxiques est extrêmement rarement observée dans les tumeurs non associées à des SNP, montrant que cet infiltrat immunitaire est associé à la présence d’un tel syndrome. Par ailleurs, les DC matures infiltrant les tumeurs associées à une Yo-DCP sont également plus fréquemment en contact avec la zone tumorale que dans les tumeurs contrôles, suggérant qu’elles pourraient participer à la capture d’Ags tumoraux et à leur présentation aux LT. L’étude de la tumeur associée à ARHGAP5 démontre que des IgG dirigées contre cette protéine sont

présents dans le MET, montrant l'existence d'une réponse humorale dirigée contre l'Ag onco-neuronal dans la tumeur. Une forte densité de PC à IgG serait associée à une réponse anti-tumorale efficace dans ces tumeurs, alors que notre étude dans les tumeurs de sein et de l'ovaire non-associées à des SNP suggère plutôt un rôle anti-tumoral des IgA. Cependant, les IgG pourraient également jouer des rôles anti-tumoraux, particulièrement lorsqu'ils sont associés à d'autres cellules immunitaires infiltrant la tumeur avec lesquels ils pourraient agir en synergie, ici des LT CD8⁺. La concomitance d'une réponse T CD8⁺ et d'une réponse Acs pourrait permettre une meilleure élimination des cellules tumorales en agissant en synergie, par exemple via la formation de complexes immuns à IgG qui favorisent la présentation croisée d'Ags au LT CD8⁺ par les DC (Schuurhuis et al., 2002; Simitsek et al., 1995), ou car les PC à IgG pourraient sécréter des cytokines permettant d'activer ces LT.

4.2. Des altérations des gènes des antigènes onco-neuraux pourraient induire la rupture de tolérance contre ces antigènes

La pathologie auto-immune est induite par une rupture de tolérance immunitaire contre l'Ag onco-neuronal, mais les mécanismes sous-jacents restent en grande partie méconnus, mais sont liés au développement de la tumeur. Dans ce contexte, nous avons étudié au niveau génique et protéique les Ags dans la tumeur pour comprendre ce qui leur confère une immunogénicité particulière. Les gènes des Ags onco-neuraux CDR2 et CDR2L sont amplifiés et/ou mutés dans toutes les tumeurs associées à une Yo-DCP étudiées, avec des mutations non-synonymes, des insertions/délétions de bases, ou des mutations tronquantes. Certaines de ces mutations non-synonymes conduisent à des peptides mutés, dont l'affinité prédite pour les molécules du CMH-I est fortement augmentée par rapport à celle du peptide natif et est compatible avec celle d'un néo-épitope CD8. De plus, l'Ag CDR2L est surexprimé dans les tumeurs. Ces différentes altérations des Ags onco-neuraux dans la tumeur, à la fois au niveau génique et protéique, pourraient donc conduire à la rupture de tolérance contre ces Ags, à l'apparition de la pathologie auto-immune, mais également au contrôle de la tumeur.

5. Conclusion générale

L'ensemble de ce travail démontre donc une diversité et une hétérogénéité de la réponse humorale dans les tumeurs de sein et d'ovaire, avec à la fois des IgA présentes sous formes monomérique et dimérique et des IgG pouvant jouer des rôles différentiels dans la progression tumorale, les IgA semblant avoir un rôle protecteur dans les tumeurs de sein. Cependant, une concomitance de PC à IgG et de LT CD8⁺ cytotoxiques semble également permettre une réponse anti-tumorale efficace, comme démontré dans les tumeurs associées à un SNP dont l'analyse met en évidence que cette réponse immunitaire pourrait être initiée par des modifications génétiques des Ags exprimés dans la tumeur. D'autres aspects restent à explorer : les Acs présents dans les tumeurs

pourraient également permettre la présentation croisée des Ags tumoraux, mais aussi avoir des fonctions inhibitrices, notamment sur les CPA. Une meilleure compréhension des différents rôles de la réponse humorale dans la réponse anti-tumorale pourrait ainsi permettre d'identifier de nouvelles voies à cibler en immunothérapie.

Références

A

- Agrawal, B., Krantz, M.J., Reddish, M.A., and Longenecker, B.M. (1998). Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat. Med.* 4, 43–49.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544.
- Akiba, H., Oshima, H., Takeda, K., Atsuta, M., Nakano, H., Nakajima, A., Nohara, C., Yagita, H., and Okumura, K. (1999). CD28-Independent Costimulation of T Cells by OX40 Ligand and CD70 on Activated B Cells. *J. Immunol.* 162, 7058–7066.
- Albaret, M.A., Vermot-Desroches, C., Paré, A., Roca-Martinez, J.-X., Malet, L., Esseily, J., Gerossier, L., Brière, J., Pion, N., Marcel, V., et al. (2018). Externalized Keratin 8: A Target at the Interface of Microenvironment and Intracellular Signaling in Colorectal Cancer Cells. *Cancers* 10.
- Albert, M.L., Darnell, J.C., Bender, A., Francisco, L.M., Bhardwaj, N., and Darnell, R.B. (1998). Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat. Med.* 4, 1321–1324.
- Albert, M.L., Austin, L.M., and Darnell, R.B. (2000). Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann. Neurol.* 47, 9–17.
- Alsina-Sanchis, E., Figueras, A., Lahiguera, Á., Vidal, A., Casanovas, O., Graupera, M., Villanueva, A., and Viñals, F. (2016). The TGFβ pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation by increasing IGF1R levels. *Int. J. Cancer* 139, 1894–1903.
- Anderson, S.M., Khalil, A., Uduman, M., Hershberg, U., Louzoun, Y., Haberman, A.M., Kleinstein, S.H., and Shlomchik, M.J. (2009). Taking Advantage: High Affinity B cells in the Germinal Center Have Lower Death Rates, But Similar Rates of Division Compared to Low Affinity Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 7314–7325.
- Andreu, P., Johansson, M., Affara, N.I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D.G., et al. (2010). Fcγ activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* 17, 121–134.
- Angelova, M., Mlecnik, B., Vasaturo, A., Bindea, G., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Buttard, B., Morgand, E., Bruni, D., Jouret-Mourin, A., et al. (2018). Evolution of Metastases in Space and Time under Immune Selection. *Cell* 175, 751–765.e16.
- Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., Malefyt, R. de W., and Tangye, S.G. (2008). IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *J. Immunol.* 181, 1767–1779.
- zum Büschenfelde, K.H., and Müller, W.E. (1991). Translocation of the nuclear autoantigen La to cell surface: assembly and disassembly with the extracellular matrix. *Autoimmunity* 9, 99–107.
- Baker, K., Qiao, S.-W., Kuo, T.T., Aveson, V.G., Platzer, B., Andersen, J.-T., Sandlie, I., Chen, Z., de Haar, C., Lencer, W.I., et al. (2011). Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8–CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9927–9932.
- Baker, K., Rath, T., Flak, M.B., Arthur, J.C., Chen, Z., Glickman, J.N., Zlobec, I., Karamitopoulou, E., Stachler, M.D., Odze, R.D., et al. (2013). Neonatal Fc Receptor Expression in Dendritic Cells Mediates Protective Immunity against Colorectal Cancer. *Immunity* 39, 1095–1107.
- Bao, Y., and Cao, X. (2014). The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *J. Autoimmun.* 55, 10–23.
- Barbera-Guillem, E., May, K.F., Nyhus, J.K., and Nelson, M.B. (1999). Promotion of Tumor Invasion by Cooperation of Granulocytes and Macrophages Activated by Anti-tumor Antibodies. *Neoplasia N. Y. N* 1, 453–460.
- Barr, T.A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J., and Gray, D. (2007). TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3040–3053.
- Baseler, M.W., Maxim, P.E., and Veltri, R.W. (1987). Circulating IgA immune complexes in head and neck cancer, nasopharyngeal carcinoma, lung cancer, and colon cancer. *Cancer* 59, 1727–1731.
- Baumann, J., Park, C.G., and Mantis, N.J. (2010). Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: implications for immune surveillance in the intestine. *Immunol. Lett.* 131, 59–66.
- Bbachmann, M., Althoff, H., Tröster, H., Selenka, C., Falke, D., and Müller, W.E.G. (1992). **Translocation of the Nuclear Autoantigen La to the Cell Surface of Herpes Simplex Virus Type 1 Infected Cells.** *Autoimmunity* 12, 37–45.
- Bell, C.E., and Seetharam, S. (1977). Identification of the Schwann Cell as a Peripheral Nervous System Cell Possessing a Differentiation Antigen Expressed by a Human Lung Tumor. *J. Immunol.* 118, 826–831.
- Bell, C.E., Seetharam, S., and McDaniel, R.C. (1976). Endodermally-Derived and Neural Crest-Derived Differentiation Antigens Expressed by a Human Lung Tumor. *J. Immunol.* 116, 1236–1243.
- Berntsson, J., Nodin, B., Eberhard, J., Micke, P., and Jirström, K. (2016). Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int. J. Cancer n/a-n/a*.
- Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., and Frazer, I.H. (2017). Interferon-γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 8, e2836.

B

Bachmann, M., Chang, S., Bernd, A., Mayet, W., Meyer

- Bicknell, D.C., Kaklamanis, L., Hampson, R., Bodmer, W.F., and Karran, P. (1996). Selection for β 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr. Biol.* 6, 1695–1697.
- Björge, L., Hakulinen, J., Vintermyr, O.K., Jarva, H., Jensen, T.S., Iversen, O.E., and Meri, S. (2005). Ascitic complement system in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 92, 895–905.
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* 32, 129–140.
- Blanc, P., Moro-Sibilot, L., Barthly, L., Jagot, F., This, S., de Bernard, S., Buffat, L., Dussurgey, S., Colisson, R., Hobeika, E., et al. (2016). Mature IgM-expressing plasma cells sense antigen and develop competence for cytokine production upon antigenic challenge. *Nat. Commun.* 7, 13600.
- Blixt, O., Buetti, D., Burford, B., Allen, D., Julien, S., Hollingsworth, M., Gammerman, A., Fentiman, I., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J.M. (2011). Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R25.
- Bodogai, M., Chang, C.L., Wejksza, K., Lai, J., Merino, M., Wersto, R.P., Gress, R.E., Chan, A.C., Hesdorffer, C., and Biragyn, A. (2013). Anti-CD20 Antibody Promotes Cancer Escape via Enrichment of Tumor-Evoked Regulatory B Cells Expressing Low Levels of CD20 and CD137L. *Cancer Res.* 73, 2127–2138.
- Bohannon, C., Powers, R., Satyabhama, L., Cui, A., Tipton, C., Michaeli, M., Skountzou, I., Mittler, R.S., Kleinstein, S.H., Mehr, R., et al. (2016). Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nat. Commun.* 7, 11826.
- Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (1997). B7-1 and B7-2 Have Overlapping, Critical Roles in Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. *Immunity* 6, 303–313.
- Borrok, M.J., Luheshi, N.M., Beyaz, N., Davies, G.C., Legg, J.W., Wu, H., Dall'Acqua, W.F., and Tsui, P. (2015). Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by endowing IgG with Fc α RI (CD89) binding. *MAbs* 7, 743–751.
- Bosisio, F.M., Wilmott, J.S., Volders, N., Mercier, M., Wouters, J., Stas, M., Blokx, W.A., Massi, D., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., et al. (2016). Plasma cells in primary melanoma. Prognostic significance and possible role of IgA. *Mod. Pathol.*
- Boyerinas, B., Jochems, C., Fantini, M., Heery, C.R., Gulley, J.L., Tsang, K.Y., and Schlom, J. (2015). Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells. *Cancer Immunol. Res.* 3, 1148–1157.
- Brandsma, A.M., Ten Broeke, T., Nederend, M., Meulenbroek, L.A.P., van Tetering, G., Meyer, S., Jansen, M., Beltrán Buitrago, M.A., Nagelkerke, S.Q., Németh, I., et al. (2015). Simultaneous targeting of Fc γ Rs and Fc α RI enhances tumor cell killing. *Cancer Immunol. Res.*
- Broek, M.F. van den, Kägi, D., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1995). Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur. J. Immunol.* 25, 3514–3516.
- Brown, T.A., and Mestecky, J. (1985). Immunoglobulin A subclass distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens. *Infect. Immun.* 49, 459–462.
- Brown, D.M., Fisher, T.L., Wei, C., Frelinger, J.G., and Lord, E.M. (2001). Tumours can act as adjuvants for humoral immunity. *Immunology* 102, 486–497.
- Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., et al. (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* 26, 938.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–3725.
- Bruno, T.C., Ebner, P.J., Moore, B.L., Squalls, O.G., Waugh, K.A., Eruslanov, E.B., Singhal, S., Mitchell, J.D., Franklin, W.A., Merrick, D.T., et al. (2017). Antigen-Presenting Intratumoral B Cells Affect CD4⁺ TIL Phenotypes in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Immunol. Res.* 5, 898–907.
- Buisseret, L., Garraud, S., Wind, A. de, Eynden, G.V. den, Boisson, A., Solinas, C., Gu-Trantien, C., Naveaux, C., Lodewyckx, J.-N., Duveillier, H., et al. (2017). Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *OncImmunology* 6, e1257452.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13, 1–27.
- ## C
- Cai, C., Zhang, J., Li, M., Wu, Z.-J., Song, K.H., Zhan, T.W., Wang, L.-H., and Sun, Y.-H. (2015). Interleukin 10-expressing B cells inhibit tumor-infiltrating T cell function and correlate with T cell Tim-3 expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*
- Campane, M., Lacroix-Triki, M., Roca, L., Spielmann, M., Wildiers, H., Cottu, P., Kerbrat, P., Levy, C., Desmoulins, I., Bachelot, T., et al. (2018). UCBG 2-08: 5-year efficacy results from the UNICANCER-PACS08 randomised phase III trial of adjuvant treatment with FEC100 and then either docetaxel or ixabepilone in patients with early-stage, poor prognosis breast cancer. *Eur. J. Cancer* 103, 184–194.

- Candolfi, M., Curtin, J.F., Yagiz, K., Assi, H., Wibowo, M.K., Alzadeh, G.E., Foulad, D., Muhammad, A.K.M.G., Salehi, S., Keech, N., et al. (2011). B cells are critical to T-cell-mediated antitumor immunity induced by a combined immune-stimulatory/conditionally cytotoxic therapy for glioblastoma. *Neoplasia* N. Y. N 13, 947–960.
- Carmi, Y., Spitzer, M.H., Linde, I.L., Burt, B.M., Prestwood, T.R., Perlman, N., Davidson, M.G., Kenkel, J.A., Segal, E., Pusapati, G.V., et al. (2015). Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumor T-cell immunity. *Nature* 521, 99–104.
- Carpenter, E.L., Vance, B.A., Klein, R.S., Voloschin, A., Dalmau, J., and Vonderheide, R.H. (2008). Functional analysis of CD8+ T cell responses to the onconeural self protein cdr2 in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *J. Neuroimmunol.* 193, 173–182.
- Cassel, D., and Schwartz, R. (1994). A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J. Exp. Med.* 180, 1829–1840.
- Castino, G.F., Cortese, N., Capretti, G., Serio, S., Caro, G.D., Mineri, R., Magrini, E., Grizzi, F., Cappello, P., Novelli, F., et al. (2016). Spatial distribution of B cells predicts prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncolmunology* 5, e1085147.
- Celluzzi, C.M., Mayordomo, J.I., Storkus, W.J., Lotze, M.T., and Falo, L.D. (1996). Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* 183, 283–287.
- Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 421–434.
- Chaisemartin, L. de, Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., Cremer, I., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2011). Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer. *Cancer Res.* 71, 6391–6399.
- Charbonneau, B., Maurer, M.J., Fredericksen, Z.S., Zent, C.S., Link, B.K., Novak, A.J., Ansell, S.M., Weiner, G.J., Wang, A.H., Witzig, T.E., et al. (2012). Germline Variation in Complement Genes and Event-Free Survival in Follicular and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Hematol.* 87, 880–885.
- Chen, M.-L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 419–424.
- Chen, P.-L., Roh, W., Reuben, A., Cooper, Z.A., Spencer, C.N., Prieto, P.A., Miller, J.P., Bassett, R.L., Gopalakrishnan, V., Wani, K., et al. (2016). Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov.* 6, 827–837.
- Chesnut, R.W., Colon, S.M., and Grey, H.M. (1982). Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors, and macrophages: functional and biochemical comparison. *J. Immunol.* 128, 1764–1768.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719–722.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R.A., and Fu, X.Y. (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5328–5337.
- Clark, R., and Klebanoff, S. (1975). Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *J. Exp. Med.* 141, 1442–1447.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6, 443–446.
- Coffman, R.L., Savelkoul, H.F., and Lebman, D.A. (1989). Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. *Semin. Immunol.* 1, 55–63.
- Colluru, V.T., and McNeel, D.G. (2016). B lymphocytes as direct antigen-presenting cells for anti-tumor DNA vaccines. *Oncotarget* 7, 67901–67918.
- Coppola, D., Nebozhyn, M., Khalil, F., Dai, H., Yeatman, T., Loboda, A., and Mulé, J.J. (2011). Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am. J. Pathol.* 179, 37–45.
- Coronella, J.A., Telleman, P., Kingsbury, G.A., Truong, T.D., Hays, S., and Junghans, R.P. (2001). Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer Res.* 61, 7889–7899.
- Coronella, J.A., Spier, C., Welch, M., Trevor, K.T., Stopeck, A.T., Villar, H., and Hersh, E.M. (2002). Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 1829–1836.
- Cramer, D.W., Titus-Ernstoff, L., McKolanis, J.R., Welch, W.R., Vitonis, A.F., Berkowitz, R.S., and Finn, O.J. (2005). Conditions Associated with Antibodies Against the Tumor-Associated Antigen MUC1 and Their Relationship to Risk for Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 14, 1125–1131.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41, 529–542.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10, 942–949.
- D**
- Dalmau, J., Graus, F., Rosenblum, M. k., and Posner, J.B. (1992). Anti-Hu-Associated Paraneoplastic Encephalomyelitis/Sensory Neuronopathy A Clinical

Study of 71 Patients: *Medicine (Baltimore)* 71, 59–72.

Darnell, R.B., and DeAngelis, L.M. (1993). Regression of small-cell lung carcinoma in patients with paraneoplastic neuronal antibodies. *The Lancet* 341, 21–22.

Dechant, M., Vidarsson, G., Stockmeyer, B., Repp, R., Glennie, M.J., Gramatzki, M., Winkel, J.G.J. van de, and Valerius, T. (2002). Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood* 100, 4574–4580.

Dechant, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Weisner, W., Peipp, M., Winkel, J.G.J. van de, and Valerius, T. (2007). Effector Mechanisms of Recombinant IgA Antibodies against Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Immunol.* 179, 2936–2943.

DeFalco, J., Harbell, M., Manning-Bog, A., Baia, G., Scholz, A., Millare, B., Sumi, M., Zhang, D., Chu, F., Dowd, C., et al. (2018). Non-progressing cancer patients have persistent B cell responses expressing shared antibody paratopes that target public tumor antigens. *Clin. Immunol.* 187, 37–45.

Desai, D.D., Harbers, S.O., Flores, M., Colonna, L., Downie, M.P., Bergtold, A., Jung, S., and Clynes, R. (2007). Fcγ Receptor IIB on Dendritic Cells Enforces Peripheral Tolerance by Inhibiting Effector T Cell Responses. *J. Immunol.* 178, 6217–6226.

Detjen, K., Farwig, K., Welzel, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2001). Interferon γ inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut* 49, 251–262.

Dhodapkar, K.M., Krasovsky, J., Williamson, B., and Dhodapkar, M.V. (2002). Antitumor Monoclonal Antibodies Enhance Cross-Presentation of Cellular Antigens and the Generation of Myeloma-specific Killer T Cells by Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 195, 125–133.

Diana, J., Moura, I.C., Vaugier, C., Gestin, A., Tissandie, E., Beaudoin, L., Corthésy, B., Hocini, H., Lehuen, A., and Monteiro, R.C. (2013). Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 2335–2343.

Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 4410–4417.

Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447–456.

DiLillo, D.J., Yanaba, K., and Tedder, T.F. (2010). B Cells Are Required for Optimal CD4+ and CD8+ T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4006–4016.

Ding, Q., Mohib, K., Kuchroo, V.K., and Rothstein, D.M. (2017). TIM-4 Identifies IFN-γ-Expressing Proinflammatory B Effector 1 Cells That Promote Tumor

and Allograft Rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 199, 2585–2595.

Doi, T., Kanai, T., Mikami, Y., Sujino, T., Jun, L., Ono, Y., Hayashi, A., and Hibi, T. (2012). IgA plasma cells express the negative regulatory co-stimulatory molecule programmed cell death 1 ligand and have a potential tolerogenic role in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 918–923.

Domínguez-Soto, A., Sierra-Filardi, E., Puig-Kröger, A., Pérez-Maceda, B., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M.T., Sánchez-Mateos, P., and Corbí, A.L. (2011). Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2192–2200.

Dong, X.-Y., Su, Y.-R., Qian, X.-P., Yang, X.-A., Pang, X.-W., Wu, H.-Y., and Chen, W.-F. (2003). Identification of two novel CT antigens and their capacity to elicit antibody response in hepatocellular carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 89, 291–297.

Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 178, 6092–6099.

Duhen, T., Duhen, R., Montler, R., Moses, J., Moudgil, T., Miranda, N.F. de, Goodall, C.P., Blair, T.C., Fox, B.A., McDermott, J.E., et al. (2018). Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat. Commun.* 9, 2724.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.

E

Epstein, M.M., Di Rosa, F., Jankovic, D., Sher, A., and Matzinger, P. (1995). Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 182, 915–922.

Erić-Nikolić, A., Milovanović, Z., Sánchez, D., Pekáriková, A., Džodić, R., Matić, I.Z., Tučková, L., Jevrić, M., Buta, M., Rašković, S., et al. (2012). Overexpression of calreticulin in malignant and benign breast tumors: relationship with humoral immunity. *Oncology* 82, 48–55.

F

Fasching, C.E., Grossman, T., Corthésy, B., Plaut, A.G., Weiser, J.N., and Janoff, E.N. (2007). Impact of the Molecular Form of Immunoglobulin A on Functional Activity in Defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 75, 1801–1810.

Fernández-Madrid, F., and Maroun, M.-C. (2014). Autoantibodies in breast cancer. *Adv. Clin. Chem.* 64, 221–240.

Fillatreau, S. (2015). Regulatory plasma cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 23, 1–5.

Finkin, S., Yuan, D., Stein, I., Taniguchi, K., Weber, A.,

- Unger, K., Browning, J.L., Goossens, N., Nakagawa, S., Gunasekaran, G., et al. (2015). Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat. Immunol.* 16, 1235–1244.
- Fortner, R.T., Damms-Machado, A., and Kaaks, R. (2017). Systematic review: Tumor-associated antigen autoantibodies and ovarian cancer early detection. *Gynecol. Oncol.* 147, 465–480.
- Fosså, A., Alsøe, L., Cramer, R., Funderud, S., Gaudernack, G., and Smeland, E.B. (2004). Serological cloning of cancer/testis antigens expressed in prostate cancer using cDNA phage surface display. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 431–438.
- Fremd, C., Stefanovic, S., Beckhove, P., Pritsch, M., Lim, H., Wallwiener, M., Heil, J., Golatta, M., Rom, J., Sohn, C., et al. (2016). Mucin 1-specific B cell immune responses and their impact on overall survival in breast cancer patients. *Oncoimmunology* 5, e1057387.
- Fristedt, R., Borg, D., Hedner, C., Berntsson, J., Nodin, B., Eberhard, J., Micke, P., and Jirström, K. (2016). Prognostic impact of tumour-associated B cells and plasma cells in oesophageal and gastric adenocarcinoma. *J. Gastrointest. Oncol.* 7, 848–859.
- Fritz, J.H., Rojas, O.L., Simard, N., McCarthy, D., Hapfelmeier, S., Rubino, S., Robertson, S.J., Larijani, M., Gosselin, J., Ivanov, I.I., et al. (2011). Acquisition of a multifunctional TNF α /iNOS-producing IgA⁺ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 481, 199–203.
- Frontera, E.D., Khansa, R.M., Schalk, D.L., Leakan, L.E., Guerin-Edbauer, T.J., Ratnam, M., Gorski, D.H., and Speyer, C.L. (2018). IgA Fc-folate conjugate activates and recruits neutrophils to directly target triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 172, 551–560.
- Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., Zhang, Z., Yang, H., Zhang, H., Zhou, C., et al. (2007). Increased Regulatory T Cells Correlate With CD8 T-Cell Impairment and Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Gastroenterology* 132, 2328–2339.
- Fuchs, E.J., and Matzinger, P. (1992). B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258, 1156–1159.
- G**
- Gaetano, N.D., Cittera, E., Nota, R., Vecchi, A., Grieco, V., Scanziani, E., Botto, M., Introna, M., and Golay, J. (2003). Complement Activation Determines the Therapeutic Activity of Rituximab In Vivo. *J. Immunol.* 171, 1581–1587.
- Galdiero, M.R., Garlanda, C., Jaillon, S., Marone, G., and Mantovani, A. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J. Cell. Physiol.* 228, 1404–1412.
- Galon, J., Pagès, F., Marincola, F.M., Thurin, M., Trinchieri, G., Fox, B.A., Gajewski, T.F., and Ascierto, P.A. (2012). The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J. Transl. Med.* 10, 1.
- Garaud, S., Zayakin, P., Buisseret, L., Rulle, U., Silina, K., de Wind, A., Van den Eyden, G., Larsimont, D., Willard-Gallo, K., and Liné, A. (2018). Antigen Specificity and Clinical Significance of IgG and IgA Autoantibodies Produced in situ by Tumor-Infiltrating B Cells in Breast Cancer. *Front. Immunol.* 9.
- Garred, P., Michaelsen, T.E., and Aase, A. (1989). The IgG Subclass Pattern of Complement Activation Depends on Epitope Density and Antibody and Complement Concentration. *Scand. J. Immunol.* 30, 379–382.
- Gebauer, C., Pignolet, B., Yshii, L., Mauré, E., Bauer, J., and Liblau, R. (2016). CD4⁺ and CD8⁺ T cells are both needed to induce paraneoplastic neurological disease in a mouse model. *Oncoimmunology* 6.
- Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehen, A., Brousse, N., and Monteiro, R.C. (2001). A Subset of Human Dendritic Cells Expresses IgA Fc Receptor (CD89), Which Mediates Internalization and Activation Upon Cross-Linking by IgA Complexes. *J. Immunol.* 166, 346–352.
- Gentles, A.J., Newman, A.M., Liu, C.L., Bratman, S.V., Feng, W., Kim, D., Nair, V.S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C.D., et al. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* 21, 938–945.
- Germain, C., Gnjatich, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelletier, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., et al. (2014). Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 832–844.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., Bergen, I.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Elewaut, D., Osterhaus, A.D.M.E., Hendriks, R., Rimmelzwaan, G.F., and Lambrecht, B.N. (2009). Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J. Exp. Med.* 206, 2339–2349.
- Ghafari-Fard, S., Seifi-Alan, M., Shamsi, R., and Esfandiary, A. (2015). Immunotherapy in Multiple Myeloma Using Cancer-Testis Antigens. *Iran. J. Cancer Prev.* 8.
- Gibney, G.T., Weiner, L.M., and Atkins, M.B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 17, e542–e551.
- Gilbert, A.E., Karagiannis, P., Dodev, T., Koers, A., Lacy, K., Josephs, D.H., Takhar, P., Geh, J.L.C., Healy, C., Harries, M., et al. (2011). Monitoring the Systemic Human Memory B Cell Compartment of Melanoma Patients for Anti-Tumor IgG Antibodies. *PLoS ONE* 6.
- Girard, J.P., and Springer, T.A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* 16, 449–457.
- Glennie, M.J., French, R.R., Cragg, M.S., and Taylor, R.P. (2007). Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* 44, 3823–3837.
- Gnjatic, S., Ritter, E., Büchler, M.W., Giese, N.A., Brors, B., Frei, C., Murray, A., Halama, N., Zörnig, I., Chen, Y.-T., et al. (2010). Seromic profiling of ovarian and pancreatic

cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5088–5093.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* **69**, 2000–2009.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., De Cha, L., Ouakrim, H., Becht, É., Alifano, M., et al. (2013). Tertiary lymphoid structure DC signal a Th1 and cytotoxic immune contexture, and is required for efficient prognostic value of CD8+ T cells in lung cancer patients. *Cancer Res.*

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* **74**, 705–715.

Gomes-Silva, D., and Ramos, C.A. (2018). Cancer Immunotherapy Using CAR-T Cells: From the Research Bench to the Assembly Line. *Biotechnol. J.* **13**, 1700097.

Goodell, V., Waisman, J., Salazar, L.G., Rosa, C. dela, Link, J., Coveler, A.L., Childs, J.S., Fintak, P.A., Higgins, D.M., and Disis, M.L. (2008). Level of HER-2/neu protein expression in breast cancer may affect the development of endogenous HER-2/neu-specific immunity. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 449–454.

Gräbner, R., Lötzer, K., Döpping, S., Hildner, M., Radke, D., Beer, M., Spanbroek, R., Lippert, B., Reardon, C.A., Getz, G.S., et al. (2009). Lymphotoxin β receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE $^{-/-}$ mice. *J. Exp. Med.* **206**, 233–248.

Graus, F., Dalmou, J., Reñé, R., Tora, M., Malats, N., Verschuuren, J.J., Cardenal, F., Viñolas, N., Garcia del Muro, J., Vadell, C., et al. (1997). Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2866–2872.

Gros, A., Robbins, P.F., Yao, X., Li, Y.F., Turcotte, S., Tran, E., Wunderlich, J.R., Mixon, A., Farid, S., Dudley, M.E., et al. (2014). PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J. Clin. Invest.* **124**, 2246–2259.

Guan, H., Wan, Y., Lan, J., Wang, Q., Wang, Z., Li, Y., Zheng, J., Zhang, X., Wang, Z., Shen, Y., et al. (2016). PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. *Sci. Rep.* **6**, 35651.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). CD4 $^{+}$ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* **123**, 2873–2892.

Guy, K., Di Mario, U., Irvine, W.J., Hunter, A.M., Hadley,

A., and Horne, N.W. (1981). Circulating immune complexes and autoantibodies in lung cancer. *Br. J. Cancer* **43**, 276–283.

H

Hadaschik, E.N., and Enk, A.H. (2015). TGF- β 1-induced regulatory T cells. *Hum. Immunol.* **76**, 561–564.

Hamano, Y., Arase, H., Saisho, H., and Saito, T. (2000). Immune Complex and Fc Receptor-Mediated Augmentation of Antigen Presentation for in Vivo Th Cell Responses. *J. Immunol.* **164**, 6113–6119.

Hansen, I.S., Krabbendam, L., Bernink, J.H., Loayza-Puch, F., Hoepel, W., van Burgsteden, J.A., Kuijper, E.C., Buskens, C.J., Bemelman, W.A., Zaat, S.A.J., et al. (2018). Fc α RI co-stimulation converts human intestinal CD103 + dendritic cells into pro-inflammatory cells through glycolytic reprogramming. *Nat. Commun.* **9**, 863.

Hansen, M.H., Nielsen, H., and Ditzel, H.J. (2001). The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12659–12664.

Hansen, M.H., Nielsen, H.V., and Ditzel, H.J. (2002). Translocation of an intracellular antigen to the surface of medullary breast cancer cells early in apoptosis allows for an antigen-driven antibody response elicited by tumor-infiltrating B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 2701–2711.

Hao, C.J., Li, J., Liu, P., Li, X.L., Hu, Y.Q., Sun, J.C., and Wei, Y. (2016). Effects of the balance between type 1 and type 2 T helper cells on ovarian cancer. *Genet. Mol. Res. GMR* **15**.

Harada, K., Shimoda, S., Kimura, Y., Sato, Y., Ikeda, H., Igarashi, S., Ren, X.-S., Sato, H., and Nakanuma, Y. (2012). Significance of immunoglobulin G4 (IgG4)-positive cells in extrahepatic cholangiocarcinoma: molecular mechanism of IgG4 reaction in cancer tissue. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 157–164.

Hardouin, J., Lasserre, J.-P., Sylvius, L., Joubert-Caron, R., and Caron, M. (2007). *Cancer Immunomics. Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1107**, 223–230.

Hiemstra, P.S., Gorter, A., Stuurman, M.E., Es, L.A.V., and Daha, M.R. (1987). Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur. J. Immunol.* **17**, 321–326.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α^{+} Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* **322**, 1097–1100.

Honnorat, J. (2006). Onconeural antibodies are essential to diagnose paraneoplastic neurological syndromes. *Acta Neurol. Scand.* **113**, 64–68.

Hontani, K., Tsuchikawa, T., Hiwasa, T., Nakamura, T., Ueno, T., Kushibiki, T., Takahashi, M., Inoko, K., Takano, H., Takeuchi, S., et al. (2017). Identification of novel serum

autoantibodies against EID3 in non-functional pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 8, 106206–106221.

Hu, H., Hang, J.-J., Han, T., Zhuo, M., Jiao, F., and Wang, L.-W. (2016). The M2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumor Biol.* 37, 8657–8664.

Hunziker, W., and Kraehenbuhl, J.-P. (1998). Epithelial Transcytosis of Immunoglobulins. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3, 287–302.

I

Idusogie, E.E., Wong, P.Y., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M., and Mulkerrin, M.G. (2001). Engineered Antibodies with Increased Activity to Recruit Complement. *J. Immunol.* 166, 2571–2575.

Iglesia, M.D., Vincent, B.G., Parker, J.S., Hoadley, K.A., Carey, L.A., Perou, C.M., and Serody, J.S. (2014). Prognostic B-cell Signatures Using mRNA-Seq in Patients with Subtype-Specific Breast and Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* 20, 3818–3829.

Inoue, S., Leitner, W.W., Golding, B., and Scott, D. (2006). Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* 66, 7741–7747.

Ito, T., Saga, S., Nagayoshi, S., Imai, M., Aoyama, A., Yokoi, T., and Hoshino, M. (1986). Class distribution of immunoglobulin-containing plasma cells in the stroma of medullary carcinoma of breast. *Breast Cancer Res. Treat.* 7, 97–103.

Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117, 530–541.

J

Järås, K., and Anderson, K. (2011). Autoantibodies in cancer: prognostic biomarkers and immune activation. *Expert Rev. Proteomics* 8, 577–589.

Jochems, C., Hodge, J.W., Fantini, M., Tsang, K.Y., Vandevener, A.J., Gulley, J.L., and Schlom, J. (2017). ADCC employing an NK cell line (haNK) expressing the high affinity CD16 allele with avelumab, an anti-PD-L1 antibody. *Int. J. Cancer* 141, 583–593.

Johansson-Percival, A., He, B., Li, Z.-J., Kjellén, A., Russell, K., Li, J., Larma, I., and Ganss, R. (2017). De novo induction of intratumoral lymphoid structures and vessel normalization enhances immunotherapy in resistant tumors. *Nat. Immunol. advance online publication*.

de Jongste, A.H.C., de Graaf, M.T., van den Broek, P.D.M., Kraan, J., Sillevius Smitt, P.A.E., and Gratama, J.W. (2013). Elevated numbers of regulatory T cells, central memory T cells and class-switched B cells in cerebrospinal fluid of patients with anti-Hu antibody associated paraneoplastic neurological syndromes. *J. Neuroimmunol.* 258, 85–90.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., et al. (2002). In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells

Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity* 17, 211–220.

K

Kalampokis, I., Yoshizaki, A., and Tedder, T.F. (2013). IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res. Ther.* 15 Suppl 1, S1.

Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7556–7561.

Karagiannis, P., Gilbert, A.E., Josephs, D.H., Ali, N., Dodev, T., Saul, L., Correa, I., Roberts, L., Beddowes, E., Koers, A., et al. (2013). IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J. Clin. Invest.* 123, 1457–1474.

Karagiannis, P., Villanova, F., Josephs, D.H., Correa, I., Hemelrijck, M.V., Hobbs, C., Saul, L., Egbuniwe, I.U., Tosi, I., Ilieva, K.M., et al. (2015). Elevated IgG4 in patient circulation is associated with the risk of disease progression in melanoma. *Oncol Immunology* 4, e1032492.

Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675–678.

Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, 167–178.

Kennedy, A.D., Beum, P.V., Solga, M.D., DiLillo, D.J., Lindorfer, M.A., Hess, C.E., Densmore, J.J., Williams, M.E., and Taylor, R.P. (2004). Rituximab Infusion Promotes Rapid Complement Depletion and Acute CD20 Loss in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Immunol.* 172, 3280–3288.

Keren, L., Bosse, M., Marquez, D., Angoshtari, R., Jain, S., Varma, S., Yang, S.-R., Kurian, A., Valen, D.V., West, R., et al. (2018). A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging. *Cell* 174, 1373–1387.e19.

Keskin, D.B., Reinhold, B., Lee, S.Y., Zhang, G., Lank, S., O'Connor, D.H., Berkowitz, R.S., Brusica, V., Kim, S.J., and Reinherz, E.L. (2011). Direct Identification of an HPV-16 Tumor Antigen from Cervical Cancer Biopsy Specimens. *Front. Immunol.* 2.

Kessel, A., Haj, T., Peri, R., Snir, A., Melamed, D., Sabo, E., and Toubi, E. (2012). Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun. Rev.* 11, 670–677.

Kim, A., Heo, S.-H., Kim, Y.-A., Gong, G., and Lee, H.J. (2016). An Examination of the Local Cellular Immune Response to Examples of Both Ductal Carcinoma In Situ (DCIS) of the Breast and DCIS With Microinvasion, With Emphasis on Tertiary Lymphoid Structures and Tumor

Infiltrating Lymphocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* **146**, 137–144.

Klade, C.S., Voss, T., Krystek, E., Ahorn, H., Zatloukal, K., Pummer, K., and Adolf, G.R. (2001). Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *PROTEOMICS* **1**, 890–898.

Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **7**, 773–782.

Kobayashi, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Takehara, K., and Matsushita, T. (2014). B Cells Promote Tumor Immunity against B16F10 Melanoma. *Am. J. Pathol.*

Koller, C.A., and LoBuglio, A.F. (1981). Monocyte-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: the role of the metabolic burst. *Blood* **58**, 293–299.

Komita, H., Homma, S., Saotome, H., Zeniya, M., Ohno, T., and Toda, G. (2006). Interferon-gamma produced by interleukin-12-activated tumor infiltrating CD8+T cells directly induces apoptosis of mouse hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **45**, 662–672.

Komiyama, K., Crago, S.S., Itoh, K., Moro, I., and Mestecky, J. (1986). Inhibition of natural killer cell activity by IgA. *Cell. Immunol.* **101**, 143–155.

Kondo, T., Nakazawa, H., Ito, F., Hashimoto, Y., Osaka, Y., Futatsuyama, K., Toma, H., and Tanabe, K. (2006). Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a Th1-type immune response. *Cancer Sci.* **97**, 780–786.

Kramski, M., Schorcht, A., Johnston, A.P.R., Lichtfuss, G.F., Jegaskanda, S., De Rose, R., Stratov, I., Kelleher, A.D., French, M.A., Center, R.J., et al. (2012). Role of monocytes in mediating HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **384**, 51–61.

Kroeger, D.R., Milne, K., and Nelson, B.H. (2016). Tumor infiltrating plasma cells are associated with tertiary lymphoid structures, cytolytic T cell responses, and superior prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. clincanres.2762.2015*.

Kulić, A., Sirotković-Skerlev, M., Jelisavac-Cosić, S., Herceg, D., Kovac, Z., and Vrbanc, D. (2010). Anti-p53 antibodies in serum: relationship to tumor biology and prognosis of breast cancer patients. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **27**, 887–893.

Kurdi, A.T., Glavey, S.V., Bezman, N.A., Jhatakia, A., Guerriero, J.L., Manier, S., Moschetta, M., Mishima, Y., Roccaro, A., Detappe, A., et al. (2018). Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis by Macrophages is a Novel Mechanism of Action of Elotuzumab. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 1454–1463.

L

Ladányi, A., Kiss, J., Mohos, A., Somlai, B., Liskay, G., Gilde, K., Fejös, Z., Gaudi, I., Dobos, J., and Tímár, J. (2011).

Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **60**, 1729–1738.

Ladjeva, I., Peterman, J.H., and Mestecky, J. (1989). IgA subclasses of human colostral antibodies specific for microbial and food antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **78**, 85–90.

Lanzavecchia, A. (1990). Receptor-Mediated Antigen Uptake and its Effect on Antigen Presentation to Class II-Restricted T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 773–793.

Lawley, W., Doherty, A., Denniss, S., Chauhan, D., Pruijn, G., van Venrooij, W.J., Lunec, J., and Herbert, K. (2000). Rapid lupus autoantigen relocalization and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes. *Rheumatology* **39**, 253–261.

Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* **271**, 1734–1736.

Lecocq, M., Detry, B., Guisset, A., and Pilette, C. (2013). FcαRI-mediated inhibition of IL-12 production and priming by IFN-γ of human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 2362–2371.

Lee, C.-H., Romain, G., Yan, W., Watanabe, M., Charab, W., Todorova, B., Lee, J., Triplett, K., Donkor, M., Lungu, O.I., et al. (2017). IgG Fc domains that bind C1q but not effector Fcγ receptors delineate the importance of complement-mediated effector functions. *Nat. Immunol.* **18**, 889–898.

Lee, H.J., Park, I.A., Song, I.H., Shin, S.-J., Kim, J.Y., Yu, J.H., and Gong, G. (2015). Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *J. Clin. Pathol.*

Lee-Chang, C., Bodogai, M., Moritoh, K., Olkhanud, P.B., Chan, A.C., Croft, M., Mattison, J.A., Holst, P.J., Gress, R.E., Ferrucci, L., et al. (2014). Accumulation of 4-1BBL+ B cells in the elderly induces the generation of granzyme-B+ CD8+ T cells with potential antitumor activity. *Blood* **124**, 1450–1459.

Leffers, N., Gooden, M.J.M., de Jong, R.A., Hoogeboom, B.-N., ten Hoor, K.A., Hollema, H., Boezen, H.M., van der Zee, A.G.J., Daemen, T., and Nijman, H.W. (2008). Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 449.

Lenner, P., Wiklund, F., Emdin, S.O., Arnerlöv, C., Eklund, C., Hallmans, G., Zentgraf, H., and Dillner, J. (1999). Serum antibodies against p53 in relation to cancer risk and prognosis in breast cancer: a population-based epidemiological study. *Br. J. Cancer* **79**, 927–932.

Li, B., Xu, L., Tao, F., Xie, K., Wu, Z., Li, Y., Li, J., Chen, K., Pi, C., Mendelsohn, A., et al. (2017). Simultaneous exposure to Fcγ3B3 and Fcγ3B1 on monocytes and macrophages enhances antitumor activity in vivo.

Oncotarget 8, 39356–39366.

Li, Q., Lao, X., Pan, Q., Ning, N., Yet, J., Xu, Y., Li, S., and Chang, A.E. (2011). Adoptive transfer of tumor reactive B cells confers host T cell immunity and tumor regression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 4987–4995.

Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F.E., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., et al. (2013). Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 73, 2468–2479.

Liu, X., Tsang, J.Y.S., Hlaing, T., Hu, J., Ni, Y.-B., Chan, S.K., Cheung, S.Y., and Tse, G.M. (2017). Distinct Tertiary Lymphoid Structure Associations and Their Prognostic Relevance in HER2 Positive and Negative Breast Cancers. *The Oncologist* 22, 1316–1324.

Ljunggren, H.-G., and Kärre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162, 1745–1759.

Lohse, S., Derer, S., Beyer, T., Klausz, K., Peipp, M., Leusen, J.H.W., Winkel, J.G.J. van de, Dechant, M., and Valerius, T. (2011). Recombinant Dimeric IgA Antibodies against the Epidermal Growth Factor Receptor Mediate Effective Tumor Cell Killing. *J. Immunol.* 186, 3770–3778.

Lokant, M.T., and Naz, R.K. (2015). Presence of PSA auto-antibodies in men with prostate abnormalities (prostate cancer/benign prostatic hyperplasia/prostatitis). *Andrologia* 47, 328–332.

Ludewig, B., Odermatt, B., Landmann, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1998). Dendritic Cells Induce Autoimmune Diabetes and Maintain Disease via De Novo Formation of Local Lymphoid Tissue. *J. Exp. Med.* 188, 1493–1501.

Lundgren, S., Berntsson, J., Nodin, B., Micke, P., and Jirstrom, K. (2016). Prognostic impact of tumour-associated B cells and plasma cells in epithelial ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* 9, 21.

M

Macaulay, A.E., DeKruyff, R.H., Goodnow, C.C., and Umetsu, D.T. (1997). Antigen-specific B cells preferentially induce CD4+ T cells to produce IL-4. *J. Immunol.* 158, 4171–4179.

Macaulay, A.E., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (1998). Antigen-Primed T Cells from B Cell-Deficient JHD Mice Fail to Provide B Cell Help. *J. Immunol.* 160, 1694–1700.

Macdonald, I.K., Parsy-Kowalska, C.B., and Chapman, C.J. (2017). Autoantibodies: Opportunities for Early Cancer Detection. *Trends Cancer* 3, 198–213.

Macor, P., Tripodo, C., Zorzet, S., Piovan, E., Bossi, F., Marzari, R., Amadori, A., and Tedesco, F. (2007). In vivo Targeting of Human Neutralizing Antibodies against CD55 and CD59 to Lymphoma Cells Increases the Antitumor Activity of Rituximab. *Cancer Res.* 67, 10556–10563.

Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R.

(2011). Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1949–1955.

Mamidi, S., Cinci, M., Hasmann, M., Fehring, V., and Kirschfink, M. (2013). Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. *Mol. Oncol.* 7, 580–594.

Mamidi, S., Höne, S., and Kirschfink, M. (2017). The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. *Immunobiology* 222, 45–54.

Markiewski, M.M., and Lambris, J.D. (2009). Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol.* 30, 286–292.

Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J.-J., Rochaix, P., and Girard, J.-P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 71, 5678–5687.

Martinet, L., Filleron, T., Le Guellec, S., Rochaix, P., Garrido, I., and Girard, J.-P. (2013). High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β -producing dendritic cells in human breast cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 2001–2008.

Martini, M., Testi, M.G., Pasetto, M., Picchio, M.C., Innamorati, G., Mazzocco, M., Ugel, S., Cingarlini, S., Bronte, V., Zanovello, P., et al. (2010). IFN- γ -mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* 28, 3548–3557.

Mathew, G.D., Qualtiere, L.F., Neel, H.B., and Pearson, G.R. (1981). IgA antibody, antibody-dependent cellular cytotoxicity and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* 27, 175–180.

Matlung, H.L., Babes, L., Zhao, X.W., Houdt, M. van, Treffers, L.W., Rees, D.J. van, Franke, K., Schornagel, K., Verkuiljen, P., Janssen, H., et al. (2018). Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trophic Opsonosis. *Cell Rep.* 23, 3946–3959.e6.

Matsutani, M., Suzuki, T., Hori, T., Terao, H., Takakura, K., and Nishioka, K. (1984). Cellular immunity and complement levels in hosts with brain tumours. *Neurosurg. Rev.* 7, 29–35.

McDonald, K.G., McDonough, J.S., and Newberry, R.D. (2005). Adaptive Immune Responses Are Dispensable for Isolated Lymphoid Follicle Formation: Antigen-Naive, Lymphotoxin-Sufficient B Lymphocytes Drive the Formation of Mature Isolated Lymphoid Follicles. *J. Immunol.* 174, 5720–5728.

McGranahan, N., Furness, A.J.S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., et al. (2016). Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune

checkpoint blockade. *Science* 351, 1463–1469.

Mehdipour, F., Razmkhah, M., Hosseini, A., Bagheri, M., Safaei, A., Talei, A.-R., and Ghaderi, A. (2015). Increased B regulatory phenotype in non-metastatic lymph nodes of node positive breast cancer patients. *Scand. J. Immunol.* n/a-n/a.

Melzer, N., Golombeck, K.S., Gross, C.C., Meuth, S.G., and Wiendl, H. (2012). Cytotoxic CD8+ T cells and CD138+ plasma cells prevail in cerebrospinal fluid in non-paraneoplastic cerebellar ataxia with contactin-associated protein-2 antibodies. *J. Neuroinflammation* 9, 160.

Meshcheryakova, A., Tamandl, D., Bajna, E., Stift, J., Mittlboeck, M., Svoboda, M., Heiden, D., Stremitzer, S., Jensen-Jarolim, E., Grünberger, T., et al. (2014). B cells and ectopic follicular structures: novel players in anti-tumor programming with prognostic power for patients with metastatic colorectal cancer. *PLoS One* 9, e99008.

Messina, J.L., Fenstermacher, D.A., Eschrich, S., Qu, X., Berglund, A.E., Lloyd, M.C., Schell, M.J., Sondak, V.K., Weber, J.S., and Mulé, J.J. (2012). 12-Chemokine Gene Signature Identifies Lymph Node-like Structures in Melanoma: Potential for Patient Selection for Immunotherapy? *Sci. Rep.* 2, 765.

Metlay, J., Puré, E., and Steinman, R. (1989). Distinct features of dendritic cells and anti-Ig activated B cells as stimulators of the primary mixed leukocyte reaction. *J. Exp. Med.* 169, 239–254.

Miligy, I., Mohan, P., Gaber, A., Aleskandarany, M.A., Nolan, C.C., Diez-Rodriguez, M., Mukherjee, A., Chapman, C., Ellis, I.O., Green, A.R., et al. (2017). Prognostic significance of tumour infiltrating B lymphocytes in breast ductal carcinoma in situ. *Histopathology* 71, 258–268.

Milne, K., Köbel, M., Kalloger, S.E., Barnes, R.O., Gao, D., Gilks, C.B., Watson, P.H., and Nelson, B.H. (2009). Systematic Analysis of Immune Infiltrates in High-Grade Serous Ovarian Cancer Reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as Positive Prognostic Factors. *PLoS ONE* 4.

Minnich, M., Tagoh, H., Bönel, P., Axelsson, E., Fischer, M., Cebolla, B., Tarakhovsky, A., Nutt, S.L., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2016). Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* 17, 331–343.

Miyasato, Y., Shiota, T., Ohnishi, K., Pan, C., Yano, H., Horlad, H., Yamamoto, Y., Yamamoto-Ibusuki, M., Iwase, H., Takeya, M., et al. (2017). High density of CD204-positive macrophages predicts worse clinical prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Sci.* 108, 1693–1700.

Mohammed, Z.M.A., Going, J.J., Edwards, J., Elsberger, B., and McMillan, D.C. (2013). The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* 109, 1676–1684.

Monteiro, R.C., and Van De Winkel, J.G.J. (2003). IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 177–204.

Moore, G.L., Chen, H., Karki, S., and A, G. (2010).

Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs* 2, 181–189.

Murillo, O., Dubrot, J., Palazón, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Solano, S., Ochoa, M.C., Berasain, C., Gabari, I., et al. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. *Eur. J. Immunol.* 39, 2424–2436.

N

Nath, S., and Mukherjee, P. (2014). Muc1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 20, 332–342.

Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., Ohta, S., Satoh, M., Shitara, K., et al. (2008). Engineered Antibodies of IgG1/IgG3 Mixed Isotype with Enhanced Cytotoxic Activities. *Cancer Res.* 68, 3863–3872.

Nicholl, M.B., Ledgewood, C.L., Chen, X., Bai, Q., Qin, C., Cook, K.M., Herrick, E.J., Diaz-Arias, A., Moore, B.J., and Fang, Y. (2014). IL-35 promotes pancreas cancer growth through enhancement of proliferation and inhibition of apoptosis: evidence for a role as an autocrine growth factor. *Cytokine* 70, 126–133.

Nielsen, J.S., Sahota, R.A., Milne, K., Kost, S.E., Nesslinger, N.J., Watson, P.H., and Nelson, B.H. (2012). CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 3281–3292.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310, 1510–1512.

Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., and Ravetch, J.V. (2005). FcγRIV: A Novel FcR with Distinct IgG Subclass Specificity. *Immunity* 23, 41–51.

Nzula, S., Going, J.J., and Stott, D.I. (2003). Antigen-driven Clonal Proliferation, Somatic Hypermutation, and Selection of B Lymphocytes Infiltrating Human Ductal Breast Carcinomas. *Cancer Res.* 63, 3275–3280.

O

Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R.P., and Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* 71, 3505–3515.

Oner, F., Savaş, I., and Numanoğlu, N. (2004). Immunoglobulins and complement components in patients with lung cancer. *Tuberk. Ve Toraks* 52, 19–23.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor Rejection by in Vivo Administration of Anti-CD25 (Interleukin-2 Receptor α) Monoclonal Antibody. *Cancer Res.* 59, 3128–3133.

Otten, M.A., Rudolph, E., Dechant, M., Tuk, C.W., Reijmers, R.M., Beelen, R.H.J., Winkel, J.G.J. van de, and Egmond, M. van (2005). Immature Neutrophils Mediate

Tumor Cell Killing via IgA but Not IgG Fc Receptors. *J. Immunol.* **174**, 5472–5480.

Otten, M.A., Groenveld, I., van de Winkel, J.G.J., and van Egmond, M. (2006). Inefficient antigen presentation via the IgA Fc receptor (FcαRI) on dendritic cells. *Immunobiology* **211**, 503–510.

P

Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5944–5951.

Palomares, O., Martín-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2014). Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-β. *Genes Immun.* **15**, 511–520.

Pascal, V., Laffleur, B., Debin, A., Cuvillier, A., van Egmond, M., Drocourt, D., Imbertie, L., Pangault, C., Tarte, K., Tiraby, G., et al. (2012). Anti-CD20 IgA can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells. *Haematologica* **97**, 1686–1694.

Pasquier, B., Lepelletier, Y., Baude, C., Hermine, O., and Monteiro, R.C. (2004). Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1134–1141.

Pasquier, B., Launay, P., Kanamaru, Y., Moura, I.C., Pfirsch, S., Ruffié, C., Hénin, D., Benhamou, M., Pretolani, M., Blank, U., et al. (2005). Identification of FcαRI as an Inhibitory Receptor that Controls Inflammation: Dual Role of FcRγ ITAM. *Immunity* **22**, 31–42.

Pekáriková, A., Sánchez, D., Palová-Jelínková, L., Simsová, M., Benes, Z., Hoffmanová, I., Drastich, P., Janatková, I., Mothes, T., Tlaskalová-Hogenová, H., et al. (2010). Calreticulin is a B cell molecular target in some gastrointestinal malignancies. *Clin. Exp. Immunol.* **160**, 215–222.

Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat. Immunol.* **11**, 1110–1118.

Pilette, C., Detry, B., Guisset, A., Gabriels, J., and Sibille, Y. (2010). Induction of interleukin-10 expression through FcαRI receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 486–493.

Pinto, D., Montani, E., Bolli, M., Garavaglia, G., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Jarrossay, D. (2013). A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* **121**, 4110–4114.

Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., André, P., Dieu-Nosjean, M.-C., Alifano, M., Régnard, J.-F., et al. (2011). Profound Coordinated Alterations of Intratumoral NK Cell

Phenotype and Function in Lung Carcinoma. *Cancer Res.* **71**, 5412–5422.

Pylyayeva-Gupta, Y., Das, S., Handler, J.S., Hajdu, C.H., Coffre, M., Koralov, S.B., and Bar-Sagi, D. (2016). IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discov.* **6**, 247–255.

Q

Qiao, S.-W., Kobayashi, K., Johansen, F.-E., Sollid, L.M., Andersen, J.T., Milford, E., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2008). Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9337–9342.

Qin, Z., Richter, G., Schüler, T., Ibe, S., Cao, X., and Blankenstein, T. (1998). B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat. Med.* **4**, 627–630.

Qu, P., Wang, L., and Lin, P.C. (2016). Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **380**, 253–256.

R

Racila, E., Link, B.K., Weng, W.-K., Witzig, T.E., Ansell, S., Maurer, M., Huang, J., Dahle, C., Halwani, A., Levy, R., et al. (2008). A Polymorphism in the Complement Component C1qA Correlates with Prolonged Response Following Rituximab Therapy of Follicular Lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 6697–6703.

Rangaswamy, U.S., and Speck, S.H. (2014). Murine Gammaherpesvirus M2 Protein Induction of IRF4 via the NFAT Pathway Leads to IL-10 Expression in B Cells. *PLoS Pathog.* **10**.

Rangel-Moreno, J., Carragher, D.M., Garcia-Hernandez, M. de la L., Hwang, J.Y., Kusser, K., Hartson, L., Kolls, J.K., Khader, S.A., and Randall, T.D. (2011). The development of inducible Bronchus Associated Lymphoid Tissue (iBALT) is dependent on IL-17. *Nat. Immunol.* **12**, 639–646.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (1999). Fcγ Receptor-mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. *J. Exp. Med.* **189**, 371–380.

Reichardt, P., Dornbach, B., Rong, S., Beissert, S., Gueler, F., Loser, K., and Gunzer, M. (2007). Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* **110**, 1519–1529.

Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A., et al. (2013). Characteristics and Clinical Impacts of the Immune Environments in Colorectal and Renal Cell Carcinoma Lung Metastases: Influence of Tumor Origin. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4079–4091.

Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N. (2009). A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 1535–1544.

- Ribas, A., Camacho, L.H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanhagui, C.A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J.M., Seja, E., Parker, C.A., et al. (2005). Antitumor Activity in Melanoma and Anti-Self Responses in a Phase I Trial With the Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody CP-675,206. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8968–8977.
- Richards, E.R., Devine, P.L., Quin, R.J., Darrell Fontenot, J., Ward, B.G., and McGuckin, M.A. (1998). Antibodies reactive with the protein core of MUC1 mucin are present in ovarian cancer patients and healthy women. *Cancer Immunol. Immunother.* **46**, 245–252.
- Robson, N.C., Donachie, A.M., and Mowat, A.M. (2008). Simultaneous presentation and cross-presentation of immune-stimulating complex-associated cognate antigen by antigen-specific B cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1238–1246.
- Rochereau, N., Drocourt, D., Perouzel, E., Pavot, V., Redelinguys, P., Brown, G.D., Tiraby, G., Roblin, X., Verrier, B., Genin, C., et al. (2013). Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells. *PLoS Biol* **11**, e1001658.
- Rojas, I., Graus, F., Keime-Guibert, F., Rene, R., Delattre, J.Y., Ramon, J.M., Dalmau, J., and Posner, J.B. (2000). Long-term clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *Neurology* **55**, 713–715.
- Rosenblum, M.K. (1993). Paraneoplasia and Autoimmunologic Injury of the Nervous System: The Anti-Hu Syndrome. *Brain Pathol.* **3**, 199–212.
- Rossetti, R.A.M., Lorenzi, N.P.C., Yokochi, K., Rosa, M.B.S. de F., Benevides, L., Margarido, P.F.R., Baracat, E.C., Carvalho, J.P., Villa, L.L., and Lepique, A.P. (2018). B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses. *PLoS One* **13**, e0199034.
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C.M.T., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E.S., Rugo, H.S., and Coussens, L.M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* **26**, 623–637.
- S**
- Sahin, U., Türeci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11810–11813.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., et al. (2005). Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18538–18543.
- Scarlett, U.K., Rutkowski, M.R., Rauwerdink, A.M., Fields, J., Escovar-Fadul, X., Baird, J., Cubillos-Ruiz, J.R., Jacobs, A.C., Gonzalez, J.L., Weaver, J., et al. (2012). Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J. Exp. Med.* **209**, 495–506.
- Scheper, W., Kelderman, S., Fanchi, L.F., Linnemann, C., Bendle, G., Rooij, M.A.J. de, Hirt, C., Mezzadra, R., Slagter, M., Dijkstra, K., et al. (2019). Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat. Med.* **25**, 89.
- Schmidt, M., Hellwig, B., Hammad, S., Othman, A., Lohr, M., Chen, Z., Boehm, D., Gebhard, S., Petry, I., Lebrecht, A., et al. (2012). A Comprehensive Analysis of Human Gene Expression Profiles Identifies Stromal Immunoglobulin κ C as a Compatible Prognostic Marker in Human Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2695–2703.
- Schneider-Merck, T., Bueren, J.J.L. van, Berger, S., Rossen, K., Berkel, P.H.C. van, Derer, S., Beyer, T., Lohse, S., Bleeker, W.K., Peipp, M., et al. (2010). Human IgG2 Antibodies against Epidermal Growth Factor Receptor Effectively Trigger Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity but, in Contrast to IgG1, Only by Cells of Myeloid Lineage. *J. Immunol.* **184**, 512–520.
- Schrama, D., Straten, P., Thor, Fischer, W.H., McLellan, A.D., Bröcker, E.-B., Reisfeld, R.A., and Becker, J.C. (2001). Targeting of Lymphotoxin-α to the Tumor Elicits an Efficient Immune Response Associated with Induction of Peripheral Lymphoid-like Tissue. *Immunity* **14**, 111–121.
- Schreiber, R.D., Celada, A., and Buchmeier, N. (1986). The role of interferon-gamma in the induction of activated macrophages. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* **137C**, 203–206.
- Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69–74.
- Schuurhuis, D.H., Ioan-Facsinay, A., Nagelkerken, B., Schip, J.J. van, Sedlik, C., Melief, C.J.M., Verbeek, J.S., and Ossendorp, F. (2002). Antigen-Antibody Immune Complexes Empower Dendritic Cells to Efficiently Prime Specific CD8⁺ CTL Responses In Vivo. *J. Immunol.* **168**, 2240–2246.
- Schuurhuis, D.H., Montfoort, N. van, Ioan-Facsinay, A., Jiawan, R., Camps, M., Nouta, J., Melief, C.J.M., Verbeek, J.S., and Ossendorp, F. (2006). Immune Complex-Loaded Dendritic Cells Are Superior to Soluble Immune Complexes as Antitumor Vaccine. *J. Immunol.* **176**, 4573–4580.
- Sensel, M.G., Kane, L.M., and Morrison, S.L. (1997). Amino acid differences in the n-terminus of CH2 influence the relative abilities of IgG2 AND IgG3 to activate complement. *Mol. Immunol.* **34**, 1019–1029.
- Shah, S., Divekar, A.A., Hilchey, S.P., Cho, H.-M., Newman, C.L., Shin, S.-U., Nechustan, H., Challita-Eid, P.M., Segal, B.M., Yi, K.H., et al. (2005). Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **117**, 574–586.
- Shalapour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., Willmsky, G., Ammirante, M., Strasner, A., Hansel, D.E., et al. (2015).

Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature* 521, 94–98.

Shalapour, S., Lin, X.-J., Bastian, I.N., Brain, J., Burt, A.D., Aksenov, A.A., Vrbanc, A.F., Li, W., Perkins, A., Matsutani, T., et al. (2017). Inflammation-induced IgA⁺ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature* 551, 340.

Shaw, G.M., Levy, P.C., and Lobuglio, A.F. (1978). Human Monocyte Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity to Tumor Cells. *J. Clin. Invest.* 62, 1172–1180.

Shen, P., and Fillatreau, S. (2015). Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 441–451.

Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366–370.

Shenouda, M.M., Gillgrass, A., Nham, T., Hogg, R., Lee, A.J., Chew, M.V., Shafaei, M., Aarts, C., Lee, D.A., Hassell, J., et al. (2017). Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours. *Breast Cancer Res. BCR* 19.

Shi, J.-Y., Gao, Q., Wang, Z.-C., Zhou, J., Wang, X.-Y., Min, Z.-H., Shi, Y.-H., Shi, G.-M., Ding, Z.-B., Ke, A.-W., et al. (2013). Margin-infiltrating CD20(+) B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 5994–6005.

Shi, Y., Fan, X., Deng, H., Brezski, R.J., Ryczyn, M., Jordan, R.E., Strohl, W.R., Zou, Q., Zhang, N., and An, Z. (2015). Trastuzumab Triggers Phagocytic Killing of High HER2 Cancer Cells In Vitro and In Vivo by Interaction with Fcγ Receptors on Macrophages. *J. Immunol.* 194, 4379–4386.

Shimabukuro-Vornhagen, A., Schlößer, H.A., Gryschok, L., Malcher, J., Wennhold, K., Garcia-Marquez, M., Herbold, T., Neuhaus, L.S., Becker, H.J., Fiedler, A., et al. (2014). Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* 5, 4651–4664.

Simitsek, P., Campbell, David, Lanzavecchia, A., Fairweather, N., and Watts, C. (1995). Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J. Exp. Med.* 181, 1957–1963.

Simon, Q., Pers, J.-O., Cornec, D., Le Pottier, L., Mageed, R.A., and Hillion, S. (2016). In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1577–1584.e10.

Simoni, Y., Becht, E., Fehlings, M., Loh, C.Y., Koo, S.-L., Teng, K.W.W., Yeong, J.P.S., Nahar, R., Zhang, T., Kared, H., et al. (2018). Bystander CD8 + T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates.

Nature 557, 575.

Sjöberg, E., Frödin, M., Lövrot, J., Mezheyeuski, A., Johansson, M., Harmenberg, U., Egevad, L., Sandström, P., and Östman, A. (2018). A minority-group of renal cell cancer patients with high infiltration of CD20+B-cells is associated with poor prognosis. *Br. J. Cancer* 119, 840.

Somasundaram, R., Zhang, G., Fukunaga-Kalabis, M., Perego, M., Krepler, C., Xu, X., Wagner, C., Hristova, D., Zhang, J., Tian, T., et al. (2017). Tumor-associated B-cells induce tumor heterogeneity and therapy resistance. *Nat. Commun.* 8.

Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M., Kronqvist, P., Sandholm, J., Mönkkönen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Laittia, S., Tynnen, O., Joensuu, H., et al. (2015). Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res. BCR* 17, 101.

van der Steen, L., Tuk, C.W., Bakema, J.E., Kooij, G., Reijerkerk, A., Vidarsson, G., Bouma, G., Kraal, G., de Vries, H.E., Beelen, R.H.J., et al. (2009). Immunoglobulin A: Fc(α)RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4. *Gastroenterology* 137, 2018–2029.e1–3.

Stockinger, B., Zal, T., Zal, A., and Gray, D. (1996). B cells solicit their own help from T cells. *J. Exp. Med.* 183, 891–899.

Storstein, A., Krossnes, B.K., and Vedeler, C.A. (2009). Morphological and immunohistochemical characterization of paraneoplastic cerebellar degeneration associated with Yo antibodies. *Acta Neurol. Scand.* 120, 64–67.

Švajger, U., Obermajer, N., Anderlüh, M., Kos, J., and Jeras, M. (2011). DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. *J. Leukoc. Biol.* 89, 893–905.

Syrjänen, S., Happonen, R.P., Virolainen, E., Siivonen, L., and Syrjänen, K. (1987). Detection of human papillomavirus (HPV) structural antigens and DNA types in inverted papillomas and squamous cell carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 104, 334–341.

T

Takechi, Y., Hara, I., Naftzger, C., Xu, Y., and Houghton, A.N. (1996). A melanosomal membrane protein is a cell surface target for melanoma therapy. *Clin. Cancer Res.* 2, 1837–1842.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* 7, 94–100.

Takeda, K., Nakayama, M., Hayakawa, Y., Kojima, Y., Ikeda, H., Imai, N., Ogasawara, K., Okumura, K., Thomas, D.M., and Smyth, M.J. (2017). IFN-γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nat. Commun.* 8.

- Tan, H.T., Low, J., Lim, S.G., and Chung, M.C.M. (2009). Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J.* 276, 6880–6904.
- Tanaka, K., Tanaka, M., Igarashi, S., Onodera, O., Miyatake, T., and Tsuji, S. (1995). Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody: 2. Passive transfer of murine mononuclear cells activated with recombinant Yo protein to paraneoplastic cerebellar degeneration lymphocytes in severe combined immunodeficiency mice. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 97, 101–105.
- Tang, H., Wang, Y., Chlewicki, L.K., Zhang, Y., Guo, J., Liang, W., Wang, J., Wang, X., and Fu, Y.-X. (2016). Facilitating T Cell Infiltration in Tumor Microenvironment Overcomes Resistance to PD-L1 Blockade. *Cancer Cell* 30, 500.
- Tao, H., Lu, L., Xia, Y., Dai, F., Wang, Y., Bao, Y., Lundy, S.K., Ito, F., Pan, Q., Zhang, X., et al. (2015). Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. *Eur. J. Immunol.* 45, 999–1009.
- Tariq, M., Zhang, J., Liang, G., Ding, L., He, Q., and Yang, B. (2017). Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer. *J. Cell. Biochem.* 118, 2484–2501.
- Tellier, J., Shi, W., Minnich, M., Liao, Y., Crawford, S., Smyth, G.K., Kallies, A., Busslinger, M., and Nutt, S.L. (2016). Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* 17, 323–330.
- Thomas, D.A., and Massagué, J. (2005). TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369–380.
- Thorsson, V., Gibbs, D.L., Brown, S.D., Wolf, D., Bortone, D.S., Yang, T.-H.O., Porta-Pardo, E., Gao, G.F., Plaisier, C.L., Eddy, J.A., et al. (2018). The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* 48, 812–830.e14.
- Thura, M., Al-Aidaros, A.Q.O., Yong, W.P., Kono, K., Gupta, A., Lin, Y.B., Mimura, K., Thiery, J.P., Goh, B.C., Tan, P., et al. PRL3-zumab, a first-in-class humanized antibody for cancer therapy. *JCI Insight* 1.
- Thurner, B., Haendle, I., Röder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., et al. (1999). Vaccination with Mage-3a1 Peptide-Pulsed Mature, Monocyte-Derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advanced Stage IV Melanoma. *J. Exp. Med.* 190, 1669–1678.
- Tomaras, G.D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.-X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X., et al. (2013). Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9019–9024.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443–2454.
- Topham, D.J., Tripp, R.A., Hamilton-Easton, A.M., Sarawar, S.R., and Doherty, P.C. (1996). Quantitative analysis of the influenza virus-specific CD4+ T cell memory in the absence of B cells and Ig. *J. Immunol.* 157, 2947–2952.
- Townsend, S.E., and Allison, J.P. (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259, 368–370.
- Treffers, L.W., Zhao, X.W., Heijden, J. van der, Nagelkerke, S.Q., Rees, D.J. van, Gonzalez, P., Geissler, J., Verkuiljen, P., Houdt, M. van, Boer, M. de, et al. (2018). Genetic variation of human neutrophil Fc γ receptors and SIRP α in antibody-dependent cellular cytotoxicity towards cancer cells. *Eur. J. Immunol.* 48, 344–354.
- Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J.M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568–571.
- V**
- Valgardsdottir, R., Cattaneo, I., Klein, C., Introna, M., Figliuzzi, M., and Golay, J. (2017). Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B cells opsonized with anti-CD20 antibodies. *Blood* 129, 2636–2644.
- Venkatraman, A., and Opal, P. (2016). Paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibodies - a review. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 655–663.
- Vercelli, D., and Geha, R.S. (1992). Regulation of isotype switching. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 794–797.
- Verschuuren, J., Chuang, L., Rosenblum, M.K., Lieberman, F., Pryor, A., Posner, J.B., and Dalmau, J. (1996). Inflammatory infiltrates and complete absence of Purkinje cells in anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 91, 519–525.
- de Visser, K.E., Korets, L.V., and Coussens, L.M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7, 411–423.
- Vlahakos, D., Foster, M.H., Ucci, A.A., Barrett, K.J., Datta, S.K., and Madaio, M.P. (1992). Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2, 1345–1354.
- Voltz, R., Dalmau, J., Posner, J.B., and Rosenfeld, M.R. (1998). T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology* 51, 1146–1150.
- W**
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27, 5932–5943.
- Wang, K., Gong, H., Chai, R., Yuan, H., Chen, Y., and Liu, J. (2018a). Aberrant frequency of IL-35 producing B cells in

colorectal cancer patients. *Cytokine* 102, 206–210.

Wang, K., Liu, J., and Li, J. (2018b). IL-35-producing B cells in gastric cancer patients. *Medicine (Baltimore)* 97.

Wang, Y., Ylera, F., Boston, M., Kang, S.-G., Kutok, J.L., Klein-Szanto, A.J.P., and Junghans, R.P. (2007). Focused antibody response in plasma cell-infiltrated non-medullary (NOS) breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 104, 129–144.

Wang-Johanning, F., Liu, J., Rycaj, K., Huang, M., Tsai, K., Rosen, D.G., Chen, D.-T., Lu, D.W., Barnhart, K.F., and Johanning, G.L. (2007). Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 120, 81–90.

Wang-Johanning, F., Radvanyi, L., Rycaj, K., Plummer, J.B., Yan, P., Sastry, K.J., Piyathilake, C.J., Hunt, K.K., and Johanning, G.L. (2008). Human Endogenous Retrovirus K Triggers an Antigen-Specific Immune Response in Breast Cancer Patients. *Cancer Res.* 68, 5869–5877.

Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., and Sanz, I. (2007). A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 178, 6624–6633.

Wei, X., Jin, Y., Tian, Y., Zhang, H., Wu, J., Lu, W., and Lu, X. (2015). Regulatory B cells contribute to the impaired antitumor immunity in ovarian cancer patients. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*

Weidle, U.H., Maisel, D., Klostermann, S., Schiller, C., and Weiss, E.H. (2011). Intracellular Proteins Displayed on the Surface of Tumor Cells as Targets for Therapeutic Intervention with Antibody-related Agents. *Cancer Genomics - Proteomics* 8, 49–63.

Welinder, C., Baldetorp, B., Blixt, O., Grabau, D., and Jansson, B. (2013). Primary breast cancer tumours contain high amounts of IgA1 immunoglobulin: an immunohistochemical analysis of a possible carrier of the tumour-associated Tn antigen. *PLoS One* 8, e61749.

Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647–3654.

Wennhold, K., Weber, T.M., Klein-Gonzalez, N., Thelen, M., Garcia-Marquez, M., Chakupurakal, G., Fiedler, A., Schlösser, H.A., Fischer, R., Theurich, S., et al. (2016). CD40-activated B cells induce anti-tumor immunity in vivo. *Oncotarget* 8, 27740–27753.

Winter, S.F., Minna, J.D., Johnson, B.E., Takahashi, T., Gazdar, A.F., and Carbone, D.P. (1992). Development of Antibodies against p53 in Lung Cancer Patients Appears to Be Dependent on the Type of p53 Mutation. *Cancer Res.* 52, 4168–4174.

Wit, J. de, Souwer, Y., Jorritsma, T., Bos, H.K., Brinke, A. ten, Neefjes, J., and Ham, S.M. van (2010). Antigen-Specific B Cells Reactivate an Effective Cytotoxic T Cell

Response against Phagocytosed Salmonella through Cross-Presentation. *PLOS ONE* 5, e13016.

Wolf, H.M., Fischer, M.B., Pühringer, H., Samstag, A., Vogel, E., and Eibl, M.M. (1994). Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-6) in human monocytes. *Blood* 83, 1278–1288.

Wolf, H.M., Hauber, I., Gulle, H., Samstag, A., Fischer, M.B., Ahmad, R.U., and Eibl, M.M. (1996). Anti-inflammatory properties of human serum IgA: induction of IL-1 receptor antagonist and Fc α R (CD89)-mediated down-regulation of tumour necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6 in human monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 105, 537–543.

Wong, K.K., Li, W.A., Mooney, D.J., and Dranoff, G. (2016). Chapter Five - Advances in Therapeutic Cancer Vaccines. In *Advances in Immunology*, R.D. Schreiber, ed. (Academic Press), pp. 191–249.

Wood, W.C., Kornblith, P.L., Quindlen, E.A., and Pollock, L.A. (1979). Detection of humoral immune response to human brain tumors: specificity and reliability of microcytotoxicity assay. *Cancer* 43, 86–90.

Wu, X.-Z., Shi, X.-Y., Zhai, K., Yi, F.-S., Wang, Z., Wang, W., Pei, X.-B., Xu, L.-L., Wang, Z., and Shi, H.-Z. (2018). Activated naïve B cells promote development of malignant pleural effusion by differential regulation of TH1 and TH17 response. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 315, L443–L455.

Wu, Y.-C.B., Kipling, D., and Dunn-Walters, D.K. (2011). The Relationship between CD27 Negative and Positive B Cell Populations in Human Peripheral Blood. *Front. Immunol.* 2.

X

Xu, Y., Oomen, R., and Klein, M.H. (1994). Residue at position 331 in the IgG1 and IgG4 CH2 domains contributes to their differential ability to bind and activate complement. *J. Biol. Chem.* 269, 3469–3474.

Y

Yamaguchi, T., Fushida, S., Yamamoto, Y., Tsukada, T., Kinoshita, J., Oyama, K., Miyashita, T., Tajima, H., Ninomiya, I., Munesue, S., et al. (2016). Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* 19, 1052–1065.

Yan, J., Kloecker, G., Fleming, C., II, M.B., Hansen, R., Hu, X., Ding, C., Cai, Y., Xiang, D., Donninger, H., et al. (2014). Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncolimmunology* 3, e950163.

Yang, M., Rui, K., Wang, S., and Lu, L. (2013). Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 122–132.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2005). Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection

of late-stage tumors. *J. Exp. Med.* 201, 779–791.

Z

Zehn, D., Cohen, C.J., Reiter, Y., and Walden, P. (2006). Efficiency of peptide presentation by dendritic cells compared with other cell types: implications for cross-priming. *Int. Immunol.* 18, 1647–1654.

Zhang, A.W., McPherson, A., Milne, K., Kroeger, D.R., Hamilton, P.T., Miranda, A., Funnell, T., Little, N., Souza, C.P.E. de, Laan, S., et al. (2018a). Interfaces of Malignant and Immunologic Clonal Dynamics in Ovarian Cancer. *Cell* 173, 1755-1769.e22.

Zhang, C., Huang, H., Miao, Y., Xiong, H., and Lu, Z. (2018b). Clonal distribution and intratumour heterogeneity of the B-cell repertoire in oesophageal squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* 246, 323–330.

Zhang, Y., Eliav, Y., Shin, S., Schreiber, T.H., Podack, E.R., Tadmor, T., and Rosenblatt, J.D. (2013). B lymphocyte

inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 87–99.

Zhang, Y., Morgan, R., Chen, C., Cai, Y., Clark, E., Khan, W.N., Shin, S.-U., Cho, H.-M., Bayati, A.A., Pimentel, A., et al. (2016). Mammary Tumor Educated B cells Acquire LAP/TGF- and PD-L1 expression and Suppress Anti-Tumor Immune Response. *Int. Immunol.* dxw007.

Zhang, Y., Waterboer, T., Haddad, R.I., Miles, B.A., Wentz, A., Gross, N.D., Fakhry, C., Quon, H., Lorch, J.H., Gourin, C.G., et al. (2017). Human papillomavirus (HPV) 16 antibodies at diagnosis of HPV-related oropharyngeal cancer and antibody trajectories after treatment. *Oral Oncol.* 67, 77–82.

Annexes

BASIC AND TRANSLATIONAL—LIVER

Mouse and Human Liver Contain Immunoglobulin A–Secreting Cells Originating From Peyer's Patches and Directed Against Intestinal Antigens



Ludovic Moro-Sibilot,^{1,2,3,4,5} Pascal Blanc,^{1,2,3,4,5} Morgan Taillardet,^{1,2,3,4,5} Emilie Bardel,^{1,2,3,4,5} Coline Couillault,⁷ Gilles Boschetti,^{1,2,3,4,5} Alexandra Traverse-Glehen,⁶ Thierry Defrance,^{1,2,3,4,5} Dominique Kaiserlian,^{1,2,3,4,5,§} and Bertrand Dubois^{1,2,3,4,5,§}

¹International Center for Infectiology Research (CIRI), Lyon, France; ²Inserm U1111, Lyon, France; ³CNRS UMR5308, Lyon, France; ⁴Ecole Normale Supérieure, Lyon, France; ⁵Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; ⁶Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁷Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm U1052, CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

BACKGROUND & AIMS: The liver receives blood from the gastrointestinal tract through the portal vein, and thereby is exposed continuously to dietary antigens and commensal bacteria. Alcoholic liver disease (ALD) is associated with intestinal dysbiosis, increased intestinal permeability, release of microbes into the portal circulation, and increased serum levels and liver deposits of IgA. We characterized B-cell production of IgA in livers of mice at homeostasis, after oral immunization, in a mouse model of ALD and in human liver samples. **METHODS:** We performed studies with Balb/c and C57BL/6-Ly5.1 mice, as well as transgenic mice (quasimonoclonal, activation-induced [cytidine] deaminase–Cre–tamoxifen-dependent estrogen receptor 2 [ERT2], Blimp-1–green fluorescent protein [GFP]). C57BL/6-Ly5.1 mice were fed chronic plus binge ethanol to create a model of ALD. Some mice also were given repeated injections of FTY720, which prevents egress of IgA-secreting cells from Peyer's patches. We obtained nontumor liver tissues from patients with colorectal carcinoma undergoing surgery for liver metastases or hepatocellular carcinoma. B cells were isolated from mouse and human liver tissues and analyzed by flow cytometry and enzyme-linked ImmunoSpot (ELISpot). In wild-type and transgenic mice, we traced newly generated IgA-secreting cells at steady state and after oral immunization with 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP)-Ficoll or cholera toxin. IgA responses were also evaluated in our model of ALD. **RESULTS:** Livers of control mice contained proliferative plasmablasts that originated from Peyer's patches and produced IgAs reactive to commensal bacteria. After oral immunization with cholera toxin or a thymus-independent antigen, a substantial number of antigen-specific IgA-secreting cells was found in the liver. Mice fed ethanol had features of hepatitis and increased numbers of IgA-secreting cells in liver, compared with mice given control diets, as well as higher levels of serum IgA and IgA deposits in liver sinusoids. Injection of FTY720 during ethanol feeding reduced liver and serum levels of IgA and IgA deposits in liver and prevented liver injury. Human liver tissues contained a significant proportion of IgA-producing plasma cells that shared phenotypic and functional attributes with those from mouse liver, including reactivity to commensal bacteria. **CONCLUSIONS:** Based on studies of mice and human liver tissues, we found the liver to be a site of IgA production by B cells, derived from gut-associated lymphoid tissues. These IgAs react with commensal bacteria and oral antigens. Livers from mice with ethanol-induced injury contain

increased numbers of IgA-secreting cells and have IgA deposits in sinusoids. IgAs in the liver could mediate clearance of gut-derived antigens that arrive through portal circulation at homeostasis and protect these organs from pathogens.

Keywords: Microbiota; Humoral Response; S1PR1; Hepatic.

Because of its unique vasculature system and anatomic localization, the liver receives the majority of blood supply from the gastrointestinal tract through the portal vein, and thus faces continuous exposure to dietary antigens and bacterial components. Besides its essential metabolic functions, the liver prevents systemic dissemination of gut-derived endotoxins and also appears essential for immune tolerance to intestinal antigens,^{1–3} a role long attributed solely to gut-associated lymphoid tissues (GALT). Thus, the gut and the liver share a microenvironment prone to tolerance and theoretically also to induction of IgA response owing to the presence of IgA-prone cytokines and tolerogenic antigen-presenting cells.⁴ However, whether the liver indeed contributes to the intestinal IgA response remains unclear. Moreover, although the biology of most hepatic immune cell subsets has been amply documented, not much is known regarding liver B-cell distribution and biology.⁵

Intestinal IgAs limit bacterial translocation and systemic dissemination, neutralize pathogenic microorganisms and

[§]Authors share co-senior authorship.

Abbreviations used in this paper: AID, activation-induced (cytidine) deaminase; ALD, alcoholic liver disease; BM, bone marrow; BrdU, bromodeoxyuridine; CCR, CC family chemokine receptors; CSR, class-switch recombination; CT, cholera toxin; CXCR, CXC family chemokine receptors; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; GALT, gut-associated lymphoid tissue; LNPC, liver nonparenchymal cell; LP, lamina propria; MHC, major histocompatibility complex; mLN, mesenteric lymph node; PB, plasmablast; PBS, phosphate-buffered saline; PC, plasma cell; PP, Peyer's patch; QM, quasimonoclonal; SFC, spot-forming cell; SI LP, small intestine lamina propria; TD, T-cell dependent; TI, T-cell independent.

Most current article

© 2016 by the AGA Institute
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.014>

associated toxins, and maintain diversity of the gut commensals.⁶ Gut IgA plasma cells (PCs) originate from B cells activated in GALT in response to T-cell dependent (TD) or T-cell independent (TI) intestinal antigens. B cells massively expand in Peyer's patches (PP), undergo IgA class-switch recombination (CSR) and somatic hypermutation under the control of activation-induced (cytidine) deaminase (AID) and differentiate into plasmablasts (PBs), producing high-affinity (TD antigen) or low-affinity "natural" (TI antigen) IgA.⁷ PBs then transit to mesenteric lymph nodes (mLNs), where they further differentiate and receive signals to home to the intestinal lamina propria (LP), and to a lesser extent in spleen and bone marrow (BM), where they further mature into antibody-producing PCs.

The first link between the liver and intestinal humoral immunity was illustrated by the hepatobiliary transport of IgA, which clears free IgAs and IgA immune complexes from blood, and fuels the duodenum with functional polymeric IgAs via the bile.⁸ That a significant part of biliary IgAs might originate from liver was suggested by the presence of immunoglobulin-secreting cells in rat liver parenchyma⁹ and human biliary epithelium.¹⁰ Moreover, circulating IgAs were proposed to contribute to endotoxin clearance in the liver, mediated by Kupffer cells.¹¹ Interestingly, alcoholic liver disease (ALD), characterized by dysbiosis and increased intestinal permeability leading to abnormal bacterial translocation in portal circulation,¹² is associated with increased serum IgA levels and liver IgA deposits.¹³ However, the origin of these IgA disorders and whether IgA could participate in liver damage remains poorly understood.

In this study, we show that the liver constitutes an effector site for IgA responses because it hosts PBs/PCs originating from PP and secreting IgAs against gut commensal bacteria and orally delivered antigens. Moreover, we document in a model of ALD that accumulation of IgA PBs in the liver is linked to IgA disorders, and that liver injury is prevented by a drug blocking PP-derived IgA PB migration to the liver.

Materials and Methods

Mice

Balb/c and C57BL/6-Ly5.1 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Quasimono-clonal (QM) mice¹⁴ were kindly provided by M. Cascalho (Ann Arbor, MI). AID-Cre-ERT2 transgenic mice¹⁵ were obtained from C.A. Reynaud (Paris, France) and were crossed with ROSA26-loxP-enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Their progeny received 10 mg tamoxifen (Sigma Aldrich, St Louis, MO) orally on 2 consecutive days. Blimp-1-GFP mice¹⁶ were kindly provided by S. Nutt (Victoria, Australia). In some experiments, mice received daily intraperitoneal injections of 25 μ g FTY720 (Sigma Aldrich). Except Balb/c mice, all mice were bred under specific pathogen-free conditions in the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Ecole Normale Supérieure, Lyon, France) and were used at 10–16 weeks of age. All mouse studies were approved by the local ethics committee (CECCAPP Lyon,

registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation under no. 15) in accordance with European guidelines for animal experiments. Except when indicated, Balb/c mice were used.

Human Biological Samples

Macroscopically and histologically healthy portions of human liver were obtained from patients with colorectal carcinoma undergoing liver metastasis resection at the Centre Léon Bérard and Centre Hospitalier Lyon-Sud (Lyon, France). Non-tumoral tissue from resected liver of hepatocellular carcinoma patients was obtained from Croix-Rousse Hospital (Lyon, France). All patients provided informed consent and protocols were approved by the hospital ethics committee. Normal sera were obtained from healthy donors at the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes Auvergne.

Liver Nonparenchymal Cell Preparation

Mouse liver nonparenchymal cells (LNPCs) were obtained by mechanical dissociation using GentleMACS (Miltenyi Biotec, Paris, France) of cold PBS-perfused liver, followed by 40%/80% Percoll density gradient centrifugation (GE Healthcare, Aulnay-Sous-Bois, France). Human LNPCs were obtained from perfused liver fragments by a 30- to 40-minute enzymatic digestion with 0.1 mg/mL DNase I and 1 mg/mL collagenase IV (Worthington, Lakewood, NJ), followed by a Percoll gradient.

Oral Immunization and Antigen-Specific B Cell In Vivo Tracking

Mice were immunized orally by gavage with 5 mg NP77-AECM-FICOLL (NP-Ficoll) (Biosearch Technologies, Novato, CA) and/or 10 μ g cholera toxin (CT) (List Biological Laboratories, Campbell, CA) in NaHCO₃ 0.2 mol/L, pH 8.3. For adoptive transfer experiments, spleen cells from QM mice (Ly5.2) were stained with CellTrace Violet (Life Technologies, Carlsbad, CA) and injected intravenously (10⁷) into C57BL/6-Ly5.1 recipients just before oral immunization.

Mouse Model of Chronic Alcohol Consumption

We used the recently described chronic-binge ethanol feeding model.²⁴ Briefly, after 5 days of acclimatization to feeding tubes and the Lieber-DeCarli liquid diet (Bio-Serv, FrenchTown, NJ), C57BL/6-Ly5.1 mice were pair-fed for 10 days with either control diet or 5% ethanol-containing liquid diet. At day 10, mice received a single binge of ethanol (5 g/kg) or isocaloric dextrin-maltose and were killed 9 hours later. Serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were measured with an Abbott Architect c16000 chemistry analyzer (Rungis, France).

Analysis of IgA Coating of Fecal Bacteria by Flow Cytometry

Mouse fecal bacteria were isolated as described elsewhere²³ and were incubated for 1 hour on ice with sera, intestinal washes, or LNPC culture supernatant diluted in phosphate-buffered saline (PBS) + protease inhibitor (cOmplete protease inhibitor, Roche, Meylan, France) to reach a concentration of 1 μ g/mL of IgAs. After washings, bacteria were incubated with anti-IgA-biotin (Southern Biotech, Birmingham,

AL) followed by streptavidin-APC (BD Pharmingen, Pont de Claix, France). Alternatively, ATCC strains of *Escherichia coli* (#8739), *Enterococcus faecalis* (#29212), *Enterobacter cloacae* (#13047) and *Bacteroides vulgatus* (#8482) were incubated (2.5×10^7 bacteria) for 1 hour on ice with serial dilutions of human sera or human LNPC culture SN diluted in PBS + protease inhibitor, washed, and further incubated with anti-human IgA-FITC (Southern Biotech). Bacterial suspensions then were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), washed, and suspended in PBS containing 2.5 $\mu\text{g/mL}$ DAPI (Sigma Aldrich). Thirty thousand events were analyzed with the BD LSRII cytometer at a flow rate of 500–1500 events/s. Events that were DAPI-positive were considered as bacteria.

Statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (La Jolla, CA). An unpaired *t* test was used for experimental groups containing 10 or more points, whereas the Mann-Whitney *U* nonparametric test was preferred for experimental groups containing $4 \leq n < 10$ points. Histogram data are shown as means + SEM and results were considered statistically significant when the *P* value was less than .05.

Results

Mouse Liver Shelters a Significant Population of IgA-Secreting Cells

Flow cytometry analyses have shown that mouse LNPCs contained roughly 20% of CD19⁺CD138⁺ B cells (Figure 1A), comprising primarily B220⁺CD11b⁺ B2 cells and a minor subset of B220⁺CD11b⁺ B1 cells, normally enriched in the peritoneal cavity (Figure 1B, left panel). Liver B2 cells included a majority of follicular (CD23^{high}CD21^{low}) B cells (>80%), some transitional (CD23⁺CD21⁺) B cells, and virtually no (CD23^{low}CD21^{high}) marginal zone-type B cells (Figure 1C). Most hepatic B cells were naive IgD⁺IgM⁺ B cells, whereas less than 1% were switched IgA⁺ or IgG1⁺ B cells with a CD80⁺CD73⁺ memory phenotype¹⁹ (Figure 1B, right panel, and Supplementary Figure 1). This contrasted with PPs where 5%–10% of IgA⁺ B cells harbored a GL7⁺ germinal center phenotype (Supplementary Figure 1).

The liver also hosted a significant contingent of PCs (CD19^{low}CD138⁺), accounting for 0.6%–1.0% of LNPCs (Figure 1A), 70% of which were expressing IgA, and the remaining comprising almost equal proportions of IgG and IgM PCs (Figure 1D and E). These liver IgA PCs co-expressed surface and cytoplasmic IgA, and showed a classic plasmacytoid morphology (Figure 1F). Importantly, liver IgA⁺CD138⁺ cells did not contain much apoptotic cells (Supplementary Figure 2). Finally, although the liver IgA PC contingent was far less important in number and proportion than that of the small intestinal lamina propria (SI LP), it nevertheless contained approximately 50,000 cells on average and was quantitatively similar to the BM IgA PC pool (Figure 1F). Thus, mouse liver contains a major population of naive B cells, some memory B cells, and a significant contingent of IgA-producing cells.

Mouse Liver IgA⁺CD138⁺ Cells Are Plasmablasts and Harbor a Unique Phenotype

In mice, B-cell differentiation into PCs is driven by Blimp-1 up-regulation,^{16,20} and is characterized by loss of CD19 and B220 and acquisition of CD138²¹ and Ly6C.²² Liver IgA⁺CD138⁺ cells were CD19^{−/lo}B220^{−/lo} and, despite high expression of CD138, expressed low levels of Blimp-1 and Ly6C (Figure 2A and Supplementary Figure 3A). Their PB phenotype was indicated further by homogenous expression of the proliferation marker Ki67, contrasting with the resting status of terminally differentiated IgA PCs in SI LP and BM (Figure 2B). This proliferative potential of hepatic IgA PCs was shown further by their capacity to divide upon in vitro culture (Figure 2C). Moreover, an in vivo bromodeoxyuridine (BrdU) pulse-chase experiment showed that almost all liver IgA⁺CD138⁺ cells had incorporated BrdU within 6 days. The staining then was lost rapidly after BrdU withdrawal (Figure 2D), indicating that liver IgA PBs were recently generated and renewed rapidly.

Analysis of the intensity of cytoplasmic IgA staining of IgA⁺CD138⁺ cells, IgA spot size, and amount of IgA produced in vitro showed that although BM PCs appeared to be the most efficient IgA-producing cells, hepatic and splenic IgA-secreting cells produce more IgA on a per-cell basis than their SI LP counterpart (Figure 2E). The higher secretory capacity of liver IgA PBs is unlikely because of the use of different isolation protocols for liver and SI LP (Supplementary Figure 3C). Therefore, despite their immature phenotype, liver IgA PBs show substantial IgA secretion capacities.

In addition, although the majority of liver IgA PBs expressed the mucosal integrin $\alpha 4\beta 7$, they differed from SI LP IgA PCs by lower expression of CCR9 and lack of CCR10, similarly to splenic IgA-secreting cells (Figure 2F). Finally, analysis of major histocompatibility complexes (MHCs) and co-stimulatory/-inhibitory molecules showed subtle differences between IgA PCs from liver and SI LP, including reduced expression of MHC-II, CD80, and inducible T-cell costimulator ligand (ICOS-L) but increased levels of PD-L1 and PD-L2 by gut PC (Supplementary Figure 3D). This suggests that SI LP IgA PCs, but not liver IgA PBs, may exert immunosuppressive functions.

The Liver Is an Alternative IgA Effector Site

To decipher whether an IgA response can be initiated in the liver after mucosal immunization, mice were immunized orally with both the TD antigen CT and the TI antigen NP-Ficol, and IgA responses were assessed in various organs. After the first immunization, CT-specific IgA spot-forming cells (SFCs) appeared in the liver in numbers exceeding those in the SI LP, but were hardly detected in BM and spleen (Figure 3A, prime, and Supplementary Figure 4A). The frequency of CT-specific IgA SFC increased dramatically after the booster immunization in the SI LP, but not in the liver (Figure 3A, boost). In addition, NP-specific IgA SFCs were detected in similar frequencies in liver and SI LP, but not in spleen and BM (Figure 3B). These data indicate that

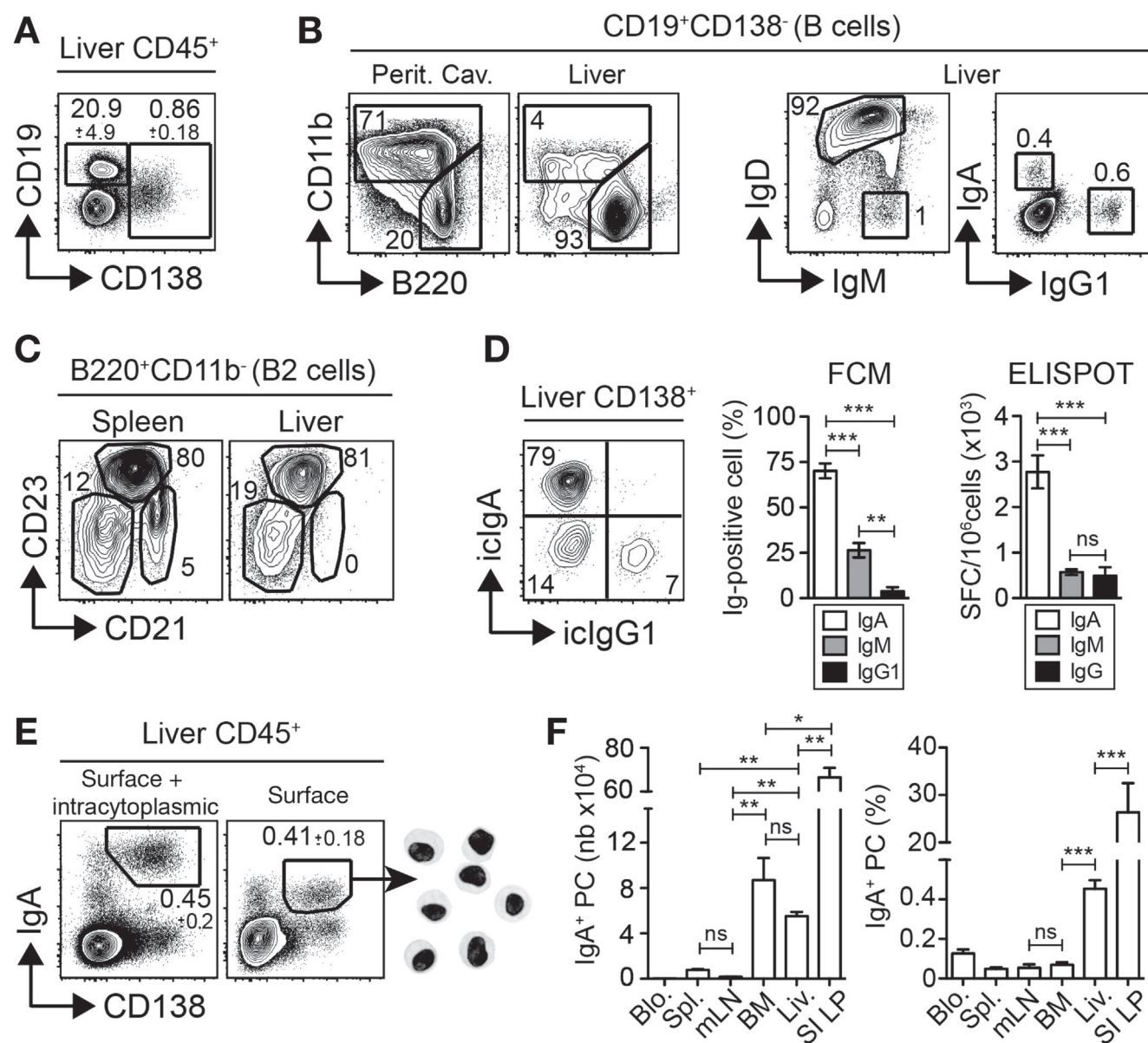


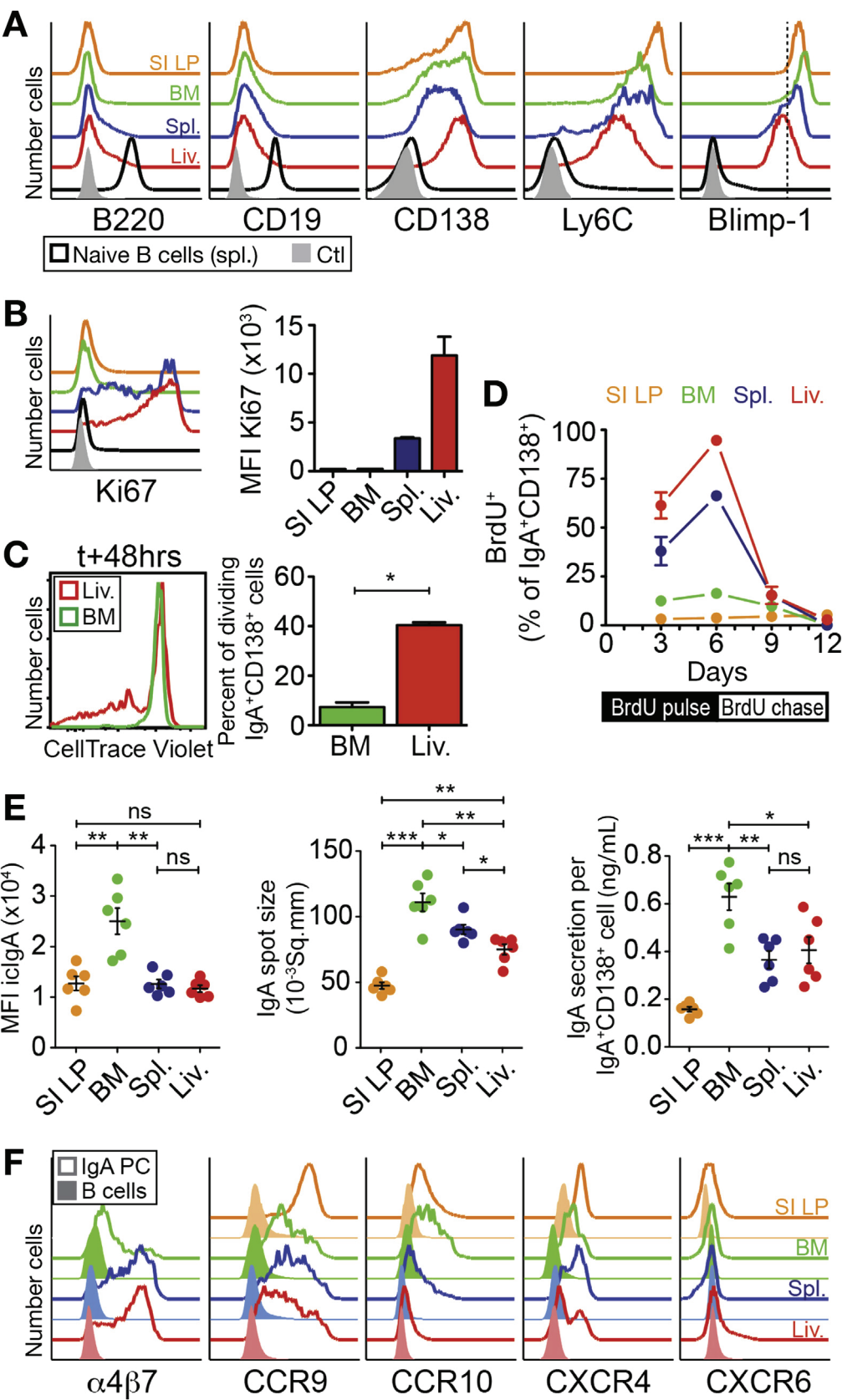
Figure 1. Mouse liver contains a significant population of naive B cells and IgA-secreting cells. (A) Identification of B cells (CD19⁺CD138⁻) and PCs (CD138⁺CD19^{low}) by FCM among CD45⁺ LNPs (n = 15, means ± SD). (B) Identification of B1 (CD11b⁺B220⁺) and B2 (CD11b⁻B220⁺) cells in B cells from the peritoneal cavity (Perit. Cav.) and liver (left panel); frequency of naive (IgM⁺IgD⁺) and isotype-switched cells in liver B cells (right panel). (C) Identification of follicular (CD21⁺CD23^{int}) and marginal zone (CD21^{low}CD23⁺) B cells in liver and spleen. (D) Frequency of IgA-, IgG-, and IgM-secreting cells determined by FCM (contour plot and left graph) among CD45⁺CD138⁺CD19^{low} LNPs and by enzyme-linked ImmunoSpot (ELISPOT) on total liver CD45⁺ cells (right graph) (n = 6). (E) Expression of intracytoplasmic IgA (icIgA) and surface IgA on CD138⁺ LNPs by FCM (left dot plots) and May-Grünwald Giemsa staining (right) of fluorescence-activated cell sorted liver sIgA⁺CD138⁺ cells. (F) Absolute number (left graph) and frequency (right graph) of IgA⁺CD138⁺ cells among CD45⁺ cells from various organs (n = 6). Bone marrow IgA PCs numbers were calculated by considering that a femur contained 12.7% of total BM CD45⁺ cells, as previously described. ns: P > .05, *P < .05, **P < .01 and ***P < .001.

the liver constitutes an IgA effector site after oral immunization with both TD and TI antigens.

To investigate whether the orally induced IgA-producing cells differentiated in situ in the liver, or derived from B cells primed elsewhere, we adoptively transferred transgenic NP-specific (QM) B cells¹⁴ into CD45.1 congenic B6 mice, and tracked their proliferation and IgA expression in various organs after oral immunization with NP-Ficoll

(Supplementary Figure 4B). At day 3 after immunization, IgA-expressing B cells, corresponding to the more divided cells, were detected only in PPs and accounted for up to 10% of QM B cells (Figure 3C), indicating that IgA CSR occurred in PPs but neither in the SI-LP nor the liver. At day 6, IgA^{int} switched B cells were still present in PPs and a minor population of highly divided IgA^{hi} B cells appeared in PPs, mLN, and liver, suggesting that CD19⁺IgA⁺ PBs

Figure 2. Characterization of mouse liver IgA⁺CD138⁺ cells. (A) Expression of B220, CD19, CD138, Ly6C, and Blimp-1 on IgA PCs (gated as shown in [Supplementary Figure 3A](#)) from SI LP (orange lines), BM (green lines), spleen (Spl.; blue lines), and liver (Liv.; red lines). Grey histograms represent staining with isotype control antibody, black histograms represent expression on splenic naive B cells (CD19⁺B220⁺IgD⁺), and dotted line shows the limit between low and high Blimp-1-GFP expression. (B) Expression of Ki67 by IgA PCs from indicated organs (n = 4). (C) Ex vivo proliferation test. LNPs and BM leukocytes were stained with CellTrace Violet and cultured for 48 hours. CellTrace Violet dilution in IgA⁺CD138⁺ cells was assessed by FCM (n = 4). (D) Kinetics of BrdU incorporation in IgA PCs in vivo (n = 4). (E) Comparison of the IgA secretion capacity of IgA PCs from various organs as measured by the MFI of intracytoplasmic IgA (icIgA) in PCs by FCM, the IgA spot size by ELISpot and IgA secretion per IgA PC by ELISA. Each point corresponds to an individual mouse and horizontal bars represent the mean. (F) FCM analysis of homing molecules on IgA PCs and B cells (CD19⁺B220⁺CD3ε⁺IgA⁺) in indicated organs. α4β7 expression could not be studied in SI LP because of its alteration by enzymes used to isolate SI LP leukocytes. Data are representative of (C–F) 2 or (A and B) more than 2 experiments. ctrl, control. ns: P > .05, *P < .05, **P < .01 and ***P < .001.



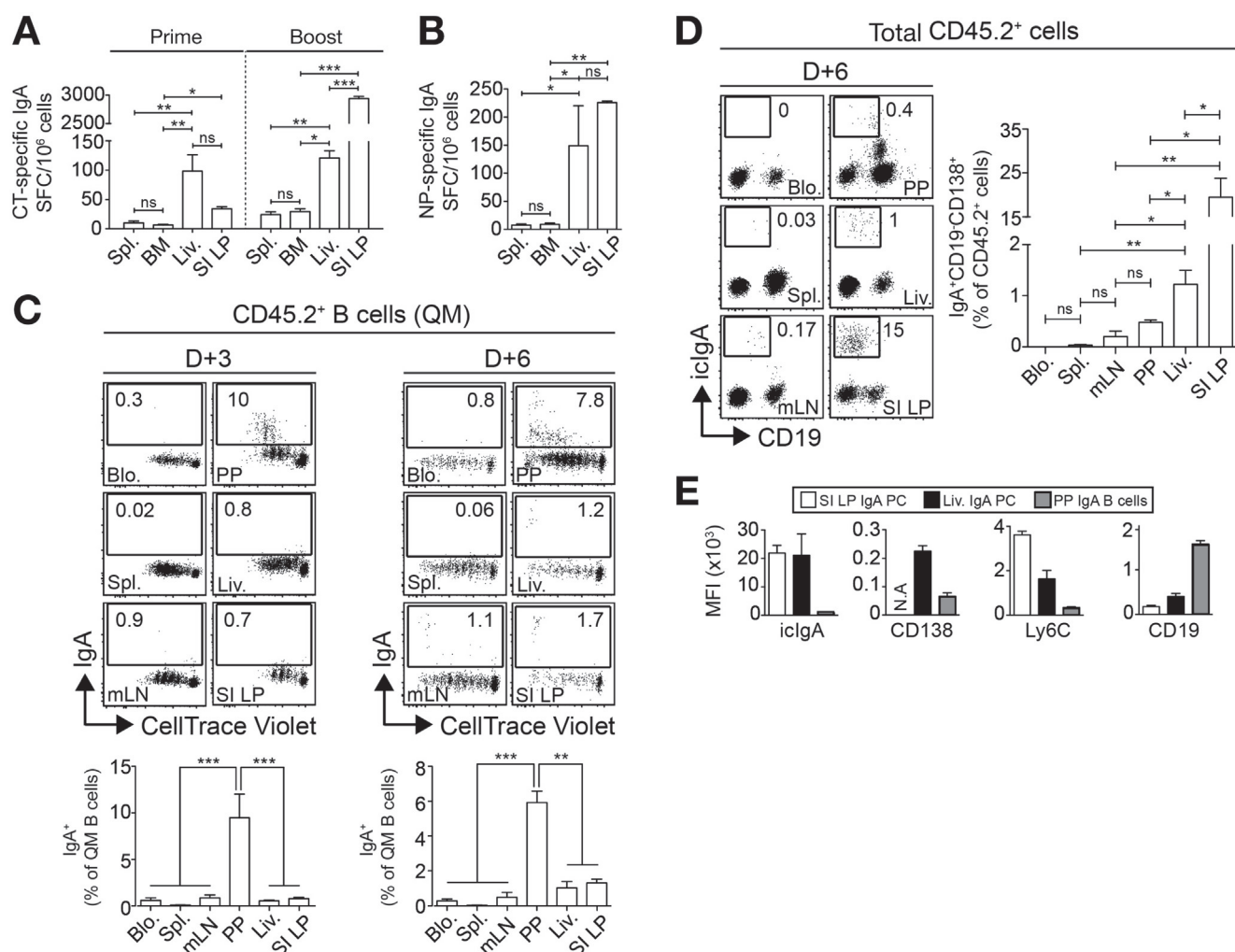


Figure 3. Liver IgA plasmablasts induced by oral immunization originate from B cells that have undergone IgA CSR in PP. (A and B) Mice were immunized orally once with NP-Ficoll or twice 14 days apart with CT. Frequencies of (A) CT-specific and (B) NP-specific IgA SFC were determined by ELISpot in the liver, SI LP, bone marrow, and spleen 1 week after each immunization ($n = 5$). (C–E) C57BL/6xLy5.1 mice were adoptively transferred with spleen QM cells stained with CellTrace Violet (CTV), and immunized orally with NP-Ficoll and CT. (C) FCM analysis of CTV dilution and surface IgA expression in donor QM B cells ($CD45.2^+CD45.1^+CD19^+$) in indicated organs 3 days (left panel) and 6 days (right panel) after oral immunization. Bottom histograms show the mean frequency of surface IgA⁺ cells in NP-specific B cells ($n = 5$). (D) Identification (dot plots) and frequencies ($n = 5$, graph) of Ag-specific IgA-producing cells (intracytoplasmic IgA [icIgA]⁺⁺CD19⁺) among donor cells ($CD45.1^+CD45.2^+$) in indicated organs 6 days after oral immunization. (E) MFI of icIgA, CD138, Ly6C, and CD19 staining on icIgA⁺CD19⁺ cells from liver, SI LP, and icIgA^{int}CD19⁺ from PPs. Data are representative of 1 of 3 experiments. ns: $P > .05$, * $P < .05$, ** $P < .01$ and *** $P < .001$.

generated in PPs can migrate to the liver. Furthermore, at day 6, NP-specific IgA PBs (icIgA⁺CD19⁺CD138⁺) were found in the SI LP as expected, but also in the liver, but not spleen (Figure 3D). The expression level of CD138, Ly6C, and CD19 confirmed that these liver icIgA⁺ cells were bona fide IgA PBs (Figure 3E). Altogether, these data indicate that after oral immunization with a TI antigen, IgA PBs generated in PPs migrate to both intestinal LP and liver.

Liver IgA Plasmablasts Derive From Recently Switched PP IgA B Cells at Steady State

To determine if liver IgA PBs also originate from PPs at steady state, AID-Cre-eYFP reporter mice¹⁵ were treated with tamoxifen to track recently switched B cells.

Twenty-four hours after tamoxifen treatment, AID-eYFP was expressed exclusively in PP IgA B cells (Figure 4A), and gradually increased with time only in PPs (Figure 4B). In contrast, AID-eYFP⁺IgA⁺ PBs were found not only in PPs but also in liver, where they accounted for up to 5% of total IgA PBs, and to a far lesser extent in SI LP and spleen. Interestingly, the kinetics of appearance of AID-eYFP⁺IgA⁺ PBs in the liver paralleled that of AID-eYFP⁺IgA⁺ B cells in PPs (Figure 4B). In addition, repeated injection of FTY720, which interferes with sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) and blocks IgA PB egress from PPs,²³ did not affect IgA⁺B220⁺ B cells in PPs but increased total IgA⁺B220⁺ PBs (Figure 4C). Furthermore, among AID-eYFP⁺IgA⁺ cells, only PBs (CD138⁺B220⁺) were increased (Figure 4C and D),

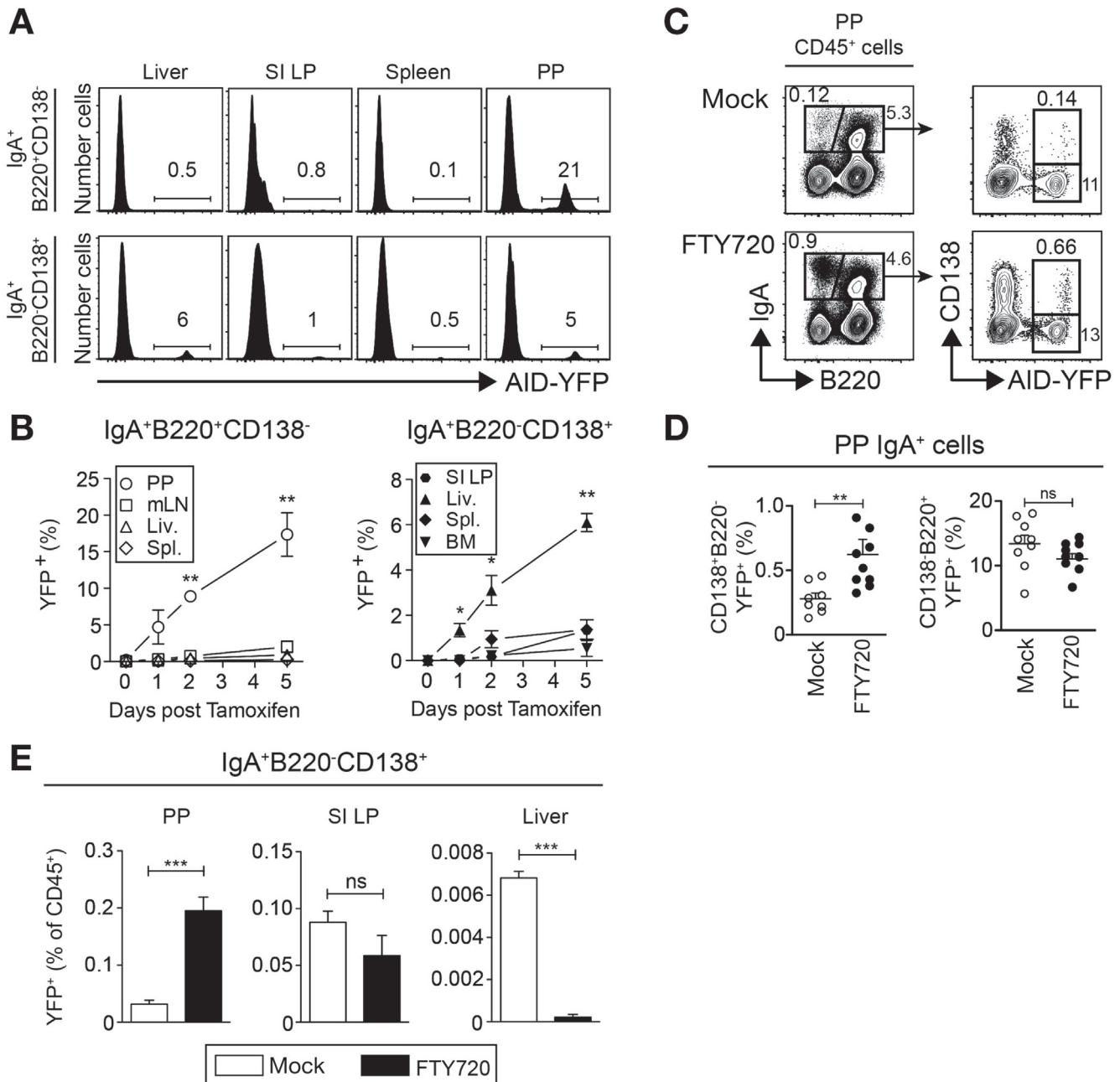


Figure 4. Liver IgA plasmablasts at steady state originate from recently switched PP B cells. (A) Representative histograms of AID-eYFP⁺ cells in gated IgA⁺ B cells (IgA⁺B220⁺CD138⁻, upper panel) and IgA-secreting cells (IgA⁺B220⁻CD138⁺, lower panel) in various organs at day 5 after tamoxifen treatment. (B) Kinetic analysis of AID-eYFP⁺ cells in IgA⁺B220⁺CD138⁻ (left graph) and IgA⁺B220⁻CD138⁺ (right graph) cells (n = 6 per group). Day 0 corresponds to controls without tamoxifen treatment. (C and D) FTY720 was administered intraperitoneally daily starting 1 day before tamoxifen treatment and AID-eYFP expression was analyzed at day 5. (C) Representative dot plots showing expression of AID-eYFP in PP surface IgA⁺B220⁺ cells according to that of CD138, allowing distinction of AID-eYFP⁺CD138⁻ B cells from AID-eYFP⁺CD138⁺ PBs. (D) Frequency of AID-eYFP⁺IgA⁺ B cells (IgA⁺B220⁺CD138⁻) and AID-eYFP⁺IgA⁺ PBs (IgA⁺B220⁻CD138⁺) among PP CD45⁺ cells in tamoxifen-treated (open symbols) vs tamoxifen+FTY720-treated (filled symbols) mice. Each symbol represents a pool of 2–3 PPs from the same mouse and horizontal bars correspond to the mean (n = 4). (E) Mean frequency (n = 4) of AID-eYFP⁺IgA⁺B220⁻CD138⁺Ly6C⁺ cells among total leukocytes in PPs, SI LP, and liver of mice treated with tamoxifen alone (white bars) or together with FTY720 (solid bars). Data are representative of 2 independent experiments. ns: P > .05, **P < .01 and ***P < .001.

confirming that FTY720 induced the retention of IgA PBs in PPs. After FTY720 treatment, virtually no AID-eYFP⁺IgA⁺ PBs were detected in the liver, whereas their SI LP

counterpart was barely affected (Figure 4E). These data show that IgA PBs differentiated in PPs constantly and rapidly seed the liver at steady state.

IgA Produced by Liver Plasmablasts Recognize Gut Commensal Bacteria

Ten percent to 30% of fecal bacteria in both mice and humans^{18,24} are coated with IgAs, showing that IgAs produced in the SI LP recognize certain commensal bacterial species. To determine whether liver IgAs show a similar reactivity, we used flow cytometry to measure IgA binding to commensal bacteria (Supplementary Figure 5A). As expected, coating by endogenous IgAs was found in approximately 30% of fecal bacteria isolated from wild-type, but not *Rag*^{-/-} mice (Figure 5A). Interestingly, IgAs from cultured LNPCs or intestinal fluid bound similarly to roughly 20% of *Rag*^{-/-} fecal bacteria, although much less could be coated by serum IgAs (Figure 5B and C). Although

the relative avidity of liver-derived IgAs for fecal bacteria, as determined by the mean fluorescence intensity (MFI), was slightly lower as compared with gut-derived IgAs, it was much higher than that of serum IgAs (Figure 5C). It is unlikely that the high level of IgGs in serum blocked binding of serum IgAs to bacteria because adding serum to intestinal washes (as a source of anticommensal IgAs) neither modified the frequency of IgA-coated bacteria nor the intensity of IgA staining (Supplementary Figure 5C). These data support that at least a fraction of IgAs produced in the liver is directed against commensal flora components.

Increase in Hepatic IgA Plasmablasts in Alcohol-Induced Hepatitis Parallels Increase of Serum IgAs and IgA Liver Deposits

We finally used a model that mimics acute-on-chronic ALD in human beings¹⁷ to investigate whether liver injury affects liver IgA PBs. Chronic-binge ethanol feeding resulted in significant body weight loss (Figure 6A), increase of hepatic transaminase levels, and development of microsteatosis (Figure 6B). Alcohol consumption induced a dramatic reduction of intestinal IgA PCs, whereas liver IgA PBs were increased by roughly 2-fold (Figure 6C and D). IgA-secreting cells were not altered significantly in PPs, spleen, and BM (Figure 6D). As described in human ALD,^{25,26} ethanol feeding resulted in an increase of serum IgA (Figure 6E) and IgA deposits in liver sinusoids (Figure 6F). Serum IgG levels were not modified (Supplementary Figure 6). Treatment of mice with FTY720 during the 10 days of pair-feeding resulted in a selective increase of IgA⁺B220^{low}CD138⁺ PBs in PPs, associated with a nearly complete disappearance of these cells from the liver (Figure 6C and D), without affecting their frequency at other sites. Importantly, FTY720 treatment prevented both the increase of serum IgA (Figure 6E) and sinusoidal IgA deposits (Figure 6F), and ameliorated the clinical (Figure 6A), macroscopic, and biological (Figure 6B) signs of the disease. Thus, ethanol-induced liver injury was associated with a selective increase of hepatic IgA PBs, likely accounting for increased circulating IgA levels and IgA deposits in liver sinusoids.

Human Liver Hosts a Significant Population of IgA Plasma Cells That Display Reactivity to Commensal Bacteria and Primarily Localizes in Portal Tracts

To determine to what extent these observations also hold true in human beings, we characterized B-cell subpopulations in normal human liver tissue from metastatic colorectal cancer patients. CD19⁺ cells accounted for 3%–4% of CD45⁺ LNPCs and contained 60%–70% of PCs (CD19⁺CD20⁺) (Figure 7A). Further phenotyping confirmed that CD19⁺CD20⁺ cells corresponded to CD24⁺CD27^{hi}CD38^{hi} PBs/PCs, and showed that CD19⁺CD20⁺ B cells contained comparable proportions of mature naive (CD27⁺CD38⁺CD24⁺IgM⁺IgD⁺) and memory B cells (CD27⁺CD38⁺CD24⁺IgM⁺IgD⁺), accounting for 16%–18%

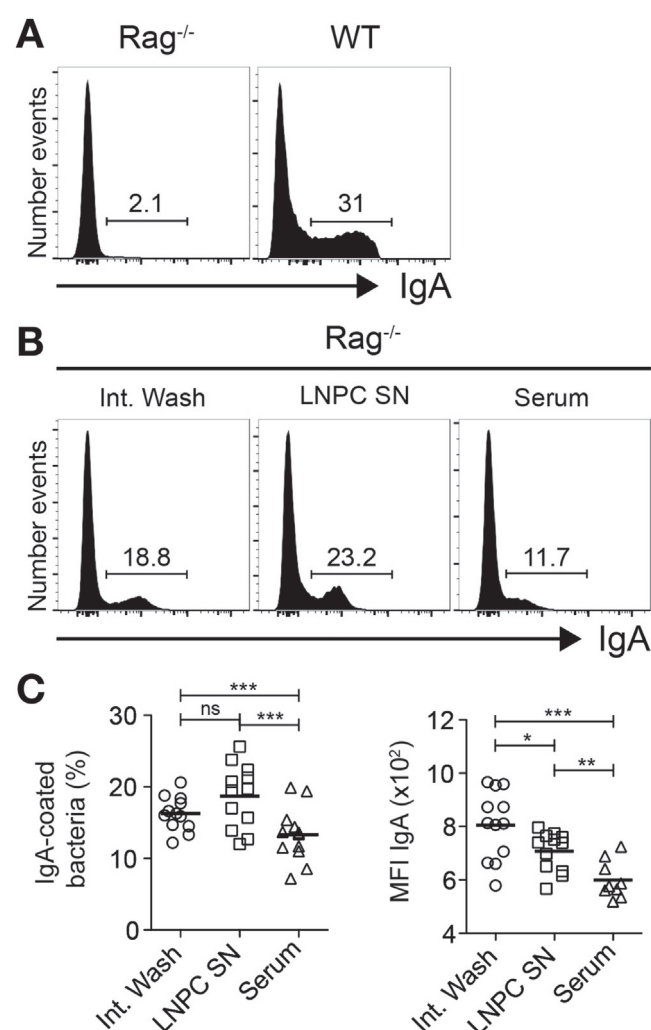


Figure 5. IgAs produced by liver plasmablasts react with commensal bacteria. (A) FCM detection of IgAs on fecal bacteria from wild-type (WT) C57BL/6 mice and *Rag*^{-/-} mice. (B) Representative histograms of IgA staining of fecal bacteria from *Rag*^{-/-} mice after incubation with intestinal fluid, serum, or liver LNPCs culture SN. (C) Proportion and MFI of IgA coating of fecal bacteria from *Rag*^{-/-} mice. Each symbol represents an individual mouse and horizontal bars correspond to the mean (pool of 4 experiments with 3 mice in each). ns: $P > .05$, * $P < .05$, ** $P < .01$ and *** $P < .001$.

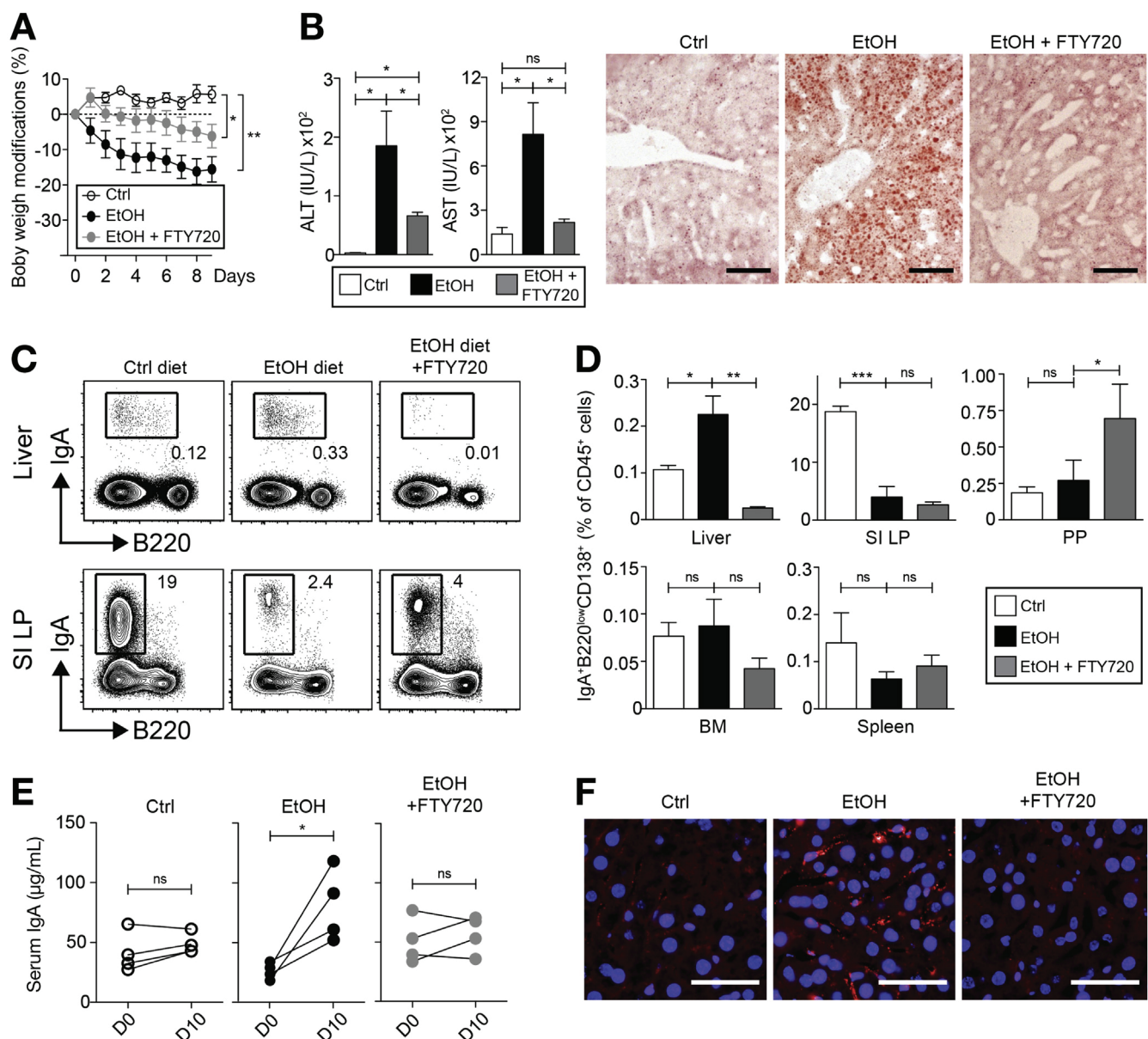


Figure 6. Alcohol-induced hepatitis is associated with an increase of serum IgAs, increased hepatic IgA plasmablasts and IgA deposits in liver sinusoids, and is prevented by FTY720 treatment. C57BL/6-Ly5.1 mice were pair-fed for 10 days with control or 5% ethanol liquid diet. A group of ethanol-treated mice also received FTY720 daily during pair-feeding. On day 10, mice received a single binge of ethanol or isocaloric dextrin-maltose and were killed 9 hours later. (A) Body weight change at various times after ethanol feeding. (B) Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels 9 hours after the ethanol binge and liver steatosis (Oil Red O staining of liver section; scale bar: 50 μ m). (C) Representative FCM dot plots of $\text{IgA}^+\text{B220}^+$ cells among CD45^+ cells in liver and SI LP and (D) mean frequency of $\text{IgA}^+\text{B220}^{\text{low}}\text{CD138}^+$ cells in various organs ($n = 4$). (E) Serum IgAs on days 0 and 10. (F) IgA (red) and DAPI (blue) staining of liver frozen sections (scale bar: 50 μ m). Data are representative of 2 independent experiments. ns: $P > .05$, * $P < .05$, ** $P < .01$ and *** $P < .001$.

of total liver B cells (Figure 7A). Liver memory B cells contained equal proportions of surface IgA- and surface IgM-expressing cells (roughly 40% each), the rest being composed of surface IgG⁺ cells (Supplementary Figure 7A). Importantly, although IgA-producing cells represented approximately 20% of PCs in tonsils, they accounted for nearly half of the total liver PC pool, with about two-thirds producing IgA1 (Figure 7B and C).

Human liver IgA PCs expressed CXCR4, $\alpha 4\beta 7$, and CCR10, but low to undetectable levels of CCR9 (Figure 7D),

indicating that they showed systemic and mucosal homing potentials as in the mouse, and no differences were observed between IgA1 and IgA2 PCs (data not shown). Interestingly, virtually no human IgA PCs expressed the proliferative Ki67 marker, whether they came from non-tumoral liver of colorectal cancer patients (Figure 7D) or hepatocellular carcinoma patients (Supplementary Figure 7A), which did or did not received prior chemotherapy, respectively. This indicates that human IgA-producing cells are mature and represent bona fide PCs.

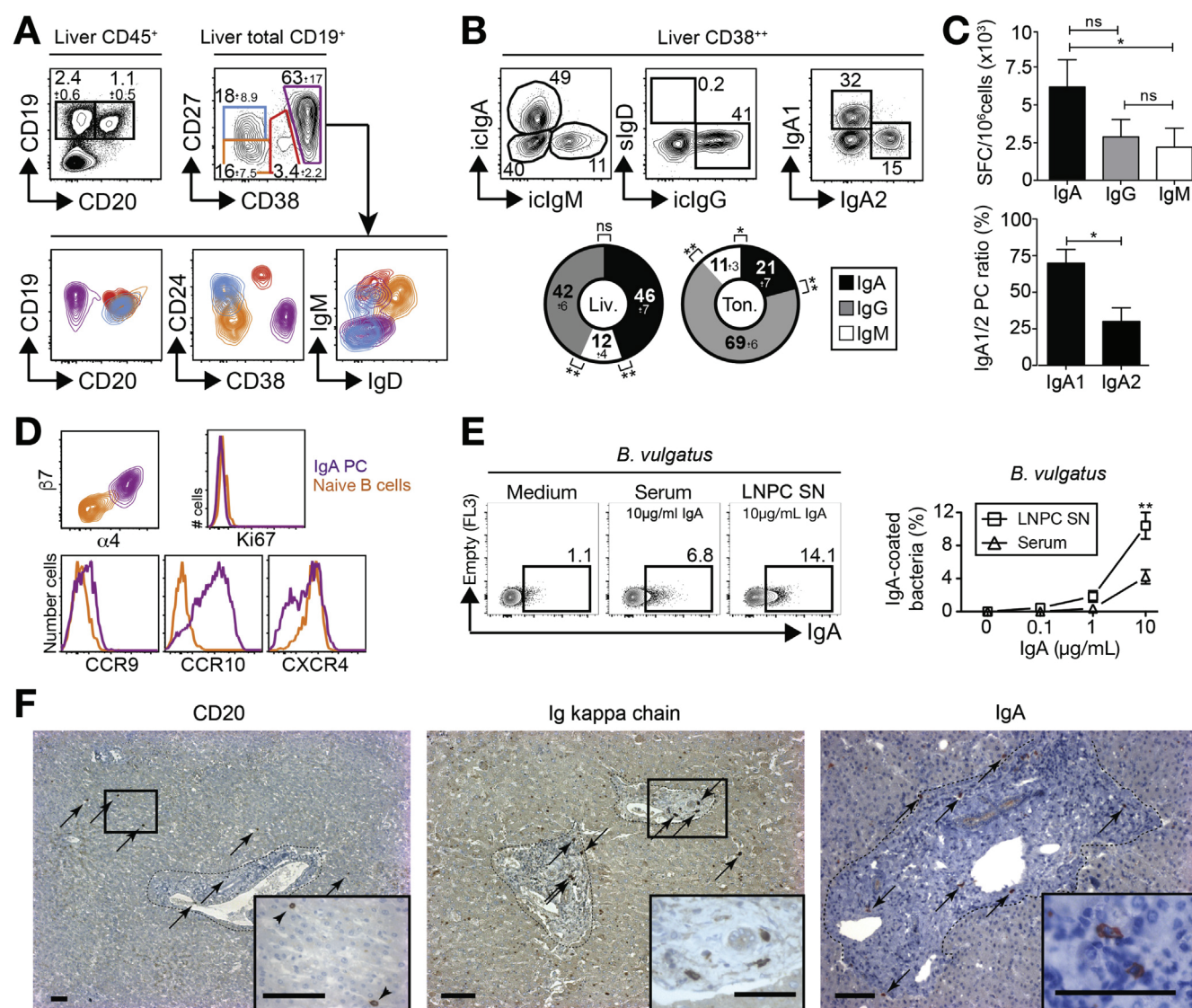


Figure 7. IgA plasma cells are enriched in human liver and localize in portal tracts. (A) FCM identification of B cells (CD19⁺CD20⁺) and PCs (CD19⁺CD20⁻) among viable CD45⁺ cells (means $\pm$ SD) from human liver (n = 12). Frequency of naive (CD27⁻CD38⁻, orange), memory (CD27^{int}CD38⁻, blue), transitional/germinal center (CD27⁻CD38⁺, red) B cells and PBs/PCs (CD27⁺CD38⁺⁺, purple) among liver B cells (CD19⁺) (means $\pm$ SD), and extensive phenotype of liver B-cell subsets (multicolor contour plots). (B) Illustrative FCM contour plots and pie charts showing the frequency of cells expressing IgM, IgD, IgG, IgA, IgA1, or IgA2 among CD19⁺CD20⁻CD27⁺⁺CD38⁺⁺ PCs in liver (n = 12) and tonsil (n = 3). (C) Fluorescent ELISpot analysis of the frequency of IgG⁺, IgA⁺, and IgM⁺-producing cells in total LNPs (left; n = 10), and the proportion of IgA1 vs IgA2 in IgA SFC (right; n = 10). (D) FCM analysis of α 4 β 7, CCR9, CCR10, CXCR4, and Ki67 expression by IgA PCs (icIgA⁺⁺CD19⁺CD20⁻CD27⁺⁺CD38⁺⁺) and naive B cells (CD19⁺CD20⁺CD24⁻IgD⁺) from human liver (n = 3). (E) FCM analysis of the capacity of IgAs from human liver and serum to bind to *Bacteroides vulgatus*. Representative contour plots and graph showing means $\pm$ SEM (n = 3). (F) CD20, Ig κ chain, and IgA staining of paraffin-embedded tissue sections of human liver. Arrows indicate positive cells and dotted lines delineate portal tracts from parenchyma (scale bars: 100 μ m). ns: $P > .05$, * $P < .05$ and ** $P < .01$.

Importantly, analysis of IgA binding against a few bacterial strains representative of the commensal flora showed that IgAs produced in the liver recognized *B. vulgatus* and *E. coli*, whereas virtually no/poor reactivity was detected for serum IgAs at similar concentrations (Figure 7E and Supplementary Figure 7C). Finally, contrary to CD20⁺ B cells that resided both near portal tracts and within the liver sinusoids, IgA PCs mostly concentrated in the connective tissue around portal tracts (Figure 7F). Altogether,

these data indicate that human liver contains naive and memory B cells, as well as a substantial fraction of IgA-producing PCs, some of which are directed against intestinal commensal bacteria.

Discussion

The concept of a gut-liver axis, which refers to the complex functional interplay between the 2 organs, was initially introduced after the description in cirrhotic patients

of increased serum IgAs directed against intestinal bacteria and food antigens,²⁷ and further supported by numerous observations in both mouse models and patients.²⁸ This functional link is based largely on the fact that important quantities of intestinal antigens permanently reach the liver via the portal vein. Our study adds a new mechanistic piece in this axis by showing that a fraction of the IgA-producing cells generated in the GALT against intestinal antigens and commensals home to the liver, which thus appears as an alternative IgA effector site.

We show that mouse liver contains at steady state an important pool of naive B cells and sparse switched memory B cells, but also features a major enrichment in IgA-producing cells as compared with most lymphoid organs, including BM. Thorough characterization of mouse liver IgA-producing cells showed a PB phenotype, characterized by a highly proliferative state, high levels of MHC II and CD80, and intermediate levels of the master PC transcription factor Blimp-1. However, these cells showed a significant IgA secretion capacity, comparable with or even higher than that of IgA PCs from the SI LP. Importantly, we identified that besides the intestinal mucosa, the liver constitutes an effector site for antigen-specific IgA responses after oral immunization with either TD or TI antigens, a finding in line with old studies proposing that the liver could constitute a site for antibody production,⁹ especially IgA.^{29,30} Coexistence of naive B cells and IgA PBs in the mouse liver raised the issue as to whether the liver constituted a potential site of B-cell activation. In the experimental conditions analyzed, it is highly unlikely that IgA CSR occurs in the liver because neither recently switched mIgA⁺ B cells nor AID transcripts (data not shown) were detectable at this site. Moreover, transgenic mouse models allowing for tracking of antigen-specific B cells after oral immunization and recently switched B cells at steady state showed that IgA CSR takes place exclusively in PPs and not in the liver. In pathologic situations such as liver autoimmunity or infection, however, it is not excluded that liver naive B cells may locally expand and differentiate into PCs in so-called lymphoid-like structures.³¹ More importantly, kinetics analysis and blocking PBs egress from PPs showed that, similarly to their intestinal counterpart, liver IgA-producing cells originate from PPs both at steady state and after oral immunization. After transit in mLN, IgA PBs originating from PPs thus follow 2 distinct pathways to either seed the gut LP or the liver, but whether this differential migration relies on a stochastic process or on the existence of gut- and liver-tropic PB subsets is questionable. Although expression of the integrin $\alpha 4\beta 7$ and the chemokine receptors CCR9 and CCR10 dictate intestinal homing of IgA PBs,³² CXCR4 promotes homing and survival of PCs to BM.³³ Liver IgA PBs lack CXCR6, involved in natural killer T cells homing to the liver,³⁴ express low levels of CXCR4 and can be distinguished from their intestinal counterparts by lower expression of CCR9, lack of CCR10, but expression of $\alpha 4\beta 7$. Because $\alpha 4\beta 7$ interaction with MadCAM-1 promotes T-cell recruitment to portal tracts,³⁵ this integrin also may condition IgA PB migration to the liver. Whether liver homing of IgA PCs solely relies on their reduced expression of CCR9

and CCR10 or additionally involves a dedicated chemokine receptor remains to be determined.

An important issue concerns the putative role of an *in situ* IgA response in the liver. We observed that specific IgA-producing cells first appeared in higher numbers in the liver than in the intestinal LP upon oral immunization with the TD antigen CT. This suggests that IgA released in the liver microenvironment or the duodenum via the bile may provide a first line of protection against infectious agents penetrating in the digestive tract. In addition, IgAs produced by liver PBs poised near the portal tracts have, similarly to intestinal IgAs, a strong reactivity with commensal bacteria, suggesting that hepatic IgA-producing cells may control liver homeostasis facing continuous encounter with microbiota-derived antigens entering the portal circulation. Indeed, lipopolysaccharide capture by liver IgAs could reduce its direct proinflammatory effects on hepatocytes and other Toll-like receptor 4-expressing liver cells, and also favor its detoxification by Kupffer cells via binding to IgA Fc fragment receptor I (Fc α RI), as shown for circulating IgAs.¹¹ Because liver IgAs appear to be more reactive to commensal components than serum IgAs, we propose that hepatic IgAs may have a prime role in endotoxin clearance from the portal circulation. These functions may be favored by direct sensing of bacterial antigens because we found that mouse and human liver IgA-secreting cells express a surface B-cell receptor, which presumably is functional as documented for BM IgA PCs,³⁶ and may enhance their survival and antibody production. Besides interacting with target antigen, liver IgAs also could contribute to immune tolerance by conditioning local dendritic cells (DCs) to exert tolerogenic functions after engaging Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin (DC-SIGN), as recently described for BM-DCs *in vitro*.³⁷

ALD is characterized by an abnormal penetration of intestinal bacterial products in portal circulation,^{12,38} which significantly contributes to hepatic inflammation and fibrosis,^{39,40} and is associated with increased serum IgA and IgA deposits in liver sinusoids.¹³ We observed similar IgA disorders in a mouse model of ALD induced by chronic plus binge ethanol feeding. Interestingly, this was correlated with a selective increase of liver IgA-producing cells. Blocking IgA PBs egress from PP using FTY720 led to complete disappearance of IgA PBs from the liver and prevented the increase in serum IgAs and liver IgA deposits, resulting in major improvement of liver injury as assessed by steatosis and serum transaminase levels. This adds to the previously documented beneficial action of FTY720 on nonalcoholic hepatitis.^{41,42} These observations indicate that the enhanced IgA production in the liver after alcohol consumption most likely is responsible for the observed IgA disorders. Whether such pathologic increase of liver IgA-producing cells plays a role in liver injury or merely results from an inoperative endotoxin clearance mechanism remains to be determined. In any case, our study suggests that FTY720 could exert beneficial effects on ALD and prevent complications, such as secondary IgA nephropathy, by blocking IgA PBs trafficking from GALT to the liver.

Importantly, a substantial contingent of IgA PCs also colonizes human liver and accounts for approximately 30% of the B-cell infiltrate. These cells were bona fide antibody-producing cells and contained roughly two thirds of IgA1 PCs and one third of IgA2 PCs, reminiscent to the IgA1/IgA2 PC ratio in the duodenum and jejunum, but different from that in the colon where IgA2 dominates.⁷ Intriguingly, hepatic B-cell subset composition varied between mice and human beings, particularly with increased numbers of antigen-experienced IgG-expressing memory B cells and PCs in human beings. This most likely reflects inherent differences of the B-cell compartments between the 2 species⁴³ and multiple exposures of human beings to pathogens and other antigenic triggers vs pathogen-free housing of mice. The presence of IgG PCs in the liver may contribute to neutralization of blood-borne antigens/pathogens. We found that human liver IgA PCs express the mucosal homing receptors $\alpha 4\beta 7$ and CCR10, similarly to IgA PCs^{44,45} in blood and mucosal tissue. Intriguingly, human liver IgA PCs are CCR9^{-/low}CCR10⁺, whereas their mouse counterparts express the reverse phenotype, indicating a subsequent homing potential to the small intestine for the latter cells vs large intestine and other mucosal tissues⁷ for human liver IgA PCs. Most importantly, liver IgA PCs in both mouse and human beings produce antibodies recognizing commensal bacterial species. These data strongly suggest that they share a similar origin, migratory pathways, and functions. It is noteworthy that mouse liver essentially hosts proliferative PBs whereas more mature resting PCs are observed in human beings. Whether this reflects different behavior of IgA PCs in human beings and mice or that human liver harbors a real PC niche allowing lower cell turnover remains to be explored. Nevertheless, because normal liver tissues came from cancer patients, a confounding effect of the disease cannot be formally excluded.

In conclusion, our study shows that the liver constitute, in both mouse and human beings, an alternative effector site for IgA responses, which may contribute to maintenance of local homeostasis and protection against infection. It also paves the way for integrating the presence of hepatic IgA PCs in the conception of novel therapeutic approaches of gastrointestinal and liver diseases associated with IgA disorders.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.014>.

References

- Knolle PA, Germann T, Treichel U, et al. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 1999;162:1401–1407.
- Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, et al. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* 2009;50:612–621.
- Goubier A, Dubois B, Gheith H, et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 2008;29:464–475.
- Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009;27:147–163.
- Zhang H, Stolz DB, Chalasani G, et al. Hepatic B cells are readily activated by Toll-like receptor-4 ligation and secrete less interleukin-10 than lymphoid tissue B cells. *Clin Exp Immunol* 2013;173:473–479.
- Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol* 2012;12:821–832.
- Brandtzaeg P, Johansen F-E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 2005;206:32–63.
- Brown WR, Kloppel TM. The role of the liver in translocation of IgA into the gastrointestinal tract. *Immunol Invest* 1989;18:269–285.
- Manning RJ, Walker PG, Carter L, et al. Studies on the origins of biliary immunoglobulins in rats. *Gastroenterology* 1984;87:173–179.
- Nagura H, Tsutsumi Y, Hasegawa H, et al. IgA plasma cells in biliary mucosa: a likely source of locally synthesized IgA in human hepatic bile. *Clin Exp Immunol* 1983;54:671–680.
- van Egmond M, van Garderen E, van Spriel AB, et al. Fc α RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med* 2000;6:680–685.
- Parlesak A, Schäfer C, Schütz T, et al. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000;32:742–747.
- van de Wiele A, Schuurman HJ, Kater L. Alcoholic liver disease: an IgA-associated disorder. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1025–1030.
- Cascalho M, Ma A, Lee S, et al. A quasi-monoclonal mouse. 1996;272:1649–1652.
- Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009;10:1292–1299.
- Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, et al. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med* 2004;200:967–977.
- Bertola A, Mathews S, Ki SH, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013;8:627–637.
- Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, et al. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin A selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 2014;41:152–165.
- Tomayko MM, Steinle NC, Anderson SM, et al. Cutting edge: hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. 2010;185:7146–7150.
- Soro PG, Morales AP, Martínez MJA, et al. Differential involvement of the transcription factor Blimp-1 in T cell-independent and -dependent B cell differentiation to plasma cells. *J Immunol* 1999;163:611–617.

21. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005;5:230–242.
22. Wrammert J, Källberg E, Agace WW, et al. Ly6C expression differentiates plasma cells from other B cell subsets in mice. *Eur J Immunol* 2002;32:97–103.
23. **Gohda M, Kunisawa J**, Miura F, et al. Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *J Immunol* 2008;180:5335–5343.
24. van der Waaij LA, Limburg PC, Mesander G, et al. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 1996;38:348–354.
25. van de Wiel A, Delacroix DL, van Hattum J, et al. Characteristics of serum IgA and liver IgA deposits in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1987;7:95–99.
26. van de Wiel A, van Hattum J, Schuurman HJ, et al. Immunoglobulin A in the diagnosis of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1988;94:457–462.
27. Volta U, Bonazzi C, Bianchi FB, et al. IgA antibodies to dietary antigens in liver cirrhosis. *Ric Clin Lab* 1987;17:235–242.
28. Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 2015;148:30–36.
29. Altorfer J, Hardesty SJ, Scott JH, et al. Specific antibody synthesis and biliary secretion by the rat liver after intestinal immunization with cholera toxin. *Gastroenterology* 1987;93:539–549.
30. Wu HY, Russell MW. Antibody-secreting cell responses in the mouse liver. *Immunology* 1992;77:443–448.
31. Murakami J, Shimizu Y, Kashii Y, et al. Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999;30:143–150.
32. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen F-E, et al. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 2008;1:11–22.
33. Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev* 2013;251:177–188.
34. **Geissmann F, Cameron TO**, Sidobre S, et al. Intravascular immune surveillance by CXCR6⁺ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol* 2005;3:e113.
35. Adams DH, Eksteen B, Curbishley SM. Immunology of the gut and liver: a love/hate relationship. *Gut* 2008;57:838–848.
36. Pinto D, Montani E, Bolli M, et al. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* 2013;121:4110–4114.
37. **Diana J, Moura IC**, Vaugier C, et al. Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *J. Immunol* 2013;191:2335–2343.
38. **Cariello R, Federico A**, Sapone A, et al. Intestinal permeability in patients with chronic liver diseases: its relationship with the aetiology and the entity of liver damage. *Dig Liver Dis* 2010;42:200–204.
39. Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, et al. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J. Endotoxin Res* 2002;8:319–327.
40. Balmer ML, Slack E, de Gottardi A, et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med* 2014;6:237ra66–237ra66.
41. Yin X-D, Jia P-J, Pang Y, et al. Protective effect of FTY720 on several markers of liver injury induced by concanavalin A in mice. *Curr Ther Res Clin Exp* 2012;73:140–149.
42. Kong Y, Wang H, Wang S, et al. FTY720, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, improves liver fibrosis in a mouse model by impairing the motility of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Inflammation* 2014;37:1326–1336.
43. Benitez A, Weldon AJ, Tatosyan L, et al. Differences in mouse and human nonmemory B cell pools 2014;192:4610–4619.
44. Kunkel EJ, Kim CH, Lazarus NH, et al. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* 2003;111:1001–1010.
45. Mei HE, Yoshida T, Sime W, et al. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* 2009;113:2461–2469.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Received July 16, 2015. Accepted April 18, 2016.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Bertrand Dubois, PhD, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, 28, Rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. e-mail: bertrand.dubois@lyon.unicancer.fr; fax: (33) 4-78-78-27-20; or Dominique Kaiserlian, PhD, Centre International de Recherche en Infectiologie, 21, Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France. e-mail: dominique.kaiserlian@inserm.fr; fax: (33) 4-37-28-23-41.

Acknowledgments

The authors thank Sébastien This, Amélie Sanlaville, Julien Gaillard, Claire Macari, Rémy Robinot, and Marion Chevandier for expert technical assistance, and Laurent Genestier and Olivier Thauat for helpful discussions and advice. The authors are grateful to Professor Michel Rivoire (Centre Régional Léon Bérard, Lyon, France) and Professor Olivier Glehen (Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Benite, France) for the provision of human liver samples, Dr Charlotte Cuercq for assistance in serum transaminase measurement, and Professor Gerard Lina and Dr Oana Dumitrescu for provision of pure bacterial strains. The authors also warmly thank Thibault Andrieu and Sébastien Dussurgey (Flow Cytometry Core Facility, SFR BioSciences Gerland UMS3444) for their technical expertise and cell sorting, and Marie Teixeira, David Gallouche, and the staff of the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris of Ecole Normale Supérieure de Lyon for maintaining and breeding mouse strains.

Present address of L.M.-S. and B.D.: Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm U1052, CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, 69008, France.

Present address of D.K.: CarMen (Centre de Recherche en Cardiologie, Métabolisme, Endocrinologie et Nutrition), Inserm U1066, Villeurbanne, France.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Funding

Supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20140930972 to L.M.-S.) and by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (to B.D.).

Chapter 5

Cancer-Associated Tertiary Lymphoid Structures, from Basic Knowledge Toward Therapeutic Target in Clinic

Bertrand Dubois, Hélène Kaplon, Coline Couillault, Christophe Caux,
and Marie-Caroline Dieu-Nosjean

Abstract The tumor growth is under the control of the immune system, and this represents a significant challenge for the development of new therapeutic strategies. It is now recognized that not only the density, but also the organization of tumor-infiltrating immune cells is critical for the shaping of the tumor microenvironment. In human cancers, several levels of structuration of lymphoid aggregates have been observed, including Tertiary Lymphoid Structures (TLS) displaying strong similarities with secondary lymphoid organs. In this review, we discuss about the role of immune cells homing selectively in the T-cell or B-cell zone of TLS with putative consequences on the initiation of efficient cellular and humoral immune responses against tumor, and ultimately on the clinical outcome of cancer patients. However, immunoregulatory cells may also infiltrate TLS and it is thus crucial to determine the circumstances in which TLS might be a site for the development of a suppressive and detrimental immune responses. We also discuss how TLS could be a useful

B. Dubois • C. Couillault
Lyon University, Lyon, France

INSERM U1052 CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,
Lyon, France

H. Kaplon • M.-C. Dieu-Nosjean (✉)
Laboratory “Cancer, Immune Control, and Escape”, INSERM UMRS1138, Cordeliers
Research Center, 15, rue de l’Ecole de Médecine, F-75270, Paris, Cedex 06, France

Sorbonne University, Pierre and Marie Curie University, UMRS1138, Paris, France

Sorbonne Paris Cité University, Paris Descartes University, UMRS1138, Paris, France
e-mail: mc.dieu-nosjean@crc.jussieu.fr

C. Caux
Lyon University, Lyon, France

INSERM U1052 CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,
Lyon, France

Centre Léon Bérard, Lyon, France

marker of efficient immunotherapy, and raise the question of the capacity of immune-based vaccinations along with immune checkpoint blockade to induce TLS neogenesis. As TLS may represent the best place to induce or amplify protective immunity targeting neoantigens, TLS may be a promising target in order to boost anti-tumoral immunity in cancer patients.

Keywords Tumor microenvironment • Tertiary lymphoid structure • Dendritic cell • T cell • Antibody • Immune checkpoint • Biomarker • Immunointervention • High endothelial venule • Neoantigen

Abbreviations

Ab	Antibody
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
Ag	Antigen
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
APC	Antigen-Presenting Cell
BCR	B-Cell Receptor
ccRCC	Clear cell Renal Cell Carcinoma
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
CRC	Colorectal Cancer
CSR	Class Switch Recombination
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DC	Dendritic Cell
FcR	Fc Receptor
FcRn	Neonatal Fc Receptor
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
GC	Germinal Center
G-VAX	GM-CSF transfected tumor cell vaccine
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HCV	Hepatitis C Virus
HEV	High Endothelial Venule
HPV	Human Papilloma Virus
ICP	Immune CheckPoint
Ig	Immunoglobulin
LN	Lymph Node
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Natural Killer cell
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer

PAP	Prostate Acid Phosphatase
PB	Plasmablast
PC	Plasma Cell
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
RCC	Renal Cell Carcinoma
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SHM	Somatic HyperMutation
SLO	Secondary Lymphoid Organ
TAA	Tumor-Associated Antigen
T _{CM}	Central-Memory T cell
TCR	T-Cell Receptor
T _{EM}	Effector-memory T cell
T _{FH}	Follicular Helper T cell
TLS	Tertiary Lymphoid Structure
T _{Reg}	Regulatory T cell

5.1 Introduction

During the evolution of animal species, the adaptive immune system has evolved from ectopic lymphoid organization with the presence of Gut-Associated Lymphoid Tissues (GALT) since lower vertebrates to a highly sophisticated system with the appearance of fully dedicated organs like lymph nodes (LN) in mammals and rare birds. Thus, many different lymphoid organizations exist in the body (i.e., spleen, LN, Peyer's patches, cryptopatches, isolated lymphoid follicles, tonsils, adenoids, tertiary lymphoid structures (TLS), and milky spots in the omentum), which differ in their anatomical localization, duration (constitutive versus transient), cellular composition, time of appearance (during embryogenesis or later on) and, as a consequence of all these characteristics, by their immune function. The role of canonical secondary lymphoid organs (SLO) in the development of antigen (Ag)-specific immunity has been extensively studied. Yet, it is now clearly established that adaptive immune responses can be induced independently of SLO [1, 2]. Thus, many efforts have been concentrated on TLS in different physiopathological disorders among which cancers. TLS are ectopic lymphoid structures that can arise in every inflamed tissue and then turn off after resorption of the inflammation. Initially described in autoimmune diseases, TLS have been reported to have a deleterious effect in autoimmunity and transplantation, whereas they have been associated with a beneficial effect in infectious diseases [3, 4].

This review will highlight recent data from the literature on tumor-associated TLS with a particular focus on their local impact on T- and B-cell immune responses and ultimately on patient's outcome. We will also discuss how TLS could represent a putative target in the next generation of immunotherapies and/or could be used as biomarkers of therapeutic efficacy of current cancer treatments.

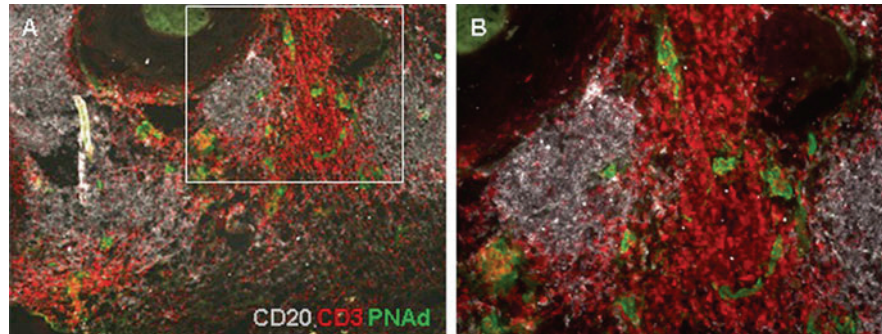


Fig. 5.1 Colocalization between TLS and HEV. Triple immunofluorescent stainings on breast cancer-associated TLS. (a) Presence of PNAAd⁺ HEV (green) within TLS segregated into two distinct areas, a CD3⁺ T-cell rich zone (red) adjacent to a CD20⁺ B-cell follicle (grey) in the tumor stroma. (b) Higher magnification of insert in (a). Original magnification: (a), $\times 10$; (b), $\times 20$

5.2 Relationship Between Tumor-Associated TLS and T Cell Infiltrate

5.2.1 From Rudimental Lymphoid Aggregates to Fully Organized TLS

Different levels of organization of infiltrating immune cells have been reported in cancer, ranging from rudimental clusters of lymphocytes, dense T and/or B cell aggregates to fully organized LN-like structures containing High Endothelial Venules (HEV) (Fig. 5.1) [5–7]. The presence of such lymphoid organizations is highly heterogeneous from one tumor to another, even if they are of the same histologic type. For instance, in infiltrated breast carcinoma, lymphocyte organization varied from simple aggregates in some tumors [8] to fully organized ectopic lymphoid structures, which exhibit strong analogy with LN [6, 9]. Using a retrospective cohort of 290 breast cancer patients, Figenschau et al. reported that TLS negative tumors were mainly estrogen and progesterone receptors positive and HER2 negative [10]. These data indicate that the tumor microenvironment along with the tumor cell itself may dictate permissiveness for TLS neogenesis. In Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), melanoma or colorectal carcinoma (CRC), most of lymphoid organizations are TLS with the selective homing of mature dendritic cells (DC), the presence of proliferating lymphocytes and reactive germinal centers (GC) [5, 11–13]. The situation is much more complex in Renal Cell Carcinoma (RCC) where mature DC can also be detected outside TLS [14]. This raises the possibility of a differential function and behavior of these antigen-presenting cells (APC) depending on their localization inside versus outside TLS.

5.2.2 Cellular Composition of the TLS T-Cell Rich Areas

As in LN, tumor-associated TLS are composed of infiltrating T and B cells, which segregate into two distinct areas, a T-cell rich zone adjacent to a B-cell follicle. The B-cell zone will be described below. Like in SLO, the T-cell zone mainly consists of T cells and, to a lesser extent, of mature DC and few B cells (Fig. 5.2) [5, 15, 16]. However, no NK cells (based on the expression of NKp46) were observed in lung tumor-associated TLS in contrast to LN [17]. Interestingly, NK cells have not been reported so far in TLS whatever the pathology concerned (other cancers, transplantation, infectious or autoimmune diseases) indicating that it is a common characteristic of TLS. As for mature DC, naïve and central-memory T cells (T_{CM}), CD62L and the CCL19/CCL21 axis are critical for the extravasation of circulating NK cells through HEV and their migration to the T-cell zone of LN. As the expression of CD62L and lymphoid chemokines have been reported in TLS of many cancers, the absence of TLS NK cells could rather be a consequence of an inappropriate expression of chemokine receptors (i.e., CCR7) by NK cells and/or the presence of distinct subsets of NK cells infiltrating the tumor compared to the canonical SLO.

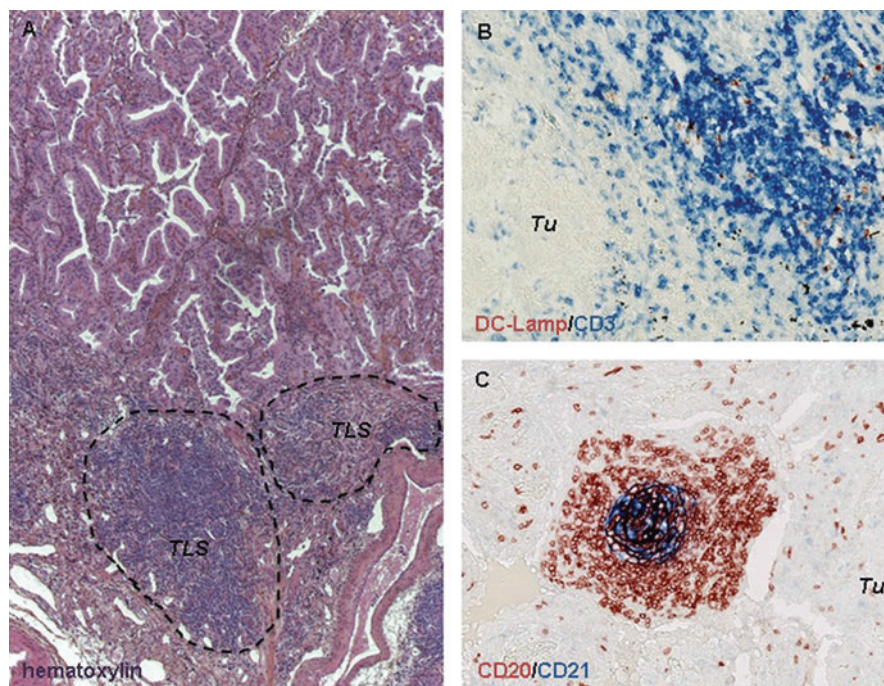
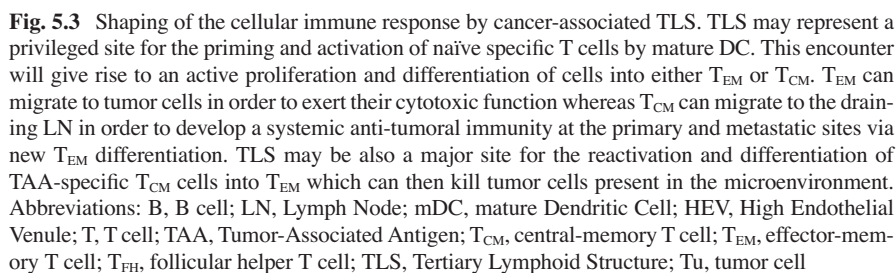


Fig. 5.2 Characterization of tumor-associated TLS. (a) Characterization of TLS (dashed line) in lung tumor section counterstained with hematoxylin. TLS are composed of a T-cell rich areas which comprised DC-Lamp⁺ mature DC (red) and CD3⁺ T cells (blue), and a CD20⁺ B cell follicle (red) characterized by the presence of a network of CD21⁺ follicular DC (blue). Original magnification: (a), $\times 200$; (b), (c), $\times 400$. Abbreviations: TLS, Tertiary Lymphoid Structure; Tu, tumor cells



190

ated with a favorable clinical outcome in cancer patients [6]. It is known that naïve and T_{CM} enter LN through HEV. In NSCLC, rare naïve T cells infiltrate the tumor but all of them home in TLS [18]. T_{CM} are also present in TLS whereas the majority of effector-memory T cells (T_{EM}) are detected in the stroma (except for TLS) and tumor nests. The selective homing of the different T cell subsets is in accordance with the expression of CCR7 by only naïve and T_{CM} , and the secretion of its two lymphoid ligands CCL19 and CCL21 in TLS. Regulatory T cells (T_{reg}) expressing CCR7 and CCR4 can migrate in response to their ligands (CCL19/CCL21 and CCL17/CCL22, respectively) produced in TLS [8, 18, 21, 22] indicating that putative suppressive mechanisms can operate in TLS (see below).

5.2.3 *Impact of Tumor-Associated TLS on the Local Immune Microenvironment*

Tumor infiltration by T cells—especially Th1, memory and cytotoxic T cells—has been correlated to a positive clinical outcome of patients in many solid cancers [23]. Nevertheless, whether the activation and differentiation of tumor-specific T cells takes place in the draining LN or in the tumor site still remains enigmatic. Thus, it is becoming critical to address this question in the context of tumor-associated TLS. One limitation for this kind of investigation is the limited relevance of currently used animal models in face of the complexity and heterogeneity of human tumors. However, some indirect responses and arguments came from human studies. In NSCLC, the presence of TLS-mature DC was strongly correlated with a specific gene signature related to Th1 polarization, T-cell activation and cytotoxic effector functions [24, 25], as well as to the density of intra-tumoral T-bet⁺ Th1 cells, some of which being in contact with tumor cells [5]. In addition, all these genes co-regulate together indicating that a coordination of the immune response occurs in tumors. By contrast, the huge density of mature DC was not associated with immune genes related to Th2 orientation, immunosuppression, inflammation, or angiogenesis. The correlation between a high expression level of cytotoxic genes and presence of TLS has also been reported in CRC and breast carcinoma [9, 21]. Thus, the presence of TLS seems to influence the shaping of the intra-tumoral immune microenvironment by inducing a bias toward a Th1 orientation, T-cell activation and cytotoxic effector functions, in at least NSCLC and CRC. This is consistent with several mouse studies demonstrating that circulating naïve CD8⁺ T cells can migrate through HEV in the tumor, and undergo activation, proliferation and differentiation into effector cells to promote tumor eradication [26], even in the absence of any SLO [27, 28]. The same demonstration has been published in infectious diseases [1] indicating that initiation of specific immunity can occur independently of canonical lymphoid organs. It is tempting to postulate that the presence of TLS mature DC may be a prerequisite for optimal processing and presentation of tumor-associated antigens (TAA)—emerging as a consequence of somatic mutations in tumor cells—and coordination of local adaptive immune response (Fig. 5.3).

Thus, TLS could play a key role in anti-tumoral immunity by allowing activation of naïve T cells and their differentiation into anti-tumor effector cells and/or reactivation of tumor-specific memory T cells at the tumor site.

In LN, many cross-talks have been reported between NK cells and other immune cells including DC and T cell subsets. Therefore, the absence of NK cells in TLS may have functional consequences on the local shaping of both innate and adaptive immune responses such as deficient IFN- γ production, incomplete T and dendritic cell activation and biased T-cell polarization towards a non-Th1 pathway. Several studies also demonstrated that tumor-infiltrating NK cells display a profound functional defect and an altered phenotype characterized by the downregulation of activation receptors and upregulation of inhibitory receptors [17]. Thus, the absence of functionally impaired NK cells in intra-tumoral TLS may favor an optimal T cell activation. It remains to be determined whether there is a causal link between the preferential localization of NK cells outside TLS and their dysfunction in situ.

In conclusion, TLS represent a privileged site for T cell recruitment, differentiation and activation in tumors, and support a key role of these lymphoid structures in the shaping of a local anti-tumor immunity.

5.2.4 Prognostic Value of Cells Homing in the TLS T Cell-Areas

During the last decade, the association between the presence of immune infiltrate and the clinical outcome of cancer patients has been extensively documented, but this is only recently that the organization of immune cells is taken into account. Indeed, the prognostic value of cancer-associated TLS has been considered through different approaches including immunohistochemistry and gene expression (Table 5.1). Whatever the strategy used, results are consistent meaning that either strategy can be used for retrospective and prospective studies depending on the biological material available.

Among the first studies, Miyagawa et al. reported that high infiltration of CD83⁺ cells, which supposedly correspond to mature DC, is associated with long-term survival of patients with colorectal liver metastasis [29] (Table 5.1). Yet, it is of note that CD83 does not solely identify mature DC but also some activated B and T cells. DC-Lamp appears as a better specific marker of human mature DC whatever the DC lineage considered (except in lung, where this molecule is also expressed by type II pneumocytes which can however be distinguished from DC by their distinct cellular morphology). Two studies showed that a high DC-Lamp⁺ mature DC density correlates with a favorable clinical outcome of patients with primary melanoma [30] or NSCLC [5], the last study achieved a complete cellular characterization of TLS. Since this pioneer work, many other publications showed that a high frequency of TLS (detection of lymphoid aggregates, mature DC, T, and B cells, and/or HEV) has a good prognostic value in primary breast, colorectal and lung

Table 5.1 Prognostic value of TLS-associated biomarkers in naïve and vaccinated cancer patients

Criteria	Cancer type	Stages of the disease	No. of patients	TLS detection by IHC	TLS detection by gene expression	Prognostic value	References
Primary tumors	Breast carcinoma	I to III	146	HEV	–	Positive	[6]
		I to III	146	mature DC	–	Positive	[113]
	CRC	I to III	794	–	T _{TH} , Th1, CXCL13	Positive	[9]
		I to IV	350	Lymphoid aggr.	–	Positive	[114]
		ND	25	mature DC	–	Positive	[31]
		I to IV	40	mature DC and T	–	Positive	[115]
		II	185	T	–	Positive	[13]
		III	166	T	–	No value	[13]
		0 to IV-A	21	–	12-chemokine genes	Positive	[21]
		I to IV	125	–	CXCL13 and CD20	Positive	[37]
		all without chemo	82	B	–	Positive	[77]
		I to III	365	–	both Th1 and B	Positive	[77]
	NSCLC	I to II	74	mature DC	–	Positive	[5]
		I to IV	362	mature DC	–	Positive	[24]
		III with neo-adj. chemo	122	mature DC	–	Positive	[11]
		III with neo-adj. chemo	122	mature DC and B	–	Positive	[11]
	Melanoma	I-A to III-A	82	mature DC	–	Positive	[30]
		IV	21	–	12-chemokine genes	Positive	[22]
	Oral SCC	all	80	B, T, GC-B, HEV, FDC	–	Positive	[116]
		all	308 + 226	Lymphoid aggr.	–	Positive	[117]
	Pancreatic cancer	all					
	RCC	all	135	mature DC	–	Positive	[14]

(continued)

Table 5.1 (continued)

Criteria	Cancer type	Stages of the disease	No. of patients	TLS detection by IHC	TLS detection by gene expression	Prognostic value	References
Metastatic tumors	CRC (lung)	ND	140	mature DC	–	Positive	[31]
	RCC (lung)	ND	51	mature DC	–	Positive	[14]
Post-vaccination	CIN + HPV16 DNA vaccine	CIN2/3	12	B, T, HEV	–	TLS neogenesis	[101]
	PDAC + G-VAX	ND	54	B, T, T _{reg} , FDC, HEV, mature DC, myeloid cells, CCL21	–	TLS neogenesis	[103]
	PDAC + G-VAX	ND	39	–	T _{reg} ^{Low} , Th17 ^{High}	Positive	[103]

Abbreviations: *chemo* chemotherapy, *CIN* cervical intraepithelial neoplasia, *CRC* ColoRectal cancer, *DC* dendritic cell, *FDC* follicular dendritic cell, *G-VAX* GM-CSF transfected tumor cell vaccine, *GC* germinal center, *HEV* high endothelial venule, *HPV* human papilloma virus, *ND* not done, *neo-adj* neo-adjuvant, *NSCLC* non-small cell lung cancer, *PDAC* pancreatic ductal adenocarcinoma, *RCC* renal cell carcinoma, *SCC* squamous cell carcinoma, *T_{reg}* follicular helper T cell, *TLS* tertiary lymphoid structure, *T_{reg}* regulatory T cell.

carcinomas, gastric cancers, melanomas as well as in metastatic CRC (Table 5.1). Despite the fact that DC-Lamp expression is considered as a hallmark of TLS in at least NSCLC, high mature DC infiltrate was unexpectedly shown to correlate with short-term survival in RCC [31]. Further analysis revealed that TLS DC-Lamp⁺ cells are associated with a favorable clinical outcome whereas non-TLS DC-Lamp⁺ cells are correlated with poor prognosis in ccRCC patients [14].

High density of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells positively influences the outcome of NSCLC patients [24, 32–34]. Interestingly, Goc et al. showed that the presence of TLS conditions the prognostic value of intra-tumoral CD8⁺ T cells [24]. Indeed, among NSCLC patients with high density of CD8⁺ T cells and overall favorable clinical outcome, those having a low density of mature DC have the worst prognosis (comparable to patients having low CD8⁺ T cell infiltrate) indicating that TLS mature DC are required to license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells (Fig. 5.3). The mechanism underlying the imprinting of CD8⁺ T cell function remains to be elucidated.

Altogether, it is tempting to speculate that TLS could potentiate anti-tumor immunity mediated by CD8⁺ T cells through different mechanisms. Firstly, infiltrating immature DC could take up and process TAA and migrate to TLS in order to present processed tumor peptides to specific T cells (Fig. 5.3). This could favor the continuous differentiation of tumor-specific T cells through the activation of naïve T cells and/or reactivation of specific memory T cells. Such local immune responses initiated in TLS could be more adaptable to the shift of tumor antigen expression occurring during tumor progression. Secondly, CD4⁺ T cells are enriched in TLS and may exert a key helper function on CD8⁺ T cells by promoting the recruitment, activation, and differentiation of naïve cells into effector cells, as demonstrated in a model of pancreatic tumors [35]. This is consistent with the strongly coordinated expression of genes related to Th1, activation and cytotoxicity, and their association with high density of mature DC reported in NSCLC [24]. Thirdly, because their prognostic impact is always observed after resection of the tumor, TLS might allow the establishment of systemic immunity against the tumors i.e., through the recirculation of anti-tumor memory T cells (T_{CM} and/or T_{EM}) previously generated in TLS.

5.3 Relationship Between TLS and B Cell Infiltrate

The existence of intra-tumor lymphoid-like structures with segregated T and B cell zones argues for the existence of a local Ag-driven humoral immune response and suggests potential roles of antibodies (Ab) and B cell subsets in anti-tumor immunity.

5.3.1 *TLS as Sites for Development of Tumor Specific Humoral Immunity*

Intra-tumor TLS have a LN-like organization with the presence of typical B cell follicles containing naïve B cells and GC, and more dispersed plasmablasts (PB)/plasma cells (PC) [5, 9, 16, 21, 36, 37]. As in SLO, GC contain highly proliferating B cells expressing AID—an enzyme involved in somatic hypermutation and Ig class switching—as well as mesenchymal follicular DC and follicular helper T cells (T_{FH}) (Fig. 5.2), a specialized subset of T helper cells critical for GC formation and development of high-affinity Ab, memory B cells and PC. TLS also contain cells producing the chemokine CXCL13, which governs the recruitment of circulating CXCR5 expressing B and T cells and structuration of B cell follicles. Importantly, this chemokine appears as one of the best predictive marker for prognosis in breast [9] and colon [21] cancers (Table 5.1), further pointing to an essential role of TLS in anti-tumor immunity. Studies in BC and NSCLC revealed that highly infiltrated tumors contained nearly all stages of B cell differentiation [11] (Couillault et al., unpublished data) arguing for an in situ Ag-driven humoral immune response resulting in the formation of memory B cells and Ab-producing PC (Fig. 5.4). Through a comprehensive molecular profiling of tumor-infiltrating $CD4^+$ T cells, Gu-Trantien et al. recently revealed that the presence of a T_{FH} signature robustly predicts breast cancer patient survival and response to chemotherapy, suggesting that local T_{FH} -driven B cell differentiation is essential for anti-tumor immunity [9].

Evidence of an in situ Ag-driven humoral response in intra-tumor TLS has been revealed by a restricted immunoglobulin (Ig) variable gene usage by tumor-infiltrating B cells, isotype switching and somatic hypermutation (SHM) in various cancers including breast medullary carcinoma [38–42], breast ductal carcinoma [16, 36, 40] and metastatic melanoma [12]. More recently, using the Cancer Genome Atlas mRNA-seq data, Iglesia et al. identified, in a subset of tumors from basal like breast cancers, specific BCR segments, which expression correlates with better patient survival, supporting that the presence of a productive and potentially restricted anti-tumor B cell response may directly impact patient clinical outcome [43].

TLS thus exhibit many features of an ongoing T-cell-dependent humoral response to protein Ag and analysis of the specificity of Ab produced in the tumor microenvironment provides evidence that TLS may be elicited by TAA [16] or autoAg [39, 44]. More recently, Germain et al. demonstrated that about half of the TLS rich NSCLC tumors contained cells producing Ab directed against one or several shared lung TAA, such as LAGE-1, MAGEA1, MAGEA2, TP53 and NY-ESO-1, known to elicit spontaneous immune responses in cancer patients [11]. Whether the Ab produced by tumor specific PC infiltrating the tumor versus those localized in peripheral tissues target similar Ag is so far poorly understood and remains an important issue to address in order to better appreciate the still obscure role of humoral immunity in cancer. In this respect, besides the shared TAA analyzed so far, it will be important to study Ab reactivity to patient specific neoantigens emerging as a result of mutations in tumor cells, as this is now being done for T cells [45].

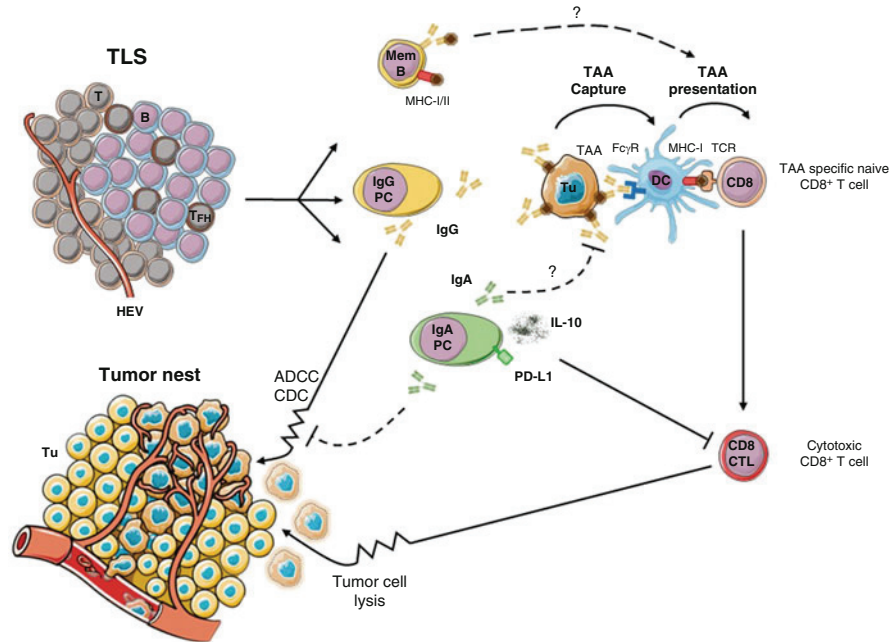


Fig. 5.4 Opposing functions of IgG and IgA produced/expressed in the tumor microenvironment. TLS allow expansion of naïve B cells, activation of CSR and SHM machineries, and differentiation into memory B cells and plasma cells producing IgG or IgA, depending on the nature of the cytokines produced by T_{FH} and other immune infiltrating cells. IgG released in the tumor microenvironment may contribute to the elimination of tumor cells by CDC and ADCC, while IgA may antagonize these processes by competition. Opsonisation of tumor cells by IgG favors the transfer of tumor Ag to dendritic cells through engagement of the $Fc\gamma R$ for cross-presentation to $CD8^+$ T cells and induction of anti-tumor cytotoxic T cells. After capture of TAA through their membrane Ig and accommodation into MHC molecules, memory B cells can also impact anti-tumor T cell immunity. IgA PC can express IL10 and PDL1 and impair anti-tumor T cell immunity. *Abbreviations:* ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; B, B cell; CDC, complement-dependent cytotoxicity; CSR, Class Switch Recombination; CTL, Cytotoxic T Lymphocyte; DC, Dendritic Cell; HEV, High Endothelial Venule; mem B, memory B cell; PC, Plasma Cell; SHM: Somatic HyperMutation; T, T cell; TAA, Tumor-Associated Antigen; T_{FH} , follicular helper T cell; TLS, Tertiary Lymphoid Structure; Tu, tumor cell

5.3.2 The Various Ways TLS B Cells May Impact Anti-tumor Immunity

5.3.2.1 By the Production of Ab

In many cancers, tumor-infiltrating B cells have been shown to produce class-switched affinity-matured anti-tumor Ab [46], most often IgG, and some anti-tumor effects of these Ab have been demonstrated [47–49]. This is in accordance with the fact that the presence of PC or IgG in the tumor is associated with a better prognosis in breast cancer, NSCLC, CRC, and metastatic melanoma [43, 50–53]. Anti-TAA

IgG may contribute to the elimination of tumor cells, either directly after fixation of complement or indirectly by activating accessory cells expressing Fc γ R to exert cytotoxic function (i.e., antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC). Tumor mouse models have indeed revealed that administration of anti-TAA IgG2 Ab can induce ADCC and prevent tumor metastasis by a process involving Fc γ R [54], but there is so far no formal proof in humans that a naturally occurring anti-tumor IgG response can exert such a role. Besides these effector roles, Ab can also contribute to the efficient priming of anti-tumor immunity (Fig. 5.4), which requires the capture of TAA and their presentation in association with MHC-class-I molecules to CD8⁺ T cells. This process, known as Ag cross-presentation, is greatly enhanced in the case of Ag/Ab immune complexes, which can engage Fc γ R on multiple DC subsets to shuttle exogenous Ag into the cross-presentation pathway [55]. IgG deposition on tumor cells has been documented in several cancers and two recent studies in mouse models point to an essential role of Ab/TAA immune complexes for priming anti-tumor CD8⁺ T cells through DC [56, 57]. This is reminiscent to a previous observation in a mouse model of CRC showing that administration of anti-TAA IgG potentiates the efficacy of anti-cancer drugs and results in enhanced anti-tumor CD8⁺ T cell response [58].

The function of Ab inside the tumor microenvironment likely varies with the class of Ig, which is known to dictate its effector functions. In this respect, one should distinguish pro-inflammatory complement fixing and ADCC-prone Ab (IgG1-3) from non-inflammatory IgG₄ and IgA, which emerge in situations of chronic antigen exposure, have poor ability to bind complement and Fc receptors and to activate effector cells, and can actively contribute to immune tolerance. B cell isotype switching to IgA and IgG₄ are induced by TGF- β and IL10, two suppressive cytokines that are often expressed in the tumor microenvironment, and there is now some evidence that these two classes of Ig may contribute to immune suppression in cancer patients. By analyzing rearranged immunoglobulin genes from micro-dissected TLS B cells, Cipponi et al. recently revealed that IgA and IgG isotype switching occurred nearly at a similar frequency in TLS of metastatic melanoma patients, indicating that TLS may favor differentiation of IgA producing PC [12] in addition to IgG⁺ PC. Indeed, serum anti-TAA IgA or tumor-infiltrating IgA⁺ PC can be detected in a proportion of tumor patients [11, 16, 59–64]. Importantly, tumor-infiltrating IgA PC were recently shown to strongly dampen anti-tumor CTL responses induced by immunogenic chemotherapy in mouse models of prostate cancer [65]. This suggests that IgG PC and IgA PC may exert opposite functions in anti-tumor immunity [66] (Fig. 5.4). IgA⁺ PC were also detected in human prostate tumors near lymphoid-like structures and patients with a high density of IgA⁺ PC displayed lower CD8/B cell ratios suggesting that, also in humans, the presence of IgA⁺ PC within the tumor microenvironment may be associated with tumor immune evasion [65]. Regarding IgG, a differential role of subclasses in anti-tumor immunity has been recently highlighted in melanoma. PC-producing tumor reactive IgG₄ were detected in melanoma tumors and elevated serum IgG₄ levels inversely correlated with patient survival [67]. Mechanistically, IgG₄ antibodies were ineffective in triggering effector cell-mediated tumor killing and even blocked IgG1-mediated

tumoricidal functions through reduction of Fc γ RI activation. IgG4 PC have also been reported in extra-hepatic cholangiosarcoma and their presence was associated with a lower survival rate and positively and negatively correlated with tumor infiltration by FoxP3⁺ T_{reg} and CD8⁺ T cells, respectively [68]. This indicates that IgG4 responses promoted by Th2-biased inflammation may restrict effector cell function and contribute to immune escape.

Altogether, these recent important advances have revealed some of the so far neglected essential roles of Ab in modulating anti-tumor immunity within the tumor microenvironment (Fig. 5.4). These include induction or modulation of tumor cell death (via ADCC and/or CDC), modulation of the biology of targeted tumor molecules, induction of anti-tumor immunity by facilitating DC-mediated TAA presentation to T cells and modulation of DC functions by engagement of FcR or C-type lectins [69]. The anti- versus pro-tumoral functions of Ab depends on several factors including the isotype of Ab and IgG subclasses, their degree of sialylation [70], the targeted Ag and the nature of infiltrating immune cells and pattern of expression of Ig receptors.

5.3.2.2 By Presenting TAA to T Cells

As sites of Ag-driven oligoclonal B cell expansion, TLS are most likely enriched in TAA specific B cells, which may become the dominant APC within tumors with the capacity to efficiently capture tumor Ag through their BCR. Compatible with such a role, TLS B cells and activated T cells were found in close contacts in melanoma and the presence of both cell types correlates with a better survival of patients [71]. B cell antigen presentation to T cells is critical for the establishment and recall of antigen-specific memory CD4⁺ T cells [72]. Not only memory B cells, which can express costimulatory molecules, but also IgM⁺ and IgA⁺ PC, which retain surface expression of Ig [73] and are able to exert Ag-presenting functions towards CD4⁺ T cells [74], could present TAA inside tumor-associated TLS. B cells and PC may thus, through their APC function, modulate T cell fates within the tumor microenvironment.

5.3.2.3 By Producing Molecules Modulating the T Cell Response

It is noteworthy that the beneficial impact of TLS B cells or T_{FH} in cancer is often associated with increased Th1 and/or CD8 responses [9], suggesting that B cells may support anti-tumoral T cell responses and/or Th1-T_{FH}-dominant immunity. It is indeed noteworthy that tumor infiltration by both CD20⁺ B cells and Th1/CD8⁺ T cells often shows the best survival benefit is several cancer types, as compared to infiltration by either population alone [37, 75–77]. At the same line, it was recently demonstrated in NSCLC that a high density of TLS B cells was associated with increased clonality of tumor-infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T cells [78]. Besides their already discussed capacity to promote TAA presentation

though Ab production, B cells could shape T cell differentiation and functions by releasing immuno-modulatory type 1 (IL12, IFN- γ), type 2 (IL4, IL13), and suppressive (IL10, TGF- β , IL35) cytokines [79]. As for example, tumor-infiltrating B cells have been shown to produce IFN- γ and IL12 in hepatocellular carcinoma [76], suggesting their potential involvement in inducing or amplifying cellular immunity. On the opposite, so-called regulatory B cells producing IL10, TGF- β or Granzyme B have been shown to dampen anti-tumor immunity and/or expand T_{reg} and to promote tumor progression [80–82]. Likewise, B cells and PC can express PD1 ligands at high levels [83, 84] and tumor-infiltrating PDL1-expressing IgA⁺ PC were recently shown to dampen CD8⁺ T cell-mediated immunity [65] (Fig. 5.4). Altogether, through their capacity to produce Th cell polarizing cytokines, such as IFN- γ , IL12, IL4 or IL13 or immunosuppressive cytokines like IL10 and TGF β [85] and express of ligands for stimulatory or inhibitory immune check points (ICP), tumor-infiltrating B cells can modulate T cell functions and increase or dampen anti-tumor immunity.

5.3.3 Regulation of TLS Immune Function

Although TLS have been associated with a better clinical outcome in most types of cancers (Table 5.1), their exact role remains debated and it is not excluded that particular types of TLS might be detrimental and favor immune suppression. Such notion of “immunosuppressive TLS” came from the field of transplantation, where TLS have been observed in tolerated lung or kidney grafts [86, 87]. Indeed, long-term lung graft acceptance is associated with induction of bronchus-associated lymphoid tissues, where FoxP3⁺ T_{reg} accumulate and control the anti-donor immune response [87]. Such TLS have not been described so far in cancer. Nevertheless, in similarly, Gobert et al. have shown in breast cancer that patients with a high density of T_{reg} in lymphoid aggregates have a worse prognosis [8]. Others have shown in mice that the transgenic expression of the TLS-inducing cytokine LT $\alpha\beta$ in hepatocytes leads to recruitment and activation of immune cells and development of hepatocellular carcinoma [88]. In likewise, LT $\alpha\beta$ expression in B cells drives the rapid re-emergence of prostate cancer following androgen deprivation [89]. Just as LN, TLS may thus act by amplifying the prevailing immune response in tumor-bearing patients, should it be a suppressive and detrimental immune response or an anti-tumoral Tc1/Th1 beneficial immune response. What differentiates these two putative types of TLS is so far poorly understood, but might rely in the functional properties of their B cells, including the nature of the cytokines and the class of Ig they produce, the pattern of expressed ICP ligands and the presence of immunosuppressive cells such as T_{reg}.

5.4 Immunotherapies and TLS Development

5.4.1 TLS Neogenesis

The mechanism of lymphoid organogenesis are now quite well known and involved many molecules including lymphotoxin (LT)- α and LT- β . TNF- α the lymphoid chemokines CCL19, CCL21, CXCL13, and RANK-L (for more details, see review by [90]). Since the growing interest in the field of TLS in autoimmunity, infectious diseases and cancers, many laboratories studied whether the neogenesis of TLS can occur via the same set of molecules involved in lymphoid organogenesis. Strikingly, the answer is yes, meaning that there is no apparent specificity within the two developmental programs (reviewed by [4]). In particular, the concomitant expression of the lymphoid chemokines is (i) mandatory for the completion of lymphoid neogenesis program, and (ii) critical for the maintenance of lymphoid organization via a self-amplification loop.

The knowledge on TLS is very recent compared to LN but it is worth noting that during the evolution of vertebrates, TLS and other lymphoid organizations like Gut-associated lymphoid tissues (GALT), emerged since lower vertebrates whereas LN appeared very recently in mammals (also in few birds). This indicates that LN organogenesis has evolved through the recapitulation of the TLS neogenesis, and thus can explain the redundancy of the molecules implicated in each of their formation.

Nonetheless, it is important to underline that one major difference exists between LN and TLS formations. During fetal development, LN organogenesis is initiated by interactions between lymphoid tissue inducer (LTi) cells and stromal organizer cells, and this key cellular cross-talk is LT α 1 β 2 (membrane form of LT β)-LT β dependent. Several studies have shown that TLS can be induced upon inflammatory stimuli in mice devoid of any LTi cells (i.e., ROR $\gamma^{-/-}$ and Id2 $^{-/-}$ mice [91]), suggesting that other inducer cells can trigger TLS neogenesis [92, 93]. By using different mouse models, several immune cell types have been shown to promote TLS induction, along with the presence of DC that seems to play a central role. In breast cancer, mature DC are the major source of the membrane-bound LT β [94] and thus this immune population play a key role in the differentiation and maintenance of mature HEV, which are essential for the extravasation of peripheral blood immune cells into TLS [94]. In a model of ectopic expression of CCL21 in the thyroid, DC-CD4 $^{+}$ T cell interaction initiates the formation of HEV in a CCR7- and LT β R-dependent mechanism, and ultimately TLS neogenesis [92]. In addition, the presence of DC has been shown to be essential for the maintenance of TLS in the lung after virus infection (influenza virus) [95] and modified vaccinia virus Ankara [96]. Interestingly, a pro-active role for neutrophils in TLS neogenesis has been recently highlighted in mice in a model of acute LPS instillations [97]. Finally, TLS formation can also be negatively regulated. Indeed, regulatory T cells (Tregs) can interfere with this lymphoid neogenesis program by dampening the neutrophilic inflammation induced

by acute LPS exposure [97]. Very recently, Joshi et al. have shown that depletion of Tregs results in an increase number of cancer-associated TLS and the promotion of anti-tumor immunity in established lung adenocarcinoma [98].

Altogether, the mechanisms of LN and TLS formation share many similarities with the particularity that several LT_i-like cells can promote TLS development at the inflammatory site.

5.4.2 Vaccination

The vaccination was discovered in 1796 by Edward Jenner who first inoculated cowpox pus, an agent of mild disease infecting cows, and then injected the smallpox to James Phipps. This pioneering experiment opened a field of intense investigation on strategies to manipulate the immune system to protect the host [99]. Thereby, anti-infectious vaccination has permitted to eradicate or at least to greatly reduce morbidity of many pathologies, notably poliomyelitis, smallpox, measles, and mumps. In the field of cancer, vaccination against human papilloma virus (HPV) serotypes 16 and 18 (Cervarix[®], Gardasil[®]) prevents 70 % of cervical cancer [100]. Despite the recent introduction of these preventative HPV vaccines, the frequency of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women remains too high worldwide. In this setting, Maldonado et al. investigated the immune infiltrate of lesional mucosa after therapeutic vaccination against HPV16 [101]. In post-vaccination, a huge modification of the immune microenvironment is observed with a marked increase of T cell infiltrate with an activated effector memory phenotype and oligoclonal expansion. In contrast to unvaccinated subjects, the immune infiltrate is organized in TLS adjacent to HEV in target lesions of treated patients indicating that TLS are a marker of efficient immunotherapy. CIN-associated TLS have features of an ongoing immune response, and their presence correlates with increased Th1 responses and immune cell activation-related genes, as previously observed in some primary tumors such as NSCLC. Thus, we can speculate that TLS may provide a local niche for the differentiation and maintenance of memory cells and consequently, may participate in the generation of a long-term protection against HPV.

Several immune-based cancer therapies aim to target DC subsets to induce anti-tumor immunity. The two main strategies of DC-based therapies were to pulse ex vivo generated DC with TAA and to reinject them to cancer patients or to directly mobilize endogenous DC using cytokines like Flt3 ligand or GM-CSF. Despite the limited adverse effects, the objective responses using either approach were quite disappointing with regards to the central role of DC as bridges between the innate and adaptive immunity. It is of note nowadays that only two anti-tumor vaccines, both targeting GM-CSF, have been approved by the US Food and Drug Administration: GVAX for pancreatic cancer and Sipuleucel-T for treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer [102]. GVAX is an allogeneic GM-CSF gene-transfected tumor cell vaccine designed to elicit T cell immunity to cancer

antigens including mesothelin. Recently, Lutz et al. observed TLS neogenesis in most pancreatic tumors following G-VAX vaccination [103]. TLS-T cells exhibit signs of activation and effector functions, and a Th17 orientation. Importantly, even in the presence of T_{reg} and expression of inhibitory ICPs i.e., PD1/PD-L1 in TLS, the effector T cells/ T_{reg} ratio is highly in favor of an anti-tumor response in vaccinated patients and the enhanced Th1/Th17 axis in TLS correlates with decreased T_{reg} density and long-term survival after vaccine therapy. Thus, these studies showed that immune-based vaccinations, which were initially designed to boost the adaptive immunity, are able to reprogram the tumor microenvironment from an unfavorable to a favorable milieu for TLS neogenesis.

It is of note that Sipuleucel-T is a GM-CSF-prostate acid phosphatase (PAP, a tumor antigen) fusion molecule contraindicated in patients with history of metastatic castrate-resistant prostate cancer. In this context, it will be interesting to evaluate the shaping of the local immune microenvironment post-vaccination, and to correlate the putative presence of TLS with the objective response to the treatment.

Altogether, it will be interesting to reanalyze data from previous vaccine clinical trials, according to TLS stratification, density of tumor-infiltrating effector T cells and outcome of vaccinated cancer patients in order to characterize therapies that best promote *de novo* formation of TLS with anti-tumoral activity.

5.4.3 Immune Checkpoints

The undeniable success of ICP inhibitors with anti-CTLA-4 (Ipilimumab) and anti-PD1 (Pembrolizumab and Nivolumab) antibodies is considered as a revolutionary therapeutic advance in cancer [104–108]. First introduced in unresectable or metastatic melanoma and now in chemo-resistant NSCLC, anti-PD1/PD-L1 therapies remarkably enhanced the survival of a fraction of patients. Recently, it has been demonstrated that the mutational landscape of tumor cells could predict response to anti-PD1 treatment in NSCLC patients [109]. Numerous somatic mutations are indeed found in smokers compared to never-smokers, leading to an increased number of neoantigens and promote the efficacy of anti-PD1 treatment. In many human cancers, PD1 and its ligands have been shown to be expressed by tumor-infiltrating immune cells among which T cells [110–112] and TLS-T cells [9]. Thus, it will be very interesting to correlate the presence of TLS with response to ICP inhibitory antibodies in order to evaluate the putative impact of these immunotherapies in patients with an already well organized immune microenvironment.

Taking into account the role of TLS in the shaping of the local immune microenvironment, we can speculate that immunotherapies based on ICP blockade may act as a powerful booster of immune responses initiated in TLS already present in the tumor, TLS being the best place to induce or amplify protective immunity targeting neoantigens.

5.5 Conclusions

The recent discovery of tumor-associated TLS adds a new variable to be integrated into the current efforts to better understand the role played by the immune system in human cancers and identify efficient immunotherapies aimed to harness anti-tumor immunity. That tumor TLS display many similarities with canonical SLO and most often correlate with long-term survival of patients, argue for a protective role of TLS in cancer. These structures, which are enriched in DC and organized in T and B cell zones, may indeed constitute preferential sites for the presentation of TAA allowing the priming of tumor-reactive naïve T cells and/or the reactivation of specific memory T cells. In addition, thanks to the presence of T_{FH} and GC, TLS are also sites for initiation and/or amplification of humoral responses, which role in cancer just start to be appreciated. From a therapeutic point of view, pre-existing intra-tumor TLS may constitute a very useful biomarker for selecting patients who could best benefit of immunotherapy aimed to reactivate tumor-specific T cells. In addition, neo-induction of TLS might be beneficial in cancer patients to generate efficient anti-tumor immunity, as suggested in animal models. Yet, several critical questions need to be addressed before exploiting TLS in therapy. One of these concerns the possible existence of detrimental TLS favoring tumor progression and the identification of the key factors that distinguish good TLS from bad TLS. Another important issue is to identify the mechanisms allowing TLS neogenesis in the tumor milieu in order to define strategies that could be used in patients. Finally, determining how TLS-based strategies could best be combined with currently used targeted- or immunotherapies is of utmost importance. In particular, combining inhibitory ICP blockade and TLS induction may represent a promising strategy to promote efficient cellular and humoral immune responses against tumor.

Acknowledgments We wish to acknowledge the participation of members of the laboratories among whom Prs. C. Sautès-Fridman and W. H. Fridman, clinicians, and pathologists who participated in the articles referenced in our review.

Conflict statement: No potential conflicts of interest were disclosed.

Grants: This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Paris Descartes, University Pierre et Marie Curie, SIRIC Cancer Research and Personalized Medicine (CARPEM), the LabeX Immuno-Oncology, Institut National du Cancer (INCa) and Canceropôle Ile-de-France, Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, MedImmune, the LABEX DEVWECAN (ANR-10-LABX-0061) of University of Lyon, the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR), and the SIRIC project (LYRIC, Grant No. INCa-4664). Hélène Kaplon was supported by a grant from La Ligue contre le Cancer.

References

1. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, Woodland DL, Lund FE, Randall TD. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med.* 2004;10(9):927–34.

2. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, Kusser K, Tighe MP, Klonowski KD, Lefrançois L, Cauley LS, Harmsen AG, Lund FE, Randall TD. Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. *Immunity*. 2006;25(4):643–54.
3. Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin Immunol*. 2008;20(1):26–42.
4. Dieu-Nosjean MC, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol*. 2014;35(11):571–80.
5. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008;26(27):4410–7.
6. Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, Rochaix P, Girard JP. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res*. 2011;71(17):5678–87.
7. Bento DC, Jones E, Junaid S, Tull J, Williams GT, Godkin A, Ager A, Gallimore A. High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncoimmunology*. 2015;4(3), e974374.
8. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Ménérier-Caux C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*. 2009;69(5):2000–9.
9. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, Veys I, Haibe-Kains B, Singhal SK, Michiels S, Rothé F, Salgado R, Duvallier H, Ignatiadis M, Desmedt C, Bron D, Larsimont D, Piccart M, Sotiriou C, Willard-Gallo K. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2873–92.
10. Figenschau SL, Fismen S, Fenton KA, Mortensen ES. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2015;15:101.
11. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, Lepelley A, Becht E, Katsahian S, Bizouard G, Validire P, Damotte D, Alifano M, Magdeleinat P, Cremer I, Teillaud JL, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(7):832–44.
12. Cipponi A, Mercier M, Seremet T, Baurain JF, Théate I, van den Oord J, Stas M, Boon T, Coulie PG, van Baren N. Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases. *Cancer Res*. 2012;72(16):3997–4007.
13. Di Caro G, Marchesi F. Tertiary lymphoid tissue: a gateway for T cells in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2014;3, e28850.
14. Giraldo NA, Becht E, Pagès F, Skliris G, Verkarre V, Vano Y, Mejean A, Saint-Aubert N, Lacroix L, Natario I, Lupo A, Alifano M, Damotte D, Cazes A, Triebel F, Freeman GJ, Dieu-Nosjean MC, Oudard S, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(13):3031–40.
15. Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, Kasajima T. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol*. 2002;196(1):37–43.
16. Coronella JA, Spier C, Welch M, Trevor KT, Stopeck AT, Villar H, Hersh EM. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Immunol*. 2002;169(4):1829–36.

17. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M, Régnard JF, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Cremer I. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2011;71(16):5412–22.
18. de Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, Cremer I, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res.* 2011;71(20):6391–9.
19. Martinet L, Le Guellec S, Filleron T, Lamant L, Meyer N, Rochaix P, Garrido I, Girard JP. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2012;1(6):829–39.
20. Hindley JP, Jones E, Smart K, Bridgeman H, Lauder SN, Ondondo B, Cutting S, Ladell K, Wynn KK, Withers D, Price DA, Ager A, Godkin AJ, Gallimore AM. T-cell trafficking facilitated by high endothelial venules is required for tumor control after regulatory T-cell depletion. *Cancer Res.* 2012;72(21):5473–82.
21. Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, Mulé JJ. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol.* 2011;179(1):37–45.
22. Messina JL, Fenstermacher DA, Eschrich S, Qu X, Berglund AE, Lloyd MC, Schell MJ, Sondak VK, Weber JS, Mulé JJ. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci Rep.* 2012;2:765.
23. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298–306.
24. Goc J, Germain C, Vo-Bourgeois TK, Lupo A, Klein C, Knockaert S, de Chaisemartin L, Ouakrim H, Becht E, Alifano M, Validire P, Remark R, Hammond SA, Cremer I, Damotte D, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2014;74(3):705–15.
25. Goc J, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncoimmunology.* 2013;2(12), e26836.
26. Yu P, Lee Y, Liu W, Chin RK, Wang J, Wang Y, Schietinger A, Philip M, Schreiber H, Fu YX. Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nat Immunol.* 2004;5(2):141–9.
27. Thompson ED, Enriquez HL, Fu YX, Engelhard VH. Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors. *J Exp Med.* 2010;207(8):1791–804.
28. Peske JD, Thompson ED, Gemta L, Baylis RA, Fu YX, Engelhard VH. Effector lymphocyte-induced lymph node-like vasculature enables naive T-cell entry into tumours and enhanced anti-tumour immunity. *Nat Commun.* 2015;6:7114.
29. Miyagawa S, Soeda J, Takagi S, Miwa S, Ichikawa E, Noike T. Prognostic significance of mature dendritic cells and factors associated with their accumulation in metastatic liver tumors from colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2004;35(11):1392–6.
30. Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Mohos A, Gaudi I, Tímár J. 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.* 2007;56(9):1459–69.
31. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, Crozet L, Ouakrim H, Goc J, Cazes A, Fléjou JF, Gibault L, Verkarre V, Régnard JF, Pagès ON, Oudard S, Mlecnik B, Sautès-Fridman C, Fridman WH, Damotte D. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res.* 2013;19(15):4079–91.
32. Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5220–7.

33. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Lyberis P, Bruna MC, Macrì L, Daniele L, Oliaro A. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms. *Ann Thorac Surg.* 2009;87(2):365–71.
34. Suzuki K, Kachala SS, Kadota K, Shen R, Mo Q, Beer DG, Rusch VW, Travis WD, Adusumilli PS. Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(16):5247–56.
35. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res.* 2010;70(21):8368–77.
36. Nzula S, Going JJ, Stott DI. Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. *Cancer Res.* 2003;63(12):3275–80.
37. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Becker C, Pagès F, Speicher MR, Trajanoski Z, Galon J. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity.* 2013;39(4):782–95.
38. Coronella JA, Telleman P, Kingsbury GA, Truong TD, Hays S, Junghans RP. Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61(21):7889–99.
39. Hansen MH, Nielsen H, Ditzel HJ. The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12659–64.
40. Wang Y, Ylera F, Boston M, Kang SG, Kutok JL, Klein-Szanto AJ, Junghans RP. Focused antibody response in plasma cell-infiltrated non-medullary (NOS) breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;104(2):129–44.
41. Kotlan B, Gruel N, Zafrani B, Füredi G, Foldi J, Petranyi GG, Fridman WH, Teillaud JL. Immunoglobulin variable regions usage by B-lymphocytes infiltrating a human breast medullary carcinoma. *Immunol Lett.* 1999;65(3):143–51.
42. Kotlan B, Simsa P, Foldi J, Fridman WH, Glassy M, McKnight M, Teillaud JL. Immunoglobulin repertoire of B lymphocytes infiltrating breast medullary carcinoma. *Hum Antibodies.* 2003;12(4):113–21.
43. Iglesia MD, Vincent BG, Parker JS, Hoadley KA, Carey LA, Perou CM, Serody JS. Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(14):3818–29.
44. Hansen MH, Nielsen HV, Ditzel HJ. Translocation of an intracellular antigen to the surface of medullary breast cancer cells early in apoptosis allows for an antigen-driven antibody response elicited by tumor-infiltrating B cells. *J Immunol.* 2002;169(5):2701–11.
45. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69–74.
46. Siliņa K, Rulle U, Kalniņa Z, Linē A. Manipulation of tumour-infiltrating B cells and tertiary lymphoid structures: a novel anti-cancer treatment avenue? *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(7):643–62.
47. Yasuda M, Mizukami M, Hanagiri T, Shigematsu Y, Fukuyama T, Nagata Y, So T, Ichiki Y, Sugaya M, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K. Antigens recognized by IgG derived from tumor-infiltrating B lymphocytes in human lung cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(5A):3607–11.
48. Mizukami M, Hanagiri T, Shigematsu Y, Baba T, Fukuyama T, Nagata Y, So T, Ichiki Y, Sugaya M, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K. Effect of IgG produced by tumor-infiltrating B lymphocytes on lung tumor growth. *Anticancer Res.* 2006;26(3A):1827–31.
49. Mizukami M, Hanagiri T, Yasuda M, Kuroda K, Shigematsu Y, Baba T, Fukuyama T, Nagata Y, So T, Ichiki Y, Sugaya M, So T, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K. Antitumor effect of antibody against a SEREX-defined antigen (UOEHL-1) on lung cancer xenotransplanted into severe combined immunodeficiency mice. *Cancer Res.* 2007;67(17):8351–7.
50. Schmidt M, Hellwig B, Hammad S, Othman A, Lohr M, Chen Z, Boehm D, Gebhard S, Petry I, Lebrecht A, Cadenas C, Marchan R, Stewart JD, Solbach C, Holmberg L, Edlund K, Kulitima HG, Rody A, Berglund A, Lambe M, Isaksson A, Botling J, Karn T, Müller V,

- Gerhold-Ay A, Cotarelo C, Sebastian M, Kronenwett R, Bojar H, Lehr HA, Sahin U, Koelbl H, Gehrman M, Micke P, Rahnenführer J, Hengstler JG. A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin k C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2012;18(9):2695–703.
51. Nagalla S, Chou JW, Willingham MC, Ruiz J, Vaughn JP, Dubey P, Lash TL, Hamilton-Dutoit SJ, Bergh J, Sotiriou C, Black MA, Miller LD. Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis. *Genome Biol.* 2013;14(4):R34.
 52. Lohr M, Edlund K, Botling J, Hammad S, Hellwig B, Othman A, Berglund A, Lambe M, Holmberg L, Ekman S, Bergqvist M, Pontén F, Cadenas C, Marchan R, Hengstler JG, Rahnenführer J, Micke P. The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2013;333(2):222–8.
 53. Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, Patterson JW, Slingluff Jr CL. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res.* 2012;72(5):1070–80.
 54. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science.* 2005;310(5753):1510–2.
 55. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* 1999;189(2):371–80.
 56. Baker K, Rath T, Flak MB, Arthur JC, Chen Z, Glickman JN, Zlobec I, Karamitopoulou E, Stachler MD, Odze RD, Lencer WI, Jobin C, Blumberg RS. Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity.* 2013;39(6):1095–107.
 57. Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, Burt BM, Prestwood TR, Perlman N, Davidson MG, Kenkel JA, Segal E, Pusapati GV, Bhattacharya N, Engleman EG. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumor T-cell immunity. *Nature.* 2015;521(7550):99–104.
 58. Noguchi T, Kato T, Wang L, Maeda Y, Ikeda H, Sato E, Knuth A, Gnjatich S, Ritter G, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H, Nishikawa H. Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. *Cancer Res.* 2012;72(7):1672–82.
 59. Ito T, Saga S, Nagayoshi S, Imai M, Aoyama A, Yokoi T, Hoshino M. Class distribution of immunoglobulin-containing plasma cells in the stroma of medullary carcinoma of breast. *Breast Cancer Res Treat.* 1986;7(2):97–103.
 60. Sieinski W. Immunohistological patterns of immunoglobulins in dysplasias, benign neoplasms and carcinomas of the breast. *Tumori.* 1980;66(6):699–711.
 61. Pekáriková A, Sánchez D, Palová-Jelínková L, Simsová M, Benes Z, Hoffmanová I, Drastich P, Janatková I, Mothes T, Tlaskalová-Hogenová H, Tucková L. Calreticulin is a B cell molecular target in some gastrointestinal malignancies. *Clin Exp Immunol.* 2010;160(2):215–22.
 62. Erić-Nikolić A, Milovanović Z, Sánchez D, Pekáriková A, Džodić R, Matić IZ, Tučková L, Jevrić M, Buta M, Rašković S, Juranić Z. Overexpression of calreticulin in malignant and benign breast tumors: relationship with humoral immunity. *Oncology.* 2012;82(1):48–55.
 63. Suzuki H, Graziano DF, McKolanis J, Finn OJ. T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease. *Clin Cancer Res.* 2005;11(4):1521–6.
 64. Hannani D, Locher C, Yamazaki T, Colin-Minard V, Vetizou M, Aymeric L, Viaud S, Sanchez D, Smyth MJ, Bruhns P, Kroemer G, Zitvogel L. Contribution of humoral immune responses to the antitumor effects mediated by anthracyclines. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):50–8.
 65. Shalpour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, Willmsky G, Ammirante M, Strasner A, Hansel DE, Jamieson C, Kane CJ, Klatte T, Birner P, Kenner L, Karin M. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature.* 2015;521(7550):94–8.
 66. Zitvogel L, Kroemer G. Cancer: antibodies regulate antitumor immunity. *Nature.* 2015;521(7550):35–7.

67. Karagiannis P, Gilbert AE, Josephs DH, Ali N, Dodev T, Saul L, Correa I, Roberts L, Beddowes E, Koers A, Hobbs C, Ferreira S, Geh JL, Healy C, Harries M, Acland KM, Blower PJ, Mitchell T, Fear DJ, Spicer JF, Lacy KE, Nestle FO, Karagiannis SN. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1457–74.
68. Kimura Y, Harada K, Nakanuma Y. Pathologic significance of immunoglobulin G4-positive plasma cells in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2012;43(12):2149–56.
69. Ziętara N, Łyszkiewicz M, Krueger A, Weiss S. B-cell modulation of dendritic-cell function: signals from the far side. *Eur J Immunol*. 2014;44(1):23–32.
70. Oaks M, Taylor S, Shaffer J. Autoantibodies targeting tumor-associated antigens in metastatic cancer: Sialylated IgGs as candidate anti-inflammatory antibodies. *Oncoimmunology*. 2013;2(6), e24841.
71. Ladányi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liszkay G, Gilde K, Fejös Z, Gaudi I, Dobos J, Tímár J. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(12):1729–38.
72. Linton PJ, Harbertson J, Bradley LM. A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells. *J Immunol*. 2000;165(10):5558–65.
73. Pinto D, Montani E, Bolli M, Garavaglia G, Sallusto F, Lanzavecchia A, Jarrossay D. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood*. 2013;121(20):4110–4.
74. Pelletier N, McHeyzer-Williams LJ, Wong KA, Urich E, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1110–8.
75. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, Nelson BH. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27-memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3281–92.
76. Shi JY, Gao Q, Wang ZC, Zhou J, Wang XY, Min ZH, Shi YH, Shi GM, Ding ZB, Ke AW, Dai Z, Qiu SJ, Song K, Fan J. Margin-infiltrating CD20(+) B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(21):5994–6005.
77. Hennequin A, Derangère V, Boidot R, Apetoh L, Vincent J, Orry D, Fraisse J, Causeret S, Martin F, Arnould L, Beltjens F, Ghiringhelli F, Ladoire S. Tumor infiltration by Tbet+ effector T cells and CD20+ B cells is associated with survival in gastric cancer patients. *Oncoimmunology*. 2015;5(2), e1054598.
78. Zhu W, Germain C, Liu Z, Sebastian Y, Devi P, Knockaert S, Brohawn P, Lehmann K, Damotte D, Validire P, Yao Y, Valge-Archer V, Hammond S, Dieu-Nosjean MC, Higgs BW. A high density of tertiary lymphoid structure B cells in lung tumors is associated with increased CD4+ T cell receptor repertoire clonality. *Oncoimmunology*. 2015;4(12), e1051922.
79. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):441–51.
80. Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res*. 2006;66(15):7741–7.
81. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, Hagn M, Kaltenmeier C, Barth TF, Beyer T, Reister F, Fabricius D, Lotfi R, Lunov O, Nienhaus GU, Simmet T, Kreienberg R, Möller P, Schrezenmeier H, Jahrsdörfer B. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res*. 2013;73(8):2468–79.
82. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, Malchinkhuu E, Wersto RP, Biragyn A. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*. 2011;71(10):3505–15.
83. Doi T, Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Jun L, Ono Y, Hayashi A, Hibi T. IgA plasma cells express the negative regulatory co-stimulatory molecule programmed cell death 1 ligand and have a potential tolerogenic role in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(4):918–23.
84. Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun*. 2015;6:5997.
85. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*. 2000;1(6):475–82.

86. Brown K, Sacks SH, Wong W. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol.* 2011;41(1):89–96.
87. Li W, Bribiesco AC, Nava RG, Brescia AA, Ibricevic A, Spahn JH, Brody SL, Ritter JH, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ, Kreisel D. Lung transplant acceptance is facilitated by early events in the graft and is associated with lymphoid neogenesis. *Mucosal Immunol.* 2012;5(5):544–54.
88. Haybaeck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U, Kurrer MO, Bremer J, Iezzi G, Graf R, Clavien PA, Thimme R, Blum H, Nedospasov SA, Zatloukal K, Ramzan M, Ciesek S, Pietschmann T, Marche PN, Karin M, Kopf M, Browning JL, Aguzzi A, Heikenwalder M. A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* 2009;16(4):295–308.
89. Ammirante M, Luo JL, Grivnenkov S, Nedospasov S, Karin M. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2010;464(7286):302–5.
90. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol.* 2006;7(4):344–53.
91. Cherrier M, Sawa S, Eberl G. Notch, Id2, and ROR γ t sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells. *J Exp Med.* 2012;209(4):729–40.
92. Marinkovic T, Garin A, Yokota Y, Fu YX, Ruddle NH, Furtado GC, Lira SA. Interaction of mature CD3+CD4+ T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J Clin Invest.* 2006;116(10):2622–32.
93. Furtado GC, Pacer ME, Bongers G, Bénézech C, He Z, Chen L, Berin MC, Kollias G, Caamaño JH, Lira SA. TNF α -dependent development of lymphoid tissue in the absence of ROR γ t lymphoid tissue inducer cells. *Mucosal Immunol.* 2014;7(3):602–14.
94. Martinet L, Girard JP. Regulation of tumor-associated high-endothelial venules by dendritic cells: A new opportunity to promote lymphocyte infiltration into breast cancer? *Oncoimmunology.* 2013;2(11), e26470.
95. Geurts van Kessel CH, Willart MA, Bergen IM, van Rijt LS, Muskens F, Elewaut D, Osterhaus AD, Hendriks R, Rimmelzwaan GF, Lambrecht BN. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med.* 2009;206(11):2339–49.
96. Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, Suezzer Y, Hämmerling G, Garbi N, Sutter G, Worbs T, Förster R. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J Exp Med.* 2009;206(12):2593–601.
97. Foo SY, Zhang V, Lalwani A, Lynch JP, Zhuang A, Lam CE, Foster PS, King C, Steptoe RJ, Mazzone SB, Sly PD, Phipps S. Regulatory T cells prevent inducible BALF formation by dampening neutrophilic inflammation. *J Immunol.* 2015;194(9):4567–76.
98. Joshi NS, Akama-Garren EH, Lu Y, Lee DY, Chang GP, Li A, DuPage M, Tammela T, Kerper NR, Farago AF, Robbins R, Crowley DM, Bronson RT, Jacks T. Regulatory T cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures suppress anti-tumor T cell responses. *Immunity.* 2015;43(3):579–90.
99. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2005;18(1):21–5.
100. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, Koutsky LA. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 2006;354(25):2645–54.
101. Maldonado L, Teague JE, Morrow MP, Jotova I, Wu TC, Wang C, Desmarais C, Boyer JD, Tycko B, Robins HS, Clark RA, Trimble CL. Intramuscular therapeutic vaccination targeting HPV16 induces T cell responses that localize in mucosal lesions. *Sci Transl Med.* 2014;6(221):221ra13.
102. Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3520–6.
103. Lutz ER, Wu AA, Bigelow E, Sharma R, Mo G, Soares K, Solt S, Dorman A, Wamwea A, Yager A, Laheru D, Wolfgang CL, Wang J, Hruban RH, Anders RA, Jaffee EM, Zheng

- L. Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(7):616–31.
104. Weber J, Thompson JA, Hamid O, Minor D, Amin A, Ron I, Ridolfi R, Assi H, Maraveyas A, Berman D, Siegel J, O'Day SJ. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5591–8.
 105. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, Waterfield W, Schadendorf D, Smylie M, Guthrie Jr T, Grob JJ, Chesney J, Chin K, Chen K, Hoos A, O'Day SJ, Lebbé C. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):155–64.
 106. O'Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V, Gajewski TF, Pehamberger H, Bondarenko IN, Queirolo P, Lundgren L, Mikhailov S, Roman L, Verschraegen C, Humphrey R, Ibrahim R, de Pril V, Hoos A, Wolchok JD. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol.* 2010;21(8):1712–7.
 107. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor D, Salama AK, Taylor M, Ott PA, Rollin LM, Horak C, Gagnier P, Wolchok JD, Hodi FS. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2006–17.
 108. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, Spigel DR, Antonia SJ, Rizvi NA, Powderly JD, Heist RS, Carvajal RD, Jackman DM, Sequist LV, Smith DC, Leming P, Carbone DP, Pinder-Schenck MC, Topalian SL, Hodi FS, Sosman JA, Sznol M, McDermott DF, Pardoll DM, Sankar V, Ahlers CM, Salvati M, Wigginton JM, Hellmann MD, Kollia GD, Gupta AK, Brahmer JR. Overall survival and long-term safety of Nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(18):2004–12.
 109. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmfi B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348(6230):124–8.
 110. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3—potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):45–56.
 111. McDermott DF, Atkins MB. PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med.* 2013;2(5):662–73.
 112. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–64.
 113. Martinet L, Filleron T, Le Guellec S, Rochemaux P, Garrido I, Girard JP. High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin β -producing dendritic cells in human breast cancer. *J Immunol.* 2013;191(4):2001–8.
 114. Väyrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Mäkelä J, Herzig KH, Karttunen TJ, Tuomisto A, Mäkinen MJ. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer.* 2014;134(9):2126–35.
 115. McMullen TP, Lai R, Dabbagh L, Wallace TM, de Gara CJ. Survival in rectal cancer is predicted by T cell infiltration of tumour-associated lymphoid nodules. *Clin Exp Immunol.* 2010;161(1):81–8.
 116. Wirsing AM, Rikardsen OG, Steigen SE, Uhlin-Hansen L, Hadler-Olsen E. Characterisation and prognostic value of tertiary lymphoid structures in oral squamous cell carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2014;14:38.
 117. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Kanai Y, Kosuge T, Shimada K. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2015;112(11):1782–90.



Chapter 12

Identification of Tertiary Lymphoid Structure-Associated Follicular Helper T Cells in Human Tumors and Tissues

Coline Couillault, Claire Germain, Bertrand Dubois, and Hélène Kaplon

Abstract

Follicular helper T (T_{fh}) cells are major components of the humoral immune response due to their pivotal role in germinal center formation and antibody affinity maturation following B-cell isotype switching. This CD4⁺ T-cell subtype is mainly found in the B-cell zone of secondary lymphoid organs as well as in tertiary lymphoid structures (TLS), which are highly organized structures composed of T and B cells, occasionally found at the invasive margin in the tumor microenvironment.

We describe here how to perform immunofluorescence staining of tumor tissue sections and multi-color flow cytometry on tumor cell suspensions to identify and visualize these TLS-associated T_{fh} cells within the tumor microenvironment of various human cancers. These assays take advantage of combinations of markers and molecules involved in T_{fh} differentiation and function.

Key words Tumor, Paraffin-embedded tissue, Follicular helper T cell, Tertiary lymphoid structure, Immunofluorescence, Flow cytometry, Multiplex, PD-1, CXCR5, Bcl-6

Abbreviations

Bcl-6	B-cell lymphoma 6
CXCL13	C-X-C motif chemokine 13
CXCR5	C-X-C chemokine receptor type 5
FBS	Fetal bovine serum
FDC	Follicular dendritic cell
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
GC	Germinal center
HCC	Hepatocellular carcinoma
HS	Human serum
ICOS	Inducible costimulator
IF	Immunofluorescence
LN	Lymph node
mDC	Mature dendritic cell
NSCLC	Non-small cell lung cancer

PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Plasma cell
PD-1	Programmed death-1
RT	Room temperature
SLO	Secondary lymphoid organ
Tfh	Follicular helper T cell
TLS	Tertiary lymphoid structure

1 Introduction

Follicular helper T (Tfh) cells constitute a CD4⁺ T-cell subset dedicated to provide T-cell help to B cells and mainly found within germinal centers (GC) of B-cell follicles. Tfh cells support GC reactions and provide critical signals to B cells allowing antibody isotype switching, antibody affinity maturation, and B-cell differentiation into memory B cells and plasma cells (PC) [1]. GC Tfh cells are characterized by high surface expression of CXCR5 (C-X-C chemokine receptor type 5), PD-1 (programmed death-1), and inducible costimulator (ICOS); expression of the transcription factor Bcl-6 (B-cell lymphoma 6) in the nucleus; and secretion of IL-21, IL-4, and CXCL13 (C-X-C motif chemokine 13). The expression of CXCR5 by Tfh cells allows their homing to the B-cell follicle in response to gradients of CXCL13.

In solid tumors, Tfh cells are detected in lymph node-like structures with segregated T- and B-cell zones, called tertiary lymphoid structures (TLS) [2, 4]. The presence of these cells in tumor-associated TLS may suggest an ongoing local B-cell activation process leading to the differentiation of specific memory B cells and PC, whose presence predicts better patient survival in many solid cancer types [2–5]. Recent studies highlighted that the presence of a Tfh gene signature was associated with better clinical outcome in several cancer types, including breast cancer [6], colorectal cancer [7], and non-small cell lung cancer (NSCLC) [8]. Consistently, a higher risk of relapse has been observed in patients with CXCL13 deletion in colorectal cancer, probably due to lower densities of Tfh cells and B cells [7]. These findings strongly suggest that B-cell differentiation supported by tumor-infiltrating Tfh cells is a critical component of efficient antitumor immunity.

If the presence of TLS has been clearly correlated with a better prognosis in terms of survival in many solid tumors [9], the mechanisms of TLS neogenesis however are still unclear. Several factors seem to regulate their formation such as TNF family members (lymphotoxin [10, 11], LIGHT [12], BAFF [13]), cytokines (IL-17 [14], IL-6 [15], IL-22 [16]), and chemokines (CCL19/CCL21 [17, 18], CXCL13 [19, 20]). In this context, Tfh cells

may participate in TLS formation and maintenance through their capacity to secrete CXCL13, sustaining a local microenvironment controlling tumor growth [21, 22].

In this chapter, we describe complementary multiplex methods, i.e., two methods of immunofluorescence (IF) tissue staining (three- and five-color) on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections, and one method of flow cytometry analysis of cell suspensions prepared from fresh tumor samples, to efficiently detect in situ TLS-associated Tfh using NSCLC and hepatocellular carcinoma (HCC) as examples.

2 Materials

2.1 Samples

1. Five- μ m-thick FFPE TLS-associated NSCLC tumor and lymph node (LN) sections.
2. Fresh HCC tumor samples.

2.2 Buffers

2.2.1 Visualization of TLS-Associated Tfh on FFPE Tumor Tissue by Triple-CD20/CD3/PD-1 Immunofluorescence Staining

1. 100% Xylene or Clearene (Leica).
2. 100% Absolute ethanol.
3. Distilled water.
4. Ethanol solutions at 90, 70, and 50%.
5. 10 $\times$ TBS: 47.4 g Trizma[®] hydrochloride + 263 g sodium chloride, in 3 L of distilled water; pH adjusted to 7.4.
6. 1 $\times$ TBS: 1 Volume of 10 $\times$ TBS + 9 volumes of distilled water.
7. TBS-T: 1 $\times$ TBS + 0.04% Tween 20.
8. Phosphate-buffered saline (PBS).

2.2.2 Detection of TLS-Associated Tfh on FFPE Tumor Sections by Multiplex CD3/CD4/CD20/Bcl6 IF Staining

1. 10 $\times$ EZ Prep (deparaffinization solution) (Ventana): Needs to be reconstituted in type 2 pure water.
2. Pre-diluted Cell Conditioner #1 (CC1) solution: Tris-EDTA buffer pH 8.5 for antigen retrieval (Ventana).
3. 10 $\times$ Reaction Buffer (Ventana): Needs to be reconstituted in type 2 pure water.
4. Discovery Inhibitor (Ventana): Peroxidase blocking solution containing hydrogen peroxide between 1 and 5%.
5. 10 $\times$ TBS: 47.4 g Trizma[®] hydrochloride + 263 g sodium chloride in 3 L distilled water; pH adjusted at 7.4.
6. 1 $\times$ TBS: 1 Volume of 10 $\times$ TBS + 9 volumes of distilled water.

2.2.3 Tfh Identification by Multiparametric Flow Cytometry from Fresh Tumor Tissue

1. Complete RPMI: RPMI medium supplemented with 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

2.3 Reagents

2.3.1 Visualization of TLS-Associated Tfh on FFPE Tumor Tissue by Triple-CD20/CD3/PD-1 Immunofluorescence Staining

2. Complete RPMI medium without FBS: RPMI medium supplemented with 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin.
3. Phosphate-buffered saline (PBS).
4. Staining buffer: PBS supplemented with 5 mM EDTA.

1. Antigen retrieval solution: Target Retrieval Solution pH 6 (TRS, Dako, 10×; 1 volume + 9 volumes of distilled water, pH adjusted to 6).
2. 5% HS: 5% Decomplemented human serum diluted in PBS.
3. Antibody diluent (Dako REAL™, Dako).
4. Primary antibodies: Mouse anti-human CD20 (clone L26), rabbit anti-human CD3 (polyclonal IgG), and mouse anti-human PD-1 (clone NAT105) antibodies (*see* Table 1).
5. Secondary antibodies: Goat anti-mouse IgG2a-FITC, donkey anti-rabbit IgG-Cy3 (F(ab')₂), and goat anti-mouse IgG1-biotin (F(ab')₂) antibodies (*see* Table 1).
6. Streptavidin-AF647.
7. Mounting Medium with DAPI (ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI, Life Technologies).

2.3.2 Detection of TLS-Associated Tfh on FFPE Tumor Sections by Multiplex CD3/CD4/CD20/Bcl6 IF Staining

1. Primary antibodies: Mouse anti-human Bcl6 (clone GI191E/A8), rabbit anti-human CD4 (clone SP35), rabbit anti-human CD3 (clone 2GV6), mouse anti-human CD20 (clone L26) antibodies (*see* Table 1).
2. Secondary antibodies: OmniMap goat anti-rabbit coupled to HRP (ready to use) and OmniMap goat anti-mouse coupled to HRP (ready to use) (*see* Table 1).
3. Antibody diluent (Dako REAL™, Dako).
4. 9% Hydrogen peroxide.
5. Tyramide-fluorophore conjugates: Alexa Fluor AF546 tyramide reagent (Thermo Fisher), Alexa Fluor AF594 tyramide reagent (Thermo Fisher), Alexa Fluor AF647 tyramide reagent (Thermo Fisher), Alexa Fluor AF488 tyramide reagent (Thermo Fisher) (*see* Table 1).
6. DAPI solution (initial concentration 1 mg/mL, Thermo Fisher).
7. ProLong® Mounting medium without DAPI (Thermo Fisher).

2.3.3 Tfh Identification by Multiparametric Flow Cytometry from Fresh Tumor Tissue

1. Enzymes: Collagenase IA (Sigma Aldrich) and DNase I (Sigma Aldrich) endotoxin-free.
2. Türk's solution (EMD Millipore).
3. Zombie Yellow viability marker (BioLegend).

Table 1
List of reagents used to detect Tfh by immunofluorescence and flow cytometry

Antibody or reagent	Conjugate	Host	Clone	Source	Reference	Working dilution
<i>IHC/IF</i>						
CD20	UC	Mouse IgG2a	L26	Agilent/Dako	M0755	1/250
CD3	UC	Rabbit IgG	Polyclonal	Agilent/Dako	A0452	1/80
PD-1	UC	Mouse IgG1	NAT105	Roche	760-4895	Ready to use
Mouse IgG2a	FITC	Goat IgG	Polyclonal	JIR	115-545-206	1/100
Rabbit IgG	Cy3	Donkey IgG	Polyclonal	JIR	711-165-152	1/100
Mouse IgG1	Biotin	Goat IgG	Polyclonal	JIR	115-065-205	1/100
Streptavidin	AF647	NA	NA	JIR	016-600-084	1/100
<i>Multiplex</i>						
Bcl6	UC	Mouse IgG1	GI191E/A8	Ventana	760-4241	Ready to use
CD3	UC	Rabbit IgG	2GV6	Ventana	790-4341	Ready to use
CD4	UC	Rabbit	SP35	Ventana	790-4423	Ready to use
CD20	UC	Mouse IgG2a	L26	Agilent/Dako	M0755	1/250
OmniMap rabbit	HRP	Goat	NA	Ventana	760-4311	Ready to use
OmniMap mouse	HRP	Goat	NA	Ventana	760-4310	Ready to use
Tyramide	AF546	NA	NA	Thermo Fisher	B40954	1/100
Tyramide	AF594	NA	NA	Thermo Fisher	B40957	1/100
Tyramide	AF647	NA	NA	Thermo Fisher	B40958	1/100
Tyramide	AF488	NA	NA	Thermo Fisher	B40953	1/100
<i>Flow cytometry</i>						
CD45	AF700	Mouse IgG1	HI30	BD Biosciences		1/25
CD3	APC-H7	Mouse IgG1	SK7	BD Biosciences		1/25
CD4	FITC	Mouse IgG1	RPA-T4	BS Biosciences		1/25

(continued)

Table 1
(continued)

Antibody or reagent	Conjugate	Host	Clone	Source	Reference	Working dilution
PD1	BV605	Mouse IgG1	EH12.1	BD Biosciences		1/25
CXCR5	PE-Vio615	Recombinant human IgG	REA103	Miltenyi Biotec		1/10
ICOS	VioBLUE	Recombinant human IgG	REA1192	Miltenyi Biotec		1/10
Bcl6	PE	Mouse IgG1	H112.91	BD Biosciences		1/10
Mouse IgG1	BV605	Mouse IgG1	X40	BD Biosciences		1/25
Rea Control	PE-Vio615	Recombinant human IgG	REA293	Miltenyi Biotec		1/10
Rea Control	VioBlue	Recombinant human IgG	REA293	Miltenyi Biotec		1/10
Mouse IgG1	PE	Mouse IgG1	MOPC-21	BD Bioscience		1/25

The first two parts are dedicated to immunofluorescence. The last part described the characteristics of the primary antibodies used for flow cytometry. Abbreviations: *UC* unconjugated and *NA* not available

4. Foxp3/transcription factor staining buffer kit: Fixation/permeabilization buffer and permeabilization buffer (eBioscience).
5. Primary antibodies: Anti-human CD45-Alexa Fluor 700 (BD Biosciences), anti-human CD3-APC-H7 (BD Biosciences), anti-human CD4-FITC (BD Biosciences), anti-human PD1-BV605 (BD Biosciences), CXCR5-PE-Vio615 (Miltenyi Biotec), ICOS-VioBlue (Miltenyi Biotec), anti-human Bcl6-PE (BD Biosciences), mouse IgG1-BV605 (BD Biosciences), Rea Control-PE-Vio615 (Miltenyi Biotec), Rea Control-VioBlue (Miltenyi Biotec), mouse IgG1-PE (BD Biosciences) antibodies (*see* Table 1).

2.4 Specific Equipment

2.4.1 Visualization of TLS-Associated Tfh on FFPE Tumor Tissue by Triple-CD20/CD3/PD-1 Immunofluorescence Staining

1. Drying oven.
2. Laboratory fume hood.
3. Glass containers for slides.
4. Plastic containers for slides.
5. Water bath.
6. Absorbent papers.
7. Humidified chamber.

**2.4.2 Detection
of TLS-Associated Tfh
on FFPE Tumor Sections
by Multiplex CD3/CD4/
CD20/Bcl6 IF Staining**

8. Glass coverslips.
9. Slide scanner: Axio Scan.Z1 fluorescence slide scanner, driven by Zen 2012 (blue edition) (Zeiss), or equivalent.

**2.4.3 Tfh Identification
by Multiparametric Flow
Cytometry from Fresh
Tumor Tissue**

1. Drying oven.
2. Plastic containers for slides.
3. Water bath.
4. Glass coverslips.
5. Ventana Discovery XT autostainer.
6. Confocal microscope LSM710 (Zeiss).
1. Sterile jars.
2. 50 mL Falcon tubes.
3. 10 mm Petri dishes.
4. Forceps.
5. Water bath.
6. 70 μ m Cell strainers.
7. Magnetic stirrer.
8. Nonsterile V-bottom 96-well plates.
9. 1.2 mL Tubes (Micronic).
10. LSR Fortessa analyzer (BD Biosciences).
11. FlowJo[®] software (Tree Star).

3 Methods

**3.1 Visualization
of TLS-Associated Tfh
on FFPE Tumor Tissue
by Triple-CD20/CD3/
PD-1 Immuno-
fluorescence Staining**

1. Dry the slides for a minimum of 30 min (or overnight) in a drying oven at 37 °C.
2. Deparaffinize the slides: Under a laboratory fume hood, immerse the slides in three successive baths of 100% xylene (or Clearene), for 5 min each, then in one bath of absolute ethanol for 5 min, one bath of 90% ethanol for 5 min, one bath of 70% ethanol for 5 min, one bath of 50% ethanol for 5 min, and one bath of distilled water for 5 min (use glass containers for slides) at room temperature (RT).
3. Retrieval of antigens: Immerse the slides in a bath of pre-warmed antigen retrieval solution (TRS, pH 6) for 30 min at 97 °C (in a water bath; use a plastic container for slides).
4. Take out the plastic container from the water bath and let it cool for 30 min at RT, on the bench.
5. Wash the slides in 1 TBS for 5 min under gentle agitation at RT (use a glass container for slides) (*see Note 1*).

6. Dry the slides with absorbent papers (*see Note 2*).
7. Place the slides in a humidified chamber.
8. Cover the tissue with 5% HS, for 30 min at RT (for saturation of the receptors for the Fc portion of immunoglobulins). In general, 100–300 μL /tissue section is sufficient.
9. Simply remove the excess of HS (do not wash) and dry the slides with absorbent papers.
10. Cover the tissue with diluted primary antibodies: mouse anti-human CD20 (clone L26) + rabbit anti-human CD3 (polyclonal IgG) in the mouse anti-human PD-1 (clone NAT105); 100–300 μL /tissue section is sufficient (*see Table 1*). Incubate for 1.5 h at RT.
11. Wash the slides twice in TBS-T for 5 min under gentle agitation.
12. Dry the slides with absorbent papers.
13. Cover the tissue with diluted secondary antibodies: goat anti-mouse IgG2a-FITC + donkey anti-rabbit IgG-Cy3 + goat anti-mouse IgG1-biotin in TBS (*see Table 1*). Incubate for 30 min at RT.
14. Wash the slides twice in TBS-T for 5 min under agitation.
15. Dry the slides with absorbent papers.
16. Cover the tissue with streptavidin-AF647 in TBS, and incubate for 30 min at room temperature (*see Table 1*).
17. Wash the slides twice in TBS-T for 5 min under gentle agitation.
18. Wash the slides in 1 $\times$ TBS for 5 min under gentle agitation.
19. Wash the slides in distilled water for 5 min under gentle agitation (*see Note 3*).
20. Mount the slides with glass coverslips using ProLong[®] with DAPI.
21. Let dry the slides at RT in the dark for a maximum of 1 h. Store the slides at 4 °C in the dark until scanning (or at –20 °C for a longer period of time).
22. Scan the slides with a fluorescence slide scanner (Axio Scan. Z1/Zen 2012, blue edition/Zeiss, or equivalent) (Fig. 1) (*see Notes 4 and 5*).

**3.2 Detection
of TLS-Associated Tfh
on FFPE Tumor
Sections by Multiplex
CD3/CD4/CD20/Bcl6 IF
Staining**

1. Prior to the staining process, dry the slides for a minimum of 30 min (or overnight) in a drying oven at 37 °C.
2. In Ventana Discovery XT autostainer (*see Notes 6 and 7*), select deparaffinization step, in EZ prep buffer 75 °C, 8 min.
3. Choose cell conditioning using Cell Conditioner #1 (CC1) for antigen retrieval step at 95 °C for 44 min (*see Note 8*).

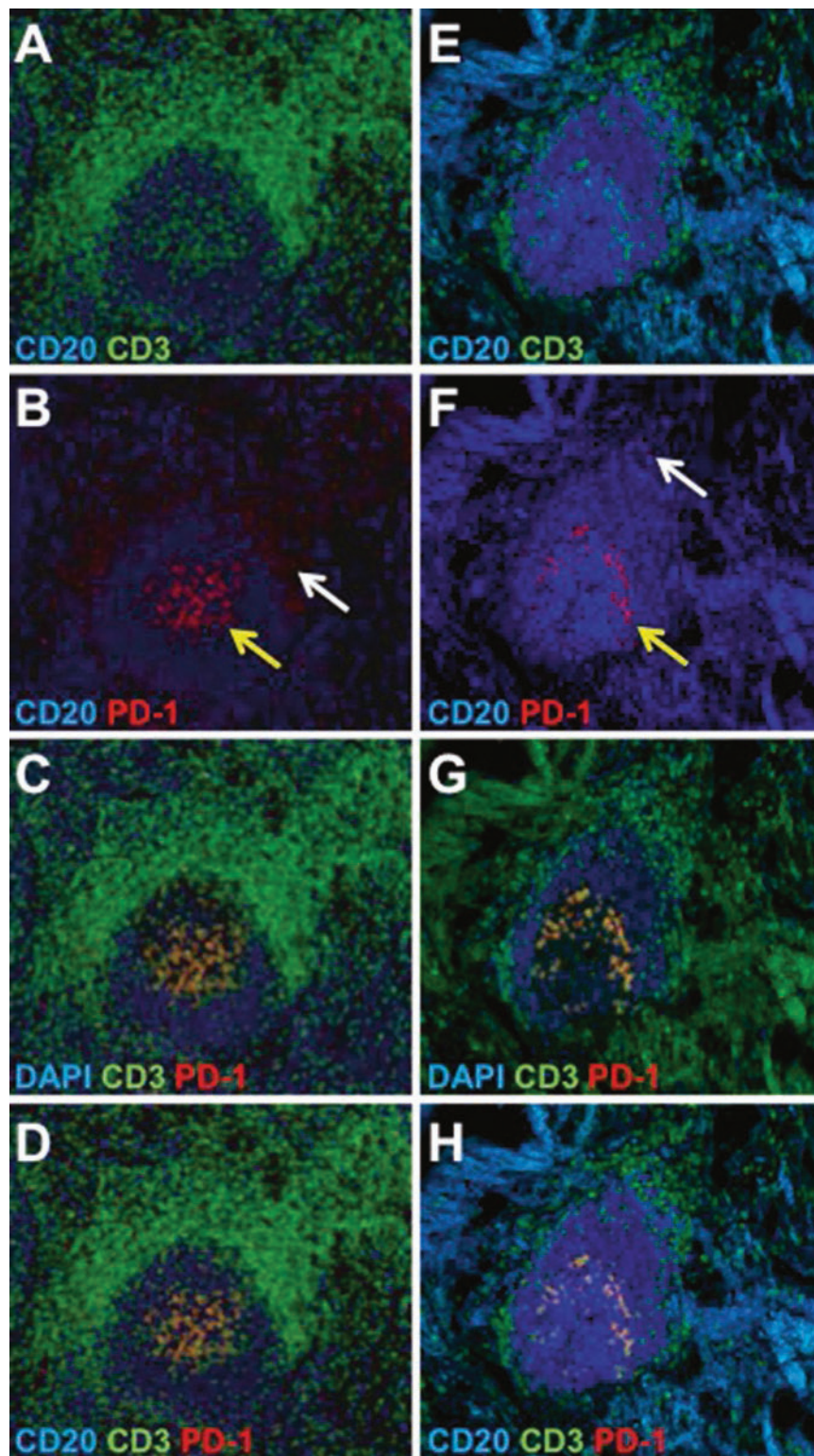


Fig. 1 Triple-IF stainings of FFPE sections from NSCLC-derived LN (a–d) or NSCLC tumor tissue (e–h) using antibodies against human CD20 (panels a–b, d, e–f, h), CD3 (panels a, c–d, e, g–h), PD-1 (panels b–d, f–h), and DAPI (panels c and g). (e–h) Focus on a TLS within NSCLC tissue. Yellow and white arrows (b, f) indicate PD-1^{bright} cells and PD-1^{+/dim} cells, respectively. Magnification: $\times 200$

4. Select blocking step to block endogenous peroxidases with one drop of Discovery Inhibitor, at RT for 8 min.
5. Select “primary antibody” to cover the tissue with 100 μ L of ready-to-use mouse anti-human Bcl6 (clone GI191E/A8) for 32 min at 37 °C.
6. Select “multimer” to incubate the slides with 100 μ L of ready-to-use secondary antibody (OmniMap mouse Ventana coupled to HRP) for 12 min.
7. Remove the slides from the Ventana autostainer and wash the slides extensively using a solution containing detergent.
8. Rinse for 2 min, three times.
9. Prepare hydrogen peroxide solution at 0.15% by diluting the stock 9% H₂O₂ in distilled water (solution A).
10. Dilute both tyramide component coupled to Alexa Fluor 546 (100 $\times$) and Solution A at 1/100 in 1 $\times$ TBS to prepare Solution B (*see Note 9*).
11. Incubate each slide with 200 μ L of Solution B at RT for 10 min.
12. Wash the slides twice in cold distilled water.
13. Put the slides in the Ventana autostainer.
14. Select dual sequence and apply antibody denaturation at 90 °C during 12 min (*see Note 10*).
15. Select “primary antibody” to cover the tissue with 100 μ L of ready-to-use mouse anti-human CD3 (clone 2GV6) for 40 min at 37 °C.
16. As previously, select “multimer” to incubate the slides with 100 μ L of ready-to-use OmniMap goat anti-rabbit coupled to HRP for 12 min.
17. Repeat **steps 7–9**.
18. Dilute both tyramide component coupled to Alexa Fluor 594 (100 $\times$) and Solution A at 1/100 in 1 $\times$ TBS to prepare Solution C (*see Note 9*).
19. Incubate each slide with 200 μ L of Solution C at RT for 10 min.
20. Wash the slides twice in cold distilled water.
21. Put the slides in the Ventana autostainer.
22. Select dual sequence and apply antibody denaturation at 90 °C during 12 min.
23. Select “primary antibody” to cover the tissue with 100 μ L of ready-to-use mouse anti-human CD4 (clone SP35) at 37 °C for 12 min.

24. Select “multimer” to incubate the slides with 100 μ L of ready-to-use OmniMap goat anti-rabbit coupled to HRP, at 37 °C for 16 min.
25. Repeat **steps 7–9**.
26. Dilute both tyramide component coupled to Alexa Fluor 647 (100 $\times$) and Solution A at 1/100 in 1 $\times$ TBS to prepare Solution D (*see Note 9*).
27. Incubate each slide with 200 μ L of Solution D at RT for 10 min.
28. Wash the slides twice in cold distilled water.
29. Put the slides in the Ventana Discovery XT autostainer.
30. Select dual sequence and apply antibody denaturation at 90 °C during 12 min.
31. Apply manually 100 μ L of mouse anti-human CD20 (clone L26, diluted at 1/250 in antibody diluent) in the Ventana Discovery XT, at 37 °C for 60 min.
32. Apply secondary antibody: ready-to-use OmniMap goat anti-mouse coupled to HRP, at 37 °C for 12 min.
33. Repeat **steps 7–9**.
34. Dilute both tyramide component coupled to Alexa Fluor 488 (100 $\times$) and Solution A at 1/100 in TBS 1 $\times$ to prepare Solution E (*see Note 9*).
35. Incubate each slide with 200 μ L of Solution E at RT for 10 min.
36. Wash the slides twice in cold distilled water.
37. Apply 200 μ L of DAPI solution (at 1 μ g/mL in TBS 1 $\times$) for nucleus staining. Incubate at RT for 12 min (*see Note 11*).
38. Wash the slides twice in cold distilled water.
39. Mount the slides with glass coverslips using ProLong® Gold mounting medium without DAPI.
40. Scan some fields in the slides using a confocal microscope (LSM710 Zeiss or equivalent).
41. View digital images using the Zen (black) imaging software (Fig. 2) (*see Notes 12–14*).

3.3 Tfh Identification by Multiparametric Flow Cytometry from Fresh Tumor Tissue

1. Place the tissue in a petri dish using forceps.
2. Dilacerate the tumor tissue in pieces of up to 2 mm using a scalpel in complete RPMI medium without FBS (about 1 mL for 500 mg of tissue).
3. Transfer the tissue pieces with the medium into a sterile jar.
4. Add collagenase IA and DNase I to reach a final concentration of 1.25 mg/mL and 100 μ g/mL, respectively, in a final

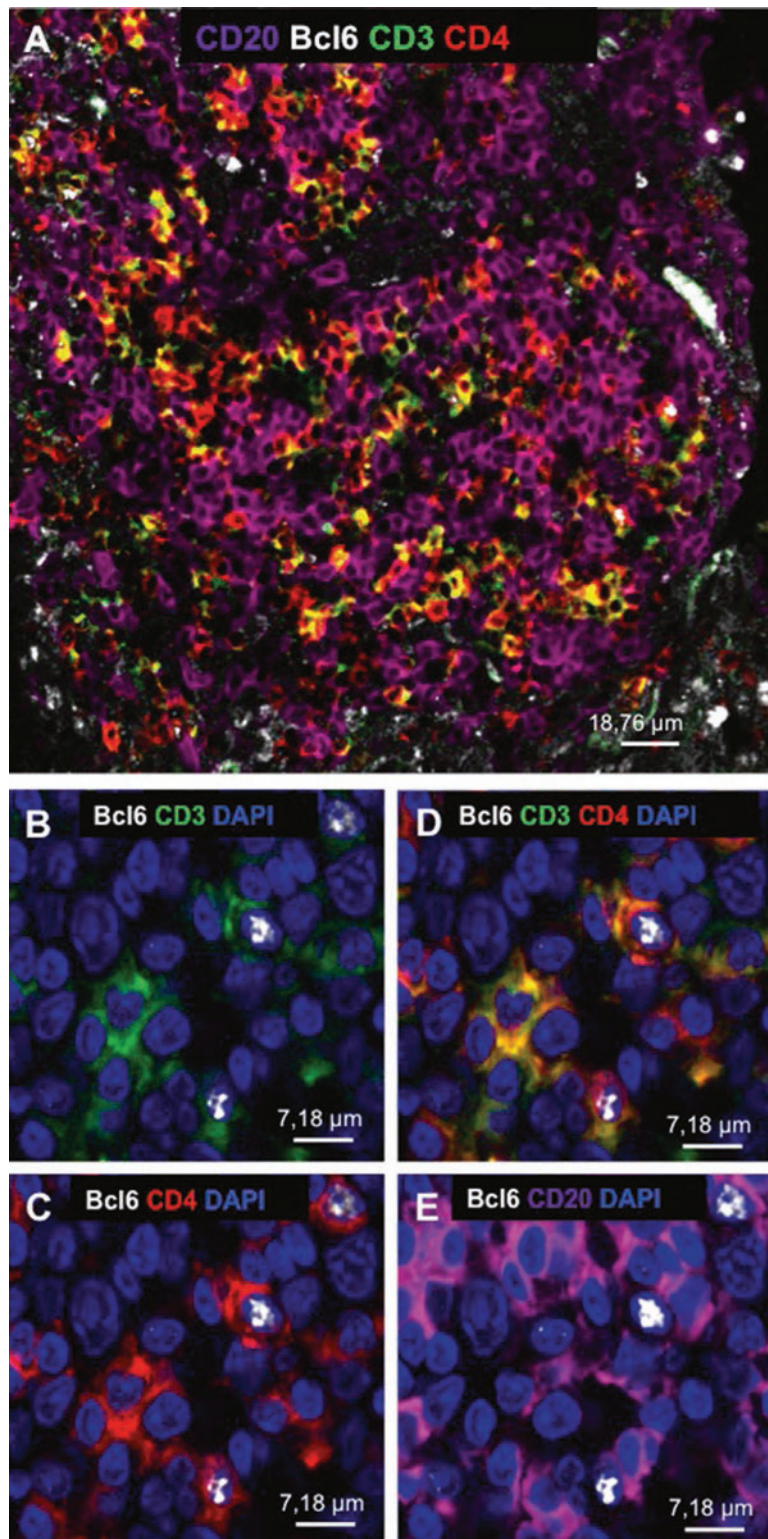


Fig. 2 Confocal imaging of a FFPE NSCLC tumor section using multiplex immunofluorescence. (a) Numerous CD3⁺ (green) CD4⁺ (red) T cells can be identified

- volume of 10 mL of complete RPMI without FBS (*see* **Notes 15** and **16**).
5. Proceed to enzymatic digestion by incubating tissue pieces for 45 min at 37 °C under magnetic agitation in a cell incubator with 5% CO₂ (*see* **Note 17**).
 6. Transfer the digested material in a 50 mL Falcon tube and centrifuge for 8 min at 350 *g*.
 7. Remove the supernatant and resuspend the pellet in 10 mL of complete RPMI medium.
 8. Filter the cell suspension through a 70 µm cell strainer and use a 10 mL syringe plunger to crush the remaining tumor fragments.
 9. Rinse the cell strainer and complete with RPMI medium up to 50 mL.
 10. Centrifuge for 8 min at 350 *g* at RT.
 11. Resuspend the pellet in 1–10 mL of complete RPMI medium depending on pellet size.
 12. Dilute 10 µL of cells in 90 µL of Türk's solution which destroys red blood cells to count them with a FastRead slide or equivalent.
 13. Resuspend 6×10^6 of cells per tissue of interest in 5 mL of complete RPMI medium.
 14. Incubate cells for a minimum of 1 h at 37 °C in a water bath to allow re-expression of CXCR5 on the cell surface (*see* **Note 18**).
 15. Prepare the antibody mix and the corresponding isotype controls (*see* Table 1 and **Note 19**).
 16. Centrifuge the cells for 8 min at 350 *g* at +4 °C.
 17. Discard the supernatant and resuspend the cells in 150 µL of the viability marker solution (Zombie Yellow diluted in 1× PBS at 1/400).
 18. Transfer 50 µL of the cell suspension in 96-well plate wells containing either antibody mix, isotype controls, or staining buffer only.
 19. Incubate for 30 min at +4 °C.

Fig. 2 (continued) (in yellow) within the CD20⁺ B-cell zone (purple) of TLS. **(b–e)** Visualization of Tfh cells within TLS. A higher magnification of Panel **(a)** enables the visualization of **(b)** CD3⁺ (green) and **(c)** CD4⁺ (red) cells. **(d)** Merge of **(b)–(c)** shows that some CD3⁺ CD4⁺ T cells (yellow) express Bcl6 (white), a master regulator of Tfh differentiation. **(e)** These Bcl6⁺ cells (white) are visualized within the CD20⁺ B-cell zone of TLS (purple), but do not express the B-cell marker CD20

20. Wash the cells with 100 μ L of PBS in each well and centrifuge for 5 min at 400 *g* at +4 °C.
21. Discard the supernatant and resuspend the cells in 50 μ L of fixation/permeabilization buffer per well.
22. Incubate for 10 min at +4 °C.
23. Centrifuge for 5 min at 400 *g* at +4 °C.
24. Remove the supernatant. Proceed to intranuclear staining by incubating the cells with antibody mix or isotype controls previously prepared in 50 μ L of permeabilization buffer (Table 1).
25. Incubate for 20 min at 4 °C in the dark.
26. Wash the cells twice with 100 μ L of permeabilization buffer at 400 *g* for 5 min.
27. Discard the supernatant.
28. Resuspend the cells with 150 μ L staining buffer and transfer into Micronic tubes.
29. Rinse the tubes with 150 μ L staining buffer and transfer into the same Micronic tubes.
30. Flow cytometry data are acquired with a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) within 2 days after staining and analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

4 Notes

1. After antigen retrieval, it is possible to let the slides in a bath of 1 $\times$ TBS overnight at RT before continuing the experiment.
2. When drying the slides with absorbent papers, pay attention to the tissue. Also, treat the slides one by one: do not let the slides dry for more than 2 min before adding the following reagent.
3. To better control DAPI intensity, it is possible (after **step 19**) to incubate the slides with a DAPI solution (working concentration: 50 μ g/mL in 1 $\times$ TBS, Life Technologies), for 2 min (or less) at RT, and then to perform step 20 using a mounting medium without DAPI (ProLong[®] Gold Antifade Reagent, Life Technologies).
4. Tfh cells correspond to PD-1^{bright} cells within CD20⁺ B-cell follicles of LN and TLS from NSCLC patients (Fig. 1b, f, yellow arrows). However, some PD-1^{+/dim} cells can also be observed outside of the GC (Fig. 1b, f, white arrows).
5. Depending on the tissue, a lot of autofluorescence (collagen fibers) can be observed, especially in the FITC, and to a lesser extent in the Cy3, channel (Fig. 1e–h). For this reason, it is

advised to associate easily recognizable CD20⁺ B-cell follicles and CD3⁺ T cells with FITC and Cy3 channels, respectively, and to associate PD-1 with the AF647 channel.

6. Protocol can be performed on all Ventana machines (Ultra, Benchmark). However, optimizations may be necessary.
7. Multiplexing IF could be replaced by multiplexed immunohistochemistry with appropriate tyramide components. By IHC, the washing of the slides has to be completed with one bath of 50% ethanol followed by one bath of 70% ethanol, then one bath of 90% ethanol, one bath of absolute ethanol, and finally two baths of 100% xylene. This step is really important to remove residual paraffin which could interfere with staining analysis. Then, mount the slides with Cytoseal 60 toluene-based medium (Richard-Allan Scientific).
8. All antibodies work with Cell Conditioner #1 (CC1) in this case, but it is possible to perform another antigen retrieval step with CC2 (pH 6 citrate buffer).
9. Reconstitute prior to use tyramide coupled to Alexa Fluor reagent with 50 μ L of DMSO (100 $\times$ stock solution) according to the manufacturer's protocol.
10. The denaturation step is crucial to strip the preceding primary and secondary antibodies. Tyramides bind covalently to the tissue, so the denaturation step does not remove the signal.
11. Avoid using the ProLong[®] mounting medium with DAPI to get a better nucleus staining.
12. It is important to perform single staining for each fluorochrome to record reference emission spectra (library) in order to carry out spectra deconvolution. During image analysis, it is important to find an area with all stainings to avoid poor deconvolution.
13. Control tissues with expected positive staining for all markers must be included for each experiment. Human tonsil or LN is recommended to detect GC zones and Tfh cells, as a positive control of the staining.
14. The combination of CD3 and CD4 markers is essential to detect Tfh cells, as CD4⁺ cells could also represent macrophages or dendritic cells.
15. **Steps 1–3** in Subheading 3.3 have to be carried out in RPMI without FBS to avoid the inhibition of enzyme action.
16. Collagenase 1A can be used to digest the extracellular matrix of different tissue with addition of DNase I to eliminate DNA of dead cells during the digestion. Timing and concentration might have to be adjusted depending on the tissue. The protocol described here works for breast, ovarian, hepatic, and NSCLC tumors.

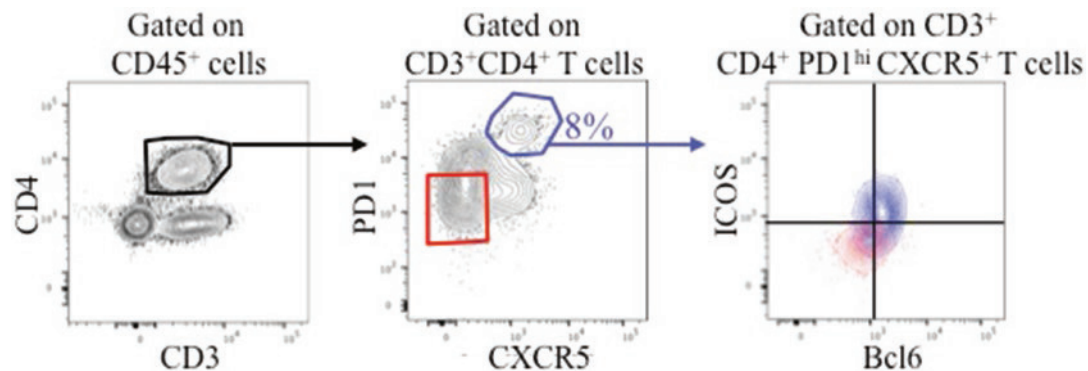


Fig. 3 Gating strategy for Tfh cell detection in hepatocellular carcinoma. After excluding debris and cell doublets, dead (Zombie Yellow⁺) cells were gated out. Then, on the CD45⁺ immune cell population, Tfh cells were identified as CD3⁺CD4⁺PD1^{hi}CXCR5⁺ T cells (blue gate). Tfh cell phenotype was confirmed with Bcl6 and ICOS expression. PD1^{lo} cells were used as a negative internal control for Bcl6 and ICOS expression

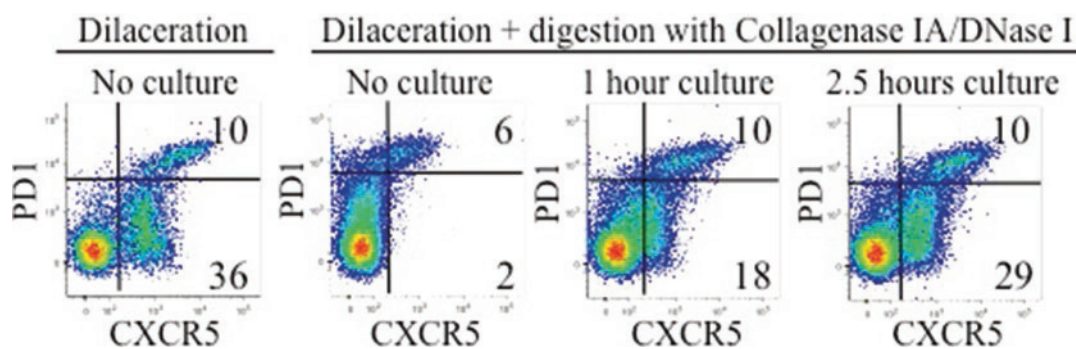


Fig. 4 Enzymatic digestion hampers surface CXCR5 detection by flow cytometry. Cells obtained by enzymatic digestion of tonsils were incubated at 37 °C in a water bath for 1 h and 2.5 h or were kept at 4 °C, and were then stained with the antibody mix (Table 1). Culture of cells prepared by enzymatic tissue digestion restores surface expression of CXCR5 and allows identification of bona fide PD1^{hi}CXCR5^{hi} Tfh by flow cytometry at a frequency similar to that observed after mechanical dissociation alone (or in the absence of enzymatic digestion)

17. Use of a water bath is preferable to maintain, over a short period, a constant temperature in the tube.
18. Tissue digestion with Collagenase IA leads to the shaving of CXCR5 which is one of the main markers allowing Tfh identification (Fig. 3). Re-expression of surface CXCR5 is optimally obtained after 2.5 h of incubation at 37 °C, but 1 h is enough to identify Tfh cells (*see* Fig. 4).
19. A negative control tube contains all the antibodies with the exception of antibodies directed against PD-1, CXCR5, ICOS, and Bcl6 that are replaced by matched isotype controls.

Funding

Hélène Kaplon was supported by a grant from La Ligue contre le Cancer. The work developed by B. Dubois's group was supported by the Ligue Contre le Cancer Comité de Savoie, Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, and INCa (PRT-K16).

References

1. Crotty S (2014) T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41(4):529–542
2. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F et al (2014) Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 189(7):832–844
3. Schmidt M, Hellwig B, Hammad S et al (2012) A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin κ C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clin Cancer Res* 18(9):2695–2703
4. Lohr M, Edlund K, Botling J et al (2013) The prognostic relevance of tumour-infiltrating plasma cells and immunoglobulin kappa C indicates an important role of the humoral immune response in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 333(2):222–228
5. Mohammed ZMA, Going JJ, Edwards J et al (2013) The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer* 109(6):1676–1684
6. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S et al (2013) CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest* 123(7):2873–2892
7. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M et al (2013) Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 39(4):782–795
8. Ma Q-Y, Huang D-Y, Zhang H-J et al (2016) Function of follicular helper T cell is impaired and correlates with survival time in non-small cell lung cancer. *Int Immunopharmacol* 41:1–7
9. Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA et al (2016) Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. *Front Immunol* 7:407
10. Drayton DL, Ying X, Lee J et al (2003) Ectopic LT alpha beta directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase. *J Exp Med* 197(9):1153–1163
11. Lee Y, Chin RK, Christiansen P et al (2006) Recruitment and activation of naive T cells in the islets by lymphotoxin beta receptor-dependent tertiary lymphoid structure. *Immunity* 25(3):499–509
12. Johansson-Percival A, He B, Li Z-J et al (2017) De novo induction of intratumoral lymphoid structures and vessel normalization enhances immunotherapy in resistant tumors. *Nat Immunol* 18(11):1207–1217
13. Kang S, Fedoriv Y, Brennenman EK et al (2017) BAFF induces tertiary lymphoid structures and positions T cells within the glomeruli during lupus nephritis. *J Immunol Baltim Md 1950* 198(7):2602–2611
14. Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M et al (2011) The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol* 12(7):639–646
15. Goya S, Matsuoka H, Mori M et al (2003) Sustained interleukin-6 signalling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung. *J Pathol* 200(1):82–87
16. Barone F, Nayar S, Campos J et al (2015) IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(35):11024–11029

17. Chen S-C, Vassileva G, Kinsley D et al (2002) Ectopic expression of the murine chemokines CCL21a and CCL21b induces the formation of lymph node-like structures in pancreas, but not skin, of transgenic mice. *J Immunol Baltim Md* 168(3):1001–1008
18. Marinkovic T, Garin A, Yokota Y et al (2006) Interaction of mature CD3+CD4+ T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J Clin Invest* 116(10):2622–2632
19. Luther SA, Lopez T, Bai W et al (2000) BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity* 12(5):471–481
20. Magliozzi R, Columba-Cabezas S, Serafini B, Aloisi F (2004) Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 148(1–2):11–23
21. Pimenta EM, Barnes BJ (2014) Role of tertiary lymphoid structures (TLS) in anti-tumor immunity: potential tumor-induced cytokines/chemokines that regulate TLS formation in epithelial-derived cancers. *Cancers* 6(2):969–997
22. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R (2016) Tertiary lymphoid organs in Cancer tissues. *Front Immunol* 7:244

RESEARCH

Open Access



Immunopathological characterization of ovarian teratomas associated with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis

Aude Chefdeville^{1,2}, Isabelle Treilleux³, Marie-Eve Mayeur¹, Coline Couillault^{2,4}, Géraldine Picard⁵, Chloé Bost^{1,2,5}, Karima Mokhtari⁶, Alexandre Vasiljevic^{2,7}, David Meyronet^{2,7}, Véronique Rogemond⁵, Dimitri Psimaras⁵, Bertrand Dubois⁴, Jérôme Honnorat^{1,2,5,8} and Virginie Desestret^{1,2,5,8*} 

Abstract

Encephalitis with anti-NMDAR antibodies (NMDAR-E) is a severe autoimmune neurological disorder, defined by a clinical presentation of encephalitis and the presence of IgG targeting the GluN1 subunit of NMDA receptors in the CSF. An underlying ovarian teratoma is commonly associated with this autoimmune disease suggesting a role of the tumor in immunopathogenesis. In this study, we characterized the salient histopathological features of 27 ovarian teratomas associated with NMDAR-E (3 immature and 24 mature teratomas) and 40 controls without associated encephalitis. All but one NMDAR-E-associated teratomas contained a nervous tissue component, while less than 40% of control teratomas did ($p < 0.001$). GluN1 expression by teratomatous nervous tissue seemed to be more often glial in NMDAR-E teratomas than in control teratomas (73% vs. 29%, $p < 0.05$). Strikingly, 3 out of 24 NMDAR-E-associated mature teratomas contained neuroglial tissue exhibiting histopathological features of central nervous system neuroglial tumor, while such glioma-like features are exceptionally described in the literature on ovarian teratomas. Moreover, NMDAR-E associated teratomas differed from sporadic ovarian teratomas by consistent and prominent infiltration of the nervous tissue component by immune cells, comprised of T- and B-cells and mature dendritic cells organized in tertiary lymphoid structures, with IgG and IgA deposits and plasma cells in close contact to the neuroglial tissue.

These data demonstrate an association between massive infiltration of NMDAR-E-associated teratomas by immune cells and particular glial features of its neuroglial component, suggesting that this glial tissue might be involved in triggering or sustaining the anti-tumor response associated with the auto-immune neurological disease.

Keywords: Ovarian teratoma, Anti-NMDAR encephalitis, Autoimmunity

Introduction

Encephalitis (E) with anti-NMDA receptor (NMDAR) antibodies (NMDAR-E) is a recently described severe autoimmune neurological disorder, defined by a clinical presentation of encephalitis and presence of IgG targeting the GluN1 subunit of the NMDAR in patients' cerebrospinal fluid (CSF) [7]. An underlying neoplasm is found in 25 to 40% of patients, primarily in young females, and this associated tumor is an ovarian teratoma

in 90% of the cases [2, 8, 29]. This strong association suggests a role of the tumor in the immunopathogenesis of the autoimmune disease. Histopathological studies reporting presence of neuroglial tissue expressing NMDAR in ovarian teratoma associated with NMDAR-E [7, 14, 27, 30] raised the hypothesis that immunization against the NMDAR might be triggered by NMDAR expression by teratoma neuroglial elements. However, later studies including sporadic teratomas without associated NMDAR-E showed that presence of an ovarian teratoma with neuroglial tissue expressing NMDAR is not sufficient to induce anti-NMDAR auto-immune response [14, 20, 27], suggesting tumor specificities in NMDAR-E patients. Moreover tumor-like features of the teratomatous

* Correspondence: virginie.desestret@chu-lyon.fr

¹Institut NeuroMyogène, Equipe Synaptopathies et Autoanticorps (SynatAc), INSERM U1217/UMR CRS 5310, Lyon, France

²University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Full list of author information is available at the end of the article



neuroglial component have been reported in the recent literature [9, 14]. Furthermore, a marked intratumoral lymphoid infiltrate colocalizing with mature neuroglial elements is reported in a few patients with NMDAR-E but is yet to be fully characterized [6, 9, 14, 19, 27, 30]. In the present study, we compared ovarian teratomas associated with NMDAR-E to those in patients with sporadic teratomas in order to describe histological features characterizing these tumors.

Methods

Patient samples

To be included, patients had to meet the recognized criteria for NMDAR-E associated with the presence of IgG directed against NMDAR in the CSF [7, 29]. Cases of NMDAR-E referred to the French Reference Center for Autoimmune Encephalitis between September 2007 and November 2018 were identified, and among these those with associated ovarian teratoma and for whom formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of the resected ovarian teratomas were available were included in the present study. Control cases (sporadic, without associated NMDAR-E) were all ovarian teratomas resected in 2013 at the gynecology department of the *Hôpital Femme-Mère-Enfant* (Lyon, France), which is the largest center in the region, and analyzed by the *Service d'Anatomopathologie* (Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Lyon). The control cases were not tested for the presence of anti-NMDAR antibodies in CSF or serum. However, these patients have not developed neurological symptoms evoking auto-immune encephalitis since 2013.

Tumor pathology

Four μm -thick FFPE tissue sections were stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS). A referent pathologist (IT) assessed the histological features of ovarian teratomas, identified their various mixed germ cell components, and analyzed the maturity of neuroglial elements when present. When an immature tissue with neural differentiation was present, grading of immature teratomas was performed according to the World Health Organization (WHO) classification [16]. All available slides of each tumor were examined at low magnification by IT and VD and the inflammatory infiltrates in contact or inside the nervous component were assessed semi-quantitatively as absent (0), low (+), moderate (++), or high (+++). Cases containing nervous tissue elements presenting the pathological features of neuroglial tumors were further examined by neuropathologists (KM, AV, DM) and were described using World Health Organization terminology for neuroglial tumors [18].

Immunohistochemical investigation

Immunohistochemistry, developed with diaminobenzidine, and counterstained with hematoxylin, was performed on

serial sections using automated staining systems (Discovery XT and Benchmark XT; Roche, Meylan, France) detailed in the Additional file 1, except for the GluN1 subunit of NMDAR that was immunostained following a manual protocol (detailed in the Additional file 1). Inflammatory cells were characterized by performing immunostaining specific for B-cells (CD20+), T-cells (CD3+), and mature dendritic cells (DC-Lamp+). Neural elements within teratomas were analyzed using neuronal markers (neurofilament – NF, chromogranin A – ChromoA) and glial markers (GFAP, Olig2), completed by routine immunomarkers dedicated to glial tumor phenotyping (PS100, EMA, ATRX, IDH1, INA, and CD34). Manual multiparametric immunofluorescence staining was performed to detect IgG and IgA -producing cells in the GFAP+ glial component. Antibodies used and concentrations are detailed in the Additional file 1: Table S1 in Online Resource.

DNA sequencing

Next-generation sequencing (NGS) was performed on the nervous component of one paraffin-embedded teratoma sample (case#5) as described in the Additional file 1. The following 10 genes were sequenced: *ATRX*, *BRAF*, *CDKN2A*, *HIST1H3B/C*, *H3F3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TERT*, and *TP53*. Chromosomal deletions on 7q, 7p, 9p 10p, and 10q, as well as 1p/19q co-deletion were also investigated.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using the R software version R-3.4.1 (<https://cran.r-project.org/>). *P*-values for nervous tissue components, GluN1 expression, and presence of inflammatory comparisons were obtained using the Fisher's exact test for contingency tables with Bonferroni correction for multiple testing. Inter-rater agreement was quantified by the Kappa (k) statistic.

Results

Histological characteristics of NMDAR-E associated teratomas

During the study period, a total of 286 cases of NMDAR-E were identified, among whom 57 (19.9%) had an associated ovarian teratoma; 27/57 (47.4%) formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were available and included in the present study. A total of 40 control ovarian teratomas were also included, all were mature and multitissular. Among NMDAR-E ovarian teratomas, 24/27 were mature multitissular teratomas; the 3 others contained foci of immature neural tissues (neuroepithelial tubules and neural blastema) and were thus diagnosed as immature ovarian teratoma (two grade 2 and one grade 1; Table 1).

Neural differentiation in NMDAR-E associated teratomas

Nervous tissue was present in all but one NMDAR-E associated teratomas (26/27, 96%) while only 15/40 (38%)

of control teratomas included nervous tissue ($p < 0.001$). In the one NMDAR-E teratoma in which we did not observe a nervous tissue component, only half of the 2-cm tumor was embedded in paraffin. As expected, when present, the nervous component always contained a central nervous tissue-like differentiation (Fig. 1). Central nervous tissue appeared as a well demarcated solid mass (in 19/26 [73%] NMDAR-E and 9/15 [60%] control teratomas) or lining the inner wall of a cystic cavity (in 17/26 [65%] NMDAR-E and 12/15 [80%] control teratomas). Choroid plexuses were commonly observed in the central nervous tissue of NMDAR-E (12/26, 46%) and control teratomas (5/15, 33%). Peripheral and enteric nervous tissue could be also present (nerves and ganglia in 9/26 [34%] NMDAR-E-associated teratoma and 7/15 [46%] control teratomas; myenteric plexuses in 6/26 [23%] and 1/15 [6%]). When nervous tissue was present, there was no significant difference in the frequencies of

central, peripheral, or enteric neural differentiation between NMDAR-E and sporadic ovarian teratomas (Table 2). These neuroglial elements were composed of glial cells that expressed GFAP or Olig2 (100% of cases), and neurons that expressed ChromoA (10/17 [59%] NMDAR-E and 6/12 [50%] control teratomas) or neurofilament F (7/17 [41%] NMDAR-E and 7/13 [54%] control teratomas; Table 3).

Neuroglial NMDAR expression in NMDAR-E associated teratomas

By immunostaining, NMDAR expression was detected in the nervous tissue of 18/22 (82%) teratomas associated with NMDAR-E and 11/14 (79%) control teratomas (Table 3). GluN1 was expressed by neurons (Fig. 2a-b) in respectively 12/22 (55%) NMDAR-E and 9/14 (64%) control tumors (Table 3), and by glial cells of astrocytic morphology both in NMDAR-E associated and control

Table 1 Histological features of NMDAR-E associated ovarian teratomas

Case #	Teratoma Grading	CNT Cystic/Solid	PNT /ENT	Inflammatory infiltrates in contact with CNT	TLS in contact with CNT
1	Immature (Grade 1)	Yes/Yes	No/Yes	++	0
2	Immature (Grade 2)	Yes/Yes	Yes/No	+++	0
3	Immature (Grade 2)	No/Yes	Yes/Yes	+	0
4*	Mature	Yes/Yes	No/No	+	0
5*	Mature	No/Yes	Yes/No	+	1
6*	Mature	Yes/Yes	No/No	+	1
7	Mature	Yes/No	No/No	+	0
8	Mature	Yes/Yes	No/No	++	0
9	Mature	Yes/No	No/No	++	0
10	Mature	No/Yes	No/No	++	1
11	Mature	Yes/Yes	Yes/Yes	++	0
12	Mature	No/No	No/No	NA	NA
13	Mature	Yes/Yes	No/No	++	0
14	Mature	Yes/Yes	No/No	+++	1
15	Mature	Yes/No	Yes/No	++	0
16	Mature	Yes/No	Yes/Yes	++	0
17	Mature	No/Yes	No/No	+	0
18	Mature	Yes/Yes	No/Yes	++	1
19	Mature	Yes/Yes	Yes/No	+++	1
20	Mature	Yes/Yes	Yes/No	+	1
21	Mature	No/Yes	Yes/No	+++	1
22	Mature	No/Yes	No/No	++	1
23	Mature	No/Yes	No/No	++	1
24	Mature	Yes/No	No/No	++	1
25	Mature	Yes/No	No/No	+++	0
26	Mature	No/Yes	No/Yes	+	1
27	Mature	No/Yes	No/Yes	+++	1

NMDAR-E: Encephalitis with anti-NMDAR antibodies; CNT: central nervous system-like teratomatous tissue; PNT: peripheral nervous tissue; ENT: Enteric nervous tissue. * Cases presenting histological features resembling glioma; TLS: Tertiary Lymphoid Structures; NA: not applicable

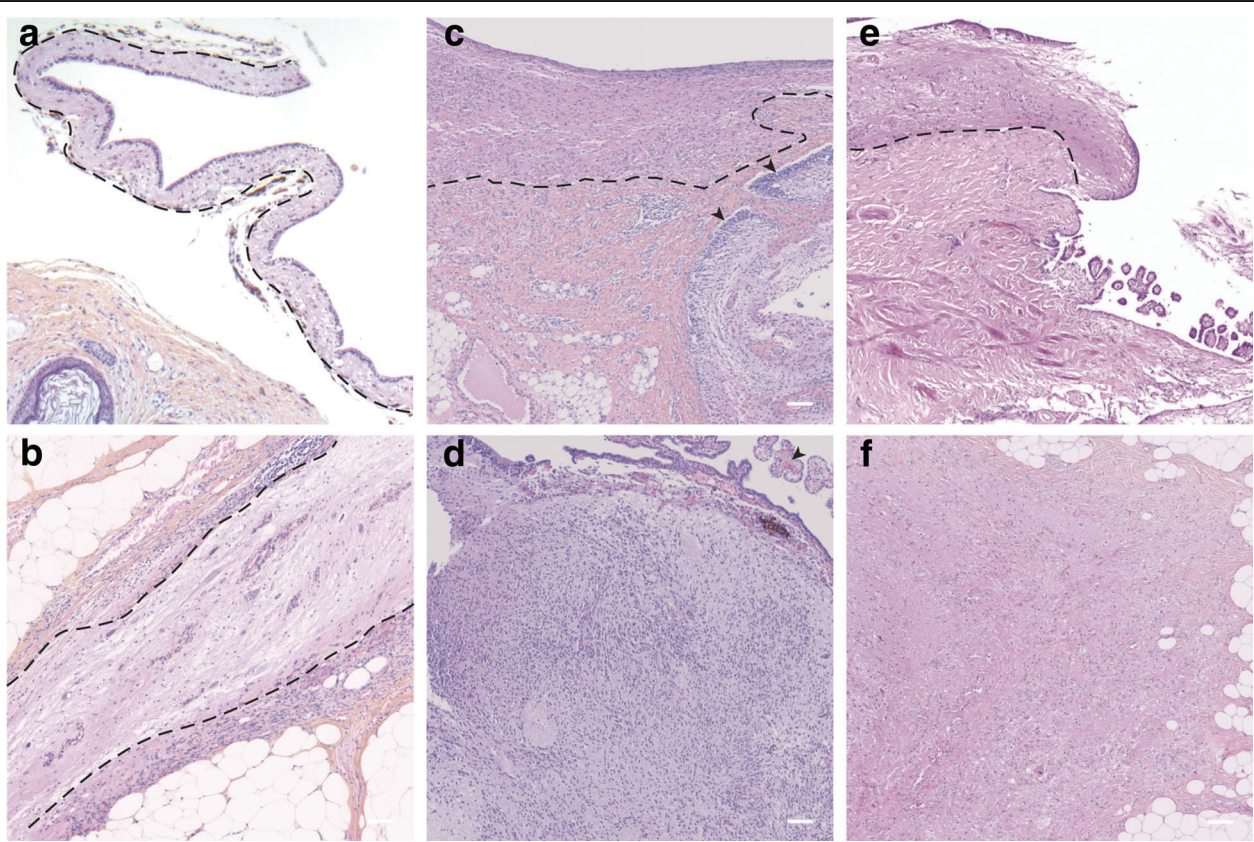


Fig. 1 Central nervous tissue in NMDAR-E-associated and control ovarian teratomas. (a–b) Representative hematoxylin-phloxine-saffron (HPS) gross structure of NMDAR-E mature ovarian teratomas. In case (a), a strip of central nervous tissue (outlined, black-dotted lines) lined the inner wall of a cystic cavity. In case (b), the central nervous tissue (outlined, black-dotted lines) formed a solid mass between connective and adipose tissues (c–d) Representative HPS structure of immature ovarian teratomas associated with NMDAR-E. In (c), note the strip of central nervous tissue (outlined, black dotted lines) and the immature foci (arrowheads) with increased cellular density and neuroepithelial tubules. In case (d), the immature nervous contingent formed a solid mass lined with ependymal wall; note the choroid plexuses (arrowhead). e–f Representative HPS structure of control mature teratomas. The case (e) contained a strip of mature nervous tissue lining the wall of a cystic cavity (outlined, black dotted line). In the case (f), the solid mature nervous tissue was surrounded by connective and adipose tissue. Scale bar: 100 μm

Table 2 Comparison between NMDAR-E-associated and control teratomas with nervous tissue

	NMDAR-E teratomas (n = 27)	Control teratomas (n = 40)	p-value
Nervous tissue, n (%)	26 (96)	15 (38)	5. 10 ^{−7***}
Central	26/26 (100)	15/15 (100)	1
Solid	19/26 (73)	9/15 (60)	0.49
Cystic	17/26 (65)	12/15 (80)	0.47
Choroid plexus	12/26 (46)	5/15 (33)	0.51
Peripheral	9/26 (34)	7/15 (46)	0.51
Enteric	6/26 (23)	1/15 (6)	0.23
Teratomas displaying histological features of gliomas, n (%)	3/26 (12)	0/15 (0)	0.54
Inflammatory infiltrates in contact to central nervous tissue, n (%)	26/26 (100)	2/15 (13)	5. 10 ^{−9***}
Tertiary lymphoid structures	13/26 (50)	1/15 (6)	0.006

***: significant after Bonferroni correction for multiple comparisons, p < 0.001

Table 3 Cell markers expressed by nervous tissue and inflammatory infiltrates in NMDAR-E-associated and control teratomas

	NMDAR-E teratomas (n = 27)	Control teratomas (n = 40)	p-value
Neuronal markers expression by neural elements when present, n (%) ^a	10/17 (58)	9/13 (69)	0.70
ChromoA+	10/17 (59)	6/12 (50)	0.71
NF+	7/17 (41)	7/13 (54)	0.71
GluN1 expression by neural element when present, n (%) ^a	18/22 (82)	11/14 (79)	1
Neuronal	12/22 (55)	9/14 (64)	0.73
Glial	16/22 (73)	4/14 (29)	0.015
Inflammatory infiltrates in contact to neural element when present, n (%) ^a	26/26 (100)	2/15 (13)	5. 10 ⁻⁹ ***
B-cells (CD20+)	19/23 (83)	–	–
T-cells (CD3+)	22/23 (96)	–	–
Mature dendritic cells (DC-Lamp+)	11/24 (46)	–	–

^aPercentages are calculated on the number of assessable cases. NF: neurofilament. ChromoA: chromogranin A

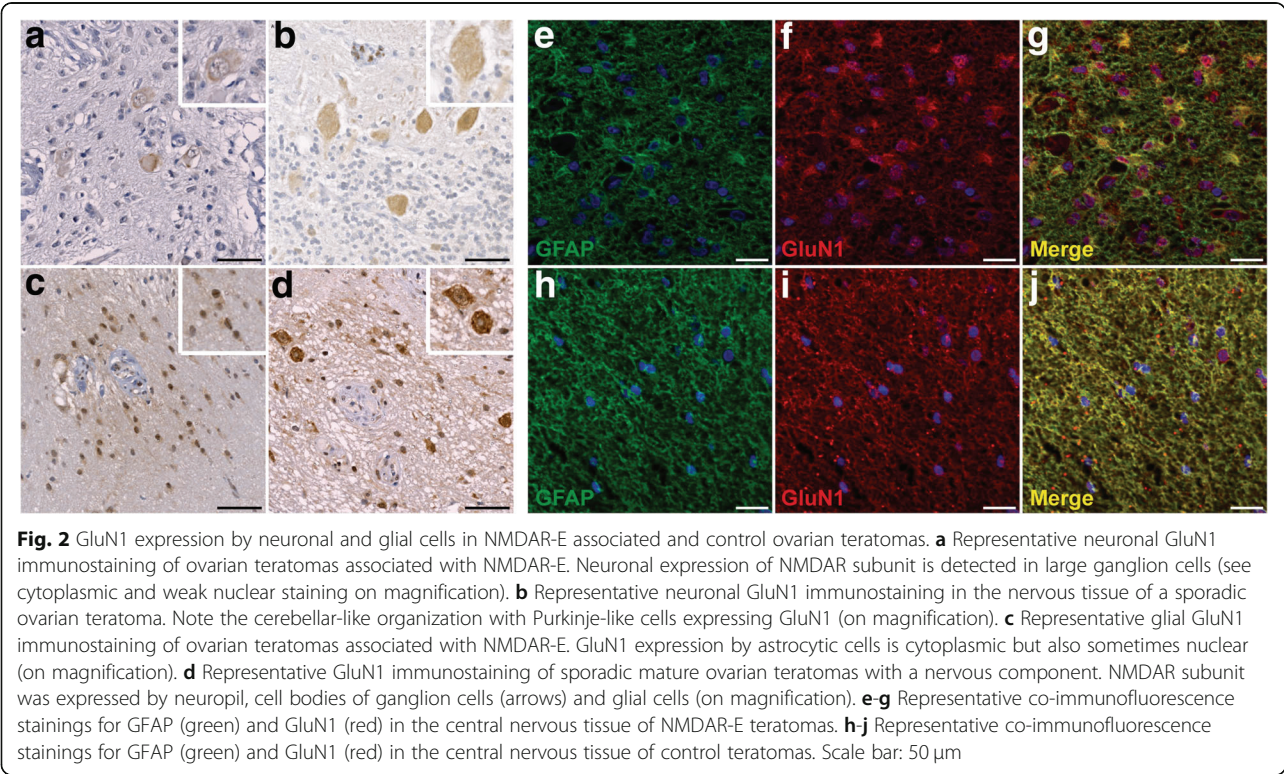
***: significant after Bonferroni correction for multiple comparisons, p<0.001

teratomas (Fig. 2c-d). Co-immunostaining with GluN1 and GFAP antibodies demonstrated that both proteins were co-expressed by astrocytes in NMDAR-E associated teratomas (Fig. 2e-g) and in control teratomas (Fig. 2h-j). This glial expression of GluN1 seemed to be more common in the nervous tissue of NMDAR-E associated ovarian teratomas (16/22 (72%) vs. 4/14 (28%); Table 3).

Glioma-like features in NMDAR-E teratomas

Tumor-like areas with histopathological features of central nervous system (CNS) neuroglial tumor was observed in 3

cases of mature ovarian teratoma with NMDAR-E (patients #4, #5, and #6). The histopathological phenotypes of tumor-like nervous tissues of these 3 cases were respectively suggestive of an oligodendroglioma, a ganglioglioma, and a malignant glioma. Detailed examination of the nervous tissue from the teratoma resected from case #4 found a proliferation of monotonous cells with round and uniform nuclei surrounded by a perinuclear cytoplasmic halo mixed with a vascular network of short, geometrically-arranged, capillary segments, consistent with an oligodendroglioma not otherwise specified (NOS) (Fig. 3a). Tumor cells were positive for



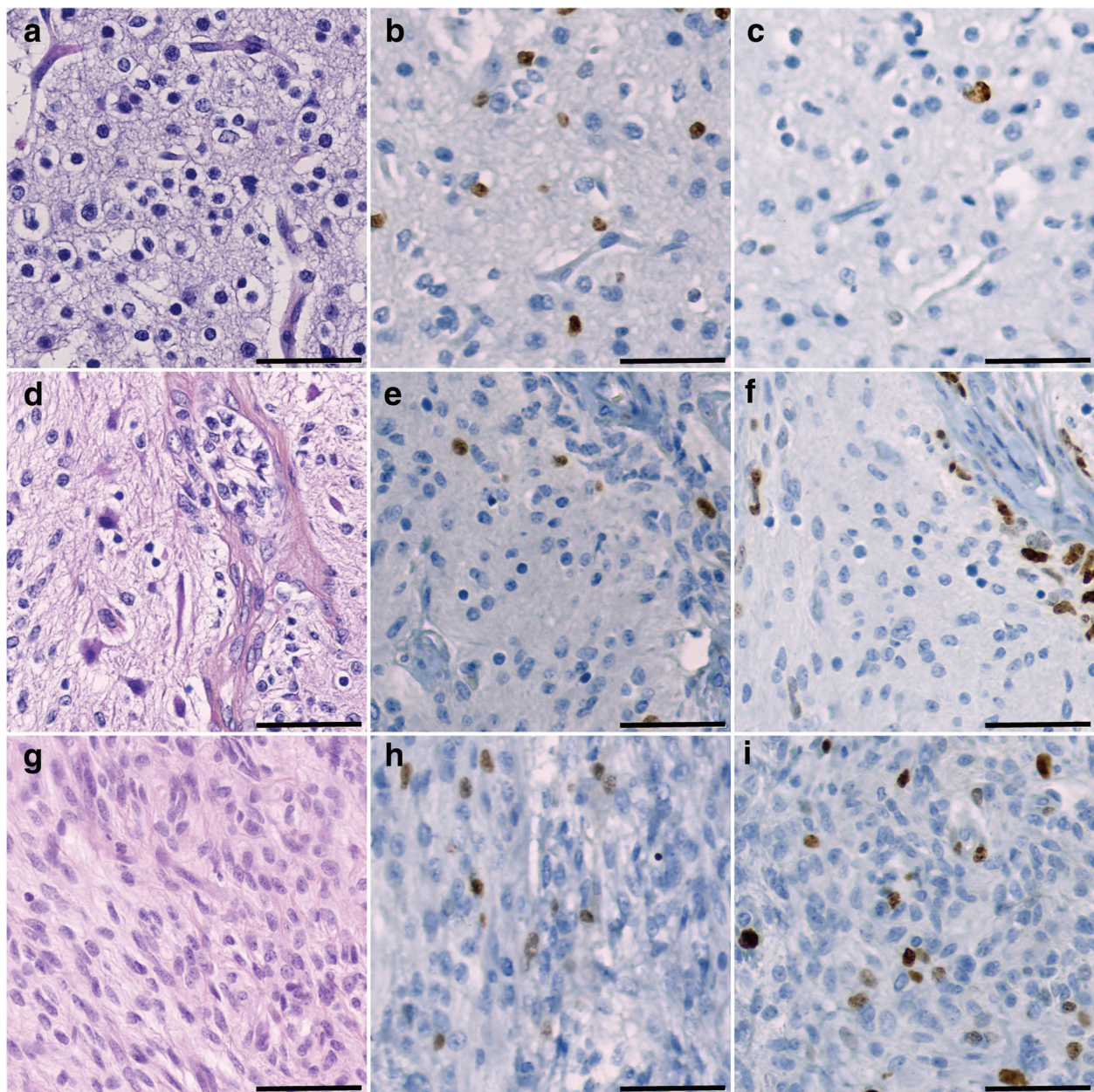


Fig. 3 Histopathological phenotypes of NMDAR-E associated teratoma presenting histological features of gliomas. **a-c** Case #4. Hematoxylin-phloxine-saffron (HPS) staining (**a**) of the solid nervous tissue containing monotonous cells surrounded by perinuclear cytoplasmic halos (“fried-egg” oligodendrocytes-like cells) mixed with a vascular network consisting of short geometrically-arranged capillary segments, consistent with the histopathological observations of an oligodendroglioma. Some tumor cells showed positivity for Olig2 expression (**b**) but low Ki-67 proliferation index (**c**). **d-f** Case #5. HPS staining (**d**) of the neuroglial tissue showing increased cellular density, clusters of ganglion cells and aligned oligodendrocytes-like cells, consistent with the histological features of a ganglioglioma. Some tumor cells were found to be positive for Olig2 expression (**e**) and the Ki-67 proliferation index was increased in the perivascular area (**f**). **g-i** Case #6. HPS staining (**g**) of the nervous tissue with highly elevated cellular density and pleomorphic or poorly differentiated cells, consistent with the histopathological aspect of a malignant glioma. Some tumor cells show positivity for Olig2 expression (**h**) and elevated Ki-67 proliferation index (**i**). Scale bar: 100 μ m

Olig2 (Fig. 3b), PS100 and ATRX, and negative for R132H-IDH1. Ki-67 proliferation index was < 5% (Fig. 3c). Histological investigation of the nervous tissue component from case #5 found elevated cellular density with presence of clusters of ChromoA-positive CD34-negative ganglion

cells and alignments of oligo-like cells, evoking the histological features of a ganglioglioma (Fig. 3d). No bush-like astrocyte was detected with CD34 immunohistochemistry. In case #6, the nervous tissue component presented highly elevated cellular density and abundant pleomorphic cells

(Fig. 3g), which were sometimes positive for Olig2 (Fig. 3h), PS100 or EMA. Ki-67 proliferation index was focally elevated at 8% (Fig. 3i). Necrosis, mitosis and microvascular proliferation were absent. In these 3 cases, no immature neural tissue was found. The genetic alterations commonly associated with gliomas were searched for using NGS analysis of the nervous component for case #5 (it was not possible for the 2 other cases because of technical failure); no mutation commonly associated with gliomagenesis was found. Medical NMDAR-E history and outcome of these 3 cases of NMDAR-E were classical and further described in the Additional file 1. There was no teratoma relapse, as expected in the case of mature teratoma.

Characteristics of inflammatory infiltrates in NMDAR-E associated teratomas

An immune cell infiltration closely adjacent to the neuroglial tissue was found in all 26 cases of NMDAR-E while only in 2/15 control teratomas ($p < 0.001$). Among NMDAR-E teratomas, 65% (18/26) displayed moderate to high inflammatory infiltrates (score of 2 or 3; Fig. 4; inter-rater agreement $k = 1$). There was no relationship between these immune cell infiltrates and the phenotype of the nervous tissue component (central, peripheral or enteric). These inflammatory infiltrates were composed of CD3+ T-cells and CD20+ B-cells (Fig. 5). In 50% of NMDAR-E associated cases, immune cell infiltrates in the nervous tissue component were organized in Tertiary Lymphoid Structures (TLS) with segregated T and B cell zones (13/26 (50%) vs. 1/15 (6%) control teratomas, $p = 0.006$; Fig. 5). Mature dendritic cells (DC-LAMP+), an

essential component of TLS [13], were detected in T-cell-rich areas in 46% of cases with NMDAR-E associated ovarian teratoma (12/26; Fig. 5j). Multiplex immunofluorescence staining revealed the presence of diffuse IgG and IgA deposits and individualized IgG+ or IgA+ plasma cells in contact with the neuroglial tissue of 17/19 (89%) of NMDAR-E associate teratomas while only 3/15 (20%) control teratomas exhibited some weak IgG or IgA deposits without individualized stained cells (Fig. 6).

Discussion

This histopathological study emphasizes the specificities characterizing ovarian teratomas associated with NMDAR-E. Notably, all but one NMDAR-E associated ovarian teratomas contained a nervous tissue component, while only just over a third of control ovarian teratomas did so. Furthermore, expression of the NMDAR GluN1 subunit by the teratomatous nervous tissue was significantly more often glial in NMDAR-E teratomas than in control teratomas. Another striking particularity was that among these 27 mature teratomas, 3 contained neuroglial tissue exhibiting histopathological features of CNS neuroglial tumor, while it was exceptionally reported in the literature on sporadic ovarian teratomas ([1, 3, 10, 15, 24, 25, 31–34] the histological classification of these 20 cases is summarized in Additional file 1: Table S2 in Online Resource). We also confirmed the particular immune environment of the nervous tissue of these teratomas that exhibited massive inflammatory infiltrates.

Although the frequency of immature teratomas among NMDAR-E associated cases herein is lower than that reported in the previously published case series [6, 9, 30],

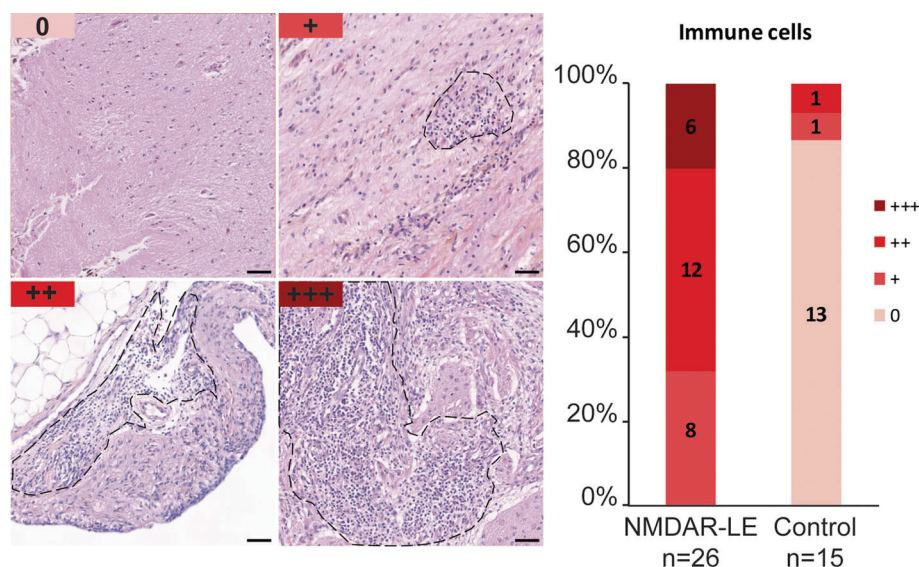


Fig. 4 Inflammatory infiltrates in contact with nervous tissue in NMDAR-E-associated and control ovarian teratomas. Representative hematoxylin-phloxine-saffron (HPS) staining of teratoma nervous tissue with no (score 0), weak (score 1+), moderate (score 2+) or high (score 3+) immune cell infiltration (dotted). Scale bars: 50 μ m. Comparison of the semi-quantitative analysis of immune cell infiltrates between NMDAR-E associated ($n = 26$) and control ($n = 15$) ovarian teratomas with nervous tissue. Scale bar: 50 μ m

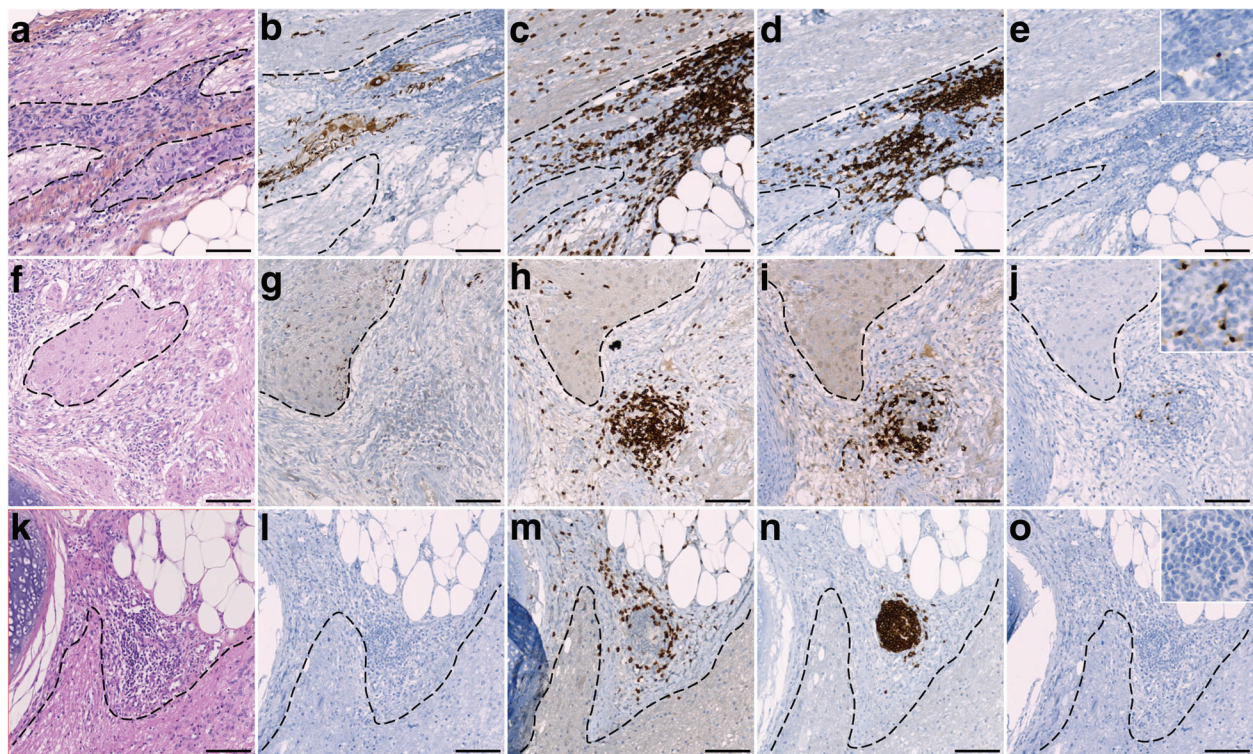


Fig. 5 Characterization of the immune environment of the nervous tissue of NMDAR-E-associated ovarian teratomas. Representative nervous tissue of NMDAR-E teratoma infiltrated by immune cells and stained by hematoxylin-phloxine-saffron (**a, f, k**) or immunolabeled with the neuronal marker NF (**b, g, l**), the CD3 T-cell marker (**c, h, m**), the CD20 B-cell marker (**d, i, n**), or the mature dendritic cell marker DC-LAMP (**e, j, o**). **a-e** Diffuse inflammatory infiltrate closely adjacent to neural tissue (**a**, dotted area) containing NF-stained neurons (**b**) and composed of T-cells (**c**) and B-cells (**d**), with some mature dendritic cells (**e**, see higher magnification in the upper right corner). **(f-j)** Tertiary Lymphoid Structure (TLS) next to a focus of neuroglial tissue (**f**, dotted area) containing some NF positive neurites (**g**), with segregated B- and T-cells (**h, i**) and mature dendritic cells (**j**, see higher magnification in the upper right corner). **k-o** Lymphoid infiltrates close to a foci of neuroglial tissue (**k**, dotted area) without NF expression (**l**) and composed of segregated T-cells (**m**) and B-cells (**n**). Note the absence of mature dendritic cells (**o**, see higher magnification in the upper right corner). Scale bars: 50 μ m

14% of all reported cases (including those herein) are immature which is much greater than sporadic ovarian teratomas; only 3% of the latter are diagnosed as immature, mostly on the presence of immature neural tissue. [4, 22]. This difference could be related to ovarian teratomas of NMDAR-E patients more frequently containing neural tissues that have de facto the potential to be immature; neural tissue was found in all but one ovarian teratoma from patients with NMDAR-E but only just over a third of controls herein, and 30% of mature ovarian teratomas described in the literature [4, 21]. This suggests that the presence of nervous tissue may be essential to trigger the breaking of immune tolerance against NMDAR associated with encephalitis. Interestingly, the expression of this receptor in the nervous component of NMDAR-E teratoma has been detected in some cases by immunofluorescence using patient serum IgG [30] or immunohistochemistry against the GluN1 subunit [14, 27] and the GluN2B subunit of NMDAR [27]. Furthermore, using a commercial antibody we confirmed herein the positivity of teratoma nervous tissues

for the GluN1 subunit of NMDAR in more than 80% of NMDAR-E teratomas of this large cohort. We also, however, report GluN1 expression in the same proportion of control teratomas with a neural differentiation, confirming that the mere ectopic expression of GluN1 is not per se sufficient to trigger the cross-immune reaction leading to neurological symptoms. This is supported by the report of GluN1 and GluN2B expression in epithelial ovarian carcinoma without occurrence of paraneoplastic NMDAR-E [23]. A possible explanation could be related to the NMDAR subunit composition profile or the cellular phenotype of cells expressing NMDAR. Herein, GluN1 was expressed both by neuronal and glial cells composing the nervous component of ovarian teratomas associated or not with NMDAR-E; neuronal expression is expected but glial expression is noteworthy, even if NMDAR expression by human astrocytes has been described [5, 17]. This glial GluN1 expression was more frequent in NMDAR-E associated teratoma than in sporadic cases, which might suggest that type of neural cells expressing the antigen NMDAR could be involved in the outbreak of NMDAR-E.

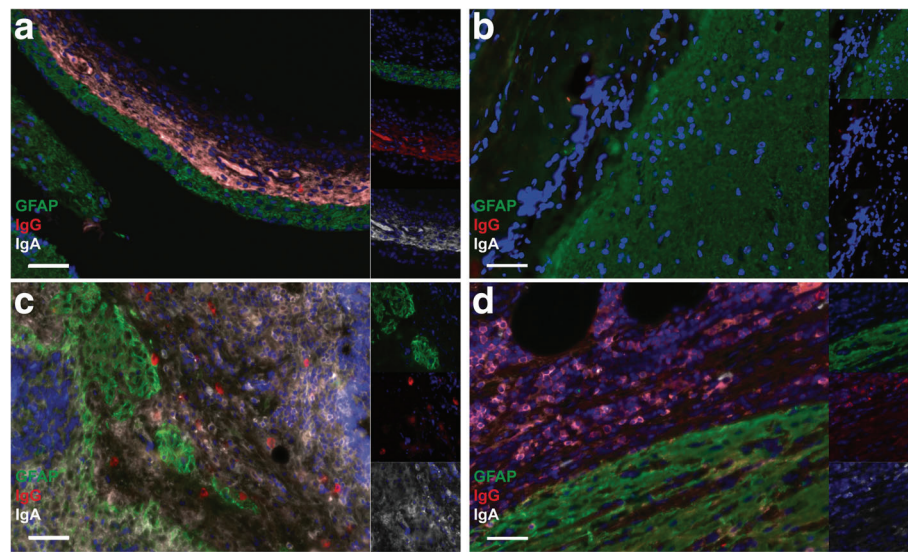


Fig. 6 IgG and IgA deposits and producing cells in NMDAR-E associated teratomas. **a** Representative GFAP/IgG/IgA immunofluorescence (IF) staining of a NMDAR-E associated teratoma showing IgG (in red) and IgA (in white) deposits along a GFAP+ strip of neuroglial tissue (in green). Hoechst was used to visualize nuclei (blue) and pictures on the right correspond to individual channels. **b** Representative GFAP/IgG/IgA IF staining of a control teratoma without IgG nor IgA deposits in contact with GFAP+ neuroglial tissue. **c** GFAP/IgG/IgA IF staining of a NMDAR-E associated teratoma focused on GFAP+ neuroglial islands surrounded by immune cells and diffuse IgA deposits (white) and some isolated IgG+ cells (red). Hoechst was used to visualize nuclei (blue) and pictures on the right correspond to individual channels. **d** GFAP/IgG/IgA IF staining of a NMDAR-E teratoma showing individualized IgA+ cells (white) and IgG+ (red) in contact with GFAP+ neural elements (green) in a NMDAR-E associated teratoma. Scale bars: 50 μ m

The present study establishes that other neuroglial features also distinguish NMDAR-E teratomas from sporadic ovarian teratomas. For instance, in three patients the mature nervous component presented tumor-like areas characterized by histological features of CNS tumors [18]. Such foci of nervous tissue forming a histological pattern reminiscent of glioblastoma can be observed in ovarian teratoma [28]. However, less than 25 cases of mature ovarian teratoma with nervous tissue exhibiting histological features of glioma (mostly glioblastoma and oligodendroglioma) have been described since 1960 [1, 3, 10, 15, 24, 25, 31–34], making these extremely rare events. The presence of a singular neuronal component in NMDAR-E teratomas has been previously suggested by the report of “abnormal neuronal elements” in 3 cases of mature ovarian teratomas [9]. Consistently, Iemura et al. have recently reported an “abnormal monotonous appearance” of the mature neuroglial tissue of 4 NMDAR-E teratomas with densely aggregated small neurons [14]. Herein, we precisely characterized these previously reported histological phenotypes that were consistent with neuroglial tumors; we observed obvious neuroglial changes that were not limited to the presence of “dysplastic or monotonous neurons”, but which also included gliomatous features, characterized by increased glial cell cellularity and glial marker expression, and clearly distinct from reactive abnormalities often observed in teratomas [9]. In one case, we further

investigated the molecular phenotype of this glioma-like component. No gliomatous mutations were detected in this ganglioglioma-like proliferation, suggesting that adult CNS gliomagenesis pathways might not be involved in the glioma-like phenotype of the teratomatous tissue.

Besides these tumoral specificities, NMDAR-E-associated ovarian teratoma were also characterized by a massive and systematic infiltration of immune cells in close contact with nervous tissue component. Dense inflammatory infiltrates around neural tissue have been previously shown in NMDAR-E teratomas [6, 9, 14, 19, 27]. These lymphoid aggregates are composed of segregated B- and T-cells and sometimes organized in reactive tertiary lymphoid structures [6, 19]. We further revealed that immune infiltrates in NMDAR-E associated teratoma frequently contained mature dendritic cells in the vicinity of nervous tissue. These features are characteristics of tertiary lymphoid organs, that have already been reported in other tumors [13] and are believed to be generated as a result of local antigen presentation in a context of chronic inflammation and to perpetuate adaptive immune responses providing local source for antibody production [12]. Herein, we observed immunoglobulin deposits and immunoglobulin secreting cells in direct contact with the nervous tissue of NMDAR-teratomas, while previous studies had already detected plasma cells in NMDAR-teratomas [19, 32]. The presence of the B-cell response effectors in the tumor

associated with B-mediated immunity supported the idea that in young females with NMDAR-E and ovarian teratoma, the tumor triggers the anti-NMDAR immune reaction. In particular, the detection of intra-tumoral IgA is consistent with the existing correlation between the presence of an associated teratoma and anti-NMDAR IgA in the CSF of patients with NMDAR-E [11]. All these data strongly suggest a link between the tumor immune environment and the CNS humoral auto-immunity directed against the onconeural antigen NMDAR. Recently, Makuch et al. demonstrated this link by showing that NMDAR ovarian teratoma tissue contained B cells which can produce IgG directed against GluN1 in culture [19]. We previously reported that genetic alteration of onconeural antigens, including gains and mutations, can play a major role in the induction of the immune response associated with paraneoplastic neurological syndromes [26]. Neoantigen production due to such genetic alterations in NMDAR coding genes might be also a potential mechanism leading to this singular anti-tumor immune response characterized by the intratumoral presence of B- and T-cell response effectors of the auto-immune disease.

Further molecular characterization of the expressed NMDAR antigens and gene expression profiling of tumor infiltrating immune cells in NMDAR-E teratoma are needed. This will require microdissection to improve the sampling of nervous tissue and infiltrates, and the prospective collection of fresh resected tumors to obtain a better quality of extracted DNA/RNA and to allow flow cytometry analysis of infiltrating immune cell population, as previously done in the cystic aspirate from one NMDAR-E teratoma by Makuch et al. [19].

In conclusion, the present study finds that the particular immune environment of the neuroglial tissue in NMDAR-E teratomas is associated with teratoma specificities. These histological features are unlikely to be sufficient per se to increase the immunogenicity of this ectopic nervous tissue; further investigation of teratoma genetic alterations is required to identify the molecular triggers of the immune tolerance breakdown leading to the auto-immune disease.

Additional file

Additional file 1: Supplemental Methods: Immunohistochemistry (IHC) study. DNA sequencing. Supplemental Results: Clinical description of NMDAR-E cases presenting glioma-like feature teratomas. Supplemental Tables: **Table S1.** Antibodies used for immunohistochemistry and immunofluorescence stainings. **Table S2.** Reported cases of mature ovarian teratoma containing nervous tissue presenting histological features of glioma. (DOCX 34 kb)

Acknowledgments

This work was supported by the LYric grant INCa-DGOS-4664, by the *Ligue Contre le Cancer Comité du Rhône and de Savoie*, by the *Agence nationale de la recherche* (ANR-14-CE15-0001-MECANO and ANR-11-EQPX-0035 PHENOCAN), and the *Fondation pour la recherche médicale* (FRM) DQ20170336751.

The funding sources had no role in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of data and in the writing of the manuscript. We gratefully thank Dr. A. Buenerd for her expertise and collaboration, as well as K. Silva and M. Daniau for their help and expert technical assistance. We gratefully acknowledge Philip Robinson for English language editing (Direction de la Recherche Clinique, Hospices civils de Lyon).

Authors' contributions

AC: acquisition of data, analysis, interpretation of the data, and drafting the manuscript for intellectual contents. IT: acquisition of data, analysis and interpretation of the data, and critical revision of manuscript for intellectual content. M-EM: acquisition of data, analysis, and interpretation of the data. CC: acquisition, analysis and interpretation of data. GP: acquisition and analysis of data. CB: acquisition, analysis, and interpretation of data. KM: acquisition of data, analysis and interpretation of the data. AV: analysis, and interpretation of the data. DM: acquisition, analysis, and interpretation of data. VR: acquisition and analysis of data. DP: acquisition and interpretation of data. BD: acquisition of data and critical revision of manuscript. JH: study and experiment concept and design, interpretation of data, and critical revision of manuscript for intellectual content. VD: experiment concept and design, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript for intellectual contents, critical revision of manuscript for intellectual content, study supervision. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Written consent was obtained from all patients, and this study was approved by the institutional review board of the University Claude Bernard Lyon 1 and Hospices Civils de Lyon.

Competing interests

The authors have declared that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Institut NeuroMyogène, Equipe Synaptopathies et Autoanticorps (SynatAc), INSERM U1217/UMR CRS 5310, Lyon, France. ²University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. ³Department of Biopathology, Centre Leon Berard, Lyon, France. ⁴INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Leon Berard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France. ⁵French Reference Center on Paraneoplastic Neurological Syndrome, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ⁶Raymond Escourolle Neuropathology Laboratory, Groupement Pitie-Salpetriere, AP-HP, Paris, France. ⁷Department of Pathology, Groupement hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ⁸Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France.

Received: 14 February 2019 Accepted: 5 March 2019

Published online: 11 March 2019

References

- Berger N, Pochaczewsky R (1969) Astrocytoma-containing ovarian teratoma in childhood. *Am J Roentgenol Radium Therapy, Nucl Med* 107:647–651
- Bost C, Chanson E, Picard G, Meyronet D, Mayeur M-E, Ducray F, Rogemond V, Psimaras D, Antoine J-C, Delattre J-Y, Desestret V, Honnorat J (2018) Malignant tumors in autoimmune encephalitis with anti-NMDA receptor antibodies. *J Neurol*. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8970-0>
- Büyükkaya Bay S, Corapcioglu F, Kavut S, Müezzinoğlu B, Anik Y, Tugay M (2010) Oligodendroglioma arising in a mature cystic ovarian teratoma in a child. *Pediatr Hematol Oncol* 27:636–640. <https://doi.org/10.3109/08880018.2010.505633>
- Caruso PA, Marsh MR, Minkowitz S, Karten G (1971) An intense clinicopathologic study of 305 teratomas of the ovary. *Cancer* 27:343–348
- Conti F, Barbarelli P, Melone M, Ducati A (1999) Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. *Cerebral cortex* 9:110–120 Doi: 10.220224
- Dabner M, McCluggage WG, Bundell C, Carr A, Leung Y, Sharma R, Stewart CJR (2012) Ovarian teratoma associated with anti-N-methyl D-aspartate

- receptor encephalitis: a report of 5 cases documenting prominent intratumoral lymphoid infiltrates. *International J Gynecol Pathology* 31:429–437. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e31824a1de2>
7. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon RJ, Lynch DR (2008) Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *The Lancet Neurology* 7:1091–1098. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70224-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70224-2)
 8. Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R (2011) Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *The Lancet Neurology* 10:63–74. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70253-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70253-2)
 9. Day GS, Laiq S, Tang-Wai DF, Munoz DG (2014) Abnormal neurons in Teratomas in NMDAR encephalitis. *JAMA neurology* 71:1–8. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.488>
 10. den Boon J, van Dijk CM, Helfferich M, Peterse HL (1999) Glioblastoma multiforme in a dermoid cyst of the ovary. A case report. *Eur J Gynaecol Oncol* 20:187–188
 11. Desestret V, Chefdeville A, Viacoz A, Bost C, Ducray F, Picard G, Rogemond V, Chaffois MO, Blanc C, Bardel C, Treilleux I, Pascual O, Antoine JC, Delattre JY, Honnorat J (2015) CSF IgA NMDAR antibodies are potential biomarkers for teratomas in anti-NMDAR encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2:e166. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000166>
 12. Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman W-H, Cadranet J (2008) Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 26:4410–4417. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0284>
 13. Dieu-Nosjean M-C, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH (2014) Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* 35: 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.09.006>
 14. Iemura Y, Yamada Y, Hirata M, Kataoka TR, Minamiguchi S, Haga H (2018) Histopathological characterization of the neuroglial tissue in ovarian teratoma associated with anti-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor encephalitis. *Pathol Int* 68:677–684. <https://doi.org/10.1111/pin.12732>
 15. Kleinman GM, Young RH, Scully RE (1993) Primary neuroectodermal tumors of the ovary. A report of 25 cases. *Am J Surg Pathol* 17:764–778
 16. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH; International Agency for Research on Cancer; World Health Organization (2014) WHO classification of tumours of female reproductive organs. International Agency for Research on Cancer, Lyon. NLM ID: 101656343
 17. Lee M-C, Ting KK, Adams S, Brew BJ, Chung R, Guillemin GJ (2010) Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PLoS One* 5:e14123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014123>
 18. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
 19. Makuch M, Wilson R, Al-Diwani A, Varley J, Kienzler A-K, Taylor J, Berretta A, Fowler D, Lennox B, Leite MI, Waters P, Irani SR (2018) N-methyl-D-aspartate receptor antibody production from germinal center reactions: therapeutic implications. *Ann Neurol* 83:553–561. <https://doi.org/10.1002/ana.25173>
 20. Mangler M, Trebesch de Perez I, Teegen B, Stöcker W, Prüss H, Meisel A, Schneider A, Vasiljeva J, Speiser D (2013) Seroprevalence of anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in women with ovarian teratoma. *J Neurol* 260:2831–2835. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7074-0>
 21. Mumtaz Khan M, Sharif N, Ahmad S (2014) Morphological spectrum of mature ovarian teratoma. *Gomal J Med Sci* 12:76–80
 22. Nogales FF, Dulcey I, Preda O (2014) Germ cell tumors of the ovary: an update. *Archives of pathology & laboratory medicine* 138:351–362. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0547-RA>
 23. North WG, Liu F, Tian R, Abbasi H, Akerman B (2015) NMDA receptors are expressed in human ovarian cancer tissues and human ovarian cancer cell lines. *Clinical pharmacology : advances and applications* 7:111–117. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S90367>
 24. Opris I, Ducrotot V, Bossut J, Lamy A, Sabourin J-C (2009) Oligodendroglioma arising in an ovarian mature cystic teratoma. *International J Gynecol Pathology* 28:367–371. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e318196c4c0>
 25. Serrano-Arévalo ML, Lino-Silva LS, Domínguez Malagón HR Oligodendroglial cell proliferation arising in an ovarian mature cystic teratoma. Clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of a case that may represent an oligodendroglioma. *Ultrastruct Pathol* 41:62–66. <https://doi.org/10.1080/01913123.2016.1261975>
 26. Small M, Treilleux I, Couillaud C, Pissaloux D, Picard G, Paindavoine S, Attignon V, Wang Q, Rogemond V, Lay S, Ray-Coquard I, Pfisterer J, Joly F, Du Bois A, Psimaras D, Bendriss-Vermare N, Caux C, Dubois B, Honnorat J, Desestret V (2018) Genetic alterations and tumor immune attack in Yo paraneoplastic cerebellar degeneration. *Acta Neuropathol* 135:569–579. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1802-y>
 27. Tabata E, Masuda M, Eriguchi M, Yokoyama M, Takahashi Y, Tanaka K, Yukitake M, Horikawa E, Hara H (2014) Immunopathological significance of ovarian teratoma in patients with anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Eur Neurol* 71:42–48. <https://doi.org/10.1159/000353982>
 28. Thurlbeck WM, Scully RE (1960) Solid teratoma of the ovary. A clinicopathological analysis of 9 cases. *Cancer* 13:804–811
 29. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangué T, Glaser C, Iizuka T, Honig LS, Benseler SM, Kawachi I, Martinez-Hernandez E, Aguilar E, Gresa-Arribas N, Ryan-Flanagan N, Torrents A, Saiz A, Rosenfeld MR, Balice-Gordon RJ, Graus F, Dalmau J (2013) Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *The Lancet Neurology* 12:157–165. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70310-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70310-1)
 30. Tüzün E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J (2009) Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 118:737–743. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0582-4>
 31. Ud Din N, Memon A, Aftab K, Ahmad Z, Ahmed R, Hassan S (2012) Oligodendroglioma arising in the glial component of ovarian teratomas: a series of six cases and review of literature. *J Clin Pathol* 65:631–634. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-200714>
 32. Unal B, Güleç F, Sedele M (2014) Oligodendroglioma arising in mature cystic teratoma. *Case Rep Oncol Med* 2014:745462. <https://doi.org/10.1155/2014/745462>
 33. Yadav A, Lellouch-Tubiana A, Fournet JC, Quazza JE, Kalifa C, Sainte-Rose C, Jaubert F (1999) Glioblastoma multiforme in a mature ovarian teratoma with recurring brain tumours. *Histopathology* 35:170–173
 34. Zannoni GF, Fadda G, Scambia G, Capelli A, Carbone A (2002) Oligodendroglioma arising within a mature cystic ovarian teratoma: case report and review of the literature. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81:896–897

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

