

Effet immunosuppresseur des lymphocytes B infiltrant le cancer du sein

Auteur : Da Veiga, Marc-Antoine

Promoteur(s) : Sadzot, Catherine

Faculté : Faculté des Sciences

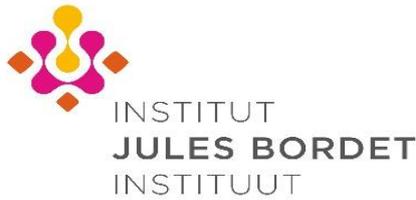
Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9904>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès restreint sur le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Par conséquent, seule une utilisation à des fins strictement privées, d'enseignement ou de recherche scientifique est autorisée conformément aux exceptions légales définies aux articles XI. 189 et XI. 190. du Code de droit économique. Toute autre forme d'exploitation (utilisation commerciale, diffusion sur le réseau Internet, reproduction à des fins publicitaires, ...) sans l'autorisation préalable de l'auteur est strictement interdite et constitutive de contrefaçon.



Effet immunosuppresseur des lymphocytes B infiltrant le cancer du sein

Mémoire de fin d'études du master de biochimie, biologie moléculaire et cellulaire à
finalité approfondie

Écrit et défendu par Marc-Antoine Da-Veiga

Département des sciences de la vie, Faculté de sciences, Université de Liège

Laboratoire d'immunologie moléculaire de l'Institut Jules Bordet

Promotrice : Soizic Garaud

Co-promotrice : Prof. Catherine Sadzot

Année académique 2019-2020

Résumé

La présence d'un infiltrat lymphocytaire au sein du microenvironnement tumoral est souvent associée à un meilleur pronostic. Depuis peu, on sait que les lymphocytes B infiltrant la tumeur (TIL-B) y jouent un rôle complexe. Récemment, une étude publiée dans notre laboratoire a démontré que les TIL-B peuvent produire des auto-anticorps dirigés contre 8 antigènes associés au cancer du sein (CS). Une ombre vient cependant noircir le tableau. Un sous-ensemble spécifique appelé lymphocytes B régulateurs (Bregs), qui possède la capacité d'inhiber la réponse immunitaire par le biais de multiples mécanismes encore trop peu compris. Actuellement, aucun consensus n'a été proclamé autour du phénotype des Bregs. La caractérisation de ces cellules s'avère pour l'instant rattachée à son activité régulatrice médiée par des cytokines anti-inflammatoires dont la plus documentée reste l'interleukine-10. En 2017, Achour *et al.*, découvrent que les Bregs peuvent inhiber la différenciation terminale des lymphocytes B (LB) en cellules mémoires ou en plasmocytes producteurs d'anticorps, en inhibant la réponse des lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{FH}). Se basant sur cette étude et ayant prouvé, dans des résultats préliminaires, la présence de Bregs sécrétant d'IL-10 dans les tumeurs du CS, l'objectif principal de cette étude consistait à caractériser l'effet immunosuppresseur des TIL-B du CS sur la fonction des T_{FH} . Ainsi, leur impact sur la différenciation terminale des LB en plasmocytes sécrétant d'immunoglobulines G (IgG) a été analysé. De façon indépendante, l'effet sur l'activation des T_{FH} et sur la différenciation en LB mémoire des facteurs solubles du microenvironnement tumoral appelés par la suite « surnageant de tumeur » (SNT) a été étudié. Dans l'optique de déterminer si les TIL-B ou le SNT possèdent un effet immunosuppresseur, des T_{FH} et LB spléniques de patients sains ont été cocultivés pendant 6 jours en présence de TIL-B de tumeur ou du SNT de patientes atteintes de CS. Durant les cultures, les populations cellulaires ont été analysées par le biais d'analyses phénotypiques et fonctionnelles. La différenciation des LB en plasmocytes a été étudiée par analyses de l'expression intracellulaire des IgG et IgM. La sécrétion d'IgG dans le milieu de culture a ensuite été déterminée par dosage immuno-enzymatique sur support solide et essai de billes cytométrique. Les données acquises ont révélé que la présence de TIL-B dans les cocultures n'a pas empêché la différenciation en plasmocytes. En revanche, la sécrétion d'IgG fut fortement ou totalement réprimée. Ces résultats suggèrent que dans les tumeurs du sein, les TIL-B jouent un rôle immunosuppresseur sur la sécrétion des IgG. Le SNT a quant à lui démontré un effet inhibiteur sur l'activation des T_{FH} et la différenciation des LB en cellules mémoires. Il semble alors clair que les futures immunothérapies contre le CS ont tout intérêt à investir dans la recherche anti-IL-10.

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier Mme Garaud Soizic qui a été ma promotrice durant ce travail de fin d'études. Elle m'a offert l'opportunité d'un stage exaltant qui m'a permis d'acquérir de précieuses nouvelles connaissances. Ses conseils avisés, sa rigueur, son esprit critique et son expertise en font pour moi un modèle à suivre.

Un tout grand merci aux autres membres du laboratoire, notamment à la directrice, Mme Karen Willard-Gallo qui a eu la gentillesse de m'accueillir dans son équipe. J'ai une pensée toute particulière pour Doïna et Grace avec qui j'ai eu l'occasion de considérablement discuter, mais aussi pour Anaïs, Céline, Noémie, Laurence, Angélique, Mireille, Amal et Grégory qui ont offert de nombreuses réponses à mes questions. Je ne peux pas oublier M. Hugues Duvillier qui m'a offert son aide dans l'acquisition des résultats de ce mémoire.

En 2017, j'ai quitté la France pour une nouvelle aventure dans la ville de Liège. Dans cette université, j'ai trouvé des professeurs en or qui m'ont partagé leurs savoirs. Je tiens tout particulièrement à remercier M. Denis Baurain un enseignant dont la personnalité m'a fortement touché, mais aussi Mme Catherine Sadzot pour m'avoir transmis sa passion de l'immunologie et d'avoir accepté d'être la copromotrice de ce mémoire.

Je tiens maintenant à exprimer ma gratitude envers mes parents qui m'ont soutenu durant mon parcours scolaire. Je dois aussi remercier mes meilleurs amis Luc et Jordan qui, malgré la distance, m'ont toujours encouragé. Cela peut prêter à rire, mais je tiens à remercier mes deux chats Pépinot et Mantéquilla qui durant toutes les périodes de blocus, de confinement, de l'écriture de ce mémoire m'ont offert du réconfort. Il existe également une personne fondamentale dans ma vie qui est ma compagne Chloé Antigny. Elle fut d'un soutien inébranlable durant toutes mes études universitaires. Elle a su gérer mes angoisses, m'encourager et m'offrir son aide pour la correction orthographique de nombreux travaux scolaires. Sans toi, je ne serais pas la personne que je suis actuellement et je t'en remercie.

Avant-propos

Avant de commencer la lecture de ce mémoire, il semble important de comprendre le contexte dans lequel celui-ci a été entrepris.

En décembre 2019, un premier cas de patient atteint du Covid-19 (de « coronavirus disease ») est détecté à Wuhan en Chine. Cette maladie infectieuse se trouve causée par un nouveau virus : le SARS-CoV-2. Ce dernier, extrêmement contagieux, s'est répandu à travers le monde jusqu'à provoquer le confinement de milliards d'individus. Le 18 mars 2020, soit à peine plus d'un mois après le début du stage, la Belgique entre dans une période de confinement qui allait durer jusqu'au 4 mai. Durant cette période, notre laboratoire a reçu comme consigne de ne pas démarrer de nouvelles expériences et de favoriser le télétravail. J'ai eu l'occasion de réaliser un travail de recherches bibliographiques plus étoffé que ce qui est normalement préconisé, ce qui explique pourquoi l'introduction prend une place plus importante. Même s'il n'a pas été possible de lancer de nouvelles cultures, j'ai toutefois eu l'opportunité d'analyser le surnageant des cultures que j'avais congelées ainsi que ceux issus d'anciennes expériences, et ce, dans une période allant jusqu'à mi-juillet.

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Anatomie du sein.....	1
1.2 Le cancer du sein	2
1.2.1 Définition générale.....	2
1.2.2 Épidémiologie	2
1.2.3 Histologie	2
1.2.4 Classifications	3
1.3 Lymphocytes infiltrant les tumeurs	4
1.3.1 Définition.....	4
1.3.2 Compositions et rôles.....	5
1.3.3 Organisations	6
1.3.4 Valeur pronostique et prédictive.....	6
1.3.5 Influence des lymphocytes B infiltrant la tumeur.....	7
1.4 Maturation des LB dépendants des T _{FH}	8
1.5 Immunoglobulines : les anticorps.....	10
1.6 Fonctions anti-tumorales des lymphocytes B.....	11
1.6.1 Production d'anticorps	11
1.6.2 Présentation d'antigènes.....	11
1.6.3 Fonctions cytotoxiques.....	12
1.6.4 Production de cytokines	12
1.7 Fonctions pro-tumorales des lymphocytes B	13
1.7.1 Sécrétion d'IL-10	14
1.7.2 Sécrétion de TNF-alpha	15
1.7.3 Sécrétion de TGF-β	15
1.7.4 Sécrétion d'IL-35	15
1.7.5 Suppression de la réponse T _{FH}	16
1.8 Résultats préliminaires	17
1.9 Objectifs de l'étude	18
2. Matériels et méthodes	18
2.1 Mise en place des tests T _{FH}	19
2.1.1 Isolation des splénocytes.....	19
2.1.2 Isolation les lymphocytes B de la rate	19
2.1.3 Tri des T _{FH} et des LT CD4 + classiques.....	20
2.1.4 Échantillons tumoraux.....	21
2.1.5 Isolation des TIL-B.....	21
2.1.6 Cultures cellulaires	22

2.2 Cytométrie en flux	22
2.2.1 <i>Marquages membranaires</i>	23
2.2.2 <i>Coloration intracellulaire</i>	23
2.3 Analyses des surnageants des cocultures	24
2.3.1 <i>ELISA</i>	24
2.3.2 <i>Essai par billes cytométriques</i>	24
2.4 Images, analyses et statistiques	25
3. Résultats	26
3.1.1 <i>Caractérisations des tumeurs</i>	26
3.1.1 <i>Contrôles de la pureté du tri des $T_{FH}/CD4+$ et de l'isolation des lymphocytes B</i>	27
3.1 Cultures cellulaires	28
3.2.1 <i>Suivi photographique des cocultures</i>	28
3.3.4 <i>Détection de la sécrétion des IgG</i>	32
4.1 Tests TFH	34
4.1.1 <i>Tri et isolation des cellules</i>	34
4.1.2 <i>Clusters de cellules</i>	34
4.1.3 <i>Effet immunosuppresseur des TIL-B</i>	34
4.2 Essai par billes cytométriques	36
4.2.1 <i>Pourquoi choisir cette méthode ?</i>	36
4.2.2 <i>Standardisation et validation</i>	36
4.3 Difficultés rencontrées	37
4.4 Perspectives	38
5. Conclusion	38
6. Références	39
7. Annexes	48
7.1 Fonctionnement du CBA	48
7.2 Suivie photographiques des cocultures avec SNAT	49
7.3 Concentration d'IgG dans le SNT et SNAT	49
7.5 Résultats préliminaires sécrétion IgG	50
7.4 Résultats des tests sur le standard des CBA	50

Liste des abréviations

- . Ac : Anticorps.
- . ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.
- . Ag : Antigène.
- . BCR : Récepteur des lymphocytes B.
- . Bregs : Lymphocytes B régulateurs.
- . CBA : Cytometric bead array.
- . CCR7 : Récepteur de chimiokine C-C de type 7.
- . CD : Cluster de différenciation.
- . CG : Centre germinatif.
- . CMHI et CMHII : Complexe majeur d'histocompatibilité humain I ou II.
- . CPA : Cellule présentatrice d'antigène.
- . CS : Cancer du sein.
- . CXCR5 : Récepteur de chimiokine C-X-C de type 5.
- . ELISA : Dosage immuno-enzymatique sur support solide.
- . ER : Récepteur à l'oestrogène.
- . FoxP3 : Forkhead box P3.
- . HER2 : Récepteur pour les facteurs de croissance épidermique humains 2.
- . ICOS : Costimulateur inductible des lymphocytes T.
- . IFN- γ : Interféron gamma.
- . Ig : Immunoglobuline.
- . IL : Interleukine.
- . LB : Lymphocyte B.
- . LT : Lymphocyte T.
- . NK : Cellule tueuse naturelle.
- . PBS : Tampon phosphate salin.

- . PD-1 : Programmed cell death 1.
- . PD-L1 : Programmed death-ligand 1.
- . PR : Récepteur à la progestérone.
- . Pt1, Pt2, Pt3 : Patiente 1, 2 ou 3.
- . SEB : Entérotoxine staphylococcique B.
- . SNT et SNAT : Surnageant de tumeur ou surnageant du tissu adjacent.
- . TD : Antigène T dépendant.
- . T_{FH} : Lymphocyte T auxiliaire folliculaire.
- . TGF- β 1 : Facteur de croissance transformant beta 1.
- . Th1/Th2 : Lymphocyte T auxiliaire 1 ou 2.
- . TIL : Lymphocyte infiltrant la tumeur.
- . TIL-B : Lymphocyte B infiltrant la tumeur.
- . TLS : Structure tertiaire lymphoïde.
- . TNBC : Cancer du sein triple négatif.
- . TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha.
- . Tregs : Lymphocytes T régulateur.

1.Introduction

1.1 Anatomie du sein

Chez la femme, les seins apparaissent constitués d'une glande mammaire, de tissus fibreux et adipeux et de la peau sus-jacente. La glande mammaire est une glande sudoripare¹ modifiée dans le fascia² superficiel antérieur aux muscles pectoraux et à la paroi thoracique antérieure [1]. Elle consiste en 12 à 20 lobes eux-mêmes divisés en lobules plus petits contenant des alvéoles ou acini qui assurent la sécrétion du lait lors de la période d'allaitement [2]. Ces derniers s'avèrent reliés par 15 à 25 conduits appelés canaux galactophores servant à acheminer le lait jusqu'au mamelon (Figure 1) [1].

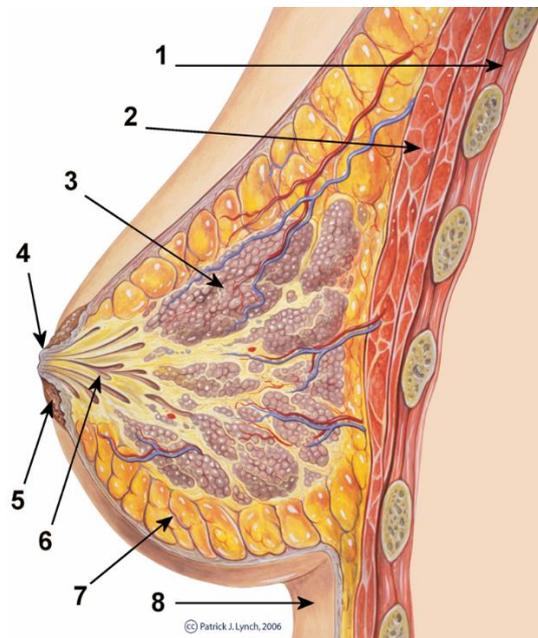


Figure 1 : Schéma anatomique d'une vue en coupe d'un sein féminin. 1-Paroi thoracique; 2-Pectoraux; 3-Lobule; 4-Mamelon; 5-Aréole; 6-Canal galactophore; 7-Tissus adipeux; 8-Peaux. Illustration de Lynch, 2006 [3].

Les seins sont également parcourus de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Des ganglions lymphatiques apparaissent situés au niveau des aisselles, de la clavicule et du thorax, et participent au drainage lymphatique des seins qui a pour but de combattre les infections [4].

¹ Famille de glandes exocrines qui sécrète soit de la sueur, des phéromones ou des hormones [5].

² Tissus fibreux de collagène qui font partie d'un système de transmission de force de tension à l'échelle du corps [6].

1.2 Le cancer du sein

1.2.1 Définition générale

Le cancer représente une maladie définie par une croissance cellulaire incontrôlée causée par la prolifération rapide des cellules aboutissant à la formation d'une tumeur. Un cancer constitue le résultat de l'accumulation progressive de mutations génétiques qui augmentent successivement la prolifération cellulaire et peuvent être causées soit par des facteurs environnementaux, l'hérédité ou des erreurs aléatoires commises lors de la réplication normale de l'ADN [7].

1.2.2 Épidémiologie

Dans le monde en 2018, environ 8,6 millions de cas de cancer ont été diagnostiqués chez les femmes. Parmi eux 2,1 millions représentaient des cancers du sein (CS), ce qui représente près de 1 cas de cancer sur 4. Il s'agit du cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans la grande majorité des pays (154/185 pays) et représente la principale cause de décès par cancer dans plus de 100 pays [8].

En Belgique, le CS représente le premier cancer chez la femme, avec 10.732 nouveaux cas enregistrés en 2017. Cette même année, 2.245 femmes en sont décédées. Environ une femme sur neuf sera atteinte d'un CS avant l'âge de 75 ans, mais 75% des cas de CS apparaissent après l'âge de 50 ans. Même si le CS chez l'homme demeure rare, on dénombre pourtant environ 80 nouveaux cas chaque année en Belgique [9].

1.2.3 Histologie

Le CS est un carcinome, qui constitue une forme de cancer se développant à partir des cellules épithéliales [10]. Majoritairement, il se trouve classé comme carcinomes canaux ou lobulaires, chez lesquels la tumeur se développe respectivement soit à partir des canaux soit des lobules (Figure 2) [11]. D'autres groupes histologiques moins courants s'avèrent cependant identifiés comme les carcinomes inflammatoires, médullaires, apocriniens, mucineux et tubulaires [12]. Outre son origine, il est qualifié d'invasif ou *in situ*, selon si la tumeur a respectivement commencé ou non à se développer à l'extérieur de la membrane basale. Dans le cancer invasif, les cellules tumorales se diffusent aux tissus conjonctifs environnants puis peuvent par la suite métastaser vers des organes distants du corps. Dans le CS, les métastases les plus courantes se produisent vers le squelette, les poumons, le foie et le cerveau, mais se retrouvent même dans les glandes surrénales et les ovaires [11].

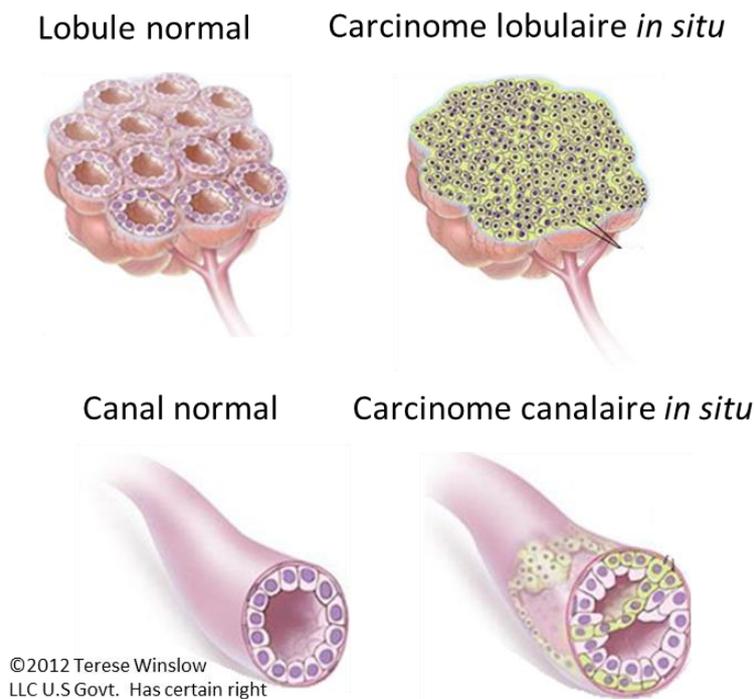


Figure 2 : Différence entre un lobule ou un canal galactophore sain et un carcinome canalaire ou lobulaire *in situ*. Image adaptée de (Winslow, s. d.) [13].

1.2.4 Classifications

En vue d'établir un pronostic précis et de planifier un traitement adapté, la classification du CS s'avère cruciale. Le système de classification dite « TNM » est basé sur les caractéristiques anatomiques de la tumeur, dont sa taille (T), l'implication des ganglions lymphatiques (N) et la présence de métastases (M) [14]. Le grade histopronostic est une classification qui représente l'agressivité potentielle d'une tumeur compte tenu du changement d'architecture de la cellule, du pléomorphisme nucléaire (variabilité de la taille et de la forme des noyaux et des nucléoles) et du nombre de cellules en division, classant les tumeurs d'un grade G1,2 ou 3 du moins au plus agressif [15]. Les tumeurs du sein peuvent aussi être classées en quatre sous-types moléculaires différents (Tableau 1). Cette classification consiste en l'expression ou non de biomarqueurs. Ces derniers sont représentés par les récepteurs hormonaux à l'estrogène (ER : de « Estrogen receptor ») et à la progestérone (PR : de « Progesterone receptor»), mais aussi par le facteur de croissance épidermique humain 2³ (HER2 : de « Human epidermal growth factor receptor 2 ») et du Ki-67⁴ un antigène (Ag) marqueur de prolifération cellulaire.

³ Oncogène, de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique humain (HER / EGFR / ERBB) [16].

⁴ De K pour Kiel (ville d'origine du scientifique qui l'a découvert) et 67 qui est la position du clone original dans la plaque à 96 puits [17].

Le Luminal A représente le sous-type le plus commun (30 à 40% des cas) : il est ER positif, PR positif, HER2 négatif et a une faible expression de Ki-67 (<20%). Il peut être traité par hormonothérapie. Le luminal B demeure similaire au luminal A, mais peut exprimer HER2 et a une expression élevée de Ki-67 (>20%). Ce sous-type est plus agressif que le luminal A. Les patients atteints de ce cancer peuvent bénéficier d'un traitement hormonal en combinaison avec un traitement avec l'anticorps (Ac) anti-HER2 (Trastuzumab), selon l'expression de HER2 ou non. Les tumeurs HER2+ s'avèrent négatives aux récepteurs hormonaux, mais disposent d'une forte expression d'HER2 et les patients sont traités au Trastuzumab. Enfin, le cancer du sein triple négatif (TNBC : de « Triple negatif breast cancer ») n'exprime aucun des trois biomarqueurs : il s'agit du sous-type avec le plus mauvais pronostic. Faute de cibles médicamenteuses spécifiques, la chimiothérapie reste le traitement primaire [18].

L'identification par un pathologiste des différents sous-types moléculaires est procédée par immunohistochimie⁵ (IHC) pour l'expression des récepteurs hormonaux (ER & PR) et du Ki-67, alors que l'expression d'HER2 s'avère généralement évaluée par hybridation *in situ* en fluorescence⁶ [19].

Sous-types	Biomarqueurs	Thérapie	Pourcentages
Luminal A	ER+,PR+/-,HER2- et Ki67 <20%	Hormonothérapie	30 à 40%
Luminal B	ER+,PR+/-,HER2+/- et Ki67 >20%	Hormonothérapie et Trastuzumab	20 à 30%
HER2+	ER-,PR- et HER2+	Chimiothérapie et Trastuzumab	12 à 20%
Triple négatif	ER-,PR- et HER2-	Chimiothérapie	15 à 20%

Tableau 1 : Sous-types moléculaires du cancer du sein. Tableau adapté de Fragomeni et al., 2018 [18] et Amirhossein 2016 [20].

1.3 Lymphocytes infiltrant les tumeurs

1.3.1 Définition

Le système immunitaire maintient l'homéostasie à travers l'immunosurveillance constante et par l'initiation de la réponse inflammatoire qui implique la coordination de cellules

⁵ Méthode de localisation des protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'Ag au moyen d'anticorps [21].

⁶ Technique qui utilise des sondes ADN marquées par une molécule fluorescente et qui permet de détecter après hybridation la séquence nucléotidique cible [22].

immunitaires innées et adaptatives. La transformation néoplasique des cellules incite le système immunitaire à s'activer pour tenter d'éliminer la tumeur. C'est pourquoi le microenvironnement tumoral englobe les cellules tumorales, mais aussi toute une variété de cellules non cancéreuses formant le stroma. Ce dernier se trouve composé de cellules déjà présentes avant le développement tumoral (fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes, composants de la matrice extracellulaire), mais aussi de cellules immunitaires infiltrantes [11]. Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL : de « Tumor infiltrating lymphocytes ») constituent l'ensemble des populations de cellules lymphocytaires qui occupent le tissu tumoral. Celles-ci ont été décrites dans plusieurs types de tumeurs solides, y compris le CS [23].

1.3.2 Compositions et rôles

Dans le microenvironnement de la tumeur du CS coexistent différents sous-types de lymphocytes dont les lymphocytes T (LT) cytotoxiques CD8⁷⁺ (CD : Cluster de différenciation ; + : positif) représentant les effecteurs principaux ; des LT auxiliaires CD4⁸⁺ avec une polarisation T auxiliaire 1 (Th1 : de « T helper 1 ») qui activent et stimulent les CD8 + ; et les macrophages ou T auxiliaire 2 (Th2 : de « T helper 2 ») qui participent à l'activation des lymphocytes B (LB). On y retrouve également des lymphocytes T régulateurs (Tregs, avec un phénotype CD4 + CD25⁹ + FoxP3¹⁰⁺), essentiels au maintien de l'auto-tolérance mais qui deviennent immunosuppresseur en contexte tumoral. En effet, ces derniers ont la capacité d'inhiber la prolifération ou de déclencher l'apoptose des LT CD8 + et des autres CD4 +. On peut également retrouver des cellules tueuses naturelles (NK : de « Natural killer »), et des LB. En plus des TIL, d'autres cellules immunitaires, telles que des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules myéloïdes immunosuppressives sont présentes dans cet environnement où elles interagissent avec les LT pour réguler leur activité [24]. L'étude de la composition des TIL dans le CS a montré qu'ils se composent à environ 75 % de LT, moins de 20 % de LB, moins de 10 % de monocytes et moins de 5% de cellules NK [25].

⁷ Glycoprotéine de la superfamille des immunoglobulines (Ig). Marqueur des LT cytotoxique, coréceptrice de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) [26].

⁸ Glycoprotéine de la superfamille des Ig. Marqueur des LT auxiliaire, coréceptrice de la molécule du CMHII [27].

⁹ Sous-unité alpha du récepteur de l'interleukine-2. Impliqué dans la régulation de la tolérance immunitaire en contrôlant l'activité des Tregs. Également présente de façon transitoire sur les LT CD4 + / CD8 + activés [28].

¹⁰ De : « Forkhead box P3 », facteur de transcription de la famille FOX. Crucial dans le développement et la fonction inhibitrice des Tregs [29].

1.3.3 Organisations

Les TIL vont s'organiser de deux façons en fonction de leurs positions et de leurs interactions. Dans le stroma, ils représentent l'infiltrat lymphocytaire sans contact direct avec les cellules tumorales. Dans le tissu tumoral, ils se situent dans des nids de cellules tumorales ou en contact direct avec des cellules tumorales. Dans le CS, les TIL apparaissent généralement plus abondants dans les zones stromales que dans les zones intratumorales [30] (Figure 3).

Une forte infiltration de TIL apparaît corrélée à la présence de structures lymphoïdes tertiaires (TLS : de « Tertiary lymphoid structure) dans les tumeurs. Les TLS représentent des organes lymphoïdes ectopiques principalement formés d'un follicule de LB entouré d'une zone de LT. Ils se développent dans les tissus non lymphoïdes aux sites d'inflammation chronique et dans le stroma entourant les tumeurs [31]. Les TLS existent sous différents états de maturation dans les tumeurs, aboutissant à la formation de pseudo centre germinatif¹¹ (CG) [32]. Ils peuvent aussi abriter les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{FH} : de « T follicular helper ») responsables de la prolifération et de la différenciation terminale des LB [33]. Des travaux effectués dans notre laboratoire par Buisseret *et al.*, 2017 [31] ont révélé que les TLS étaient détectées dans 60% des tumeurs du CS. Fait intéressant, une corrélation a été décrite entre des densités élevées de TLS et une survie prolongée du patient dans plus de 10 types de cancer différents, dont le CS [34].

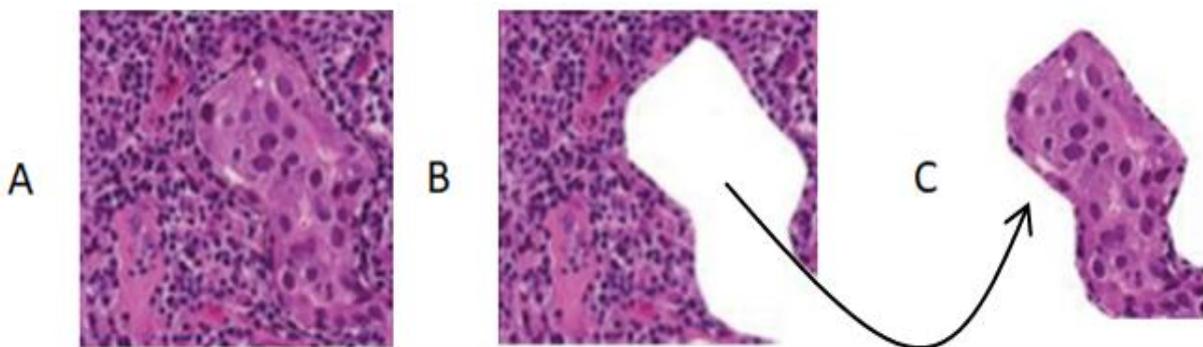


Figure 3 : Exemple de TIL sur lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine. A) Vue d'ensemble. B) TIL stromales. C) TIL intratumoraux. Image adaptée de Salgado *et al.*, 2015 [30].

1.3.4 Valeur pronostique et prédictive

Afin de déterminer si les TIL peuvent avoir un effet pronostique sur les différents sous-types de CS, Mao *et al.*, 2016 [35] ont entrepris une méta-analyse de 25 études portant sur 22 964 patientes atteintes d'un CS. Celle-ci a permis d'établir que les TIL semblaient liés à une

¹¹ Microstructure spécialisée formée dans les tissus lymphoïdes secondaires où sont générés les plasmocytes et les LB mémoires [36].

amélioration de la survie sans maladie¹² et de la survie globale¹³ chez les patientes atteintes d'un CS TNBC. Le sous-ensemble de LT CD8 + paraissait tout particulièrement associé à une amélioration de la survie sans maladie dans la population globale. Chez les patientes ER-, les LT CD8 + étaient liés à une meilleure survie spécifique du CS¹⁴. En outre, Denkert *et al.*, 2018 [37] ont démontré le rôle prédictif des TIL dans le CS traité par chimiothérapie néoadjuvante¹⁵. Ils ont constaté que l'augmentation des TIL améliore la réponse pathologique complète¹⁶ à cette thérapie dans tous les sous-types moléculaires.

L'influence des TIL sur le CS ne semble pas que positive. Les Tregs peuvent contribuer de manière substantielle à la suppression des réponses des LT antitumoraux. Ils s'accumulent fréquemment dans le microenvironnement tumoral où ils peuvent représenter la population principale de LT CD4 + infiltrante [38]. Zhou *et al.*, 2017 [39] ont combiné les données de 14 études menées sur 10259 patientes atteintes de CS. Cette méta-analyse a révélé qu'une infiltration élevée de Tregs était positivement corrélée avec des grades histopronostic élevés, une négativité d'ER, une surexpression de HER2 et une survie sans maladie courte.

Il paraît essentiel de connaître la fonction des différentes cellules immunitaires qui peuvent infiltrer l'environnement tumoral. Actuellement, la plupart des stratégies immunothérapeutiques se concentrent sur l'augmentation de l'immunité médiée par les LT CD8 +. Néanmoins, un nouveau sujet de recherche émerge, considérant les LB comme des acteurs cruciaux à prendre en compte dans les thérapies contre le cancer [40].

1.3.5 Influence des lymphocytes B infiltrant la tumeur

Le sous-ensemble des lymphocytes B infiltrant la tumeur (TIL-B : de « Tumor infiltrating B cell) semble être indicateur d'un bon pronostic chez l'humain pour la majorité des types de tumeurs solides [41]. Dans le cas du CS, Mahmoud *et al.*, 2011 [42] ont analysé 1350 tumeurs par IHC. Les résultats ont permis d'associer la présence de TIL-B à une meilleure survie spécifique du CS dans les tumeurs de grade 3, ER-, TNBC et HER2+. Xu *et al.*, 2018 [43] ont montré que pour tous les types de CS, des infiltrats élevés de LB prédisaient une survie globale

¹² Décrit la période après un traitement réussi au cours de laquelle il n'y a aucun signe ni symptôme de la maladie traitée. [44].

¹³ Temps entre la date du diagnostic et le début du traitement d'une maladie pendant laquelle les patients diagnostiqués sont toujours en vie [45].

¹⁴ Temps (en mois) entre la date du traitement chirurgical primaire et le moment du décès par CS [35].

¹⁵ Traitement visant à diminuer la taille d'une tumeur avant une intervention chirurgicale (limite l'étendue de l'exérèse) ou avant une radiothérapie (augmente l'efficacité) [46].

¹⁶ Représente la disparition de toutes les cellules cancéreuses invasives du CS et dans les ganglions auxiliaires après la fin d'une chimiothérapie néoadjuvante [47].

et une survie sans maladie prolongée. Récemment, une étude de notre laboratoire publiée par Garaud *et al.*, 2019 [48] confirme et étend la corrélation entre des densités de TIL-B plus élevées et un pronostic favorable pour des patientes atteintes de CS HER2+ et TNBC. Les données identifient une augmentation de la densité des TIL-B dans le CS non traité par rapport aux tissus mammaires normaux, associés aux CD4 + et CD8 +, à des grades tumoraux plus élevés et des récepteurs hormonaux négatifs. Dans ce contexte, tous les stades de différenciation des LB étaient détectables, mais des augmentations significatives de TIL-B mémoire s'avéraient présentes. Les CS les plus infiltrés restaient caractérisés par la présence de LB spécifiques du CG qui étaient à leurs tours corrélés avec des T_{FH} et des TIL-B sécrétant des Ac principalement situés dans des TLS. Dans l'ensemble, ces données soutiennent le concept d'une réponse immunitaire humorale générée par les TIL-B au niveau du site tumoral.

1.4 Maturation des LB dépendants des T_{FH}

L'activation des LB naïfs a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires au sein d'un follicule et est initiée lors de la reconnaissance de l'Ag T dépendant (TD) par le récepteur d'un LB (BCR : de « B cell receptor ») qui va l'endocyter et le dégrader. Le LB régule par conséquent positivement le récepteur de chimiokine C-C de type 7¹⁷ (CCR7 : de « C-C chemokine receptor type 7 ») tout en maintenant l'expression du récepteur de chimiokine C-X-C de type 5¹⁸ (CXCR5 : de « C-X-C chemokine receptor type 5 »). Cela lui permet de se déplacer vers le bord du follicule. Parallèlement, un LT CD4 + naïf s'avère activé lorsqu'il reconnaît l'Ag présenté par une cellule dendritique dans la zone des LT. Cette dernière fournit des signaux de costimulation pour promouvoir la différenciation du LT CD4 + en T_{FH}. Ceci entraîne une régulation à la hausse de CXCR5 et une régulation à la baisse de CCR7. Ces régulations permettent au TFH de s'éloigner de la zone riche en LT et d'aller vers la région interfolliculaire à l'interface LT/LB. À cette frontière, le LB présente des fragments de l'Ag via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II¹⁹ (CMHII) au T_{FH}. En retour, il lui fournit des signaux de survie et

¹⁷ Protéine transmembranaire de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Exprimé dans divers tissus lymphoïdes où ils activent les LB et LT. Le ligand 19 de chimiokine est le ligand spécifique de ce récepteur [49].

¹⁸ Protéine transmembranaire de la famille des récepteurs des chimiokines CXC. Se lie au chimioattractant des LB et permet la migration des LB dans les follicules [50]. Considéré comme marqueur phénotypique des T_{FH} [51].

¹⁹ Protéine membranaire, exprimée par les cellules présentatrices d'antigène, expose les Ag dérivés de protéines extracellulaires. Les Ag présentés par le CMHI sont issus de protéines cytosoliques [52].

de costimulation au travers CD40²⁰/CD40L²¹ (le ligand de CD40), l'Interleukine-21 (IL-21)²² et par le costimulateur inductible des LT (ICOS)²³ (Figure 4.A) [53]. Suite à cette interaction, le LB peut se différencier et proliférer en cellules plasmatiques extrafolliculaires de courte durée ou entrer dans le GC pour devenir des cellules plasmatiques à longue durée de vie et des LB mémoires. Pour cela, les deux types de cellules régulent à la baisse CCR7 tout en exprimant de manière stable CXCR5. Cela permet d'échapper à l'attraction chimiotactique de la zone des LT et de se déplacer vers le centre du follicule. Au centre de ce dernier, les T_{FH} fournissent des signaux de survie et de prolifération aux LB de façon à former le CG via plusieurs voies, dont CD40L, l'interleukine-4 (IL-4)²⁴, l'IL-21 et la mort cellulaire programmée 1 (PD-1)²⁵ [54]. En l'absence de stimuli de survie, les T_{FH} du CG éliminent les LB du CG via Fas-FasL²⁶. La signalisation FasL-Fas déclenche l'apoptose, le recrutement médié par les protéines adaptatrices et l'activation de la cystéine protéase spécifique à l'aspartate : la caspase-8 [55]. Finalement le CG produit des LB mémoires, et des cellules plasmatiques à haute affinité (Figure 4.B) [56].

²⁰ Protéine costimulatrice, réceptrice transmembranaire de CD40L, appartenant à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF, de « Tumor necrosis factor »). Présente sur les CPA, elle est essentielle dans la commutation de classe d'immunoglobulines dépendant des LT, le développement des LB mémoires et la formation du CG [57].

²¹ Protéine (membranaire ou soluble) membre des TNF, exprimée à la surface des LT activés [58].

²² Cytokine immunorégulatrice de la famille des cytokines à chaîne commune. Impliqué dans la génération / maintien des T_{FH} et la formation des CG [59].

²³ Protéine transmembranaire de la superfamille des récepteurs de surface cellulaire CD28 et CTLA-4 exprimée sur les LT activés [60].

²⁴ Cytokine pléiotropique ligand du récepteur de l'interleukine 4. Principalement connus pour stimuler la différenciation d'un LT auxiliaire naïf en Th2 [61].

²⁵ Récepteur inhibiteur transmembranaire du ligand PD1 (PD-L1), de la superfamille Ig. Présent sur les LT activés par l'Ag qui joue un rôle essentiel dans l'induction et le maintien de la tolérance du soi [62].

²⁶ Fas est le récepteur transmembranaire de FasL, deux protéines de la superfamille TNF [63] [64]. La liaison de FasL au domaine extracellulaire de Fas induit la trimérisation du récepteur et déclenche l'apoptose de la cellule.

protègent en utilisant par exemple l'agglutination²⁸, l'activation de la voie classique du complément, l'opsonisation²⁹ pour la phagocytose, et la neutralisation des toxines. Elle joue aussi un rôle important dans la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps³⁰ (ADCC : de « Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity) et se caractérise également par des auto-anticorps³¹ significativement associés aux maladies auto-immunes [68], mais aussi à aux cancers, dont le CS [69].

1.6 Fonctions anti-tumorales des lymphocytes B

L'ensemble des fonctions anti-tumorales des LB discutées sont regroupées dans la figure 5.

1.6.1 Production d'anticorps

Dans l'esprit commun, les Ac se dirigent contre des pathogènes ou des Ag du « non-soi ». Depuis quelques années, nos connaissances s'élargissent sur leurs spectres d'action. Des travaux de notre laboratoire publiés par Garaud *et al.*, 2018 [69] ont révélé que plus de 84% des patients examinés atteints de CS produisaient des auto-anticorps. Ces derniers étaient dirigés contre un ou plusieurs des Ag présents sur une puce à ADN³² de 91 Ag associés aux tumeurs. De cette façon, 8 Ag qui provoquent des réponses d'auto-anticorps associés au CS ont pu être identifiés. Chez la souris, Carmi *et al.*, 2015 [70] ont constaté que le rejet de tumeurs allogéniques³³ est initié par des IgG se liant aux tumeurs qui permettent aux cellules dendritiques d'internaliser les Ag tumoraux et d'activer ensuite les LT CD8 + qui agiront contre la tumeur.

1.6.2 Présentation d'antigènes

Les LB disposent de la capacité à absorber de faibles concentrations d'Ag à l'aide de leurs BCR et peuvent jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Dans le cancer de l'ovaire, les tissus tumoraux restent peu infiltrés par les cellules dendritiques. En dépit de ça, on sait que les LB se situent de façons rapprochées des LT CD8 + dans ces tumeurs. Milne *et al.*, 2009 [71] suggèrent par conséquent que les LB pourraient servir de CPA locale dans ce contexte. Candolfi *et al.*, 2011 [72] ont testé un traitement à base de cytotoxine et de cytokine

²⁸ Représente la formation d'amas de cellules ou de particules inertes par des Ac spécifiques dirigés contre des Ag [73].

²⁹ Processus de reconnaissance et de ciblage des particules envahissantes avant la phagocytose [74].

³⁰ Permet à des cellules effectrices porteuses de récepteurs pouvant reconnaître le fragment cristallisable d'un Ac de tuer la cellule recouverte d'Ac et d'exprimer ensuite à leur surface des Ag dérivés de cette cellule [75].

³¹ Ac dirigé contre une ou plusieurs protéines de l'individu producteur de l'Ac [69].

³² Ensemble de molécules d'ADN fixé sur une surface [69].

³³ Tumeur provenant d'un donneur implanté par la suite dans le receveur [70].

immunostimulante visant à réduire des tumeurs du cerveau chez la souris. Ce traitement a conduit à la régression tumorale dépendante des LT CD8 + médiée par les LB comme CPA.

1.6.3 Fonctions cytotoxiques

Il existe un faisceau de preuves sur la cytotoxicité directe des LB dans la destruction des cellules tumorales. En 1996, Hahne *et al.*, [76] ont démontré pour la première fois dans un modèle murin que les LB pouvaient exprimer FasL. Pourtant, il faudra attendre Tao *et al.*, 2015 [77] pour affirmer que des LB étaient capables d'éliminer directement les cellules cancéreuses par la voie Fas / FasL chez la souris. Pour éliminer les cellules pathogènes, les LT cytotoxiques et les NK sécrètent des granules comme le granzyme B (peptidase). Celle-ci pénètre dans le cytosol par endocytose et cible la caspase-3 (protéase à cystéine), provoquant la cascade des caspases aboutissant à la fragmentation de l'ADN et *in fine* l'apoptose [78]. En 2009, l'équipe de Hahn a montré que les LB humains stimulés par l'IL-21 pouvaient sécréter le granzyme B [79]. La cytotoxicité directe contre les cellules tumorales n'a en revanche été démontrée que dans un modèle murin par Catalán *et al.*, 2015 [80].

1.6.4 Production de cytokines

Comme de nombreuses autres cellules, les LB disposent de la capacité de sécréter des cytokines qui semblent être impliquées dans l'activité anti-tumorale. La lymphotoxine représente une cytokine de la famille TNF produite par les lymphocytes et premièrement identifiée comme favorisant la progression tumorale [81]. Pour Tang *et al.*, 2017 [82], il semblerait que les LB peuvent faciliter la formation des TLS en sécrétant de la lymphotoxine. La même année Sarvaria *et al.*, 2017 [83] découvrent que les LB sécrètent de l'interféron gamma (IFN- γ)³⁴ qui polarise les LT vers une réponse Th1 ou Th2. Ceci expliquerait le bon pronostic attribué au cancer infiltré par les LB.

³⁴ Cytokine anti-inflammatoire de la classe des interférons de type II [84].

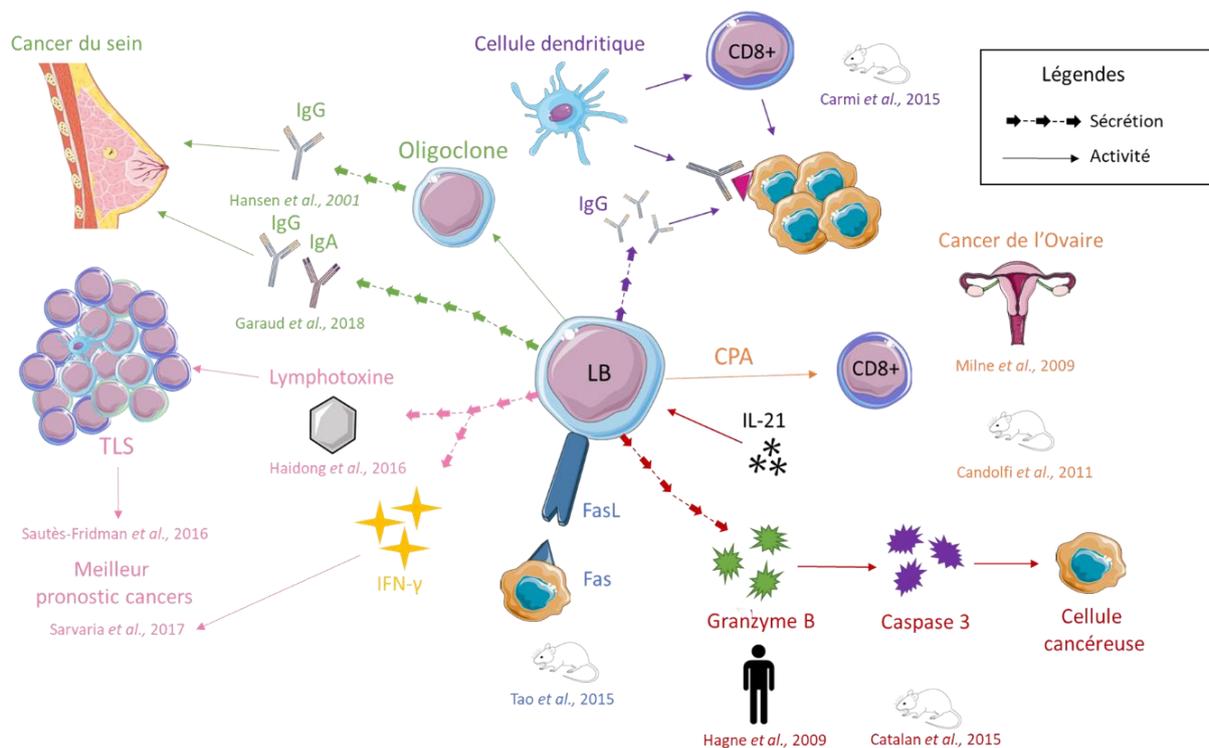


Figure 5 : Fonctions anti-tumorales des lymphocytes B. Schéma créé à partir de la banque d'images « SMART - Servier Medical ART », s. d. [65].

1.7 Fonctions pro-tumorales des lymphocytes B

L'ensemble des fonctions pro-tumorales des LB discutés est regroupé dans la figure 6.

Ces dernières années, en plus du rôle bien établi des Tregs dotés de la capacité d'inhiber la prolifération des LT effecteurs, une nouvelle vague de recherches a décrit un rôle similaire pour les LB. Les lymphocytes B régulateurs (Bregs) représentent des cellules ayant pour rôle d'inhiber ou de supprimer les réponses engagées par le système immunitaire afin de ne pas aboutir à une inflammation excessive [85]. Contrairement aux Tregs et son marqueur FoxP3, aucun marqueur n'a été formellement identifié chez les Bregs. Ce qui permet de les discriminer parmi les autres LB constitue en la libération, tout comme les Tregs, de médiateurs anti-inflammatoires et dont le plus important reste l'interleukine-10 (IL-10)³⁵. Les Bregs peuvent également sécréter l'interleukine-35 (IL-35)³⁶, le facteur de croissance transformant beta 1 (TGF-

³⁵ Cytokine immunorégulatrice majeure qui agit sur de nombreuses cellules du système immunitaire où elle a de profondes fonctions anti-inflammatoires, limitant la perturbation excessive des tissus causée par l'inflammation [86].

³⁶ Cytokine immunosuppressive de la famille de l'interleukine-12 [87].

$\beta 1$)³⁷, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α)³⁸ et exprimer à la surface de leurs membranes des molécules inhibitrices, telles que le ligand de mort programmé 1 (PD-L1)³⁹ [88]. Les Bregs, en tant que sous-population distincte de LB, ont été principalement étudiés pour leurs rôles dans les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires [89]. En dépit de cela, quelques recherches récentes se sont concentrées sur le rôle des Bregs dans le cancer.

1.7.1 Sécrétion d'IL-10

Une étude menée par Shalapour *et al.*, 2015 [90] s'est concentrée sur l'oxaliplatine. Il s'agit d'un agent chimiothérapeutique provoquant une réponse immunogène efficace dans le cancer de la prostate qui active les LT CD8 +. Pourtant, trois modèles différents de cancer de la prostate chez la souris étaient réfractaires à l'oxaliplatine, à moins qu'ils ne soient appauvris en LB. Il s'est avéré en effet que des cellules sécrétrices d'IL-10 qui exprimaient les IgA et PD-L1 empêchaient l'éradication dépendante des LT cytotoxiques des cellules tumorales traitées par l'oxaliplatine. En 2015, Wei et son équipe [91] ont collecté et analysé des ascites⁴⁰ de patientes atteintes de cancer de l'ovaire qui contenaient des fréquences élevées de LB producteurs d'IL-10. En exécutant des cocultures de LT CD8 + avec des LB ascitiques, ils ont constaté que les LT CD8 + ne produisaient plus IFN- γ . Cette suppression était en partie médiée par l'IL-10 qui a provoqué une faible expression des CD80 et CD86. Ces deux dernières représentent des molécules de costimulation exprimée à la surface des CPA qui agissent durant l'activation des LT CD8 + en se liant à leur récepteur CD28. Sans cette costimulation, les LT CD8 + qui reconnaissent l'Ag s'avèrent anergiques⁴¹ et ne peuvent pas s'activer. En empêchant la sécrétion d'IL-10 et en stimulant les CD28, Wei *et al.* ont partiellement inversé la suppression médiée par les LB IL-10+. Récemment, Zhang *et al.*, 2017 [92] ont étudié l'elotuzumab, un Ac humanisé⁴² servant à activer le mécanisme ADCC des NK dans un contexte de myélome. Durant cette étude, ils ont découvert à travers des expériences de cocultures que les NK ne savaient plus supprimer les cellules tumorales quand ils se retrouvaient en présence de LB producteurs d'IL-10.

³⁷ Cytokine pléiotropique de la superfamille des TGF- β . Contrôle de nombreuses fonctions cellulaires (croissance cellulaire, prolifération cellulaire, différenciation cellulaire et l'apoptose) [93].

³⁸ Cytokine proinflammatoire de la superfamille des TNF [94].

³⁹ Glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des Ig, ligand du récepteur inhibiteur immunitaire PD1 [95].

⁴⁰ Accumulation de liquide dans la cavité péritonéale [96].

⁴¹ État hyporéactif d'un LT naïf après une costimulation faible ou une coinhibition forte qui induit une faible activation/production l'interleukine-2 [97].

⁴² Ac humains avec les régions hypervariables (site de liaison à l'Ag) et régions charpentes (acide aminés impliqués dans la structure du site de liaison) remplacés par des régions d'origines murines [98].

1.7.2 Sécrétion de TNF- α

En 2011, Schioppa *et al.*, [99] parviennent à démontrer que les Bregs sont engagés dans la promotion du développement du cancer cutané via la production de TNF- α . La croissance de ce dernier pouvait être réduite chez les souris présentant une carence en LB. Lors du transfert des LB, la croissance du cancer ne restait que partielle, alors que durant le transfert des LB modifiés TNF- α déficient, le cancer se développait. De plus, la résistance au développement du cancer chez les souris déficientes s'avérait associée à une augmentation des LT CD8 + producteurs d'IFN- γ et à une réduction significative des Bregs producteurs d'IL-10. Ensemble, ces données indiquent que le TNF- α intervient dans la promotion de l'activité tumorale via l'IL-10 qui réprime l'immunité antitumorale médiée par les LT CD8 +. Dans une étude de Shao *et al.*, 2014 [100], les Bregs ont favorisé la croissance du carcinome hépatocellulaire en interagissant directement avec les cellules cancéreuses par la voie de signalisation CD40. Dans une expérience de cocultures de Bregs et de cellules tumorales hépatiques, la prolifération de ces dernières a augmenté et l'apoptose a diminué. De façon corrélée à cette prolifération, les sécrétions d'IL-10 et TGF- β 1 ont augmenté et l'expression du TNF- α a diminué. L'inhibition de l'interaction CD40 a conduit à une diminution de TGF- β 1 et d'IL-10 et à l'augmentation de la sécrétion de TNF- α dans la coculture. L'augmentation de l'IL-10 et du TGF- β 1 pourrait favoriser la croissance tumorale en inhibant la sécrétion de TNF- α . Le TNF- α posséderait, à la lumière des études citées ci-dessus, des effets antagonistes. Celui-ci agit comme promoteur de tumeur endogène en stimulant le développement d'un type cancer quand d'un autre côté, il participe à l'élimination des cellules tumorales.

1.7.3 Sécrétion de TGF- β

En 2011, Olkhanud *et al.*, [101] ont procédé à une étude du CS chez la souris qui indique que le rôle principal des Bregs dans le processus de métastases pulmonaires consistait à induire la conversion dépendante du TGF- β 1 des LT CD4 + en Tregs. En l'absence de Bregs, les tumeurs ne parvenaient pas à métastaser efficacement dans les poumons en raison d'une mauvaise conversion de Tregs. Plus tard, Wang *et al.*, 2015 [102] vont plus loin en démontrant chez des patients atteints de cancer gastrique, qu'en sécrétant du TGF- β 1, les Bregs inhibaient la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les LT CD4 +, ce qui les convertissaient en Tregs.

1.7.4 Sécrétion d'IL-35

Wang *et al.*, 2018 [103] ont prélevé des échantillons de sang de donneurs sains et de patients atteints de cancer gastrique non traités. Après analyse, ils constatèrent que les échantillons des patients cancéreux contenaient de fortes quantités de Bregs producteurs d'IL-35. Ces

résultats impliquent que ce groupe de LB pourrait participer à la progression du cancer gastrique.

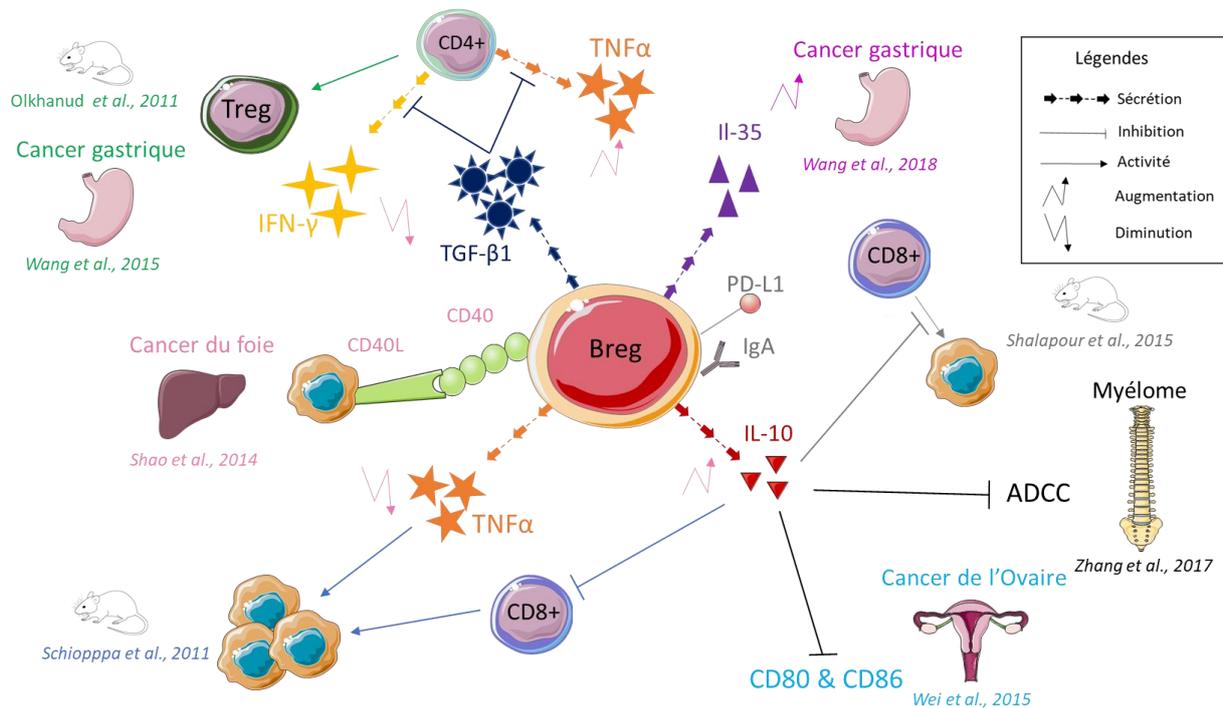


Figure 6 : Fonctions pro-tumorales des lymphocytes B régulateurs. Schéma créé à partir de la banque d'images « SMART - Servier Medical ART », s. d. [65].

1.7.5 Suppression de la réponse T_{FH}

L'étude fonctionnelle des Bregs dans le cancer se concentre principalement sur leurs impacts dans la réponse antitumorale médiée par les LT cytotoxiques. Néanmoins, comme nous l'avons vu ci-dessus, les LB peuvent également répondre au cancer, notamment en produisant des Ac. Ceci est permis suite à l'interaction entre les TFH et LB. À ce jour, une seule étude conduite par Achour *et al.*, 2017 [104] a étudié l'effet des Bregs sur cette fonction des T_{FH} . Pour cela ils ont cocultivé des T_{FH} , des Bregs et des LB pour induire la différenciation terminale de ces derniers en plasmocytes et cellules mémoires. Pour obtenir les T_{FH} , ils ont simulé l'amorçage avec une CPA en cultivant des LT CD4 + humains avec des Ac monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28⁴³, et en ajoutant de l'IL-12⁴⁴ et de l'IL-21 [105]. Les LB quant à eux ont été activés avec du CpG-oligodésoxynucléotides (séquence ADN synthétique) qui simule la détection d'un motif moléculaire associé aux pathogènes par le récepteur toll-like 9 et ont été cultivé avec des fibroblastes transfectés avec le gène pour le CD40L humain dont l'interaction avec le CD40

⁴³ L'anti-CD3 se lie au CD3 et active le récepteur du LT (TCR). L'anti-CD28 se lie au CD28 et stimule le LT sans CD80 ou CD86 [106].

⁴⁴ Permet d'induire la différenciation des LT CD4 + en T_{FH} producteur d'IL-21 [105].

des LB favorise leurs différenciations en Bregs [107 & 108]. Dans les cocultures, les Bregs ont inhibé la différenciation des LB en plasmocytes et LB mémoire et entravé la sécrétion des Ig (Figure 7). Pour cela, les Bregs ont modulé l'expression des récepteurs de l'IL-21 sur les T_{FH} et les LB, ont impliqué des interactions avec les molécules CD40, CD80, CD86 et ont nécessité la production d'IL-10 et de TGF- β . Même si cette étude n'a pas été entreprise dans un contexte tumoral, les résultats acquis permettent d'établir les bases de mécanismes à investir dans la recherche de la lutte contre le cancer.

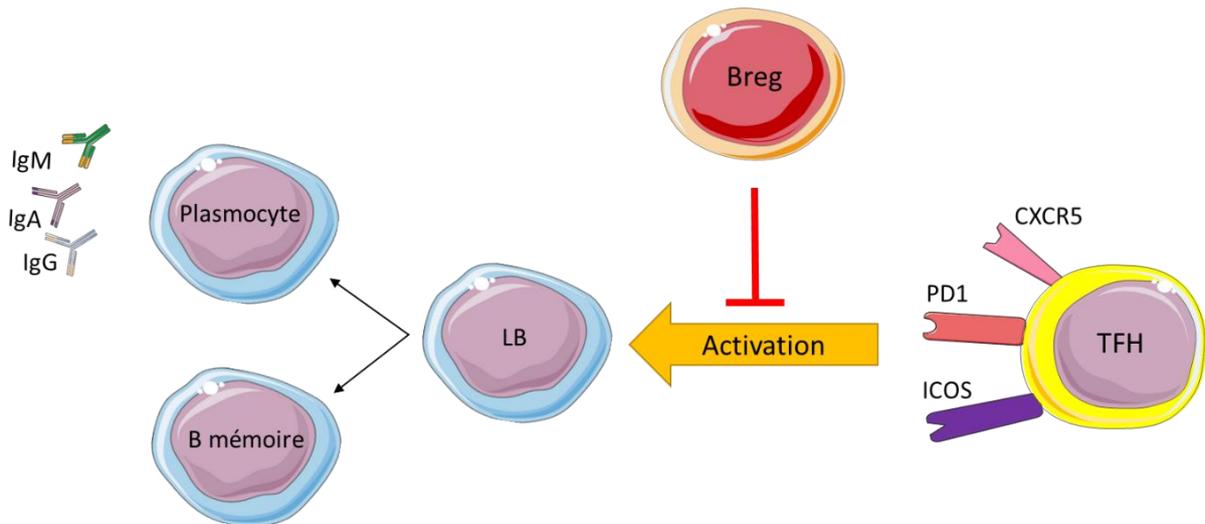


Figure 7 : Effet immunosuppresseur des lymphocytes B régulateurs (Bregs) sur la fonction des T_{FH}. Schéma adapté de Achour et al., 2016 [104] et créé à partir de la banque d'images « SMART - Servier Medical ART », s. d. [65].

Suite à ces différentes publications, il s'avère possible d'affirmer aujourd'hui que les Bregs jouent un rôle important et complexe de par l'hétérogénéité de leurs effets dans le cancer.

1.8 Résultats préliminaires

En 2019 notre laboratoire a commencé une étude (non publiée) en vue de déterminer la présence des Bregs dans le CS. Des résultats préliminaires (Figure 8) ont rapporté que le pourcentage de LB sécrétant d'IL-10 (Bregs) apparaissaient significativement plus élevé chez les LB provenant d'une tumeur du sein (TIL-B) contrairement au sang périphérique des patientes atteintes de CS ou de donneur sain.

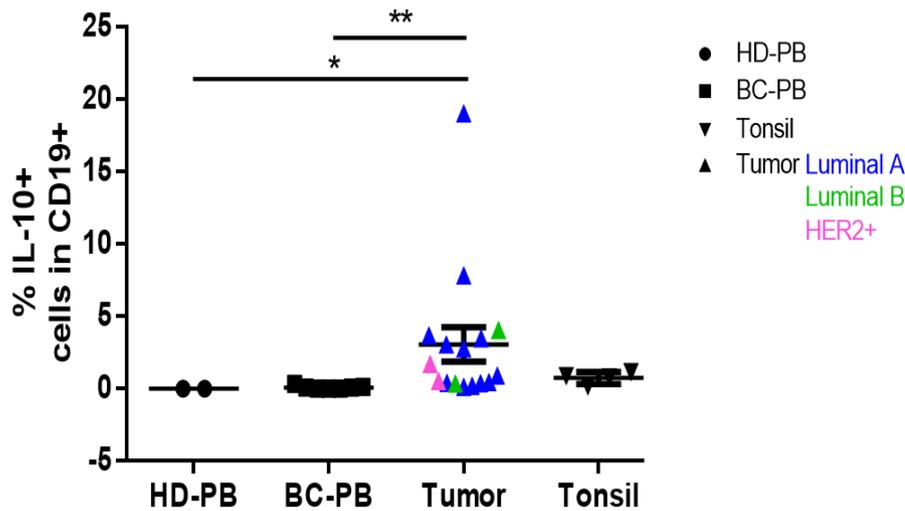


Figure 8 : Pourcentages de LB producteur d'IL-10 dans : le sang de donneur sain (HD-PB), le sang de patiente atteint de CS (BC-PB), les tumeurs de CS et les amygdales de patients sains (tonsil) après stimulation par 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate et Ionomycine.

1.9 Objectifs de l'étude

Se basant sur l'étude de Achour *et al.*, 2017 [104] et ayant attesté la présence de Bregs dans les tumeurs du CS dans des résultats préliminaires, l'objectif principal de cette étude résidait en la caractérisation de l'effet immunosuppresseur des TIL-B de tumeur du CS sur la fonction des T_{FH}. L'impact des TIL-B sur l'expression et la sécrétion des IgG par les plasmocytes spléniques a été évalué par le biais d'analyses phénotypiques et fonctionnelles après optimisation des protocoles. De façon indépendante, l'effet des facteurs solubles présent dans le microenvironnement tumoral (appelé par la suite surnageant de tumeur (SNT)) sur l'activation de LT et la différenciation terminale des LB a également été examiné.

2. Matériels et méthodes

Pour évaluer l'effet immunosuppresseur des TIL-B, une coculture regroupant des TIL-B de tumeur du CS, des T_{FH} et des LB d'une rate saine a été entreprise. Pour dépendre l'effet du SNT sur les LT et LB, des cocultures regroupant des T_{FH} et des LB spléniques furent également réalisées en compagnie de SNT de différentes tumeurs. Ces deux expériences ont été rassemblées sous le nom de tests T_{FH}. Les matériels et méthodes essentielles à celles-ci sont décrits ci-dessous.

2.1 Mise en place des tests T_{FH}

2.1.1 Isolation des splénocytes

Les splénocytes, cellules issues de rates saines, requises à l'expérience ont été dissociés mécaniquement le jour même de l'ablation de celle-ci. Une fois l'homogénat filtré, les cellules ont été séparées par un gradient de densité en utilisant du Ficoll. Les cellules ayant formé un anneau au centre du tube ont été extraites et lavées avec du tampon phosphate salin (PBS : de « Phosphate buffer saline »). Finalement, les cellules ont été dénombrées et disposées dans des cryotubes à raison de $20 \cdot 10^6$ cellules dans du PBS contenant 10% de diméthylsulfoxyde. Ces tubes ont tout d'abord été disposés à -80°C puis entreposés dans des cuves spéciales contenant de l'azote liquide. Cette congélation en deux étapes se trouvait primordiale à la bonne conservation des cellules.

2.1.2 Isolation les lymphocytes B de la rate

À partir des splénocytes fraîchement décongelés dans du RPMI chaud, les LB ont été isolés par déplétion des non-LB (sélection négative) grâce au kit « B cell isolation kit II, human » (Miltenyi Biotec) en suivant le protocole du fabricant. Brièvement, les non-LB ont été indirectement marqués magnétiquement avec un cocktail d'Ac monoclonaux conjugué à la biotine⁴⁵, comme marquage primaire⁴⁶ (Figure 9.1). Des Ac monoclonaux anti-biotine conjugués à des billes magnétiques ont ensuite été employé comme marquage secondaire⁴⁷. Les non-LB magnétiquement marqués ont été retenus dans une colonne par le champ magnétique d'un séparateur, tandis que les LB non marqués ont été élués dans un premier tube. Pour finir, l'aimant a été retiré et une pression a été exercée pour diriger la fraction positive (c'est-à-dire celle contenant les cellules non-LB retenues par l'aimant) dans un second tube (Figure 9.2).

⁴⁵ Marqueur couramment utilisé dans la détection, la purification et l'immobilisation des protéines en raison de sa liaison extraordinairement forte à des protéines comme l'avidine ou la streptavidine [109].

⁴⁶ Utilise un Ac primaire qui se fixe directement sur l'Ag ciblé.

⁴⁷ Utilise un Ac secondaire qui se fixe sur l'Ac primaire pour détecter ce dernier.

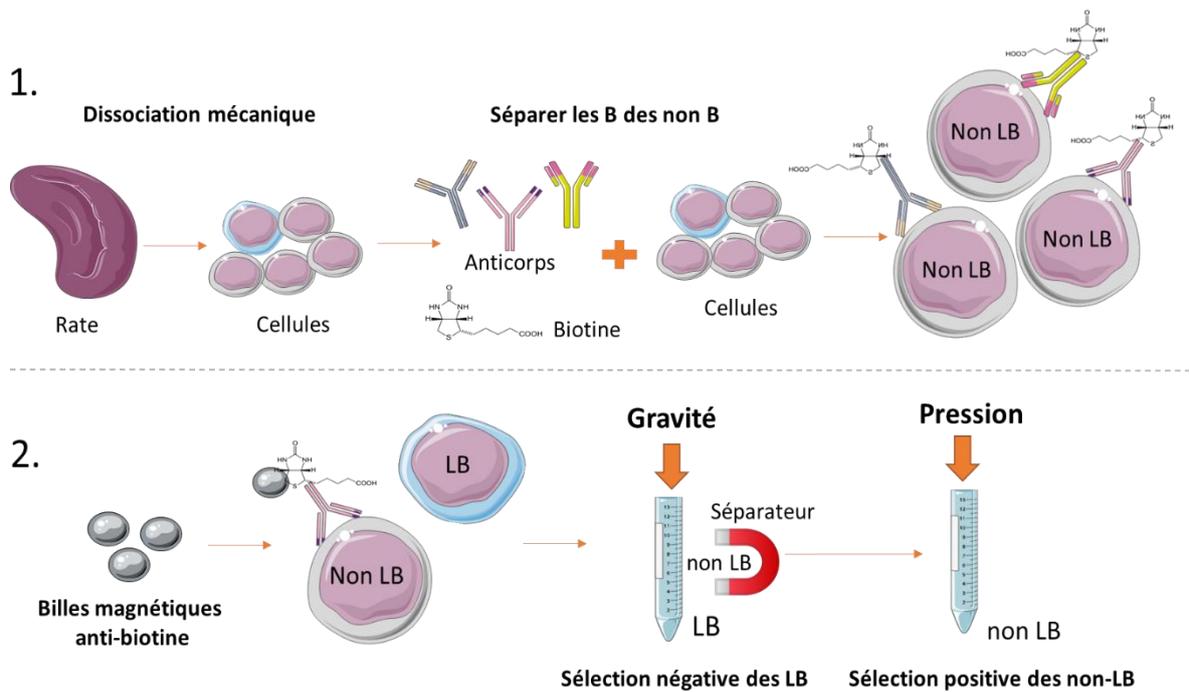


Figure 9 : Schéma synthétique de la sélection négative des lymphocytes B à partir de splénocytes de rate saine à l'aide du kit «B cell isolation kit II, human » (Miltenyi Biotec). Schéma créé à partir de la banque d'images « SMART - Servier Medical ART », s. d. [65] et adapté de (« B Cell Isolation Kit II, human - B cells - MicroBeads and Isolation Kits - Cell separation reagents - MACS Cell Separation - Products - Miltenyi Biotec - Belgique », s. d.) [110].

2.1.3 Tri des T_{FH} et des $LT CD4 +$ classiques

Dans l'optique d'isoler les T_{FH} parmi les non-LB collectés, les cellules ont été séparées grâce à des Ac conjugués à des fluorochromes en utilisant un trieur de cellules. Le tri des T_{FH} était basé sur l'expression positive de CD4, CXCR5, ICOS et PD1. Un contrôle négatif ($LT CD4 +$ classiques) qui n'exprime pas toutes ces protéines (sauf CD4) a également été trié (Figure 10).

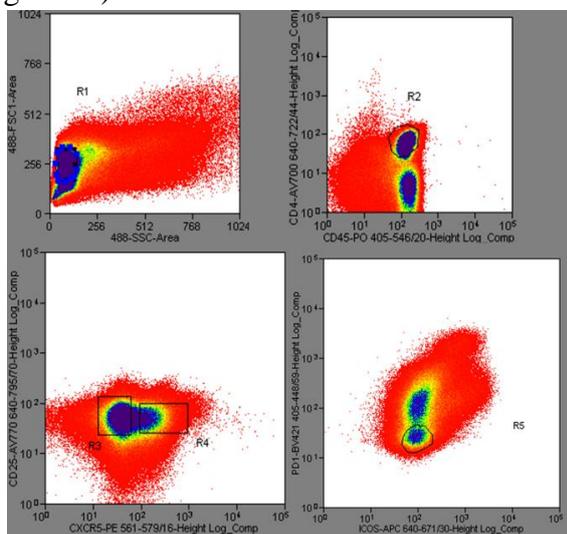


Figure 10 : Exemple représentatif de la stratégie de tri des cellules T_{FH} et $LT CD4 +$ classiques (contrôle négatif). Le tri des T_{FH} était basé sur l'expression positive de CD4, CXCR5, ICOS et PD1. Dans l'exemple, cela est représenté par les fenêtres R1, R2 et R4. Un contrôle négatif qui n'exprime pas ces protéines a également été trié, pour cela les fenêtres R1, R2, R3 et R5 ont été utilisées.

2.1.4 Échantillons tumoraux

Les TIL-B et le SNT ou le surnageant du tissu adjacent (SNAT, contrôle négatif) employé pour l'expérience ont été recueillis par dissociation non enzymatique des tissus de tumeurs fraîches du jour (et de leurs tissus adjacents), en suivant le protocole de Garaud *et al.*, 2014 [111]. Brièvement, les fragments tissulaires (adjacent et tumeur) ont été disséqués dans du milieu cellulaire hématopoïétique sans sérum défini chimiquement (ci-après dénommé milieu) X-VIVOTM 15 de chez Lonza. Les fragments produits ont été homogénéisés avec un dissociateur. L'homogénat a été filtré par la suite sur un tamis cellulaire de 40 µm dans un premier tube conservé temporairement à 4°C. Une série de lavages avec du milieu a été accompli sur le tube dissociateur et le tamis afin de rassembler tous les éléments dans un second tube. Les deux tubes ont ensuite été centrifugés pendant 15 min à 600 g. Le surnageant du premier tube a été clarifié à 15 000 g pendant 15 min à 4°C et aliquoté avant stockage à l'azote liquide, et représente finalement le SNT ou SNAT. Le surnageant du second tube a été écarté et les culots cellulaires des deux tubes ont été resuspendus et regroupés dans 1 ml de milieu puis entreposés à l'azote liquide. Avant stockage, un échantillon a été prélevé et le nombre de cellules viables a été estimé à l'aide d'un compteur de cellule.

2.1.5 Isolation des TIL-B

Les TIL-B de la tumeur du CS ont été isolés par sélection positive en utilisant le kit MicroBead CD19 humain (Miltenyi Biotec) selon le protocole du fabricant. Tout d'abord, les TIL-B (CD19⁴⁸ +) ont été magnétiquement marquées avec des « MicroBeads CD19 » conjuguées à des Ac monoclonaux (Figure 11.1). Ensuite, la suspension cellulaire a été chargée sur une colonne, qui a été placée dans le champ magnétique d'un séparateur. Les cellules TIL-B marquées ont été retenues magnétiquement, alors que les cellules non marquées ont chuté par gravité dans un premier tube qui a ensuite été écarté. Après avoir retiré l'aimant, les TIL-B ont été élués par pression dans un second tube (Figure 11.2).

⁴⁸ Glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des Ig. Marqueur des LB, elle régule le développement et l'activation des LB par le biais d'interactions avec CD21, CD22 et le BCR [112].

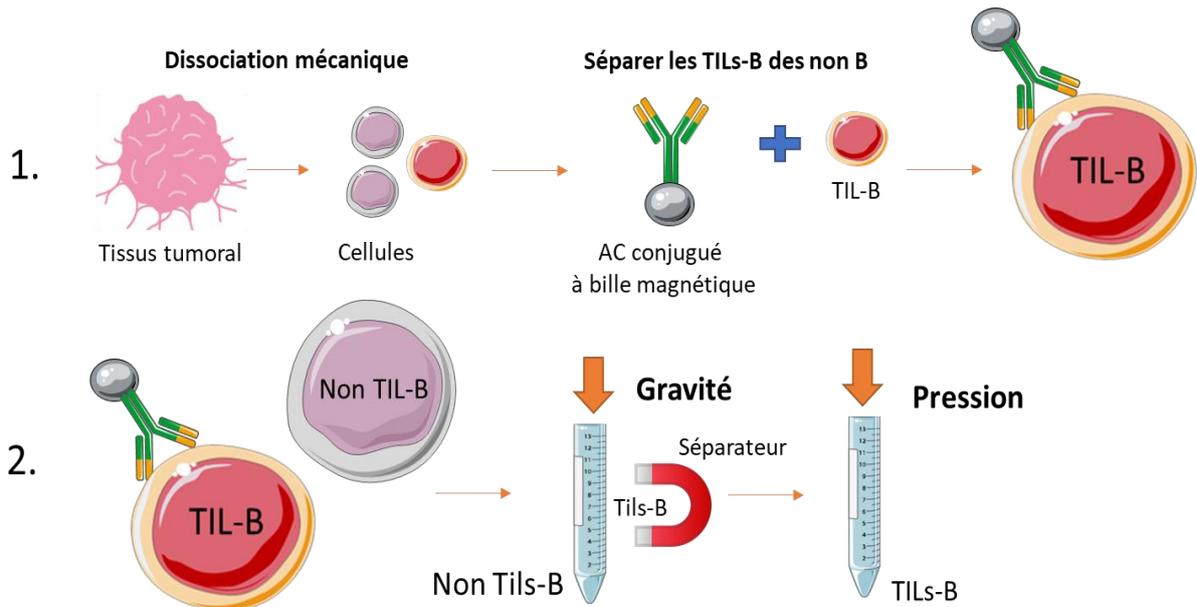


Figure 11 : Schéma synthétique de la sélection positive des TIL-B d'une tumeur de CS à l'aide du kit MicroBead CD19 humain (Miltenyi Biotec). Schéma créé à partir de la banque d'images « SMART - Servier Medical ART » [65].

2.1.6 Cultures cellulaires

Différentes cocultures composées de populations cellulaires distinctes ont été employées pour la mise en place des tests T_{FH} .

Les tests T_{FH} contrôle étaient composés de :

- 10 000 T_{FH} ou LT CD4 + classiques et 25 000 LB dans 200 μ l de RPMI complet.
- 10 000 T_{FH} et 2 x 25 000 LB dans 200 μ l de RPMI complet

Les tests T_{FH} étaient composés de :

- 25 000 LB, 10 000 T_{FH} et 25 000 TIL-B dans 200 μ l de RPMI complet
- 25 000 LB, 10 000 T_{FH} et 100 μ l de SNT ou SNAT dans 100 μ l de RPMI complet.

Toutes les cocultures ont été entreprises dans des plaques 96 puits en présence de 0,5 μ g / ml d'entérotoxine staphylococcique B (SEB) pour imiter l'interaction entre les T_{FH} spécifiques de l'Ag et les LB présentant l'Ag [113]. Finalement, les cellules ont été incubées à 37°C, 5% de CO₂ ceci durant 6 jours.

2.2 Cytométrie en flux

Les populations lymphocytaires présentes dans les cultures/cocultures ont été examinées au cytomètre à différents jours de l'expérience, en incubant les cellules avec des Ac spécifiques couplés à des fluorochromes.

2.2.1 Marquages membranaires

Au jour 0, la pureté de l'isolation des LB et du tri des LT CD4 + classiques et des T_{FH} a été mesurée.

Au jour 1, un test de viabilité des cellules a été effectué.

Au jour 3, la différenciation des LB en LB mémoires/plasmocytes et l'activation des LT ont été déterminées.

Le dernier jour (jour 6), de nouveau la différenciation des LB en LB mémoires a été caractérisée, et l'expression des IgG et IgM ont été évaluées par une coloration intracellulaire.

La viabilité des cellules a également été contrôlée aux jours 3 et 6.

Les panels d'Ac utilisés sont décrits dans la figure 12 ci-dessous.

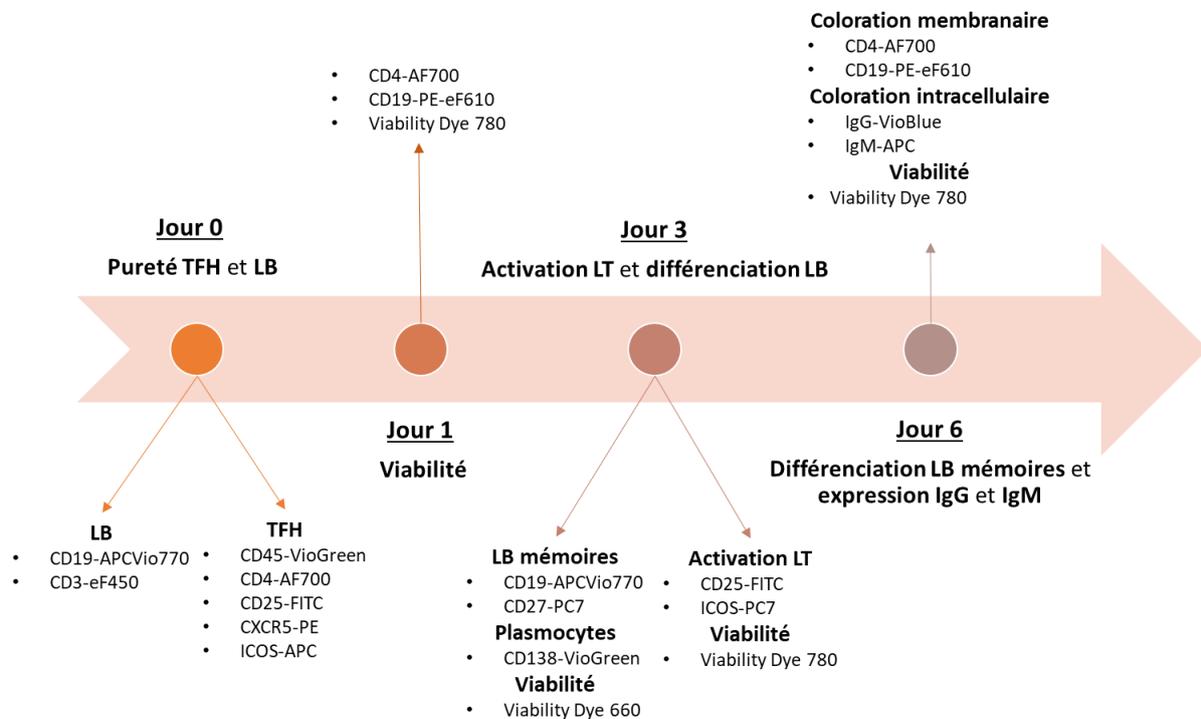


Figure 12 : Frise chronologique des marquages effectués sur les cellules et les panels d'anticorps associés.

2.2.2 Coloration intracellulaire

Pour la coloration intracellulaire, les cellules ont d'abord été incubées avec des Ac visant des protéines membranaires (Figure 12) 30 min à 4°C dans le noir. Puis le kit « BD Cytofix / Cytoperm™ » a été employé. Après lavage des cellules avec le tampon de coloration, les cellules ont été resuspendues dans une solution de fixation/perméabilisation et ont été incubées 20 min à 4°C dans le noir. Une fois les cellules fixées et perméabilisées, celles-ci ont été lavées

avec la solution BD Perm/Wash et remises en suspension dans cette même solution. Par la suite, le marquage des Ig intracellulaire a été appliqué en laissant incuber les cellules avec des Ac spécifiques (Figure 12) 30 min à 4°C dans le noir. Enfin, les cellules ont été rincées deux fois avec la solution BD Perm/Wash puis resuspendues dans cette dernière et disposées toute la nuit dans le noir à 4°C. Cette dernière étape permettait selon des résultats précédents d'avoir de meilleures colorations. Le lendemain les données ont été acquises sur le cytomètre en flux.

2.3 Analyses des surnageants des cocultures

Les surnageants de cultures/cocultures prélevées pour les tests au jour 6 ont été conservés à -80°C. Ces derniers ont servi à l'analyse de la sécrétion des IgG totales au travers de deux techniques. Par dosage immuno-enzymatique sur support solide (ELISA, de « Enzyme-linked immunosorbent assay ») et essai par billes cytométriques (CBA, de « Cytometric beads array »).

2.3.1 ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés avec le test «Ready-SET-Go (eBiosciences) ». Premièrement, une plaque de 96 puits a été recouverte d'Ac monoclonaux anti-IgG humaine dans du PBS pendant toute une nuit. Les puits ont ensuite été rincés avec du tampon de lavage (PBS, Tween-20 0,05%) puis du tampon de blocage a été ajouté pendant 2 heures à température ambiante pour éviter l'adsorption non spécifique d'autres protéines. Ensuite, les échantillons pré-dilués et des standards avec des concentrations connues d'IgG ont été ajoutés et incubés pendant 2 heures à température ambiante. Les plaques ont ensuite été lavées et incubées avec des Ac monoclonaux de détections (anti-IgG humaines conjuguées à la peroxydase de raifort pendant 1 heure dans les mêmes conditions. Après incubation de 15 min avec une solution de substrat (5,5'-tétraméthylbenzidine) pour détecter la peroxydase de raifort, une solution-stop d'H₂SO₄ a été adjointe. Finalement, la plaque a été lue via un spectrophotomètre à 450 nm (longueur d'onde de référence 670 nm).

2.3.2 Essai par billes cytométriques

Une explication du principe du CBA est disponible en annexe 7.1.

Pour les essais par billes cytométriques, le kit « BD Cytometric Bead Array Human Immunoglobulin Master Buffer Kit » a été employé en suivant le protocole du fabricant. Tout d'abord, il a été nécessaire de reconstituer le standard lyophilisé avec un produit spécial « assay diluent » fourni dans le kit. Par la suite, une dilution en série a été accomplie pour créer une gamme étalon. Puis, il a fallu préparer le mix de billes de captures et l'agent de détection PE en fonction du nombre d'échantillons. Ces derniers ont par ailleurs été dilués 50x avec l'assay

diluent. Cette dilution se basait sur des résultats d'expériences antérieurement pratiquées dans notre laboratoire. Une fois la plaque avec filtre de 96 puits humidifié avec le tampon de lavage, les échantillons (y compris les standards) et le mix de billes ont été disposés dans les puits pour une incubation de 1h. La plaque a ensuite été rincée deux fois (Figure 13.1). Les anticorps de détection ont été ajoutés et la plaque a été incubée pendant 2h. Finalement, les échantillons ont été placés dans des tubes 5 ml pour être analysés par cytométrie en flux (Figure 13.2). Les résultats ont été acquis avec le logiciel FCAP Array™ pour générer des tableaux et des graphiques.

La moyenne d'intensité de fluorescence obtenue avec un standard IgG totale fraîchement reconstitué a été comparée à celle d'un standard congelé à -80°C et celle d'une lecture de plaque au cytomètre effectuée trois jours après l'expérience.

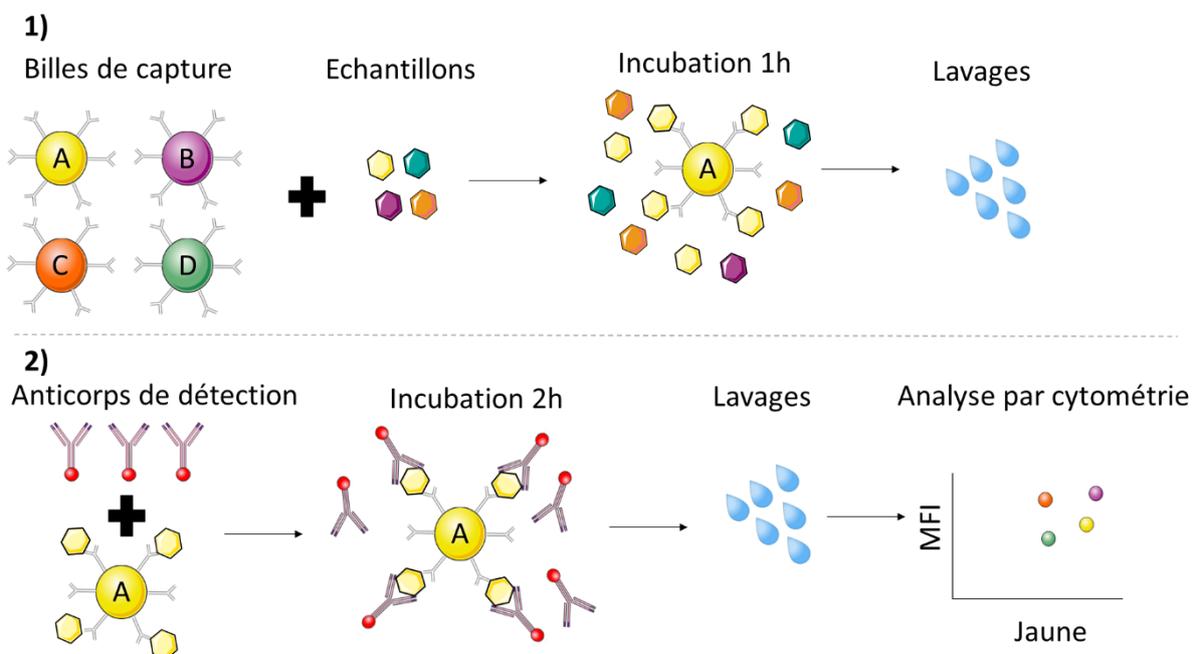


Figure 13 : Schéma synthétique du protocole de l'essai par billes cytométriques. Schéma créé à partir de la banque d'images « SMART - Servier Medical ART », s. d. [65] et adaptée de Salazar et al., 2017 [114].

2.4 Images, analyses et statistiques

Des images des cocultures ont été capturées aux jours 3 et 6 à l'aide de l'appareil ZOE fluorescent cell imager de Bio-Rad™. Ces photographies ont ensuite été analysées avec le logiciel Image J pour déterminer la surface des clusters⁴⁹.

⁴⁹ Amas de cellules.

Les scans des coupes des tumeurs ont été effectués avec le NanoZoomer RS Digital Pathology System de chez Hamamatsu et observés avec le logiciel NDPview.

Toutes les analyses par cytométrie ont été acquises avec le cytomètre NAVIOS (Beckman Coulter) puis ont été interprétées avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Le tri des cellules a été procédé à l'aide du trieur de cellules MoFlo ASTRIOS (Beckman Coulter).

Les graphiques ont été créés à l'aide du logiciel Prism 8 (GraphPad).

3. Résultats

3.1 Mise en place des tests T_{FH}

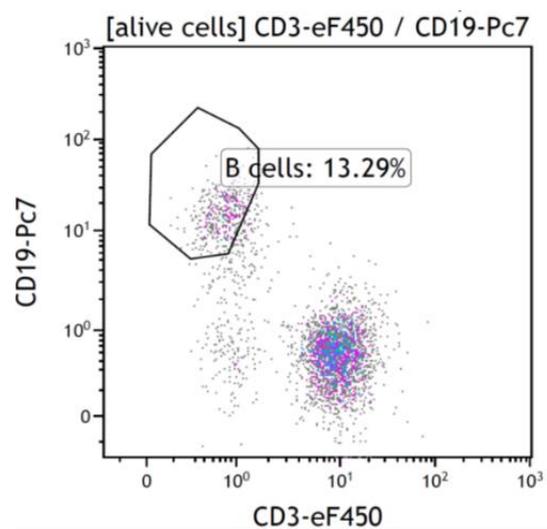
La première étape fut d'identifier les tumeurs suffisamment infiltrées par des TIL-B. Dans un second temps, pour mettre en place les cocultures, des LB, T_{FH} & CD4⁺ de la rate saine, et des TIL-B de la tumeur ont été isolés.

3.1.1 Caractérisations des tumeurs

Après l'excision d'une tumeur par l'équipe chirurgicale, notre laboratoire réceptionne un fragment sur lequel une analyse cytométrique est opérée de façon à en déterminer la composition immunitaire. En parallèle, le service d'anatomo-pathologie procède à un diagnostic à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline/éosine⁵⁰ et d'une IHC.

Les tumeurs de trois patientes (Pt1, Pt2 & Pt3) ont été sélectionnées en raison de leur fort taux de TIL-B (>12%). À titre d'exemple, le taux d'infiltration en LB de la tumeur de la Pt1 était d'environ 13% (Figure 14).

Figure 14 : Analyse par cytométrie de l'infiltration des LB CD19⁺ de la tumeur de la Pt1. L'anticorps CD19-Pc7 cible les LB CD19⁺ et l'anticorps CD3-eF450 est utilisé comme contrôle pour vérifier la présence de LT CD3⁺.



⁵⁰ Coloration qui permet dans un tissu typique de colorer les noyaux en bleu, et le cytoplasme/matrice extracellulaire avec des variations de rose [115].

D'après les pathologistes, d'un point de vue histologique ces trois tumeurs représentaient des carcinomes canaux. L'analyse du sous-typage moléculaire de la Pt1 (10% *in situ*) chez qui ont été prélevés les TIL-B, a révélé qu'il s'agissait d'une Luminal B, celui la tumeur Pt2 d'une HER2+ et celui de Pt3 d'une Luminal B.

La coloration à l'hématoxyline/éosine a permis de déterminer la présence et le positionnement des TIL vis-à-vis de la tumeur. De façon remarquable, les trois tumeurs présentaient une morphologie extrêmement hétérogène. Toutefois, comme attendu les TIL se situaient dans le stroma formant des amas denses autour du tissu tumoral (Figure 15).

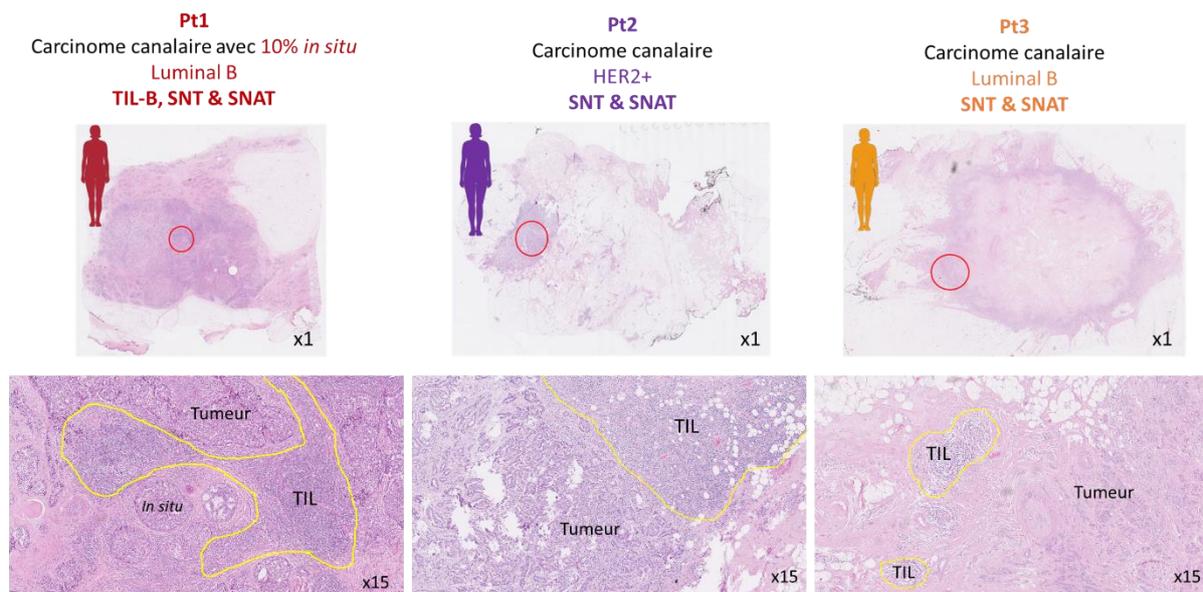


Figure 15 : Images des coupes des tumeurs des Pt1, Pt2 et Pt3 colorées à l'hématoxyline/éosine permettant de discriminer les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) des tissus tumoraux (Tumeur). Vue générale (x1) ; cercle rouge ; agrandissement de la zone (x15) ; contour jaune : TIL dans le stroma.

La complexité et la diversité intrinsèque aux échantillons tumoraux permettent d'acquérir des informations essentielles qui seront prises en compte dans l'interprétation des résultats de l'étude, mais aussi dans la continuité du projet.

3.1.1 Contrôles de la pureté du tri des $T_{FH}/CD4+$ et de l'isolation des lymphocytes B

Afin de disposer des splénocytes de rate saine requis à la mise en place des tests T_{FH} , une isolation des LB a été entreprise par sélection négative, puis les cellules non-LB issus de cette première isolation ont été séparées avec un trieur de cellules pour sélectionner les T_{FH} et les LT $CD4+$ classiques.

D'après l'exemple représentatif des résultats avant les tris exposés dans la figure 16.A, parmi la population lymphocytaire (CD45 +) qui représentait 51% des cellules, 41% correspondaient simplement des CD4 +, et au sein de ces derniers 73% s'avéraient être des LT CD4 + classiques (CD4 +, CD25 +) et 15% des T_{FH} (CD4 +, CXCR5 +). Après tri (Figure 16.B) les T_{FH} et les LT CD4 + classiques étaient purs à >95%. Une pureté d'au moins 98% s'avérait quant à elle obtenue après isolation des LB (Figure 16.C).

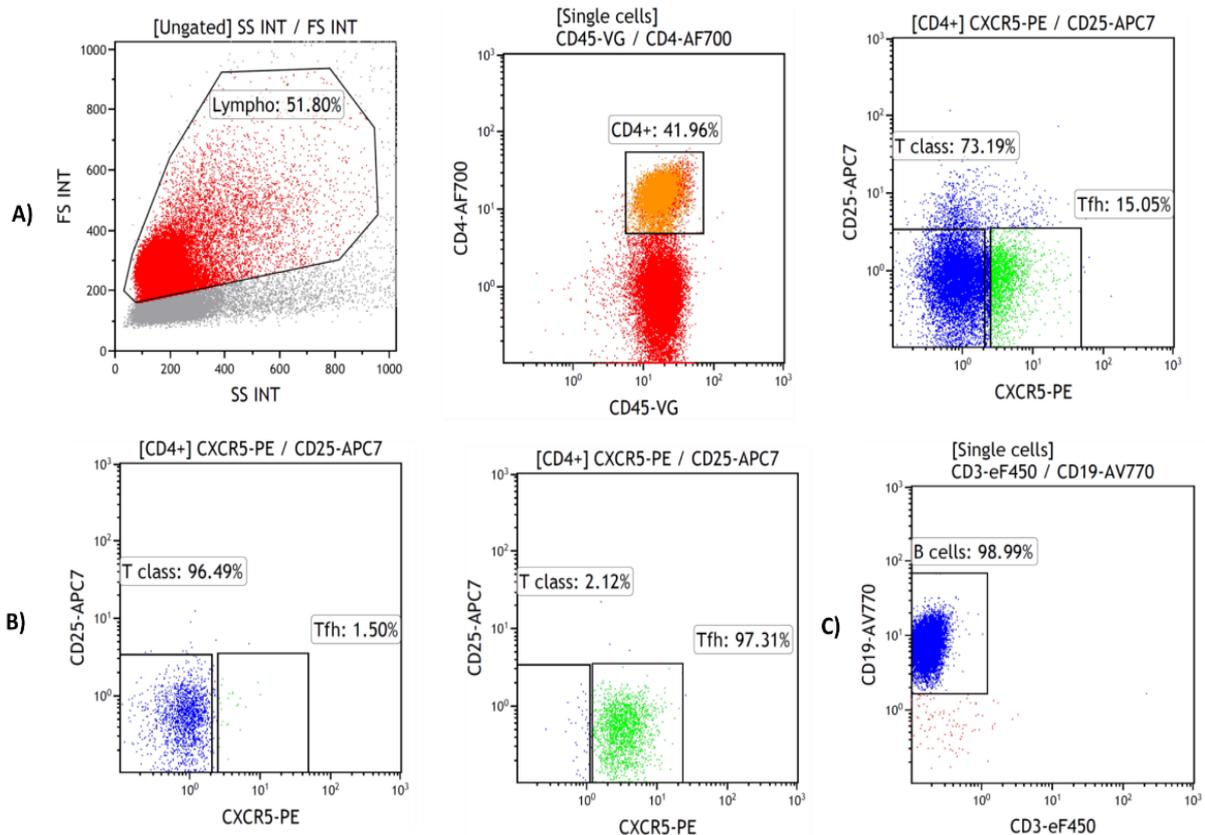


Figure 16 : Analyses cytométriques du tri des T_{FH} (CXCR5 + CD25 +) et des LT CD4 + classiques (CD4 + CD45 +) avant tri (A), après tri (B) et de la pureté des LB (CD19 +) après isolation (C).

Suite aux résultats acquis, il est possible de confirmer le tri et l'isolation efficace de tous les sous-types lymphocytaires nécessaire à la mise en place de l'expérience.

3.1 Cultures cellulaires

Après avoir prélevé toutes les populations de cellules souhaitées pour le test T_{FH} et les cocultures avec SNT, des cultures de 6 jours stimulées par SEB ont été entreprises. Des images, des analyses phénotypiques (différenciation des LB) et fonctionnelles (activation des LT) ont été réalisées durant la période de culture.

3.2.1 Suivi photographique des cocultures

Des clichés aux jours 3 et 6 des différentes cocultures ont été capturés et la surface des clusters formés par les cellules a été calculée.

Les cocultures de LT classiques CD4 + & LB, T_{FH} & LB et celles avec les SNAT (Figure 22 annexe 7.2) présentaient un cluster naissant de cellules au jour 3 et finissaient par former un cluster au bord bien défini au jour 6 (Figure 17.A). Cependant, la surface des clusters des cocultures des LT classiques CD4 + & LB et avec le SNAT apparaissait significativement plus grande que celles des T_{FH} & LB (Figure 17.B). Dans la coculture avec le SNT de la Pt1, les cellules n'ont pas développé un cluster au bord clairement défini, mais une masse nuageuse (Figure 17.A). La coculture avec le SNT de la Pt2 a modelé quant à elle un cluster bien visible au jour 6 (Figure 17.A), mais qui reste considérablement plus petit comparé aux cocultures contrôles (Figure 17.B). Enfin, dans les cocultures avec le SNT de la Pt3 ou celle avec les TIL-B de la Pt1, les cellules n'ont pas formées de cluster (Figure 17.A).

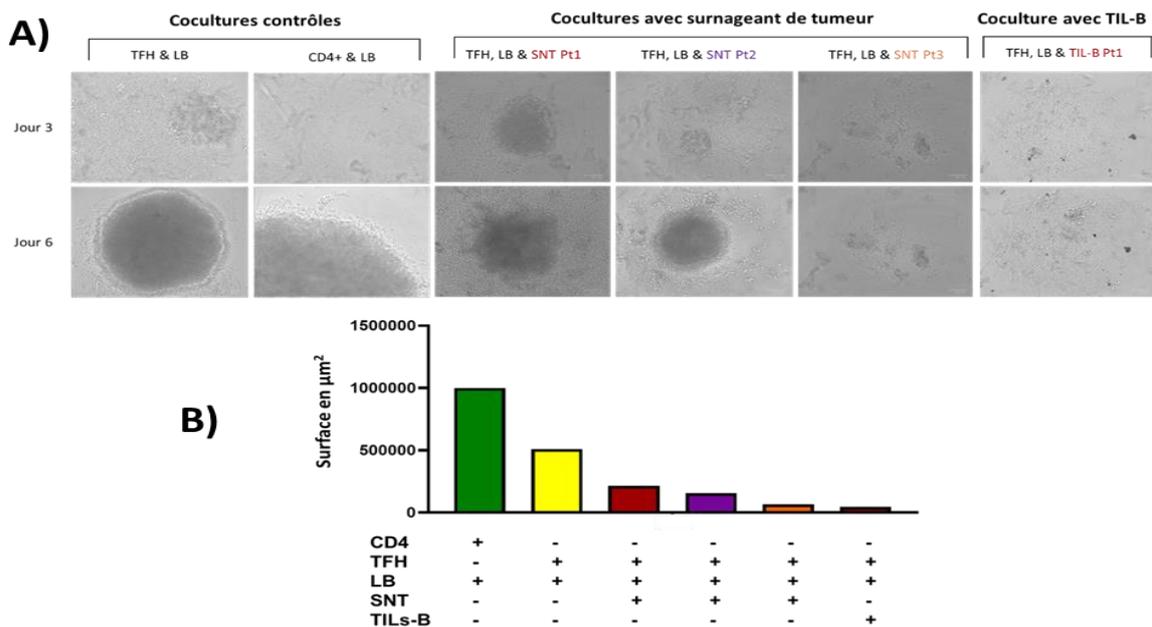


Figure 17 : A) Suivre photographique des cocultures avec SNT des Pt1, Pt2 et Pt3 aux jours 3 et 6. B) Surfaces des clusters de cellules en μm^2 . Type cellulaire : (+) Présent ; (-) Absent.

L'analyse photogénique a permis de suivre l'état d'avancement des cocultures durant les tests T_{FH}.

3.2.2 Activations des lymphocytes T

Avant l'ajout de TIL-B ou de surnageant, l'activation au jour 3 des LT représentés par l'expression de CD25 et ICOS en présence de LB et stimulé par du SEB a été vérifiée dans un test T_{FH} contrôle. L'activation au jour 3 des LT des cocultures avec SNT ou SNAT a également été analysée.

Dans le test T_{FH} contrôle, 20 % des LT classiques $CD4^+$ et 55 % des T_{FH} apparaissent activés, bien que dans les cultures de cellules seules $>2\%$ des LT classiques $CD4^+$ et 3% des T_{FH} étaient activés (Figure 18.A). Comme dans le test T_{FH} contrôle, l'activation des LT s'avérait meilleure pour les cocultures T_{FH} & LB (2/3) que celles avec des LT classiques $CD4^+$ & LB. L'expression membranaire des marqueurs ICOS et CD25 sur les LT atteste la possibilité d'activer les LT par stimulation au SEB. Quand les cellules ont été cultivées avec du SNT, l'activation des T_{FH} apparaissait divisée par deux par rapport à celles avec le SNAT. Ces dernières possédaient par ailleurs similairement le même pourcentage de T_{FH} activé que celles sans SNAT (Figure 18.B). La présence du SNT de tumeur semble en conséquence restreindre l'activation des LT.

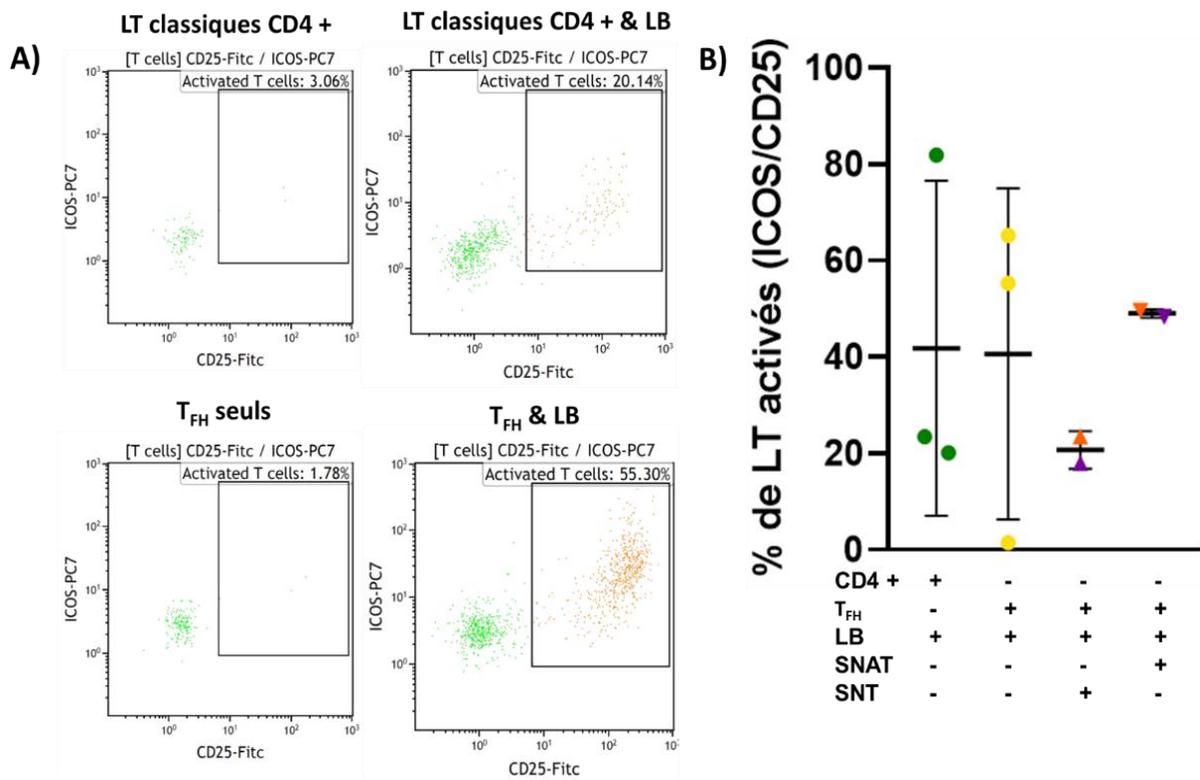


Figure 18 : A) Analyses cytométriques du pourcentage d'activation (ICOS + CD25 +) des T_{FH} et LT classiques $CD4^+$ dans les cocultures du test T_{FH} contrôle. B) Pourcentage d'activation (ICOS + CD25 +) des T_{FH} et LT classiques $CD4^+$ dans les cocultures de tous les tests T_{FH} . Type cellulaire : (+) Présent ; (-) Absent.

3.2.3 Différenciation terminale des lymphocytes B

3.2.3.1 Lymphocytes B mémoire

La différenciation terminale des LB en cellules mémoires (CD19 +, CD27⁵¹ +) a été évaluée dans le test T_{FH} contrôle, et dans tous les autres tests T_{FH}, ceci à différents jours en fonction des conditions de cultures.

Le pourcentage de LB mémoires dans les cultures de LB seuls et de LT classiques CD4 + & LB a diminué de plus de la moitié entre les jours 3 et 6 (Figure 19.A et B). La plupart des cocultures T_{FH} & LB (2/3) ont vu leur population de LB mémoires atteindre environ 70 % au jour 6 (Figure 19.A et B). Les résultats de cette expérience démontrent la possibilité d'obtenir des LB mémoires dans les conditions exposées. Au même titre que les cocultures contrôles, celles avec les SNAT et le SNT de la tumeur du Pt3, ont permis la différenciation des LB en LB mémoires qui représentaient approximativement 60% des cellules. Dans les cocultures avec le SNT de la Pt2 et Pt3, les pourcentages de LB s'approchent de zéro au jour 6 (Figure 19.B). Le SNT semblait avoir une influence négative sur la différenciation terminale des LB en LB mémoires.

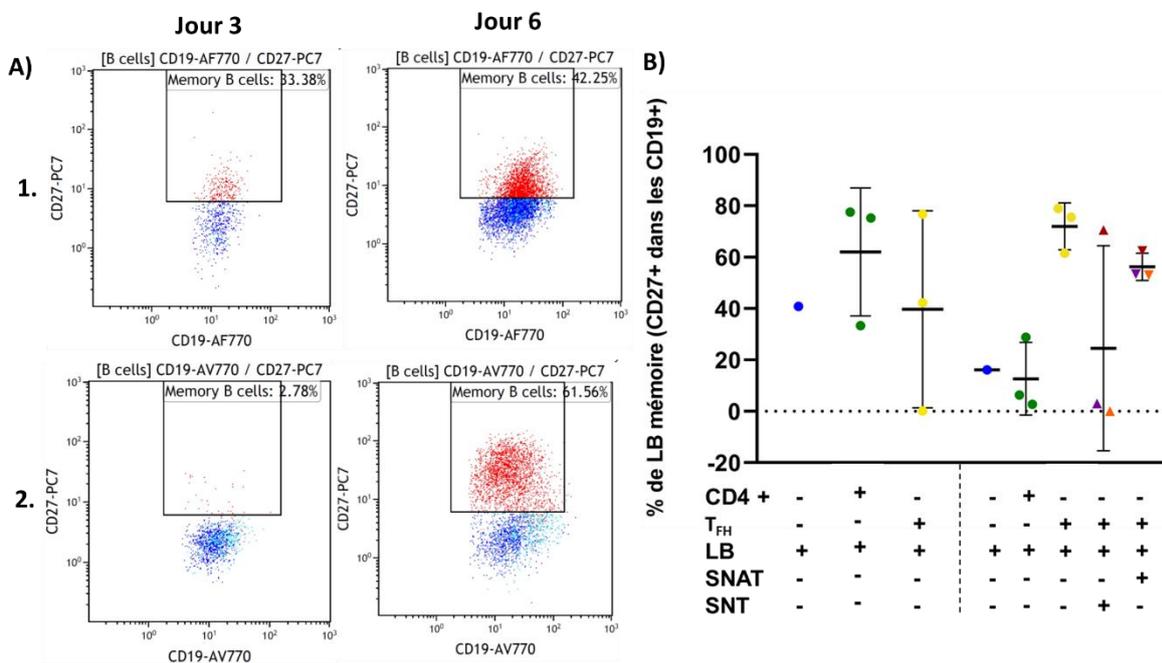


Figure 19 : A) Analyses cytométriques du pourcentage de différenciation des LB (CD19 +) en LB mémoires (CD19 + CD27 +) du test T_{FH} contrôle dans les cocultures de : 1) LT classiques CD4 + & LB, 2) T_{FH} & LB. B) Pourcentages de différenciation des LB (CD19+) en LB mémoires (CD19 + CD27 +) des cocultures de tous les tests T_{FH}. Type cellulaire : (+) Présent ; (-) Absent.

⁵¹ Protéine transmembranaire de la superfamille des TNF, récepteur du ligand CD27 [116] marqueur des LB mémoire chez l'Homme [117].

3.2.3.2 Plasmocytes

Le marquage avec l'Ac anti-CD138 n'a pas donné de résultats probants pour évaluer la différenciation des LB en plasmocytes. Pour contourner ce problème, une coloration intracellulaire des IgM et IgG a été conduite puis analysée par cytométrie en flux au jour 6.

D'après les résultats de la coloration intracellulaire dans les cocultures des LT classiques CD4 + & LB, ces derniers n'ont exprimé aucune IgG et faiblement des IgM. Dans toutes les autres cocultures, les LB ont exprimé des IgG et de manière plus significative des IgM. Ces résultats attestent de la différenciation des LB en plasmocytes (Figure 20).

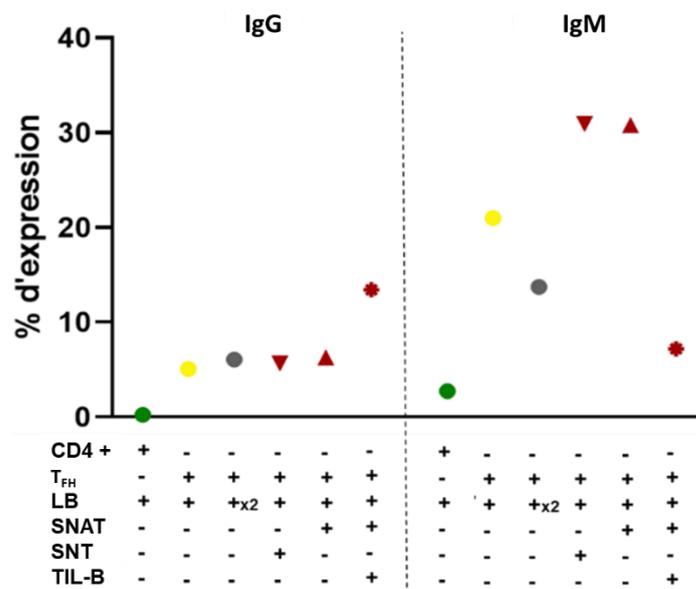


Figure 20 : Pourcentage d'expression des IgG et IgM après coloration intracellulaire dans les CD19 + au jour 6. Type cellulaire : (+) Présent ; (-) Absent ; (x2) Quantité initiale double.

3.3.4 Détection de la sécrétion des IgG

Une fois le test T_{FH} terminé, le surnageant de culture du jour 6 a été analysé par ELISA et CBA pour déterminer la quantité des IgG totales sécrétées par les plasmocytes.

Dans les tests ELISA aucune IgG n'a été détectée dans les cocultures avec les LT classiques CD4 + et une moyenne de 222 ng/ml été attribuée aux cocultures T_{FH} & LB. Les cocultures de T_{FH} avec deux fois plus de LB ont quant à elles produisaient en moyenne 555 ng/ml ce qui représente plus du double qu'avec une quantité de LB normale. Dans les cocultures avec les TIL-B seule une faible quantité d'IgG a été détectée (Figure 21.A). De la même façon qu'avec les tests ELISA, aucune IgG n'a été détectée dans les cocultures les LT classiques CD4 + & LB par CBA. Les concentrations trouvées dans les cocultures de T_{FH} & LB s'avèrent largement supérieures à celles trouvées avec le test ELISA, avec une moyenne de 3000 ng/ml

(Figure 21.B). De façon similaire aux résultats de l'ELISA, aucune IgG n'a été retrouvée dans les cocultures avec TIL-B par CBA. Il est important de noter que les SNT de 4 tests T_{FH} avec des TIL-B auparavant acquis par le laboratoire ont été ajoutés à l'analyse par CBA. Même si l'échelle de concentration en IgG n'est pas la même entre l'ELISA et le CBA, la dynamique des résultats restait conservée entre les deux méthodes.

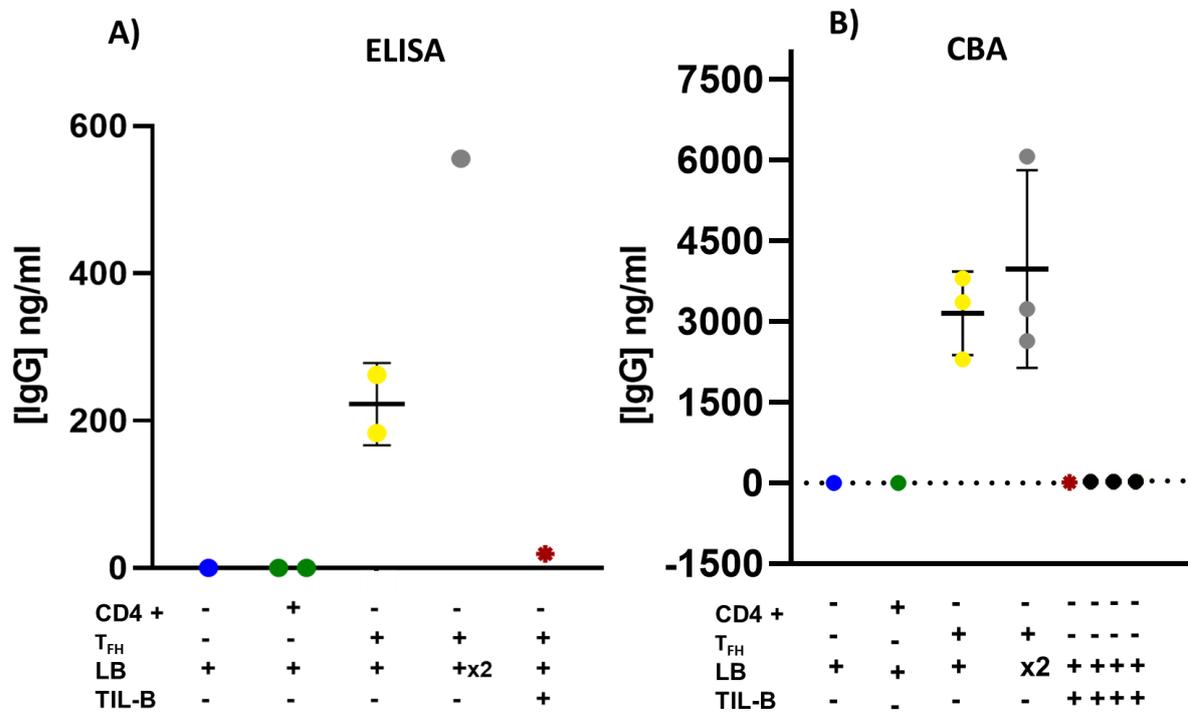


Figure 21 : Concentrations d'IgG sécrétées (ng/ml) par les cellules CD19 + au jour 6 dans le surnageant de culture analysé par : A) ELISA, B) CBA. Type cellulaire : (+) Présent ; (-) Absent ; (x2) Quantité initiale double.

4. Discussion

Le CS représente le cancer le plus commun chez les femmes et malgré les avancées des thérapies, un besoin d'amélioration s'avère encore primordial [118]. Différentes études ont décrit les fonctions positives des TIL-B dans le microenvironnement tumoral (Figure 6). Néanmoins, un sous-ensemble spécifique de TIL-B, les Bregs, semble modifier négativement les réponses immunitaires et contribuer au développement de cancers (Figure 7). Ceci notamment par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. Des résultats précédemment produits dans notre laboratoire ont permis de confirmer la présence de ces LB producteurs d'IL-10 parmi les TIL-B dans les tumeurs du CS. S'appuyant sur les découvertes de Achour *et al.*, en 2017 [104], l'objectif principal de ce projet consistait à étudier l'effet immunosuppresseur des TIL-B du CS sur fonction des T_{FH} . Parallèlement, l'impact des facteurs solubles présents dans

le microenvironnement tumoral du CS sur des cocultures de cellules spléniques de patients sains a été évalué.

4.1 Tests TFH

4.1.1 Tri et isolation des cellules

La faisabilité et la reproductibilité du tri/isolation des splénocytes requis à la mise en place des tests T_{FH} furent confirmées de façon robuste. Ceci offre la garantie de pouvoir poursuivre l'étude tout en utilisant les méthodes employées jusque-là.

4.1.2 Clusters de cellules

Les images acquises au moment des tests T_{FH} ont accordé l'opportunité de mieux appréhender les résultats des tests effectués sur les cocultures. La présence d'un cluster aux pourtours bien définis représentait le signe avant-coureur de la bonne activation, prolifération et différenciation des cellules. Au demeurant, il s'agit d'une méthode simple et efficace qui permet de recueillir des informations non négligeables comme la morphologie, la pureté, la densité et la santé des cellules, et qui peut servir de contrôles pour l'interprétation des résultats cytométriques.

4.1.3 Effet immunosuppresseur des TIL-B

Suite aux analyses de la sécrétion d'IgG dans les cocultures avec les TIL-B, il s'est avéré que la présence de ces derniers apparaissait systématiquement corrélée à une absence d'IgG dans le milieu de culture. Pourtant, aux vues des résultats de la coloration intracellulaire, il semble que les TIL-B n'ont pas endigué la différenciation terminale au jour 6 des LB en plasmocytes producteurs d'IgG et d'IgM. Il paraît alors imaginable qu'il puisse exister une interaction de nature encore inconnue entre les TIL-B et les LB de rate saine, qui empêcherait ces derniers de sécréter les IgG. Un autre point intéressant mérite d'être soulevé. Si l'expression d'IgG semblait assez faible (~5%) pour les cocultures sans TIL-B, dans la coculture avec TIL-B les LB ont exprimé 13% d'IgG. En revanche, ces dernières ont exprimé moins d'IgM que les cultures sans TIL-B. Deux hypothèses pourraient expliquer cette situation. Premièrement, il est plausible qu'en 6 jours les LB spléniques n'aient disposé du temps adéquat pour commuter de classe et n'expriment par conséquent que fortement des IgM. Dans l'étude de Achour *et al.*, 2017 [104] des plasmocytes sécrétant des IgM, IgG et IgA étaient obtenues après 6 jours de coculture de LB et T_{FH} . Il s'avère toutefois difficile de comparer strictement ces résultats avec ceux acquis ici. En effet, les T_{FH} et Bregs utilisés dans leur étude ont été différenciés et activés

in vitro alors qu'ici seule l'activation fut réalisée de cette façon. En outre, les molécules employées pour l'activation, différées entre les deux études. Ces disparités pourraient en partie expliquer la non-concordance des résultats. Deuxièmement, la population totale de TIL-B a été implémentée dans les cocultures. Sachant que celle-ci pouvait potentiellement contenir des plasmocytes ayant commuté de classe [48], ces derniers auraient étéensemencés dans la coculture. Les plasmocytes décelés se seraient différenciés avant le test T_{FH} , ce qui expliquerait pourquoi des cellules exprimant plus d'IgG que d'IgM sont détectées. Dans ce cas de figure, la présence des TIL-B aurait tout de même affectée la différenciation en plasmocytes des LB spléniques.

A présent, il est important de nuancer ces résultats. Les données d'expression n'ont été acquises qu'avec un échantillon de tumeur, ce qui rend la solidité de l'interprétation de ces dernières plutôt fragile d'un point de vue statistique. *A contrario*, la sécrétion d'IgG en présence de TIL-B a été analysée dans le surnageant de 4 tumeurs avec des résultats parfaitement identiques. Même si ces derniers ne suffissent pas pour entreprendre des analyses statistiques affirmant ou non la fiabilité de ces résultats, cela apporte tout de même un début de réponse à la problématique.

4.1.4 Impact des facteurs solubles du microenvironnement tumoral

Dans l'optique d'exploiter pleinement le matériel biologique à disposition, les SNT/SNAT des tumeurs ont été implémentés dans l'expérience. Ceux-ci ont permis d'évaluer les conséquences directes des facteurs solubles présents dans le microenvironnement tumoral sur les splénocytes des cocultures. Le SNT de tumeur possède une influence négative sur l'activation des T_{FH} pour les tumeurs de la Pt2 & 3, et *in fine* sur la différenciation des LB en LB mémoire pour ces deux mêmes tumeurs. Contrairement aux autres, le SNT de la Pt1 n'a pas eu d'influence sur la différenciation en LB mémoire. La variation des résultats sur les SNT pourrait être due au caractère *in situ* de la tumeur de la Pt1. À ce stade de la maladie, les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral restent différentes de celui du stade invasif [119]. Cette évolution du paysage cytokinique entre les deux stades de la maladie pourrait justifier ces résultats antagonistes. Le contenu en IgG des SNT/SNAT a été analysé (Figure 23 annexes 7.3). La présence d'une importante quantité d'IgG retrouvée dans ces surnageants a rendu l'analyse de l'incidence sur la sécrétion des IgG non interprétable.

4.2 Essai par billes cytométriques

4.2.1 Pourquoi choisir cette méthode ?

Au cours de l'étude, les résultats des ELISA ont été confrontés à ceux des CBA pour la détection des IgG sécrétées dans le milieu de culture. Ce comparatif s'avérait guidé par la volonté de déterminer quelle technique serait la plus adaptée pour réaliser par la suite un isotypage plus complet des Ig (IgG, IgG2, IgG3, IgG4, IgA & IgM) dans le surnageant au jour 6 des tests T_{FH}. Il est clair que le test ELISA reste la méthode de référence en matière de quantification des protéines. Cependant, si l'on souhaite détecter plusieurs protéines en même temps, chaque plaque individuelle doit être recouverte avec les différents Ac de capture ou tous les différents Ac de capture doivent être dans une seule plaque. Une autre technique offre la détection d'un large éventail de protéines en une seule fois : l'essai de billes cytométriques. Cette méthode utilise un réseau de billes cytométriques qui mesure l'intensité de la fluorescence à l'aide d'un cytomètre en flux. Celle-ci s'avère plus rapide à mettre en place et s'adapte facilement à une analyse à haut débit. Les billes peuvent être utilisées avec la plupart des cytomètres en flux commerciaux tant que la machine est équipée du bon laser et de l'optique pour exciter et détecter les billes. En définitive, l'argument *a priori* décisif dans cette étude reste le volume de l'échantillon requis dans un CBA au regard de l'ELISA. Un ELISA typique demande 100 à 200 µl d'échantillon pour chaque analyte quand le CBA ne nécessite que 1/5 de cette quantité [120]. Aux vues de la rareté des échantillons de cette étude, il paraît souhaitable que chaque expérience conçoive délivrer un maximum d'information en une seule fois. Ainsi, en regard des avantages mentionnés ci-dessus, la décision fut prise d'employer le CBA.

4.2.2 Standardisation et validation

Afin de standardiser et valider le CBA, les résultats de sécrétion des IgG dans le milieu de culture ont dû être comparés avec ceux des ELISA. Ceci a été opéré en interne par le laboratoire, en raison de la difficulté liée à se baser sur la bibliographie. En effet, une review publiée en 2006 Elshal et McCoy [121] estime que, bien que les kits CBA commerciaux aient été largement évalués par leurs fabricants respectifs, il existe un nombre limité de rapports évalués par des pairs qui compare les résultats acquis par CBA à ceux des ELISA. Ils jugent difficile de pouvoir confronter les données de différentes études, en raison de la diversité des méthodes utilisées et du niveau hétérogène de détails méthodologiques fournis par les chercheurs pour comparer ces deux techniques.

Les données acquises par ELISA apparaissaient semblables à celles auparavant produites aux laboratoires (Figure 24 annexe 7.4). Les CBA offrent des résultats reproductibles

entre les différents tests effectués. Néanmoins, seul le schéma de réponse fut identique entre les deux approches. La présence de TIL-B a bien fortement ou totalement inhibé la sécrétion d'IgG pour les deux méthodes, mais dans les cocultures contrôles un changement d'échelles de concentration en IgG environs 4 fois supérieures dans le CBA a été relevé. Si on se fie au protocole du kit du fabricant, celui-ci avertit que les résultats du CBA devraient être différents de ceux des ELISA, mais il ne permet pas d'apprécier la proportion dans laquelle les données peuvent fluctuer. Dans la mesure où ces résultats ont été reproductibles, il paraît acceptable de poursuivre l'étude avec le CBA.

4.2.3 Tests sur le standard

Dans le protocole du fabricant du kit CBA, le standard lyophilisé des IgG est reconstitué dans un volume total de 1 ml. Or, seulement 50 µl sont nécessaires pour réaliser la gamme étalon. Le fabricant recommande d'écarter le restant du standard reconstitué, mais par souci de lutte contre le gaspillage il a été décidé d'évaluer la pertinence de cette recommandation. La moyenne d'intensité de fluorescence entre un standard frais/congelé a diminué, pourtant cette dernière reste interprétable de par la conservation de l'allure de sa courbe (Figure 25 annexe 7.5). La réutilisation du standard congelé reconstitué permet de réaliser 20 tests CBA au lieu d'un seul. Sachant que chaque produit du kit CBA est commandable séparément, cela épargne le gaspillage d'un produit à haute valeur ajoutée et une économie financière considérable. Il en est de même pour la lecture par cytomètre effectuée sur le standard du CBA à n+3 (Figure 25 annexe 7.5). Cela pourrait par exemple permettre de laisser à 4°C et dans le noir la plaque jusqu'à 3 jours en attendant que le cytomètre soit disponible en cas de panne du matériel.

4.3 Difficultés rencontrées

En raison du travail avec des échantillons de tumeurs de CS humain, la disponibilité de ces derniers demeurait limitée. Malgré une moyenne de 10 ablations par semaine, il s'avérait rare qu'une tumeur réponde à nos besoins (grande taille et non traitée). En plus de la disponibilité, en dépit de la forte infiltration en LB des tumeurs sélectionnées, la quantité de TIL-B disponible dans le tissu tumoral ne suffisait qu'à la mise en place d'une seule coculture. Par conséquent, au cours de cette étude, il n'a pas été possible d'inclure des réplicats de cultures pour les TIL-B d'une même patiente. Il paraissait impensable d'apporter un support analytique de la pureté des cellules issues de l'isolation des TIL-B, car cela engendrerait la perte d'un nombre considérable de cellules durant l'analyse cytométrique. En outre, l'ensemble des TIL-B a été utilisé pour l'expérience, et il ne semble pas exclu que les résultats constatés soient dus à différentes sous-classes de LB.

En plus des difficultés intrinsèques à l'étude, le contexte sanitaire lié à la pandémie entraîna son lot d'inconvénients. Comme expliqué dans l'avant-propos, il ne fut pas possible d'entreprendre de nouveaux tests T_{FH} ce qui explique la faiblesse statistique des résultats exposés. Des problèmes de délais de livraison et d'approvisionnement des kits ont également été rencontrés. Ceci eu pour conséquences de retarder les manipulations, mais aussi d'annuler l'analyse de la sécrétion des IgA par CBA dans les surnageants de cultures.

4.4 Perspectives

Aucune étude statistique de validation de la fiabilité des résultats n'a pu être réalisée. Pour pallier à ce manque, il apparaît essentiel dans la suite de l'étude de poursuivre les tests T_{FH} avec de nouveaux échantillons dans l'objectif d'atteindre un nombre statistiquement interprétable. En vue d'approfondir les recherches, il sera nécessaire de procéder à l'isotypage complet des Ig (IgA, IgD, IgG1,2 3 et 4) sécrétées par les plasmocytes présents dans les tests T_{FH} avec TIL-B. Ceci permettra de caractériser avec précision l'étendue de l'effet immunosuppresseur des Bregs dans le CS. Afin de mieux comprendre les interactions entre les Bregs et les autres cellules du microenvironnement tumoral, il semble intéressant de parvenir à les localiser à travers leur sécrétion d'IL-10 à l'aide d'une double IHC. Enfin, pour déterminer le ou les facteurs solubles qui provoquent les effets observés dans les cocultures avec SNT, il faudra isoler et identifier les différentes molécules présentes. Dans un second temps, ces dernières devront être insérées au moins une à une (avant d'éventuellement tester des co-effets) dans des cocultures de T_{FH} & LB de rate saine pour caractériser leur impact.

5. Conclusion

Les résultats préliminaires ont indiqué que le pourcentage d'expression d'IL-10 apparaissait plus élevé dans les TIL-B du CS que dans les LB du sang de patientes saines ou atteintes de CS. Les données acquises dans cette étude suggèrent quant à elle que dans les tumeurs du sein, les TIL-B jouent un rôle immunosuppresseur sur la sécrétion des IgG. Le SNT a quant à lui démontré un effet inhibiteur sur l'activation des T_{FH} et la différenciation des LB en cellules mémoires.

Développer le champ d'action thérapeutique de la lutte contre le CS, est un véritable challenge dans lequel chaque avancée est un pas de plus vers l'accompagnement personnalisé essentiel pour outrepasser l'hétérogénéité de cette maladie. Il semble alors clair que les futures immunothérapies contre le CS ont tout intérêt à investir dans la recherche anti-IL-10. Avant cela, une connaissance plus approfondie des T_{FH} et Bregs humain reste requise.

6. Références

1. Drake, R., Vogl, A. W., & Mitchell, A. W. M. (2019). Gray's Anatomy for Students E-Book. In Gray's anatomy for student (fourth éd., p. p140). Maarssen, Pays-Bas : Elsevier Gezondheidszorg.
2. Tanis, P. J., Nieweg, O. E., Valdés Olmos, R. A., & Kroon, B. B. R. (2001). Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy11No competing interests declared. *Journal of the American College of Surgeons*, 192(3), 399-409. [https://doi.org/10.1016/s1072-7515\(00\)00776-6](https://doi.org/10.1016/s1072-7515(00)00776-6)
3. Lynch, P. J. (2006). *Breast normal anatomy cross-section* [Illustration]. Consulté à l'adresse https://en.wikipedia.org/wiki/Mammary_gland#/media/File:Breast_anatomy_normal_scheme.png
4. Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S., and Cardoso, F. 2015. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 26(suppl 5): v8–v30. doi:10.1093/annonc/mdv298
5. Brandenburger, M. (2020). Heterogeneity of Sweat Gland Stem Cells. Consulté le 11 août 2020, à l'adresse https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-030-24108-7_3
6. Schleip, R., Jäger, H., & Klingler, W. (2012). What is 'fascia' ? A review of different nomenclatures. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, 16(4), 496-502. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2012.08.001>
7. Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330-1334. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>
8. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
9. Cancer du sein | Fondation contre le Cancer. (s. d.). Consulté le 21 avril 2020, à l'adresse <https://www.cancer.be/les-cancers-types-de-cancers-liste-z/cancer-du-sein>
10. Types of Breast Cancer - Breast Pathology | Johns Hopkins Pathology. (s. d.-b). Consulté le 25 juin 2020, à l'adresse <https://pathology.jhu.edu/breast/types-of-breast-cancer>
11. Kurbasic, E. (2017). Landscaping the cell surface proteome of breast cancer: Following pathways through organelles to the plasma membrane. Department of Immunotechnology, Lund University.
12. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955–960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>
13. Winslow, T. (s. d.). Breast-related. Consulté le 10 mai 2020, à l'adresse <https://www.teresewinslow.com/breast-related>

14. Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, 17(6), 1471–1474. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>
15. Elston C. W. (1984). The assessment of histological differentiation in breast cancer. *The Australian and New Zealand journal of surgery*, 54(1), 11–15. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1984.tb06677.x>
16. Mitri, Z., Constantine, T., & O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer : Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2012/743193>
17. Menon, S. S., Guruvayoorappan, C., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2019). Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica Chimica Acta*, 491, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.011>
18. Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(1), 95-120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>
19. Kos, Z., & Dabbs, D. J. (2015). Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. *Histopathology*, 68(1), 70-85. <https://doi.org/10.1111/his.12795>
20. Amirhossein, K. (2016). Potential novel molecular targets for breast cancer diagnosis and treatment. E-Print AB. Consulté à l'adresse https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/45243/Thesis_Amirhossein_Kharman_Biz.pdf?sequence=1&isAllowed=y
21. Ramos-Vara, J. A. (2017). Principles and Methods of Immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, 115-128. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_5
22. Levsky, J. M. (2003). Fluorescence in situ hybridization : past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116(14), 2833-2838. <https://doi.org/10.1242/jcs.00633>
23. Basu, A., Ramamoorthi, G., Jia, Y., Faughn, J., Wiener, D., Awshah, S., Czerniecki, B. J. (2019). Immunotherapy in breast cancer : Current status and future directions. *Advances in Cancer Research*, 295-349. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.03.006>
24. Coussens, L. M., & Pollard, J. W. (2011). Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), a003285. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003285>
25. Ruffell, B., Au, A., Rugo, H. S., Esserman, L. J., Hwang, E. S., & Coussens, L. M. (2012). Leukocyte composition of human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2796–2801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104303108>
26. Lyons, G. E., Moore, T., Brasic, N., Li, M., Roszkowski, J. J., & Nishimura, M. I. (2006). Influence of Human CD8 on Antigen Recognition by T-Cell Receptor-Transduced Cells. *Cancer Research*, 66(23), 11455-11461. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-2379>
27. Bernstein, H. B., Plasterer, M. C., Schiff, S. E., Kitchen, C. M. R., Kitchen, S., & Zack, J. A. (2006). CD4 Expression on Activated NK Cells : Ligation of CD4 Induces Cytokine Expression and Cell Migration. *The Journal of Immunology*, 177(6), 3669-3676. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3669>

28. Triplett, T. A., Curti, B. D., Bonafede, P. R., Miller, W. L., Walker, E. B., & Weinberg, A. D. (2012). Defining a functionally distinct subset of human memory CD4⁺ T cells that are CD25^{POS} and FOXP3^{NEG}. *European Journal of Immunology*, 42(7), 1893-1905. <https://doi.org/10.1002/eji.201242444>
29. Bettelli, E., Dastrange, M., & Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5138-5143. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501675102>
30. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., ... Loi, S. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology*, 26(2), 259-271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
31. Buisseret, L., Desmedt, C., Garaud, S., Fornili, M., Wang, X., Van den Eyden, G., ... Willard-Gallo, K. (2017). Reliability of tumor-infiltrating lymphocyte and tertiary lymphoid structure assessment in human breast cancer. *Modern Pathology*, 30(9), 1204-1212. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.43>
32. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., & Fridman, W. H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 19(6), 307-325. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6>
33. Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., ... Willard-Gallo, K. (2013). CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2873-2892. <https://doi.org/10.1172/jci67428>
34. Sautès-Fridman, C., Lawand, M., Giraldo, N. A., Kaplon, H., Germain, C., Fridman, W. H., & Dieu-Nosjean, M.-C. (2016). Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00407>
35. Mao, Y., Qu, Q., Chen, X., Huang, O., Wu, J., & Shen, K. (2016). The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 11(4), e0152500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152500>
36. Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., & Graca, L. (2018). Regulation of the Germinal Center Response. *Frontiers in immunology*, 9, 2469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
37. Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., ... Loibl, S. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology*, 19(1), 40-50. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30904-x](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30904-x)
38. Speiser, D. E., Ho, P.-C., & Verdeil, G. (2016). Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 599-611. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.80>
39. Zhou, Y., Shao, N., Aierken, N., Xie, C., Ye, R., Qian, X., ... Lin, Y. (2017). Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with breast cancer : a meta-analysis. *Journal of Cancer*, 8(19), 4098-4105. <https://doi.org/10.7150/jca.21030>

40. Gunderson, A. J., & Coussens, L. M. (2013). B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Experimental Cell Research*, 319(11), 1644-1649. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.03.005>
41. Wouters, M. C. A., & Nelson, B. H. (2018). Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clinical Cancer Research*, 24(24), 6125-6135. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-1481>
42. Mahmoud, S. M. A., Lee, A. H. S., Paish, E. C., Macmillan, R. D., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2011). The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(2), 545-553. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1620-1>
43. Xu, Y., Lan, S., & Zheng, Q. (2018). Prognostic significance of infiltrating immune cell subtypes in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumori*, 104(3), 196-201. <https://doi.org/10.5301/tj.5000624>
44. Disease free survival. (s. d.). Consulté le 18 août 2020, à l'adresse <https://www.nature.com/subjects/disease-free-survival>
45. NCI Dictionary of Cancer Terms. (s. d.). Consulté le 3 mai 2020, à l'adresse <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/overall-survival>
46. NCI Dictionary of Cancer Terms. (s. d.-c.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/neoadjuvant-therapy>
47. Pathological Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer : Use as an Endpoint to Support Accelerated Approval Guidance for Industry. (2020). Consulté à l'adresse <https://www.fda.gov/media/83507/download#:~:text=U.S.%20marketing%20approval%3A-1.,completion%20of%20neoadjuvant%20systemic%20therapy>
48. Garaud, S., Buisseret, L., Solinas, C., Gu-Trantien, C., de Wind, A., Van den Eynden, G., Naveaux, C., Lodewyckx, J. N., Boisson, A., Duvillier, H., Craciun, L., Ameye, L., Veys, I., Paesmans, M., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M., & Willard-Gallo, K. (2019). Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI insight*, 5(18), e129641. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129641>
49. CCR7 C-C motif chemokine receptor 7 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. (s. d.). Consulté le 12 mai 2020, à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1236>
50. CXCR5 - C-X-C chemokine receptor type 5 - Homo sapiens (Human) - CXCR5 gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P32302#function>
51. Moser, B. (2015). CXCR5, the Defining Marker for Follicular B Helper T (TFH) Cells. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00296>
52. HLA-DRA - HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain precursor - Homo sapiens (Human) - HLA-DRA gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P01903#function>
53. Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 185-189. <https://doi.org/10.1038/nri3803>

54. Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*, 41(4), 529-542. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>
55. Yolcu, E. S., Shirwan, H., & Askenasy, N. (2017). Fas/Fas-Ligand Interaction As a Mechanism of Immune Homeostasis and β -Cell Cytotoxicity: Enforcement Rather Than Neutralization for Treatment of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00342>
56. Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annual Review of Immunology*, 29(1), 621-663. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>
57. CD40 - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 precursor - Homo sapiens (Human) - CD40 gene & protein. (s. d.). Consulté le 24 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P25942#function>
58. CD40LG - CD40 ligand - Homo sapiens (Human) - CD40LG gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P29965#function>
59. IL21 - Interleukin-21 precursor - Homo sapiens (Human) - IL21 gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9HBE4#function>
60. Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U.-A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H., & Flavell, R. A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, 409(6816), 97-101. <https://doi.org/10.1038/35051100>
61. IL4 - Interleukin-4 precursor - Homo sapiens (Human) - IL4 gene & protein. (s. d.). Consulté le 24 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P05112#function>
62. PDCD1 - Programmed cell death protein 1 precursor - Homo sapiens (Human) - PDCD1 gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/Q15116#function>
63. FAS - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 precursor - Homo sapiens (Human) - FAS gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P25445>
64. FASLG - Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6 - Homo sapiens (Human) - FASLG gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P48023>
65. SMART - Servier Medical ART. (s. d.). Consulté le 26 avril 2020, à l'adresse <https://smart.servier.com/>
66. Chen, M., Guo, Z., Ju, W., Ryffel, B., He, X., & Zheng, S. G. (2012). The development and function of follicular helper T cells in immune responses. *Cellular & Molecular Immunology*, 9(5), 375-379. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.18>
67. Complement System. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/complement-system>
68. Schroeder, H. W., Jr, & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
69. Garaud, S., Zayakin, P., Buisseret, L., Rulle, U., Silina, K., de Wind, A., ... Linē, A. (2018). Antigen Specificity and Clinical Significance of IgG and IgA Autoantibodies Produced in situ

- by Tumor-Infiltrating B Cells in Breast Cancer. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02660>
70. Carmi, Y., Spitzer, M. H., Linde, I. L., Burt, B. M., Prestwood, T. R., Perlman, N., ... Engleman, E. G. (2015). Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumor T-cell immunity. *Nature*, 521(7550), 99-104. <https://doi.org/10.1038/nature14424>
 71. Milne, K., Köbel, M., Kalloger, S. E., Barnes, R. O., Gao, D., Gilks, C. B., ... 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(7), e6412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006412>
 72. Candolfi, M., Curtin, J. F., Yagiz, K., Assi, H., Wibowo, M. K., Alzadeh, G. E., ... Castro, M. G. (2011). B Cells Are Critical to T-cell—Mediated Antitumor Immunity Induced by a Combined Immune-Stimulatory/Conditionally Cytotoxic Therapy for Glioblastoma. *Neoplasia*, 13(10), 947-IN23. <https://doi.org/10.1593/neo.11024>
 73. Stavitsky, A. B. (1998). Agglutination. *Encyclopedia of Immunology*, 56-59. <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0016>
 74. Thau, L. (s. d.). Physiology, Opsonization - StatPearls - NCBI Bookshelf. Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534215/>
 75. Tsokos, G. C. (2004). Overview of cellular immune function in systemic lupus erythematosus. *Systemic Lupus Erythematosus*, 29-92. <https://doi.org/10.1016/b978-012433901-9/50005-3>
 76. Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmeler, M., French, L., Bornand, T., ... Tschopp, J. (1996). Activated B cells express functional Fas ligand. *European Journal of Immunology*, 26(3), 721-724. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260332>
 77. Tao, H., Lu, L., Xia, Y., Dai, F., Wang, Y., Bao, Y., ... Chang, A. E. (2015). Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. *European Journal of Immunology*, 45(4), 999-1009. <https://doi.org/10.1002/eji.201444625>
 78. Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., & Bleackley, R. C. (2003). Granzyme B: a natural born killer. *Immunological Reviews*, 193(1), 31-38. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00044.x>
 79. Hagn, M., Schwesinger, E., Ebel, V., Sontheimer, K., Maier, J., Beyer, T., ... Jahrsdörfer, B. (2009). Human B Cells Secrete Granzyme B When Recognizing Viral Antigens in the Context of the Acute Phase Cytokine IL-21. *The Journal of Immunology*, 183(3), 1838-1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901066>
 80. Catalán, E., Jaime-Sánchez, P., Aguiló, N., Simon, M. M., Froelich, C. J., & Pardo, J. (2015). Mouse Cytotoxic T Cell-derived Granzyme B Activates the Mitochondrial Cell Death Pathway in a Bim-dependent Fashion. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 6868-6877. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.631564>
 81. Ammirante, M., Luo, J.-L., Grivennikov, S., Nedospasov, S., & Karin, M. (2010). B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 464(7286), 302-305. <https://doi.org/10.1038/nature08782>

82. Tang, H., Zhu, M., Qiao, J., & Fu, Y.-X. (2017). Lymphotoxin signalling in tertiary lymphoid structures and immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(10), 809-818. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.13>
83. Sarvaria, A., Madrigal, J. A., & Saudemont, A. (2017a). B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(8), 662-674. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.35>
84. IFNG - Interferon gamma precursor - Homo sapiens (Human) - IFNG gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P01579#function>
85. Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 221-241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934>
86. 86.IL10 - Interleukin-10 precursor - Homo sapiens (Human) - IL10 gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P22301#function>
87. IL12A - Interleukin-12 subunit alpha precursor - Homo sapiens (Human) - IL12A gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P29459#function>
88. Cai, X., Zhang, L., & Wei, W. (2019). Regulatory B cells in inflammatory diseases and tumor. *International Immunopharmacology*, 67, 281-286. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.007>
89. Berthelot, J.-M., Jamin, C., Amrouche, K., Le Goff, B., Maugars, Y., & Youinou, P. (2013). Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, 80(1), 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.04.010>
90. Shalapour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., ... Karin, M. (2015). Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*, 521(7550), 94-98. <https://doi.org/10.1038/nature14395>
91. Wei, X., Jin, Y., Tian, Y., Zhang, H., Wu, J., Lu, W., & Lu, X. (2015). Regulatory B cells contribute to the impaired antitumor immunity in ovarian cancer patients. *Tumor Biology*, 37(5), 6581-6588. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4538-0>
92. Zhang, L., Tai, Y.-T., Ho, M., Xing, L., Chauhan, D., Gang, A., ... Anderson, K. C. (2017). Regulatory B cell-myeloma cell interaction confers immunosuppression and promotes their survival in the bone marrow milieu. *Blood Cancer Journal*, 7(3), e547. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.24>
93. TGFB1 - Transforming growth factor beta-1 proprotein precursor - Homo sapiens (Human) - TGFB1 gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P01137#function>
94. TNF - Tumor necrosis factor precursor - Homo sapiens (Human) - TNF gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P01375#function>
95. CD274 - Programmed cell death 1 ligand 1 precursor - Homo sapiens (Human) - CD274 gene & protein. (s. d.). Consulté le 12 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NZQ7#function>
96. Hou, W., & Sanyal, A. J. (2009). Ascites : Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*, 93(4), 801-817. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2009.03.007>

97. Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z., & Zou, W. (2013). T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, 25(2), 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.12.003>
98. Safdari, Y., Farajnia, S., Asgharzadeh, M., & Khalili, M. (2013). Antibody humanization methods – a review and update. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 29(2), 175-186. <https://doi.org/10.1080/02648725.2013.801235>
99. Schioppa, T., Moore, R., Thompson, R. G., Rosser, E. C., Kulbe, H., Nedospasov, S., ... Balkwill, F. R. (2011). B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10662-10667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100994108>
100. Shao, Y., Lo, C. M., Ling, C. C., Liu, X. B., Ng, K. T.-P., Chu, A. C. Y., ... Man, K. (2014). Regulatory B cells accelerate hepatocellular carcinoma progression via CD40/CD154 signaling pathway. *Cancer Letters*, 355(2), 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.026>
101. Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R. P., & Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer research*, 71(10), 3505–3515. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4316>
102. Wang, W., Yuan, X., Chen, H., Xie, G., Ma, Y., Zheng, Y., ... Shen, L. (2015). CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Bregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer. *Oncotarget*, 6(32). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5588>
103. Wang, K., Liu, J., & Li, J. (2018). IL-35-producing B cells in gastric cancer patients. *Medicine*, 97(19), e0710. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000010710>
104. Achour, A., Simon, Q., Mohr, A., Séité, J.-F., Youinou, P., Bendaoud, B., ... Jamin, C. (2017). Human regulatory B cells control the T FH cell response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(1), 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.042>
105. Schmitt, N., Morita, R., Bourdery, L., Bentebibel, S. E., Zurawski, S. M., Banchereau, J., & Ueno, H. (2009). Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity*, 31(1), 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.016>
106. Trickett, A., & Kwan, Y. L. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of immunological methods*, 275(1-2), 251–255. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(03\)00010-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(03)00010-3)
107. Morva, A., Lemoine, S., Achour, A., Pers, J.-O., Youinou, P., & Jamin, C. (2012). Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes. *Blood*, 119(1), 106-114. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-360768>
108. Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., & Jamin, C. (2011). Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *Journal of Autoimmunity*, 36(3-4), 228-238. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.005>
109. Overview of Protein Labeling | Thermo Fisher Scientific - NL. (s. d.). Consulté le 22 août 2020, à l'adresse <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/protein->

biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-labeling.html#/legacy=www.piercenet.com

110. B Cell Isolation Kit II, human - B cells - MicroBeads and Isolation Kits - Cell separation reagents - MACS Cell Separation - Products - Miltenyi Biotec - Belgique. (s. d.). Consulté le 25 juillet 2020, à l'adresse <https://www.miltenyibiotec.com/BE-en/products/b-cell-isolation-kit-ii-human.html#gref>
111. Garaud, S., Gu-Trantien, C., Lodewyckx, J. N., Boisson, A., De Silva, P., Buisseret, L., Migliori, E., Libin, M., Naveaux, C., Duvaillier, H., & Willard-Gallo, K. (2014). A simple and rapid protocol to non-enzymatically dissociate fresh human tissues for the analysis of infiltrating lymphocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (94), 52392. <https://doi.org/10.3791/52392>
112. CD19 - B-lymphocyte antigen CD19 precursor - Homo sapiens (Human) - CD19 gene & protein. (s. d.). Consulté le 25 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P15391>
113. Obeng-Adjei, N., Portugal, S., Tran, T. M., Yazew, T. B., Skinner, J., Li, S.,... Crompton, P. D. (2015). Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. *Cell Reports*, 13(2), 425-439. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.004>
114. Salazar, A., Velázquez-Soto, H., Ayala-Balboa, J., & Jiménez-Martínez, M. C. (2017). Allergen-Based Diagnostic : Novel and Old Methodologies with New Approaches. *Allergen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69276>
115. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(6), pdb.prot4986. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
116. CD27 - CD27 antigen precursor - Homo sapiens (Human) - CD27 gene & protein. (s. d.). Consulté le 22 août 2020, à l'adresse <https://www.uniprot.org/uniprot/P26842>
117. Memory B Cell Markers : R&D Systems. (s. d.). Consulté le 22 août 2020, à l'adresse <https://www.rndsystems.com/resources/cell-markers/immune-cells/b-cells/memory-b-cell-markers>
118. McGuire, A., Brown, J. A., Malone, C., McLaughlin, R., & Kerin, M. J. (2015). Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers*, 7(2), 908–929. <https://doi.org/10.3390/cancers7020815>
119. Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M. I., Nava-Castro, K. E., Castro, J. I., & Morales-Montor, J. (2015). The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 35(1), 1–16. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0026>
120. Morgan, E., Varro, R., Sepulveda, H., Ember, J. A., Apgar, J., Wilson, J., Lowe, L., Chen, R., Shivraj, L., Agadir, A., Campos, R., Ernst, D., & Gaur, A. (2004). Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 110(3), 252–266. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.017>

121. ELSHAL, M., & MCCOY, J. (2006). Multiplex bead array assays : Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA☆. *Methods*, 38(4), 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.010>

7. Annexes

7.1 Fonctionnement du CBA

Les tests CBA fournissent une méthode de capture des protéines solubles avec des billes de taille et de fluorescence connues. Lorsque les billes de capture et les réactifs de détection sont incubés avec des standards ou des échantillons inconnus contenant des analytes reconnus, un sandwich complexe (perle de capture + analyte + réactif de détection) se forme. Ces complexes peuvent être mesurés en utilisant la cytométrie en flux pour identifier les particules ayant des caractéristiques de fluorescence à la fois de la bille et du détecteur. Chaque bille de capture a une intensité de fluorescence unique et est recouverte d'un AC de capture spécifique pour un seul analyte. De cette façon, une combinaison de différentes billes peut être mélangée avec un échantillon ou un étalon et un mélange d'AC de détection (conjugués à une molécule rapportrice (PE)). Après incubations et lavages, les analyses sont acquises sur un cytomètre en flux.

Le logiciel FCAP Array TM se déclenche sur chaque population de billes individuelle et détermine l'intensité de fluorescence médiane (MFI) pour chaque analyte dans la matrice. Il génère une courbe standard, effectue une interpolation des concentrations des échantillons par rapport à la courbe standard et il fournit un rapport d'analyse sous forme de tableau.

Les billes avec des positions différentes peuvent être combinées dans les tests pour créer un test multiplex et analyser jusqu'à 30 protéines à la fois. L'intensité de fluorescence PE de chaque sandwich révèle la concentration de cet analyte particulier.

7.2 Suivre photographiques des cocultures avec SNAT

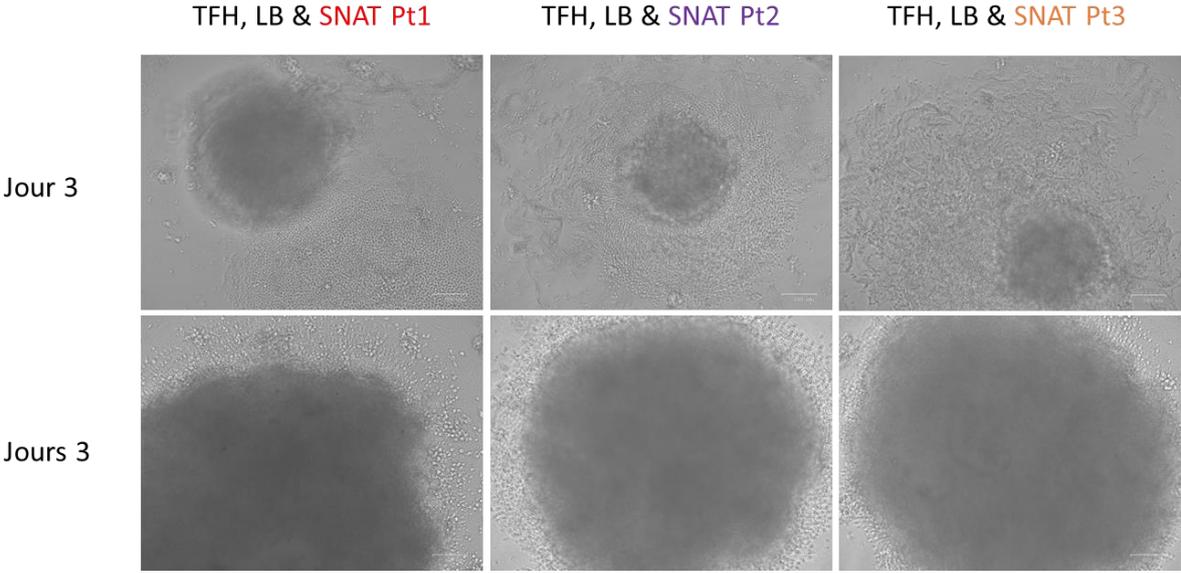


Figure 22 : Suivre photographique des cocultures avec SNAT aux jours 3 et 6.

7.3 Concentration d'IgG dans le SNT et SNAT

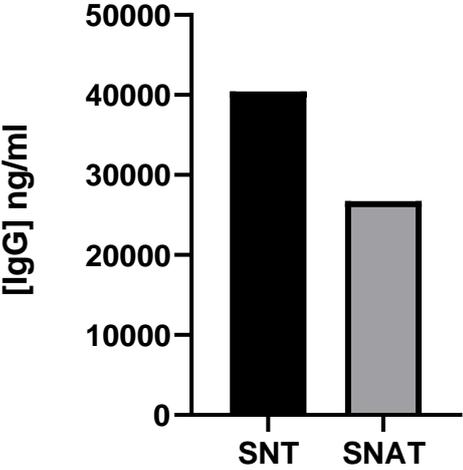


Figure 23 : Concentration des IgG dans le SNT et SNAT de la Pt1.

7.4 Résultats préliminaires sécrétion IgG

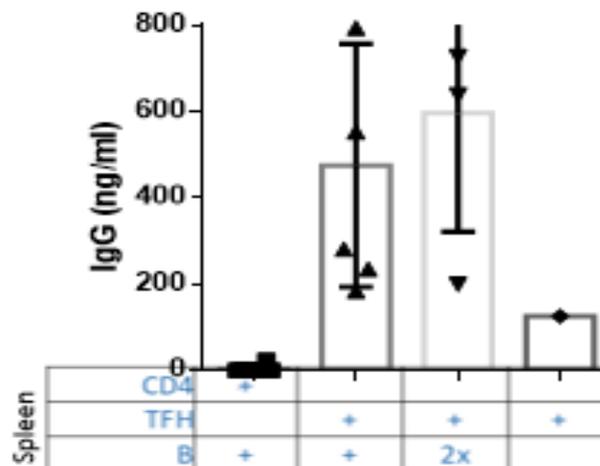


Figure 24 : Sécrétion d'IgG par les cellules CD19+ au jour 6. Concentrations (ng/ml) d'IgG sécrétées par les cellules CD19 + dans le surnageant de culture analysé par ELISA.

7.5 Résultats des tests sur le standard des CBA

La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) a baissé graduellement en fonction de la qualité du standard. Le standard frais avait la MFI la plus élevée, suivi par une MFI plus faible pour le CBA analysé par cytométrie trois jours après et pour finir avec la MFI du CBA dont le standard a été congelé.

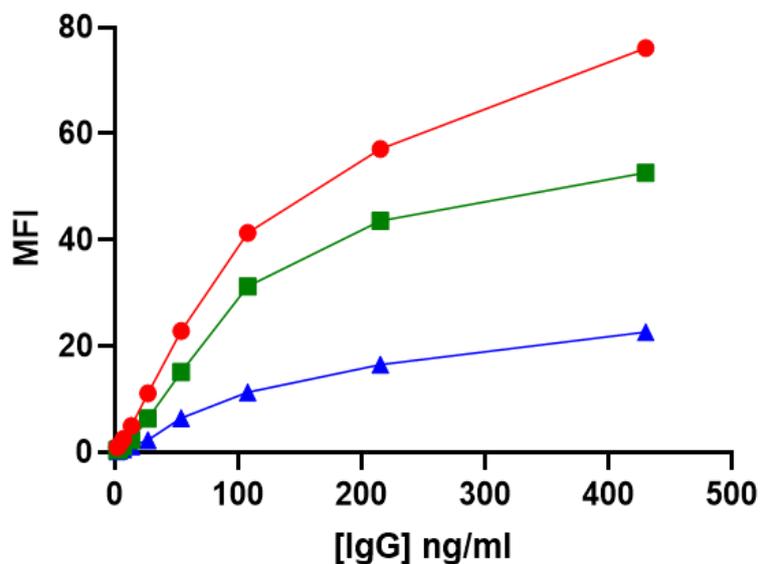


Figure 25 : Moyenne d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en IgG des CBA. Avec un standard frais (cercles rouges), un CBA analysé 3 jours après (carrés verts) et un CBA avec un standard congelé (triangle bleu).