



Rôle de l'innervation locale dans la formation des structures lymphoïdes tertiaires au sein des tumeurs pulmonaires non-à-petites cellules

Laïla Letaief

► To cite this version:

Laïla Letaief. Rôle de l'innervation locale dans la formation des structures lymphoïdes tertiaires au sein des tumeurs pulmonaires non-à-petites cellules. Cancer. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS133 . tel-03738117

HAL Id: tel-03738117

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03738117>

Submitted on 25 Jul 2022

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

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

Sorbonne Université

École doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire « Microenvironnement Immunitaire et Immunothérapie »

UMRS 1135 INSERM, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris)

Rôle de l'innervation locale dans la formation des structures lymphoïdes tertiaires au sein des tumeurs pulmonaires non- à-petites cellules

Par madame **Laïla Letaïef**

Thèse de **doctorat en Immunologie**

Dirigée par le Dr Marie-Caroline Dieu-Nosjean

Présentée et soutenue le vendredi 20 Mars 2020

Devant un jury composé de :

Docteur Karen Willard-Gallo (Rapportrice)

Docteur Abdelhadi Saoudi (Rapporteur)

Professeur Cécile Badoual (Examinatrice)

Professeur Pierrick Gandolfo (Examineur)

Docteur Isabelle Brunet (Invitée)

Professeur Patrice Debré (Président)

Docteur Jean-Luc Teillaud (Co-encadrant de thèse)

Docteur Marie-Caroline Dieu-Nosjean (Directrice de thèse)

Sorbonne Université

École doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire « Microenvironnement Immunitaire et Immunothérapie »

UMRS 1135 INSERM, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris)

Rôle de l'innervation locale dans la formation des structures lymphoïdes tertiaires au sein des tumeurs pulmonaires non- à-petites cellules

Par madame **Laïla Letaïef**

Thèse de **doctorat en Immunologie**

Dirigée par le Dr Marie-Caroline Dieu-Nosjean

Présentée et soutenue le vendredi 20 Mars 2020

Devant un jury composé de :

Docteur Karen Willard-Gallo (Rapportrice)

Docteur Abdelhadi Saoudi (Rapporteur)

Professeur Cécile Badoual (Examinatrice)

Professeur Pierrick Gandolfo (Examineur)

Docteur Isabelle Brunet (Invitée)

Professeur Patrice Debré (Président)

Docteur Jean-Luc Teillaud (Co-encadrant de thèse)

Docteur Marie-Caroline Dieu-Nosjean (Directrice de thèse)



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Résumé

En 2008, le laboratoire a montré pour la première fois la présence de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) au sein de tumeurs solides, les cancers du poumon non-à-petites cellules (NSCLC) et leur association à un pronostic plus favorable. Ces structures sont le siège du développement de réponses anti-tumorales, cellulaires et humores. Au plan anatomique, les TLS ressemblent à des ganglions lymphatiques et partagent des mécanismes de genèse similaires. L'implication du système nerveux périphérique (SNP) dans la genèse des organes lymphoïdes secondaires a été suggérée mais son rôle dans la genèse des TLS n'est pas documenté. Nous avons émis l'hypothèse que le SNP participe à la néogenèse des TLS.

Les objectifs de mon travail ont été d'étudier le rôle des fibres nerveuses sympathiques dans la formation et le maintien des TLS en utilisant des modèles murins tumoraux et non tumoraux d'inflammation pulmonaire, ainsi que de caractériser les fibres nerveuses présentes dans les tumeurs de patients atteints d'un carcinome du poumon non à petites cellules.

Une méthode d'imagerie 3D (piDISCO⁺) que j'ai adaptée m'a permis d'étudier la localisation des fibres nerveuses et des TLS présentes dans les biopsies tumorales fixées et incluses en paraffine (FFPE), en collaboration avec l'équipe du Dr. Brunet (Collège de France). Les marquages 3D de ces biopsies ont permis de visualiser et localiser réseau vasculaire, fibres nerveuses et cellules immunitaires. Après le traitement des biopsies tumorales FFPE effectué pour l'imagerie 3D, une extraction des protéines a pu être faite, grâce à un tampon optimisé. Des protéines de hauts ou bas poids moléculaires, phosphorylées ou non, ont pu être détectées à partir de ces biopsies FFPE traitées pour l'imagerie 3D, ce qui n'avait jamais été rapporté.

Parallèlement, j'ai développé deux modèles murins d'inflammation pour étudier le rôle des fibres nerveuses sympathiques dans la mise en place des TLS. Le premier utilise des injections intranasales de lipopolysaccharide (LPS) chez des souris C57Bl/6 immunocompétentes. Ce modèle m'a permis d'établir une cinétique d'apparition et de régression des TLS, de montrer que l'injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) détruit en grande partie les fibres nerveuses sympathiques et s'accompagne d'une réduction majeure du nombre des TLS dans les poumons de souris ayant reçu du LPS, comparativement aux souris contrôles. Ces souris traitées avec la 6-OHDA et le LPS montrent de plus un infiltrat diffus de lymphocytes B et T au sein du parenchyme pulmonaire, suggérant un rôle direct ou indirect des fibres sympathiques dans l'organisation des cellules lymphoïdes au sein du tissu pulmonaire inflammatoire.

Le modèle tumoral pulmonaire que j'ai alors développé, fondé sur l'injection par voie intraveineuse de cellules de carcinome pulmonaire murin, est marqué par l'induction de TLS et une croissance tumorale rapide. Dans ce modèle, j'ai montré que les souris traitées avec la 6-OHDA présentaient des agrégats lymphoïdes plutôt que des TLS – ceux-ci étant de taille réduite et en nombre réduit. Une analyse détaillée par imagerie 3D, menée en collaboration avec le Dr. Brunet a montré que ces rares TLS étaient retrouvées près des fibres sympathiques résiduelles. L'ensemble de ces données indiquent que 1) des fibres nerveuses sympathiques sont présentes dans les tumeurs NSCLC de patients ; 2) la déplétion de ces fibres a un profond impact sur la formation et la taille des TLS dans les modèles murins étudiés. Dans une situation inflammatoire transitoire induite par le LPS, les TLS sont quasiment absentes. Dans une situation inflammatoire tumorale aiguë, la forte diminution de la présence des fibres sympathiques s'accompagne d'une diminution du nombre et de la taille des TLS et de la présence d'agrégats lymphoïdes.

Mon travail ouvre la voie à une étude approfondie de l'impact des fibres nerveuses sympathiques sur la genèse des TLS et le développement tumoral et à une analyse intégrée de l'architecture des tumeurs solides et des protéines parties prenantes de cette architecture et de son évolution.

Abstract

In 2008, our laboratory demonstrated the presence of tertiary lymphoid structures (TLS) in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) and their association with a more favourable prognosis. These structures are the site of cellular and humoral anti-tumor responses development. Anatomically, TLS look like lymph nodes and share similar genesis mechanisms. Peripheral nervous system (PNS) involvement has been suggested in the genesis of secondary lymphoid organs, but it is not documented for TLS. We hypothesized that SNP is involved in the neogenesis of TLS in NSCLC tumors.

The objectives of my work were to study therefore the role of sympathetic nerve fibers in the formation and maintenance of TLS using tumoral and non-tumoral mouse models of pulmonary inflammation, as well as to characterize nerve fibers in NSCLC tumors.

A 3D imaging method (piDISCO⁺) that I adapted allowed me the study of the location of nerve fibers and TLS presence in tumor biopsies fixed and embedded in paraffin (FFPE), in collaboration with the team of Dr. Brunet (Collège de France). The 3D stainings of these biopsies made it possible to visualize and locate vascular network, nerve fibers and immune cells. After the treatment of FFPE tumor biopsies performed for 3D imaging, a protein extraction was made, thanks to the setting of an optimized buffer. High- and low-molecular weight proteins, phosphorylated or not, could be detected from these FFPE biopsies treated for 3D imaging, which had never been performed before.

In parallel, I developed two mouse inflammation models to study the role of sympathetic nerve fibers in the generation of TLS. The first model uses intranasal injections of lipopolysaccharide (LPS) in immunocompetent C57Bl/6 mice. This model allowed me to establish the kinetic of the onset and regression of TLS. The injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) largely destroyed sympathetic nerve fibers and was accompanied by a marked significant reduction in the number of TLS in the lungs of mice that received LPS, as compared to control mice. These mice treated with 6-OHDA and LPS also showed a diffuse infiltrate of B and T lymphocytes within the pulmonary parenchyma, suggesting a direct or indirect role of sympathetic fibers in the organization of lymphoid cells within inflammatory pulmonary tissue.

The pulmonary tumor model that I also developed, based on intravenous injection of murine pulmonary carcinoma cells, was marked by TLS induction and rapid tumor growth. In this model, I showed that mice treated with 6-OHDA had essentially lymphoid aggregates rather than TLS, the latter being smaller and in reduced numbers. Detailed analysis by 3D imaging performed in collaboration with Dr. Brunet showed that these rare TLS were mostly found near the residual sympathetic fibers. All of these data indicate that i) sympathetic nerve fibers are present in NSCLC tumors; ii) the depletion of these fibers has a profound impact on the formation and size of TLS in the mouse models studied. In a transient inflammatory situation induced by LPS, TLS were almost absent. In an acute tumor inflammatory situation, the decrease of sympathetic fibers is accompanied by a decrease in the number and size of TLS and the presence of lymphoid aggregates.

Thus, my work paves the way for an in-depth study of the impact of sympathetic nerve fibers on the genesis of TLS and tumor development and for an integrated analysis of the architecture of solid tumors and proteins involved in this architecture and its evolution.

Remerciements

Je tiens à remercier mes parents, **Selma Jrad** et **Ameur Letaïef** pour vos sacrifices, votre travail acharné, j'admire votre courage et tout ce que vous avez accompli pour nous offrir toutes les conditions nécessaires à un bel avenir et j'espère que l'on continuera à faire briller les petites étincelles discrètes dans vos yeux.

Je remercie le **clan Letaïef-France** pour leur amour et leur soutien sans faille depuis le début, mes frères **Mehdi** et **Rochdi**. Ma sœur **Douâa**, mon modèle, tu m'as toujours suivie et encouragée dans toutes mes aventures à travers la planète. Je compte sur toi pour me trouver une place dans ton équipe chez Legrand.

Mes belles-sœurs, **Hélène** et **Aïcha**, pour votre soutien et vos encouragements (je vous pardonne de ne pas venir courir le dimanche matin).

Mes neveux, **Sami**, **Omrane** et **Hédi**, source intarissable de sourires et de bonheur sans qui je ne serai jamais devenue tata lala.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, **Marie-Caroline Dieu-Nojsean** de m'avoir accordé sa confiance tout au long de ce projet et pour l'accueil au sein de son équipe.

Je tiens à remercier **Jean-Luc Teillaud** pour son investissement considérable dans ce projet, le temps passé à relire les demandes de financement, les divers manuscrits, la thèse et sa disponibilité même le 31 Décembre à 20h. Merci pour votre confiance.

Je remercie toutes les personnes que j'ai eues le plaisir de côtoyer au troisième étage de l'escalier E du **centre de recherche des cordeliers** pendant mes deux premières années de thèse.

Je tiens à remercier **Isabelle Cremer** et **Lubka Roumenina** de m'avoir permis d'accéder à l'ensemble des équipements dont j'avais besoin suite à notre départ des Cordeliers. Je vous remercie également de m'avoir accueillie chaleureusement à l'issue de notre installation à la Pitié et je vous remercie également pour vos conseils.

Au **bureau des docs**, que j'ai partagé avec **Marie**, ma co-thésarde, on a débuté ensemble cette aventure. On a partagé beaucoup de moments ensemble, certains joyeux, d'autres un peu moins. Merci pour ton soutien sans faille qui m'a permis d'achever cette thèse bien complexe et particulière. J'ai été très admirative du travail que tu accomplis durant ta thèse.

À mes autres co-thésards, **Mahmoud**, **Erwan**, **Bénédicte**, merci pour la très très bonne ambiance dans le bureau des docs, votre écoute, vos conseils avisés et votre bonne humeur au quotidien. **Bénédicte**, je dois t'avouer que je me suis servie à de nombreuses reprises dans ta réserve de chocolats et je n'oublie pas que l'on doit faire prochainement une course de 10km. Merci également de m'avoir autorisée à utiliser les équipements de la team-Galon suite à notre départ.

À **Carine**, rayon de soleil qui a un rire indescriptible et tellement communicatif. Merci pour tout ce que tu m'as apporté tant sur le plan professionnel (nos nombreux deals douteux) et personnel. Je pense que tu es la seule personne à répondre à mes appels de 22h pour me confirmer la vitesse de la centri. Merci pour tout originale compatriote tunisienne.

À **Vico**, pour ta gentillesse, ta disponibilité, tes encouragements, ton soutien, ton empathie. Merci pour tout Vico au grand cœur.

À **Magali** et **Margot**, je pense que l'on a dû faire la quasi-totalité des restaurants d'une bonne partie des rues de la Roquette et Popincourt (le 11^e, notre QG officiel). Merci pour votre soutien, les rires, les soirées, la décompression et votre bonne humeur. Je sais à quel point j'ai été très très très difficile à canaliser sur la fin. Je n'oublie pas que l'on doit déposer un brevet concernant le « sqwert » qui a vu le jour le 15 Janvier 2020 aux alentours de 23h.

Magali, merci de m'avoir accompagnée dans mes délires notamment sportifs. Tu as survécu aux séances éprouvantes de body attack, body pump et rpm de Jordan et Driss. Tu as également subi le boot camp du 21 Juillet 2019 à Bercy sous un soleil de plomb de 14 à 16h (désolée). A présent tu vas au cross fit, quel beau parcours sportif !! Je ne suis pas fan des animaux, tu le sais très bien mais j'ai fini par apprécier **Pimouse Devriese-de-Popincourt**.

Margot, à l'origine petite stagiaire de L3 et te voilà en thèse, je suis convaincue que tu vas faire une très belle thèse complément-cancer. Merci pour tout ce que tu m'as apporté tout au long de ces dernières années.

À **Nicolas, Benoît, Rémi** et **Jules** pour votre bonne humeur. Nicolas, termine rapidement ton post doc au NIH et crée ta structure pour m'embaucher. À **Pauline**, Mont-saint-Aignan nous a rapprochées, malgré ce que diront les collègues, je suis vraiment admirative de ton sens de l'humour !!

À **Tessa**, l'experte de la biologie moléculaire, des commandes Thermo et de candy crush, viva Rafael Nadal !!

À **Nathalie Jupiter**, la maman des cordeliers avec qui j'ai beaucoup rigolé. Merci pour ta générosité sans limite, les gâteaux à l'ananas, les « ma chérie, comment tu vas ? ».

À ma seule et unique stagiaire, **Sevda**, rayon de bonne humeur ambulant.

À **Christophe** et **Estelle** de la plateforme **CHIC** des Cordeliers, pour leur soutien technique en cytométrie et en histologie.

Je remercie également **Pierre Validire**, pathologiste de l'IMM qui nous a permis l'accès aux biopsies humaines.

Merci à **mon équipe des Cordeliers** pour votre présence, nos réunions de crise au sommet, nos afterworks qui ont été indispensables à mon équilibre psychologique.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai côtoyées pendant près d'un an et demi au **Collège de France**. Je remercie très chaleureusement **Isabelle Brunet**, pour son accueil au sein de son équipe, sa disponibilité, d'avoir mis à ma disposition son laboratoire et l'ensemble des équipements du Collège de France pour mener à bien ce projet. J'ai apprécié être une « Brunet ».

Safa, j'ai énormément appris à tes côtés, merci pour tout. À **Sabrina**, merci d'avoir pris le temps de me montrer plein de techniques et d'être venue à de nombreuses reprises me sauver face à ma perdition face au lightsheet et à l'axiozoom, tout comme **Guy, Sonia** et **Virginie. Marie**, ma voisine de bureau, tu me fais tellement rire, je te souhaite de réaliser une très belle thèse. Merci aux « Brunet » pour votre soutien, votre gentillesse et toute l'aide que vous m'avez apporté.

Aux collègues de bureau de l'équipe **De Thé, Pierre** merci pour tes conseils et de m'avoir fait découvrir les pâtisseries **Ernest & Valentin. Annie**, et **Cheng Cheng**, pour votre bonne humeur

au quotidien. Je remercie également l'ensemble des membres de la **plateforme Orion, Estelle, Julien, Phillipe et Tristan.**

Je remercie également les personnes avec qui nous avons fusionné à la Pitié.

Véronique, j'ai débuté l'expérimentation animale à tes côtés, ma groupie au congrès de la SFI, merci pour tes conseils, tes encouragements et ton sens de l'humour que j'apprécie énormément.

Aux « survivors », **Claire** et **Juliette** rencontrées aux cordeliers, merci pour votre soutien et l'ensemble de vos précieux conseils. À **Béré**, on s'est connue aux cordeliers, merci pour ta disponibilité quand je venais te harceler avec toutes mes questions sur la cytométrie et l'expérimentation animale. Je te souhaite de réaliser un post-doc dans une boîte pharma au soleil. J'ai fini par comprendre que le froid et toi n'étaient pas compatibles.

À **Sandra**, merci pour ta présence, ton temps et de toute l'aide que tu m'as apporté. Je te souhaite de faire de très belles choses pour la suite de ta carrière. Je dois aussi te dire que je me suis servie dans ta réserve de café (j'avoue tout).

À **Claude**, le sniper des fautes d'orthographe, mon fournisseur officiel d'héparine et d'azote à 7h40 pétante. Il faut que je te dise, je me suis servie à de nombreuses reprises dans ta réserve de chocolats le week-end. Merci pour ton dévouement pour les commandes.

À **Solène**, tu as gentiment passé mes tubes au FACS et réalisé les compensations à ma place.

À **Rachel** et **Sadi**, merci de m'avoir très gentiment aidée dans les galères administratives de la soutenance.

Je remercie également les quelques thésards cotoyés à la Pitié pour leur bienveillance et les quelques **jeudi burger** auxquels j'ai assisté. Merci à **Rémy** et **Mathias**. Mathias, mon co-thésard de la Pitié, malgré ma très faible présence, merci pour tes encouragements, ton soutien et les moments de détente pour la dernière ligne droite. Aux autres thésards du CIMI, je n'ai pas passé beaucoup de temps en votre présence mais vous avez l'air gentils.

Je n'ai pas passé beaucoup de temps à la Pitié, mais je tiens à remercier la plateforme **histomics de l'ICM, Annick, Dominique, Célia et Nicolas**. Nicolas, tu as dû regretter de m'avoir transmis ton numéro de téléphone. Rassure-toi, c'est fini, je ne vais plus te harceler pour inclure en urgence des organes divers et variés, ou encore pour me fournir des scans très très très rapidement. J'ai

beaucoup apprécié toutes les conversations que l'on a eues et j'ai beaucoup appris à tes côtés sur les multifacettes de l'axioscan.

Je ne remercie pas le **nanozoomer** qui a planté tellement de fois pendant les sessions au cours desquelles je lançais des séries de 210 lames à la chaîne. Je remercie le **microtome Leica**, sur lequel j'ai passé un nombre d'heures improbables à réaliser un nombre impressionnant de coupes. Je remercie tout de même la **RATP** pour le bon entretien des **lignes 10 et 5** que j'ai tellement utilisées pour mes nombreuses navettes entre les Cordeliers/Collège de France et la Pitié.

Je remercie la salle de sport **Freeness**, la seule salle ouverte 24h/24 7j/7, mon défouloir principal pendant ces trois dernières années. À **Picard** de la rue André Mazet, qui m'a alimenté pendant une grande partie de la thèse.

Je remercie également la **Ligue contre le cancer** qui m'a permis de finaliser mes travaux de thèse.

Je souhaite exprimer ma gratitude au **Professeur Debré** d'avoir accepté d'être le Président du Jury de cette thèse. Je voudrais également remercier les rapporteurs, le **Dr Willard-Gallo** et le **Dr Saoudi** d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail et d'y avoir apporté vos expertises. Mes remerciements vont également aux **Professeurs Badoual** et **Gandolfo** d'avoir accepté d'être examinateurs.

Merci aux **souris** qui ont très fortement contribué à ce travail. Je m'excuse auprès de celles qui ne sont pas arrivées au bout de l'expérimentation à cause de noyades ou d'embolie pulmonaire dont je suis responsable.

Cette thèse c'est aussi :

- Deux premiers prix de communication orale au congrès de la SFI et aux journées de l'école doctorale
- De l'autonomie et de l'indépendance
- De belles collaborations et de très belles rencontres
- Un travail acharné
- Trois centres de recherche

Abréviations

β_2 : récepteur β adrénergique 2
 β_3 : récepteur β adrénergique 3
 $\alpha 7$ -nAChR : sous-unité α -7 du récepteur nicotinique à l'acétylcholine
 $\alpha 9$ -nAChR : sous-unité α -9 du récepteur nicotinique à l'acétylcholine
4-DAMP : 1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
ACh : acétylcholine
ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire anticorps-dépendante
AID : activation-induced cytidine deaminase
ALK : anaplastic lymphoma kinase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ATP : adénosine triphosphate
BALT : bronchus-associated lymphoid tissue
BCPO : broncho-pneumopathie obstructive chronique
BDNF : brain-derived nerve factor
BLN : brachial lymph node
BRAF : V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
ccRCC : clear cell Renal Cell Carcinoma
CG : centre germinatif
Chrm1 : récepteur cholinergique muscarinique de type 1
Chrm2 : récepteur cholinergique muscarinique de type 2
Chrm3 : récepteur cholinergique muscarinique de type 3
Chrm4 : récepteur cholinergique muscarinique de type 4
Chrm5 : récepteur cholinergique muscarinique de type 5
CLN : cervical lymph node
CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA : cellules présentatrices d'antigène
CRC : cancer colorectal
CREB : c-AMP response Element-binding protein
CTL : lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4 : anti-cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC : cellules dendritiques
DcR3 : Decoy receptor 3
DCX : doublecortine
EFL : early-follicle-like
EGFR : epidermal growth factor receptor
EML4 : echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EMT : transition épithéliomésenchymateuse
EPAC : exchange factor directly activated by cAMP
FDC : cellule folliculaire dendritique
FFPE : formalin-fixed paraffin-embedded
FLN : facial lymph node
FUT7 : fucosyltransferase 7
GALT : gut-associated lymphoid tissue

G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor
 GDNF : glial cell line-derived neurotrophic factor
 GL : ganglions lymphatiques
 GlcNAc6ST2 : N-acetylglucosamine 6-O-sulphotransferase
 GlyCAM-1 : Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
 HCC : hepatocellular carcinoma
 HCV : virus de l'hépatite C
 HE : hématoxyline éosine
 HER-2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
 HEV : high endothelial venules
 HPV : human papilloma virus
 HSV : herpes simplex virus
 HVEM : herpes viral entry mediator
 iBALT : induced bronchus-associated lymphoid tissues
 ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1
 ICP : immune checkpoint
 Id2 : helix-loop-helix protein inhibitor of DNA binding 2
 iDISCO : imaging of solvent-cleared organs
 IFN- γ : interféron γ
 IL : interleukine
 IL-7 : interleukine- 7
 IL7-R α : interleukin-7-receptor- α
 ILC3 : innate lymphoid cells type 3
 Jak3 : Janus kinase 3
 K.O. : : knock out
 KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
 LA : agrégats lymphoïdes
 LALT : larynx-associated lymphoid tissue
 LB : lymphocytes B
 LIGHT : homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes
 LLC : Lewis lung carcinoma
 LPS : lipopolysaccharide
 LT CD4⁺ : lymphocytes T CD4
 LT CD8⁺ : lymphocytes T CD8
 LT : lymphocytes T
 LT $\alpha_1\beta_2$: lymphotoxine hétérotrimérique membranaire $\alpha_1\beta_2$
 LT α_3 : lymphotoxine α_3
 LT β R : récepteur de la lymphotoxine β
 LTfh : lymphocyte T folliculaire helper
 LTi : lymphoid tissue inducer
 LTo : lymphoid tissue organizer
 LTreg : lymphocyte T régulateur
 MADCAM-1 : mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
 MAPK : mitogen-activated protein kinases
 MDSC : myeloid-derived suppressor cells

MLN : mesenteric lymph node
 MMP-2 : matrix métallopeptidase 2
 MMP-9 : matrix métallopeptidase 9
 NA : noradrénaline
 NALT : nasal-associated lymphoid tissue
 NCR : natural cytotoxicity receptor
 ND : non déterminé
 NF- κ B : nuclear factor- κ B
 NF-H : neurofilament heavy chain
 NF-L : neurofilament light chain
 NGF : nerve growth factor
 NK : natural killer
 NSCLC : non-small-cell lung cancer
 NT-3 : neurotrophine 3
 NT-4 : neurotrophine 4
 NT-5 : neurotrophine 5
 PAMP : pathogen-associated molecular pattern
 PD-1 : programmed death 1
 pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes
 PD-L1 : programmed death-ligand 1
 PFA : paraformaldéhyde
 p-F-HHSiD : p-Fluoro-hexahydrosila-difenidol
 piDISCO⁺ : protein immunolabeling 3D imaging of solvent-cleared organs
 PFL : primary-follicle-like
 PKA : protéine kinase A
 PNAd : peripheral node addressin
 PNI : invasion péri-neurale
 PP : plaques de Peyer
 PR : polyarthrite rhumatoïde
 Prox1 : prospero homeobox protein 1
 PRR : pattern recognition receptor
 RANK : receptor activator of NF- κ B
 RANKL : receptor activator of NF- κ B ligand
 RCC : renal cell carcinoma
 ROR- γ t : retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t
 S4F : sémaphorine 4 F
 SCC : squamous cell carcinoma
 SCLC : small-cell lung cancer
 SFL : secondary-follicle-like
 siRNA : small interfering RNA
 SLO : organes lymphoïdes secondaires
 SNC : système nerveux central
 SNP : système nerveux périphérique
 Sox8 : SRY-Box Transcription factor 8
 SVZ : zone sous-ventriculaire
 TAM : tumor-associated macrophages

T-bet : T cell-specific T box transcription factor
 TC1-Luc : cellules TC1 couplées à la luciférase
 TERT : human telomerase reverse transcriptase gene
 TH : tyrosine hydroxylase
 Ti-BALT : tumor-induced bronchus associated lymphoid tissues
 TILs : tumor-infiltrating lymphocytes
 TIM-3 : T-cell immunoglobulin and mucin domain-3
 TLR : toll-like receptor
 TLR-4 : toll-like receptor 4
 TLS : structures lymphoïdes tertiaires
 TLT : tissus lymphoïdes tertiaires
 TNF- α : tumor necrosis factor alpha
 TNFR1 : tumor necrosis factor receptor 1
 TNFR2 : tumor necrosis factor receptor 2
 TRAF6 : TNF receptor-associated factor 6
 TRANCE : tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine
 TRANCER : tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine receptor
 VACHT : vesicular acetyl choline transporter
 VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1
 VEGF : vascular epidermal growth factor
 VEGFR-2 : vascular epidermal growth factor receptor 2
 VTP : vascular targeting peptide

Table des matières

Introduction	16
Prolégomènes	16
1. Les organes lymphoïdes secondaires	18
1.1 Caractéristiques générales	18
1.1.1 Organisation fonctionnelle	18
1.1.2 Mise en place des réponses immunitaires	19
1.2 L'ontogenèse des ganglions lymphatiques.....	19
1.2.1 Modèle à deux cellules : LTi et cellules mésenchymateuses	20
1.2.2 Modèle à plusieurs cellules LTo	22
1.3 Facteurs régulant le développement des organes lymphoïdes secondaires.....	24
1.3.1 LTi.....	24
1.3.2 La famille du tumor necrosis factor	26
1.3.3 Les chimiokines.....	27
1.3.4 L'implication du système nerveux	27
1.3.4.1 L'acide rétinoïque	27
1.3.4.2 L'innervation des SLO	28
2. Les structures lymphoïdes tertiaires	29
2.1 Caractéristiques générales des TLS.....	29
2.2 TLS et inflammation	30
2.2.1 Les maladies auto-immunes	30
2.2.2 Le rejet de greffe	31
2.2.3 Infections virales et bactériennes	31
2.2.3.1 Infections pulmonaires	31
2.2.3.2 Infections au sein de divers organes.....	32
2.3 TLS et tumeurs	33
2.3.1 Le microenvironnement tumoral	33
2.3.2 Réponses adaptatives anti-tumorales et TLS	40
2.3.2.1 Cellules dendritiques et lymphocytes T	40
2.3.2.2 Lymphocytes B	41
2.4 La genèse des TLS	44
2.4.1 Les cellules impliquées	44
2.4.2 Les molécules impliquées	45
2.4.3 Les high endothelial venules (HEV)	47
2.4.4 L'implication du système nerveux	47
2.5 TLS et thérapies anti-cancéreuses	49
2.5.1 Impact positif des TLS dans les cancers	49
2.5.2 Induction des TLS à des fins thérapeutiques.....	50
3. Le système nerveux périphérique au sein du microenvironnement tumoral	52
3.1 Caractéristiques générales du système nerveux périphérique	52
3.2 Dialogue croisé entre SNP et cellules immunitaires	54

3.2.1 Les fibres parasympathiques et les cellules immunitaires	55
3.2.2 Fibres sympathiques et cellules immunitaires.....	57
3.3 Système nerveux autonome et tumeurs.....	58
3.3.1 Effets sur la réparation de l'ADN	59
3.3.2 Effets sur les oncogènes	60
3.3.3 Effets sur la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)	60
3.3.4 Effets sur l'apoptose.....	60
3.4 Fibres nerveuses au sein du microenvironnement tumoral	60
3.4.1 Le système autonome, initiateur des tumeurs	60
3.4.2 Système autonome et croissance tumorale.....	63
3.4.3 Néoangiogenèse dans les tumeurs.....	65
3.4.4 Les fibres nerveuses, un moyen de dissémination des cellules tumorales	66
3.4.5 Les cellules tumorales et l'induction de l'axonogenèse.....	68
3.5 Thérapies anti-cancéreuses ciblant le système nerveux	71
3.5.1 L'utilisation des β -bloquants.....	71
3.5.2 L'utilisation des inhibiteurs des récepteurs muscariniques.....	71
4. Le cancer du poumon.....	73
4.1 Epidémiologie	73
4.2 Étiologie des tumeurs pulmonaires	73
4.2.1 Le tabagisme	73
4.2.2 Les facteurs environnementaux.....	73
4.2.3 Facteurs génétiques	74
4.3 Traitements.....	74
Hypothèse et objectifs	76
Résultats	78
Manuscrit #1. <i>Tissue-Cleared 3D imaging followed by protein analysis: a single biopsy, multiple informations</i>	78
Manuscrit #2. <i>Sympathetic nerve fibers impacts TLS formation in response to inflammation...</i>	118
Discussion.....	163
Conclusion et perspectives	175
Annexe.....	178
Evolution vers la 3 ^{ème} dimension pour une meilleure compréhension du microenvironnement immunitaire dans les tumeurs.....	178
Bibliographie.....	190

Sommaire des Figures (hors manuscrits #1 et #2)

Figure 1. Composition d'un ganglion lymphatique.	18
Figure 2. Organogenèse des ganglions lymphatiques (modèle à deux cellules)	21
Figure 3. Organogenèse des ganglions lymphatiques selon le modèle à multiples cellules.....	22
Figure 4. L'implication des fibres nerveuses dans la formation des ganglions lymphatiques	28
Figure 5. Composition cellulaire des TLS	29
Figure 6. Le microenvironnement tumoral	34
Figure 7. Le recrutement des cellules immunitaires sous le contrôle des chimiokines et des cytokines	35
Figure 8. Présence de TLS au sein des tumeurs pulmonaires de type NSCLC.....	36
Figure 9. Différents stades de maturation des TLS dans les carcinomes épidermoïdes pulmonaires	39
Figure 10. Les différentes sous-populations de LB au sein des TLS	42
Figure 11. Genèse des TLS	48
Figure 12. Les différents acteurs du système nerveux et leurs fonctions.....	52
Figure 13. Morphologie et acteurs des systèmes sympathique et parasympathique du SNP..	54
Figure 14. L'effet pro-tumoral du système sympathique	59
Figure 15. L'implication des fibres nerveuses dans le cancer de la prostate.	62
Figure 16. Interactions entre les composantes nerveuses, immunitaires et tumorales au sein du microenvironnement tumoral.	70

Sommaire des Tableaux (hors manuscrits #1 et #2)

Tableau 1. Comparaison des deux modèles de genèse des SLO.....	24
Tableau 2. Récapitulatif des modèles murins K.O. ayant des altérations des SLO	25
Tableau 3. Expression des membres de la famille du TNF- α et de leurs récepteurs	26
Tableau 4. Comparaison des SLO avec les TLS.	30
Tableau 5. Valeur pronostique des TLS au sein des tumeurs primaires et métastatiques.....	37
Tableau 6. Expression des récepteurs muscariniques au sein des principales populations de cellules immunitaires.....	57
Tableau 7. Expression des récepteurs muscariniques dans les tumeurs solides.....	64
Tableau 8. Valeur pronostique des invasions périneurales dans les tumeurs solides.	68

Introduction

Prolégomènes

C'est depuis la fin du XIX^e siècle que l'immunité a commencé à être explorée de façon empirique, pour sa capacité à contrôler la croissance tumorale. En 1891, William Coley observait pour la première fois la régression d'un sarcome suite à l'inoculation d'extraits bactériens provenant d'un érysipèle. Ses essais cliniques se poursuivirent avec des souches bactériennes inactivées moins dangereuses, *Serratia marcescens* et *Streptococcus pyogenes*, ce qui donnera naissance à la « toxine » de Coley. Cependant, il fallut attendre plus de 50 années pour que l'idée de traiter les tumeurs par inoculation d'extraits bactériens soit de nouveau explorée, en 1959, grâce à l'utilisation du Bacillus Calmette-Guérin pour le traitement des carcinomes (Old et al., 1959) ainsi que pour le traitement des cancers superficiels de la vessie. Au même moment, le rôle du système immunitaire dans le contrôle de la croissance tumorale est également mis en lumière au travers de l'irradiation de patients atteints de leucémie aiguë, suivie d'une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (Mathé et al., 1959). Parallèlement à ces avancées pré-cliniques et cliniques, un nouveau concept, avancé par Macfarlane Burnet voit le jour, celui de l'immunosurveillance des tumeurs : ce dernier propose que la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales repose sur l'immunité adaptative chez les hôtes immunocompétents (Burnet, 1957).

Malgré ces avancées empiriques et conceptuelles, la démonstration d'un réel lien entre système immunitaire et élimination des cellules tumorales a connu beaucoup d'échecs au cours des deux décennies suivantes, notamment dans les modèles murins de transplantation de cellules tumorales. Le regain d'intérêt pour le système immunitaire fut apporté par la capacité des lymphocytes T (LT) de patients atteints d'un mélanome à reconnaître des antigènes tumoraux carcino-embryonnaires (désignés ultérieurement sous le nom de « antigen testis ») exprimés par les cellules tumorales (Traversari et al., 1992). Dix ans plus tard, les travaux de Robert Schreiber (Dunn et al., 2002) démontrent de plus que les cellules tumorales peuvent échapper au système immunitaire ; un nouveau concept est alors élaboré par ce dernier : l'*immunoediting*, composé de trois phases principales : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Une preuve majeure de l'immunosurveillance chez l'homme est ensuite apportée par la démonstration que la présence d'un infiltrat immunitaire est liée à un meilleur pronostic : la quantité, la qualité ainsi que la disposition

spatiale des lymphocytes T infiltrant la tumeur, les *tumor-infiltrating lymphocytes* (TILs), notamment les lymphocytes T CD8⁺ mémoires, corrélient avec la survie des patients (Pagès et al., 2005; Galon et al., 2006).

Ces travaux pionniers montrent alors l'importance primordiale de l'étude du microenvironnement tumoral dont le but est de mieux comprendre la complexité et l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral pour ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. Notre équipe a été la première à décrire la présence de LT et lymphocytes B (LB) ainsi que de cellules dendritiques (DC) organisées en structures lymphoïdes tertiaires (TLS) au sein des tumeurs pulmonaires. L'impact positif de leur présence sur la survie des patients a été également démontré (Dieu-Nosjean et al., 2008; Germain et al., 2014; Goc et al., 2014a). D'autres équipes ont par la suite confirmé la corrélation positive entre pronostic et TLS dans divers cancers tels que celui du sein (Martinet et al., 2011) ou celui des voies aériennes supérieures (Wirsing et al., 2014). Une meilleure compréhension des mécanismes menant à leur genèse est indispensable afin de favoriser les réponses intra-tumorales et ainsi les utiliser comme outil thérapeutique.

Dans cet environnement inflammatoire, aigu ou chronique, le système immunitaire peut à la fois être pro- ou anti-tumoral. En fonction des chimiokines et des cytokines présentes, la balance tend vers l'élimination des cellules tumorales ou bien vers le développement de la tumeur (Ostrand-Rosenberg, 2008). Les acteurs de l'immunité innée [macrophages, DC, cellules *natural killer* (NK), granulocytes] et adaptative (LT, LB) présentent ce double visage : la différenciation des LT CD4⁺ en Th1 permet l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques, ce qui favorise le développement d'une immunité anti-tumorale. Cependant, à l'opposé, une différenciation des LT helper en Th2 ou bien en Th17 a un effet pro-tumoral car elle s'oppose à l'action des LT CD8⁺. S'ajoute à cette balance pro- vs anti-tumorale, une néo-vascularisation. Enfin, de récents travaux rapportent un impact pro-tumoral du système nerveux périphérique (SNP) dans le développement des tumeurs de la prostate (Magnon et al., 2013). Toutefois, les relations entre le SNP et le système immunitaire dans un contexte tumoral commencent tout juste à être explorées.

Durant mes trois années de thèse, je me suis attachée à analyser la présence de fibres nerveuses dans les tumeurs du poumon et à décrypter leur éventuel impact sur la formation des TLS, dont la composition anatomique est très proche de celle des organes lymphoïdes secondaires (SLO).

1. Les organes lymphoïdes secondaires

1.1 Caractéristiques générales

1.1.1 Organisation fonctionnelle

Les réponses immunitaires innées et adaptatives se développent au sein des SLO qui comprennent les ganglions lymphatiques (GL), la rate, les plaques de Peyer (PP) et les tissus lymphoïdes muqueux. Les GL se développent *in utero* et se composent de trois zones principales : le cortex, le paracortex et la médulla (**Fig. 1**). Le cortex et la médulla sont considérés comme les zone B des SLO. En effet, au sein du cortex, on distingue des LB naïfs, présents au niveau des follicules primaires, ainsi que des cellules présentatrices d'antigène (CPA), les cellules dendritiques folliculaires, ainsi que quelques LT $CD4^+$ folliculaires helper (LTfh). Des LB activés et différenciés sous la forme de plasmablastes producteurs d'anticorps sont retrouvés au niveau de la médulla.

Le paracortex renferme quant à lui des LT, des DC, et représente la zone T des SLO. Cette zone est une zone de trafic cellulaire très intense, liée aux vaisseaux lymphatiques et à la présence de *high endothelial venules* (HEV) qui représentent les voies d'entrées majeures des cellules immunitaires.

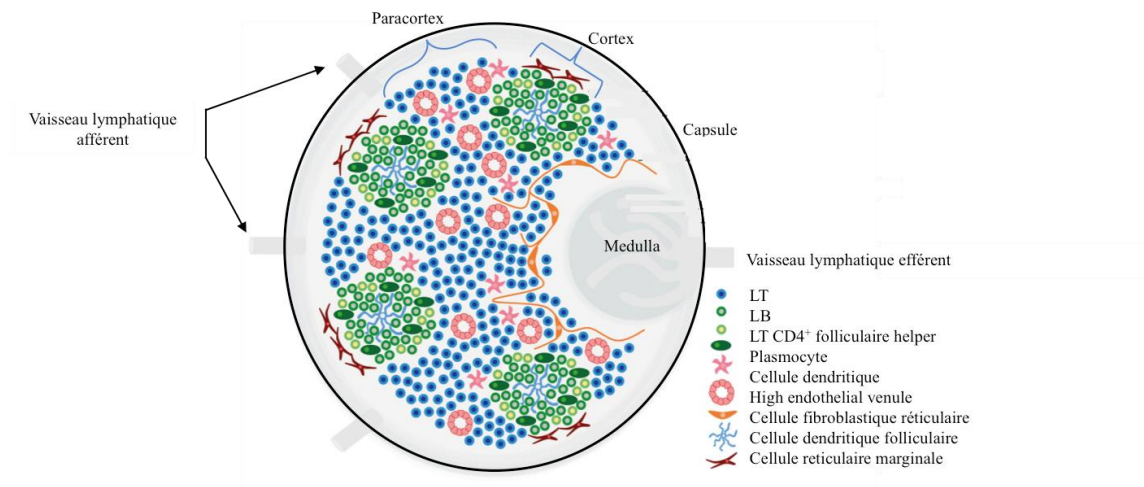


Figure 1. Composition d'un ganglion lymphatique (adapté de Colbeck et al., 2017).

Les ganglions lymphatiques sont entourés d'une capsule riche en collagène et présentent trois zones distinctes. La première, le cortex, contient les LB, les LT folliculaires ainsi que des cellules dendritiques folliculaires. La seconde zone est représentée par le paracortex qui contient les LT, les DC, ainsi que les cellules réticulaires fibroblastiques. Les ganglions lymphatiques présentent également un système lymphatique représenté par les vaisseaux lymphatiques

afférents et efférents. Les vaisseaux lymphatiques afférents permettent notamment l'acheminement des antigènes. Ainsi, suite à la rencontre avec un antigène, les LB naïfs prolifèrent dans les follicules primaires, ce qui donne naissance à des follicules secondaires, contenant notamment des centres germinatifs qui sont les sites de différenciation des en LB mémoires et plasmocytes producteurs d'anticorps. Des HEV sont également présents et permettent l'acheminement des cellules immunitaires. Abréviations : LB, lymphocyte B ; LT, lymphocyte T.

1.1.2 Mise en place des réponses immunitaires

Lors d'une infection, les CPA reconnaissent les potentiels agents pathogènes grâce à l'expression de divers récepteurs regroupés sous le terme de *Pattern recognition receptor* (PRR). Une fois l'antigène capturé, ces cellules migrent du site infectieux vers les ganglions drainants grâce aux vaisseaux lymphatiques afférents. Au sein de cet environnement très dynamique, les DC présentent alors l'antigène aux LT (sous formes de fragments peptidiques lorsqu'il s'agit d'une protéine) et aux LB (sous forme intacte principalement). Une fois activés, les LB prolifèrent intensément et cette prolifération conduit à la formation de follicules secondaires au sein desquels on distingue un centre germinatif (CG) composé des LB en train de proliférer ainsi que des zones éparses de LB inactifs. Les LB activés peuvent se transformer en LB mémoires ou en plasmocytes producteurs d'anticorps qui peuvent être à courte ou longue durée de vie. Cette réponse ainsi générée correspond à la réponse immunitaire adaptative humorale. Une intense prolifération des LT est également observée. Les LT CD4⁺ peuvent se polariser en différents types de LT auxiliaires (ou « helper ») en fonction de la nature de l'antigène (Th1, Th2, Th17). Les LT CD8⁺ effecteurs se présentent majoritairement sous la forme de LT CD8⁺ cytotoxiques. Ce phénomène correspond à la réponse immunitaire adaptative cellulaire. Cependant, certains LT vont se transformer en LT mémoires à longue durée de vie. Ces différentes populations cellulaires de l'immunité adaptative peuvent enfin se rendre sur le lieu de l'infection pour éliminer l'agent pathogène via les vaisseaux lymphatiques efférents.

1.2 L'ontogenèse des ganglions lymphatiques

Deux types de modèles d'ontogenèse des GL ont été décrits chez la souris. Ils dépendent du nombre de cellules mésenchymateuses dites *lymphoid tissue organizer* (LTo). Dans le premier modèle, dit à « deux cellules », des cellules appelées *lymphoid tissue inducer* (LTi) activeraient ces cellules mésenchymateuses (LTo) (Mebius, 2003 ; Randall et al., 2008 ; van de Pavert and Mebius, 2010) qui permettraient alors l'organisation des GL. A l'inverse, l'autre modèle récemment décrit, propose que différents sous-types de LTo sont impliqués dans la mise en place des GL (Onder and Ludwig, 2018).

Dans les deux cas, le premier évènement se produit chez la souris au jour embryonnaire 10 (E10) en parallèle de la mise en place des systèmes nerveux et digestif et correspond à la polarisation des cellules endothéliales de la veine cardinale. Ces dernières expriment alors deux protéines, la *prospero homeobox protein 1* (Prox1) et la *SRY-Box Transcription factor 8* (Sox8) (Mebius, 2003 ; Cupedo and Mebius, 2003). Une fois polarisées, ces cellules endothéliales bourgeonnent et forment le sac lymphatique primitif, qui deviendra le réseau lymphatique.

En parallèle, les cellules pre-LTi générées au sein du foie fœtal se retrouvent en périphérie. Elles expriment à leur surface divers récepteurs, dont celui de l'*interleukine-7* (IL-7), l'*interleukin-7-receptor- α* (IL7-R α), ainsi que le facteur de transcription *helix-loop-helix protein inhibitor of DNA binding 2* (Id2). Elles expriment de plus le récepteur nucléaire de la famille des récepteurs de l'acide rétinoïque, *retinoic acid receptor-related orphan receptor γ* (ROR γ t), un facteur de transcription notamment essentiel à la survie des LTh17. A partir de cette étape, deux histoires divergentes sont proposées, comme cela est détaillé ci-dessous.

1.2.1 Modèle à deux cellules : LTi et cellules mésenchymateuses

Une fois circulant à la périphérie les cellules pré-LTi suivent le gradient de la chimiokine CXCL13 produite par les cellules mésenchymateuses et interagir avec ces dernières (E12.5-E13.5, **Fig. 2a**). Cette première interaction provoque la mise en place de premiers agrégats de cellules pré-LTi, renforcés grâce à l'expression par les pré-LTi du récepteur *tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine receptor* (TRANCE) (également nommé RANK, *receptor activator of NF- κ B*) et de son ligand, TRANCE / RANK-L. Le couple TRANCE/TRANCE favorise les interactions entre les cellules pré-LTi. Cela induit la maturation des cellules pré-LTi en cellules matures LTi qui expriment alors la lymphotoxine hétérotrimérique membranaire $\alpha_1\beta_2$ (LT $\alpha_1\beta_2$). De nouvelles interactions se mettent alors en place avec les cellules mésenchymateuses désormais différenciées en cellules stromales exprimant le récepteur de la lymphotoxine β (LT β R). Cela a pour conséquence l'obtention du premier centre d'organisation stromale (E13.5-E14.5, **Fig. 2b**). Au sein de ce dernier, de nombreuses molécules d'adhérence sont exprimées telles que le *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1* (MADCAM-1), l'*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) ou encore le *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1). Par ailleurs, la signalisation de la lymphotoxine (via le *nuclear factor- κ B*, NF- κ B) induit une augmentation de l'expression de

TRANCER, ce qui induit une boucle de rétroaction positive permettant le recrutement massif de cellules LTi. En plus de l'expression de ces molécules d'adhérence, des chimiokines lymphoïdes sont libérées comme les chimiokines CXCL13, CCL21 ou encore CCL19, permettant le recrutement des LB et LT circulants qui formeront les différentes zones fonctionnelles des ganglions (**Fig. 2c**) (van de Pavert and Mebius, 2010).

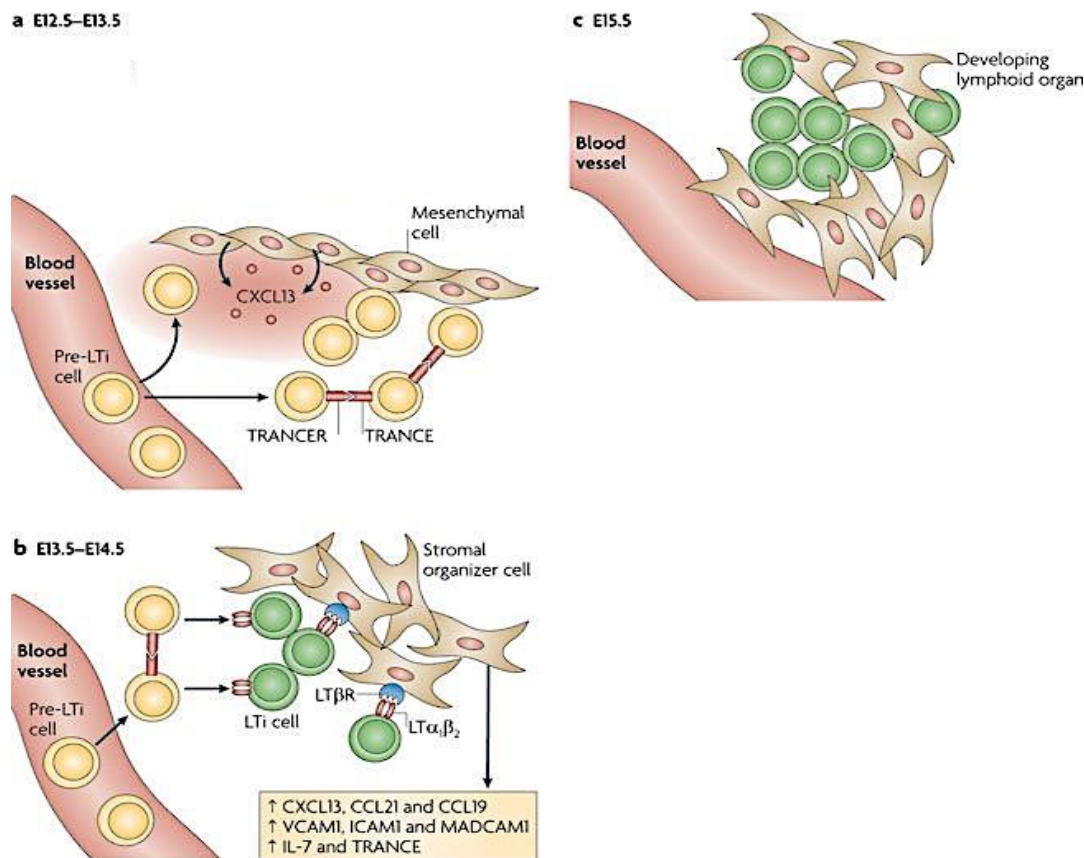


Figure 2. Organogenèse des ganglions lymphatiques (modèle à deux cellules) (van de Pavert and Mebius, 2010).

(a) Les cellules mésenchymateuses libèrent la chimiokine CXCL13 responsable du recrutement des cellules pre-LTi à partir de la circulation sanguine. Cette première interaction permet la formation d'amas de cellules pre-LTi, un phénomène impliquant la signalisation TRANCE-TRANCER. (b) Ces interactions induisent la maturation des cellules pre-LTi en cellules LTi matures via l'expression de LTα₁β₂. Ces dernières cellules interagissent alors avec les cellules stromales exprimant LTβR. Cela permet la mise en place du centre d'organisation stromale dans lequel des chimiokines (CXCL13, CCL21 et CCL19) et des molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, MADCAM-1) sont libérées. (c) Ces facteurs permettent l'attraction et la rétention des cellules pre-LTi et hématopoïétiques conduisant au développement des GL. Abréviations: ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; LTi, lymphoid tissue inducer; MADCAM-1, mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1; TRANCE, tumor necrosis factor-related activation-induced

cytokine; TRANCER, tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine receptor; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1.

1.2.2 Modèle à plusieurs cellules LTo

Dans ce modèle, le recrutement des cellules LTi est différent et fait intervenir les cellules lymphatiques endothéliales [1^{er} sous-type de LTo, (**Fig. 3**)] via l'expression de la chimiokine CCL21. Puis, les cellules mésenchymateuses (2^e sous-type de LTo) localisées au niveau des niches périvasculaires libèrent la chimiokine CXCL13 permettant la maturation du ganglion. Le dernier sous-type de LTo à intervenir sont les cellules endothéliales vasculaires. Ces trois sous-types, vont interagir avec les LTi grâce à l'expression de la LT β R.

Ces différentes interactions, induisent la maturation de l'arbre vasculaire avec notamment la mise en place des HEV exprimant à leur surface des molécules d'adhérence telles que MADCAM-1 et ICAM-1. Les cellules mésenchymateuses se différencient en cellules fibroblastiques réticulaires, précurseurs des cellules dendritiques folliculaires. Cette structure obtenue à E18 est prête pour le recrutement des LT et LB grâce aux différents gradients de chimiokines lymphoïdes : CXCL13, CCL19 et CCL21 (Onder and Ludewig, 2018).

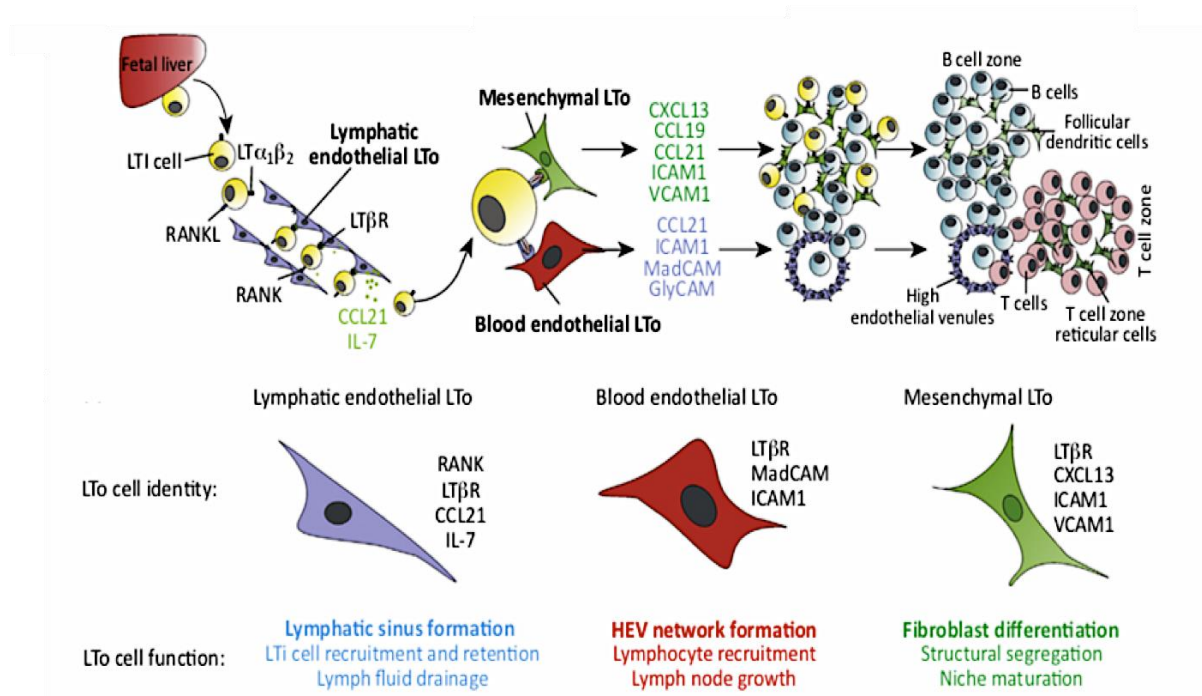


Figure 3. Organogenèse des ganglions lymphatiques : modèle à multiples cellules (Onder and Ludewig, 2018).

Les cellules pre-LTi provenant du foie fœtal interagissent avec un premier type de cellules LTo via l'axe RANK/RANK-L, les cellules lymphatiques endothéliales qui produisent CCL21, puis avec le second type de cellules LTo, les cellules mésenchymateuses, et avec un troisième type de LTo, les cellules endothéliales vasculaires via l'expression de LTβR. Ces diverses interactions conduisent à la libération de chimiokines et à l'expression de molécules d'adhérence, permettant la formation des différents compartiments des ganglions lymphatiques. Abréviations : GlyCAM-1, Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 ; HEV, high endothelial venule ; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1 ; LTi, lymphoid tissue inducer; LTo, lymphoid tissue organizer ; MADCAM-1, mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 ; RANK, receptor activator of NF-κB ; RANK-L, receptor activator of NF-κB ligand ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1.

Malgré de fortes similarités entre les deux modèles proposés (**Tableau 1**), les récentes découvertes sur l'organogenèse des GL amènent quelques interrogations sur le modèle à « deux cellules ». En effet, ce modèle, assez simple, reflète-t-il correctement les processus complexes qui régissent la formation des GL ?

Le second modèle, légèrement modifié implique plusieurs types de LTo qui ont chacun un rôle bien précis (Onder and Ludewig, 2018). Les LTo lymphatiques détermineraient à quel moment et à quel endroit les GL se mettent en place lors du développement embryonnaire. Les LTo mésenchymateuses, seraient responsable du recrutement et de l'amplification des LTi. Enfin, les LTo endothéliales, pourraient être responsables du remodelage vasculaire permettant le recrutement des LB et LT.

Tableau 1. Comparaison des deux modèles de genèse des SLO.

Acteurs	Modèles d'organogenèse	
	« Deux cellules »	« Plusieurs cellules »
LTi	Oui	Oui
LTo mésenchymateuses	Oui	Oui
LTo endothéliales	x	Oui
LTo lymphatiques	x	Oui
Chimiokines (CXCL13, CCL21, CCL19)	Oui	Oui
Molécules d'adhérences (MADCAM-1, VCAM-1, ICAM-1)	Oui	Oui
Interleukine (IL-7)	Oui	Oui
TNF-α (LT$\alpha_1\beta_2$, LIGHT, TRANCE)	Oui	Oui

Abréviations : ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; LT $\alpha_1\beta_2$, lymphotoxine $\alpha_1\beta_2$; LTi, lymphoid tissue inducer ; LTo, lymphoid tissue organizer ; MADCAM-1, mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 ; TRANCE, tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine ; TNF- α , tumor necrosis factor alpha ; TRANCE, tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine receptor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.

1.3 Facteurs régulant le développement des organes lymphoïdes secondaires

1.3.1 LTi

L'un des événements principaux menant à la formation des SLO est l'agrégation des cellules LTi. Leur différenciation dépend de différents facteurs de transcriptions, comme Id2, ROR γ t, Ikaros, et Janus kinase 3 (Jak3). L'invalidation de l'un de ces gènes induit des altérations des GL et des PP sans pour autant altérer l'organisation de la rate (Yokota et al., 1999; Eberl and Littman, 2003 ; Tsuji et al., 2008). Par ailleurs, la maturation des LTi, caractérisée par l'expression de la lymphotoxine membranaire LT $\alpha_1\beta_2$ est sous le contrôle de l'Il-7 et de TRANCE. Les modèles murins n'exprimant pas ces dernières molécules présentent également des altérations de la plupart des SLO (**Tableau 2**).

Tableau 2. Récapitulatif des modèles murins K.O. ayant des altérations des SLO (adapté de Mebius, 2003).

Gènes K.O.	SLO			Références
	GL	PP	NALT	
LTα -/-, LTβR -/-, Rela x TNFR -/-	–	–	+	(Banks et al., 1995), (Weih et al., 1995), (Alcamo et al., 2002)
NFκb2 -/- Relb -/-	+	–	ND	(Yilmaz et al., 2003)
LTβ -/-	CLN, MLN	–	+	(Koni et al., 1997)
LIGHT -/- x LTβ -/-		–	ND	(Scheu et al., 2002)
TNF-α -/-	+	Réduit	+	(Pasparakis et al., 1997)
LTα +/- x LTβ +/-	+	–	ND	(Koni and Flavell, 1998)
TRANCE -/-, TRANCER, Traf6 -/-	CLN	+	+	(Naito et al., 1999), (Dougall et al., 1999)
Ikaros -/-	–	–	ND	(Wang et al., 1996), (Georgopoulos et al., 1994)
RORγt -/-	–	–	+	(Sun et al., 2000)
IL7-R , Jak3 -/-	BLN, ALN, MLN	–	+	(Park et al., 1995), (Cao et al., 2010)
Id2 -/-	–	–	–	(Fukuyama et al., 2002)
IL7-R -/-	–	–	ND	(von Freeden-Jeffry et al., 1995)
CXCR5 -/- CXCL13 -/- CXCL19 -/- , CCL21 -/-	CLN, FLN, MLN	–	ND	(Ansel et al., 2000) (Förster et al., 1996)

Abréviations : ALN, axillary lymph node ; BLN, brachial lymph node ; CLN, cervical lymph node ; FLN, facial lymph node ; Id2, helix-loop-helix protein inhibitor of DNA binding 2 ; IL7-R α , interleukin-7-receptor- α ; Jak3, Janus kinase 3 ; K.O. , knock out ; MLN, mesenteric lymph node ; NALT, nasal-associated lymphoid tissue ; TNF- α , tumor necrosis factor alpha ; TNFR, tumor necrosis factor receptor ; Traf6, TNF-receptor associated factor 6 ; TRANCE, tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine ; TRANCER, tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine receptor ; ROR γ t, retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t.

1.3.2 La famille du tumor necrosis factor

La famille du TNF présente trois acteurs principaux : le TNF- α , les lymphotoxines et la molécule LIGHT. Parmi les lymphotoxines, deux formes existent : la forme sécrétée homotrimérique, LT α_3 qui se fixe aux récepteurs du TNF- α (TNFR1 et TNFR2) ; la seconde forme, membranaire, est présente sous une forme hétérodimérique LT $\alpha_1\beta_2$. Cette dernière interagit uniquement avec le récepteur LT β R. La molécule LIGHT peut être sous forme membranaire et sécrétée, et se fixe à trois types de récepteurs, LT β R, herpes viral entry mediator (HVEM), et le Decoy receptor 3 (DcR3) (**Tableau 3**). Ces trois molécules régulent la genèse des SLO à différents niveaux, dans la maturation des HEV, la libération des chimiokines et des molécules d'adhérence (Gommerman and Browning, 2003).

Tableau 3. Expression des membres de la famille du TNF- α et de leurs récepteurs (adapté de Gommerman and Browning, 2003).

Molécules	Expression	Références
Ligands		
LTα/β (sécrétée et membranaire)	LT, LB, NK, LTi, macrophages	(Ware et al., 1995) (Gramaglia et al., 1999) (Ansel et al., 2000) (Kashii et al., 1999)
LIGHT (sécrétée et membranaire)	LT, DC immatures, granulocytes, monocytes	(Granger and Ware, 2001) (Tamada et al., 2000) (Pakala et al., 2001)
Récepteurs		
LTβR	DC et monocytes	(Browning and French, 2002) (Murphy et al., 1998)
	HEV et FDC	(Husson et al., 2000) (Hochman et al., 1995) (Muller et al., 2001)
DcR3	Tumeurs colorectales	(Bai et al., 2000)
HVEM	LT, DC immatures, macrophages	(Morel et al., 2001) (Lee et al., 2001) (Granger and Ware, 2001)
TNFR1	Expression ubiquitaire	(Aggarwal and Natarajan, 1996)
TNFR2	LT, DC, macrophages	(Faustman and Davis, 2013) (Siegmond et al., 2016)

Abréviations : DC, cellule dendritique ; DcR3, Decoy receptor 3 ; FDC, cellule dendritique folliculaire ; HEV, high endothelial venule ; HVEM, herpesvirus entry mediator ; LB, lymphocyte B ; LT α/β , lymphotoxine $\alpha\beta$; LT β R, récepteur β de la lymphotoxine ; LT, lymphocyte T ; LTi, *lymphoid tissue inducer* ; NK, cellule natural killer ; TNFR1, tumor necrosis factor receptor 1 ; TNFR2, tumor necrosis factor receptor 2.

Toutefois, la signalisation de la lymphotoxine contribue fortement, mais n'est pas indispensable à l'établissement des SLO. Des souris déficientes en lymphotoxine $LT\alpha_1\beta_2$ présentent des HEV dépourvus de l'expression de *peripheral node addressin* (PNAd), ainsi que de GlyCAM-1 et de l'enzyme HEC-6ST (également nommée N-acetylglucosamine 6-O-sulphotransferase, GlcNAc6ST2), des molécules indispensables à l'expression luminale du PNAd (Drayton et al., 2003 ; Ying et al., 2005).

1.3.3 Les chimiokines

L'agrégation des cellules LT α est possible grâce au gradient de la chimiokine CXCL13. En son absence ou bien en l'absence de son récepteur CXCR5, les GL périphériques sont absents, seuls quelques GL au niveau mésentérique et cervical persistent. Au fur et à mesure du développement ganglionnaire, d'autres chimiokines comme CCL19 et CCL21 interviennent afin d'attirer les lymphocytes au sein des futures zones fonctionnelles. L'invalidation des gènes codant pour ces chimiokines ou encore leur récepteur (CCR7) n'abolit pas le développement des GL. En revanche, la délétion combinée des trois chimiokines (CXCL13, CCL19 et CCL21) ou de leur récepteur empêche la formation de la plupart des GL, sauf ceux au niveau mésentérique (Förster et al., 1996 ; Ansel et al., 2000 ; Ohl et al., 2003 ; Luther et al., 2003). Ces observations sont liées au fait que CXCL13 est responsable du recrutement des LB, celui des LT étant assuré par CCL19 et CCL21.

1.3.4 L'implication du système nerveux

1.3.4.1 L'acide rétinoïque

Concernant les GL, il a été suggéré que la source majeure de la production de CXCL13 par les cellules mésenchymateuses est liée à la libération d'acide rétinoïque par les fibres nerveuses adjacentes aux GL (**Fig. 4**) (van de Pavert et al., 2009 ; van de Pavert and Mebius, 2010). L'acide rétinoïque est un métabolite de la vitamine A et occupe une place majeure dans la maturation du système nerveux. L'absence de la *retinaldehyde deshydrogenase 2*, enzyme impliquée dans sa formation induit de sévères perturbations du développement neuronal. L'acide rétinoïque pourrait contribuer à la migration des LB, l'expression des immunoglobulines (IgA) par les LB, mais également à l'expression de récepteurs de chimiokines. De plus, la stimulation du nerf vague induit la libération d'acide rétinoïque au niveau intestinal (van de Pavert et al., 2009).

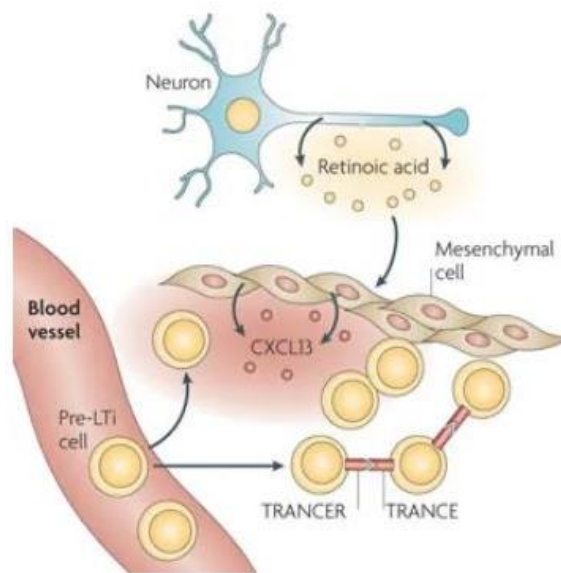


Figure 4. L'implication des fibres nerveuses dans la formation des ganglions lymphatiques (van de Pavert and Mebius, 2010).

Les fibres nerveuses seraient impliquées dans l'organogenèse des ganglions lymphatiques via la libération de l'acide rétinoïque. Ce dernier induirait alors la production de CXCL13 par les cellules mésenchymateuses, permettant le recrutement des cellules pre-LTi. Abréviations: LTi, lymphoid tissue inducer; TRANCE, tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine; TRANCER, tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine receptor.

1.3.4.2 L'innervation des SLO

Au sein des SLO, les réponses immunitaires sont altérées par les neurotransmetteurs et les neuropeptides tels que la substance P, la noradrénaline, ou encore la dopamine libérées au niveau des terminaisons nerveuses (ThyagaRajan and Priyanka, 2012). La présence des fibres sympathiques a été démontrée au sein des GL (Nance and Sanders, 2007). Récemment, ces fibres ont été décrites dans l'ensemble des zones fonctionnelles des GL. Elles sont en effet présentes aux abords des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, des HEV, des LB, des cellules dendritiques et des macrophages (Al-Shalan et al., 2019 ; Hu et al., 2019). La présence éventuelle d'une innervation parasymphatique, n'est pas documentée à ce jour.

2. Les structures lymphoïdes tertiaires

Les TLS sont des structures lymphoïdes ectopiques qui se développent dans différents organes et sont générées lors d'une inflammation persistante. Leur présence a été rapportée dans des maladies auto-immunes, lors des rejets de greffes ainsi que dans des tumeurs solides.

2.1 Caractéristiques générales des TLS

D'un point de vue histologique, les TLS présentent une très forte analogie structurale avec les SLO. Une TLS se compose de deux zones principales, une zone B au sein de laquelle on distingue la présence de LB ($CD20^+$), de macrophages ($CD68^+$) et de quelques LT ($CD3^+$) folliculaire-helper ainsi qu'un réseau de cellules folliculaires dendritiques (FDC, $CD21^+$) (**Fig. 5**), zone B qui s'apparente au follicule B d'un SLO. Adjacente à cette zone B, on observe une zone T qui est apparentée au paracortex d'un ganglion lymphatique (**Tableau 4**). Cette dernière est essentiellement composée de LT ($CD3^+$) et de cellules dendritiques (DC) matures (DC-Lamp $^+$) qui vont jouer un rôle clé dans l'activation des lymphocytes et ainsi initier le développement des réponses immunes adaptatives. Comme dans les SLO, on peut noter la présence de veinules post-capillaires (HEV) au sein ou en périphérie des TLS.

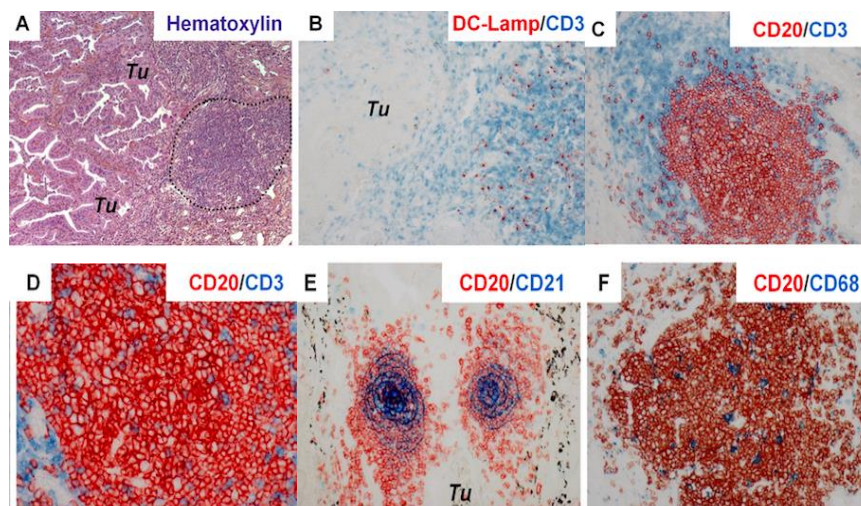


Figure 5. Composition cellulaire des TLS (Germain et al., 2014).

Images de TLS associées aux tumeurs pulmonaires humaines. A, Visualisation d'une TLS au sein du stroma tumoral. B, Zone T d'une TLS riche en LT $CD3^+$ (bleu) et DC matures DC-Lamp $^+$ (rouge). C et D, Zone B d'une TLS riche en LB $CD20^+$ (rouge) et LT $CD3^+$ (bleu). E, Réseau de FDC $CD21^+$ (bleu) dans un ganglion lymphatique composé de LB $CD20^+$ (rouge) dans deux TLS. F, Macrophages $CD68^+$ (bleu) au sein d'un follicule B $CD20^+$ (rouge). Abréviations : Tu, tumeur. Grossissements : (A, x100 ; B, C, E, x200 ; D, x400). D est un grossissement d'une zone située dans C.

Tableau 4. Comparaison des SLO avec les TLS.

		SLO	TLS
Genèse		<i>in utero</i>	<i>in utero</i>
Localisation		Ganglions lymphatiques, plaques de Peyer, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (ex. NALT, GALT, BALT, LALT, etc), rate	Tout tissu non lymphoïde
Présence		Constitutive	Inductible
Composition	LT / LB	Présence	Présence
	DC matures	Présence	Présence
	Macrophages	Présence	Présence
	NK	Présence	Absence
	HEV	Présence	Présence (exception cerveau)
	FDC	Présence	Présence
Encapsulation		Oui	Non

Abréviations : BALT, bronchus-associated lymphoid tissue ; GALT, gut-associated lymphoid tissue ; FDC, cellule folliculaire dendritique ; HEV, high endothelial venule ; LALT, larynx-associated lymphoid tissue ; LB, lymphocyte B ; LT, lymphocyte T ; NALT, nasal-associated lymphoid tissue ; NK, cellule natural killer.

2.2 TLS et inflammation

2.2.1 Les maladies auto-immunes

Les TLS ont été observées dans de nombreuses maladies auto-immunes, notamment dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), le lupus érythémateux disséminé ou le syndrome de Sjögren (Aloisi and Pujol-Borrell, 2006). La valeur pronostique des TLS au sein de ces pathologies est généralement péjorative et ces structures sont souvent associées à l'aggravation de la maladie. Les TLS ont aussi été détectées au sein des méninges de patients atteints d'une sclérose en plaques. Cependant, le cerveau est dépourvu de HEV, suggérant que les cellules immunitaires circulantes seraient recrutées du fait de l'altération de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique par l'inflammation locale et/ou via les vaisseaux lymphatiques drainant le cerveau (Louveau et al., 2015). Là encore, la présence des TLS est corrélée à une aggravation des lésions et des symptômes chez les patients (Serafini et al., 2004 ; Magliozzi et al., 2007 ; Kooi et al., 2009).

Il faut souligner que dans la polyarthrite rhumatoïde, les LB du centre germinatif des TLS expriment l'*activation-induced cytidine deaminase* (AID), une enzyme indispensable aux

mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique. La présence de LB sécrétant des anticorps dirigés contre des dérivés de la citrulline (marqueur spécifique de la PR) a été détectée dans les lésions inflammatoires (Humby et al., 2009). La production locale d'auto-anticorps a également été retrouvée dans d'autres maladies auto-immunes telles que le syndrome de Sjögren (Salomonsson et al., 2003), la myasthénie gravis (Sims et al., 2001) et la thyroïdite d'Hashimoto (Armengol et al., 2001).

En conclusion, les TLS sont immunologiquement fonctionnelles et leur présence semble participer activement à la progression de la maladie dans un contexte auto-immun.

2.2.2 Le rejet de greffe

Dans le cadre de la transplantation d'organes, que ce soit dans des modèles murins ou bien chez les patients, les TLS ont été observées et sont également corrélées à un mauvais pronostic. Plus la néogénèse de TLS est avancée et plus sévère est le rejet du greffon (Thaumat et al., 2010). Il a été de plus montré que leur présence au sein des greffes rénales ou cardiaques est associée au rejet du greffon, principalement via l'activation locale des LT cytotoxiques (Deteix et al., 2010).

2.2.3 Infections virales et bactériennes

Une étude ancienne portant sur les causes infectieuses de décès de fœtus et de nourrissons (Gould and Isaacson, 1993) a montré la co-existence entre infection et TLS (alors appelées *bronchus-associated lymphoid tissue*, BALT). Dans ce contexte infectieux, les TLS ont été observées dès la 16^e semaine de grossesse, démontrant formellement que des TLS peuvent se développer avant la naissance.

2.2.3.1 Infections pulmonaires

L'induction de TLS dans les situations infectieuses a ensuite été confirmée dans des modèles animaux après administration de bactéries ou de virus. En effet, l'instillation de bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* (Maglione et al., 2007 ; Khader et al., 2009) ou de virus comme les virus influenza et *modified vaccinia virus Ankara* (Moyron-Quiroz et al., 2004 ; Halle et al., 2009) par voie nasale ou intra-trachéale induit le développement de TLS [nommées initialement *induced bronchus-associated lymphoid tissues* (iBALT)] à proximité des bronches et des vaisseaux dans le parenchyme pulmonaire.

Le développement de ces structures s'explique par l'activation locale des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages alvéolaires et les DC suite à la reconnaissance d'agents infectieux via les PRR. Parmi ces PRR, on dénombre les *toll-like receptor* (TLR). Ainsi la reconnaissance de divers agents pathogènes ou encore d'extraits bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) présent sur les bactéries Gram négatives induit l'activation du *toll-like receptor 4* (TLR4) et mène à la formation de TLS (Rangel-Moreno et al., 2011). En effet, une signature de chimiokines (CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13) associée aux TLS a été identifiée chez l'homme comme chez la souris (Frija-Masson et al., 2017) conduisant au recrutement sélectif de cellules immunitaires. Ainsi, les LT et les LB recrutés dans les TLS vont s'activer et proliférer s'ils sont spécifiques des antigènes (ou peptides) présentés localement. En particulier, la zone B des TLS est le siège d'une différenciation des LB marquée par une commutation de classe d'Ig (Foo and Phipps, 2010) et la sécrétion d'anticorps spécifiques de l'agent infectieux (Geurts van Kessel et al., 2009). Une fois l'infection contrôlée, les TLS régressent jusqu'à disparition complète.

2.2.3.2 Infections au sein de divers organes

Les TLS ont également été détectées dans des cas d'infection chronique chez l'homme, et leur présence est alors souvent délétère pour les patients. Ainsi, lors d'une infection par *Helicobacter pylori* au niveau de la muqueuse gastrique, les LB intra-muqueux organisés en TLS peuvent subir une transformation conduisant à des lymphomes (Mazzucchelli et al., 1999). Dans le cas de l'hépatite C, l'activation prolongée des LB au sein de TLS peut-être associée à une auto-immunité systémique chez certains patients (Minutello et al., 1993).

L'ensemble de ces données montre que les TLS peuvent se développer localement au site d'entrée d'un pathogène, permettant l'élaboration d'une immunité adaptative locale. Toutefois, lorsque l'infection devient chronique, les TLS pourraient entretenir une activation inappropriée des LB et des LT, pouvant conduire à une inflammation exacerbée et délétère pour le tissu environnant et au développement d'une réponse auto-immune.

2.3 TLS et tumeurs

2.3.1 Le microenvironnement tumoral

Une tumeur est un microenvironnement complexe composé de cellules tumorales, d'une matrice extracellulaire, de fibroblastes, de cellules endothéliales sanguines et lymphatiques, ainsi que de cellules immunitaires. De façon générale, une forte hétérogénéité est observable en fonction du type de tumeur, des patients ainsi que du stade de la pathologie.

L'analyse des populations immunitaires ainsi que leur localisation au sein de la tumeur est appelée « le contexte immunitaire » (Fridman et al., 2012). Là encore, une hétérogénéité de l'infiltrat immunitaire est décrite avec des tumeurs dites « chaudes », fortement infiltrées en cellules immunitaires, en opposition aux tumeurs « froides », qui sont des déserts immunitaires. De façon générale, tous les types de cellules immunitaires peuvent infiltrer les divers compartiments de la tumeur. Comme illustré dans la **Figure 6**, les macrophages, les granulocytes, les mastocytes et les cellules myéloïdes suppressives (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) sont majoritairement localisés au centre de la tumeur mais peuvent être retrouvées de façon minoritaire au sein du front d'invasion. Des LB peuvent être détectés au niveau du front d'invasion mais également au sein des TLS. Les LT, CD4⁺ et CD8⁺, sont majoritairement localisés au niveau du front d'invasion et au sein des TLS (Galon et al., 2006).

Les DC immatures (cellules de Langerhans, interstitielles et plasmacytoïdes (pDC)) s'accumulent au cœur de la tumeur en contact très étroit avec les cellules tumorales (Sautès-Fridman et al., 2011). Les DC matures sont quant à elles uniquement localisées au sein des TLS. Ces dernières, localisées dans le front d'invasion de la tumeur sont composées de LT naïfs et mémoires, de LB et de cellules dendritiques matures (Dieu-Nosjean et al., 2008).

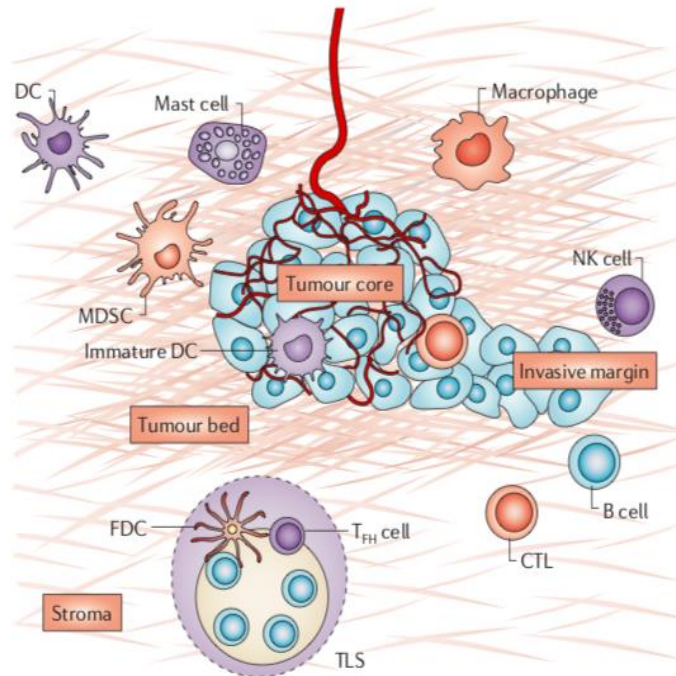


Figure 6. Le microenvironnement tumoral (Fridman et al., 2012).

Différentes populations immunitaires peuvent être identifiées dans les tumeurs. Des infiltrats de macrophages, granulocytes, mastocytes, cellules myéloïdes suppressives, cellules Natural Killer, DC et lymphocytes sont de densités et de localisation hétérogènes dans la tumeur. Les TLS, qui renferment des LB, des LT et des DC matures sont quant à elles localisées dans le stroma et principalement dans le front d'invasion. Abréviations : CTL, lymphocyte T cytotoxique ; DC, cellule dendritique ; FDC, cellules dendritique folliculaire ; MDSC, myeloid-derived-suppressor cell ; NK, cellule natural killer ; T_{fh}, lymphocyte T folliculaire helper ; TLS, structure lymphoïde tertiaire.

La localisation des cellules immunitaires n'est pas anodine et dépend des chimiokines et des cytokines exprimées au sein de la tumeur. Comme illustré **Figure 7**, les cellules tumorales sont capables via la sécrétion de CCL21 et de CCL19 d'attirer les LT exprimant à leur surface le récepteur CCR7. Les LB sont quant à eux recrutés via la chimiokine CXCL13. Les cellules endothéliales occupent un rôle actif dans le recrutement des macrophages, des LT mémoires ainsi que des lymphocytes cytoxiques via la sécrétion respective des chimiokines CCL5, CXCL9/CXCL10 et enfin CX3CL1. Les LT régulateurs (LTreg) peuvent eux être recrutés via les chimiokines CCL17 et CCL22 (Fridman et al., 2013).

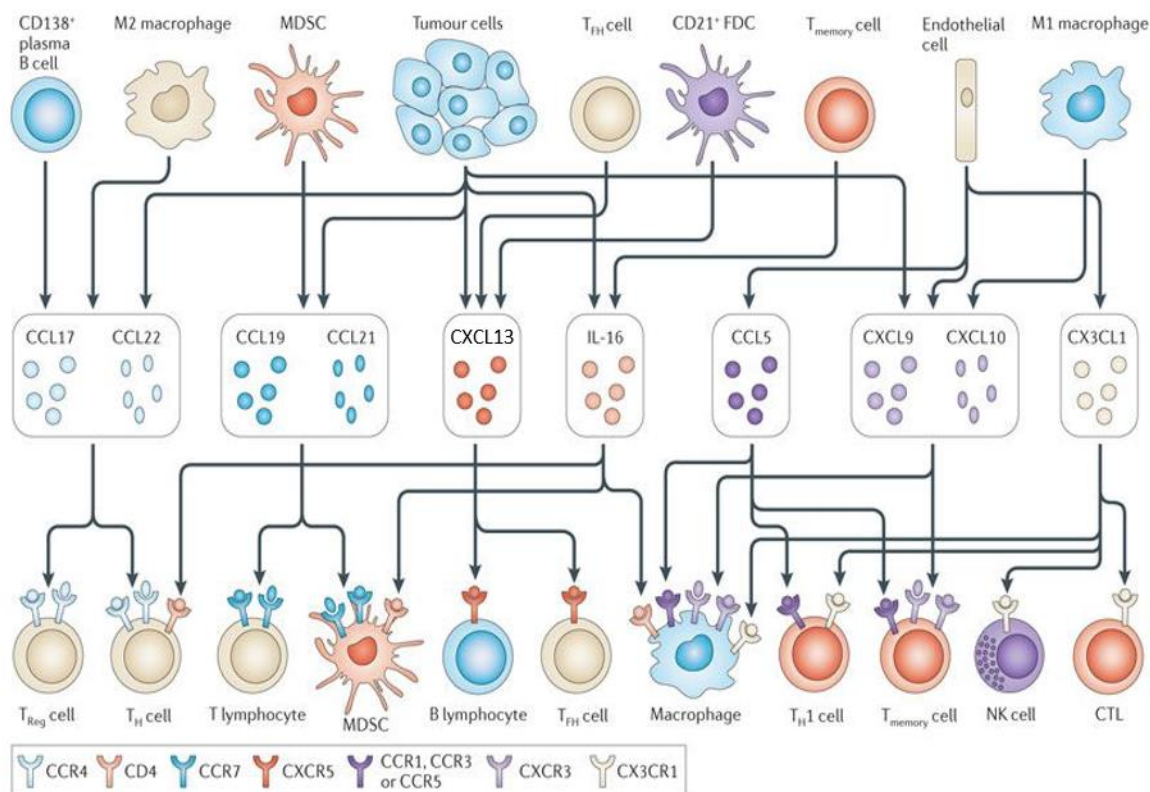


Figure 7. Le recrutement des cellules immunitaires sous le contrôle des chimiokines et des cytokines (Fridman et al., 2013).

Le recrutement des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral fait intervenir des chimiokines et des cytokines produites par les cellules tumorales, les cellules immunitaires infiltrant la tumeur ainsi que par les cellules endothéliales. A titre d'exemple, les cellules tumorales peuvent libérer les chimiokines CCL21 et de CCL19 permettant le recrutement des LT exprimant à leur surface le récepteur CCR7. Les LB sont quant à eux recrutés *via* la chimiokine CXCL13 grâce à l'expression du récepteur CXCR5. Abréviations : CTL, lymphocyte T cytotoxique ; FDC, cellule folliculaire dendritique ; MDSC, myeloid-derived-suppressor cell ; NK, cellule natural killer ; T_{TH}, T folliculaire helper, T_H, T helper ; T_{reg}, T régulateur.

Au sein de cet environnement, mon équipe a été la première à décrire la présence de TLS appelés initialement *tumor-induced bronchus associated lymphoid tissues* (Ti-BALT) (**Fig. 8**) au sein des tumeurs pulmonaires *non-small-cell lung cancer* (NSCLC) (Dieu-Nosjean et al., 2008). En se fondant sur l'expression du marqueur de DC matures uniquement observé au sein de la zone T des TLS (DC-Lamp), les tumeurs ont été ségréguées en deux groupes en fonction de la densité en DC matures [forte (DC-Lamp^{high}) vs faible (DC-Lamp^{low})]. Une forte densité de DC matures corrèle avec une infiltration accrue de LT CD8⁺. De plus, la présence de ces DC corrèle également avec la surexpression de gènes impliqués dans la polarisation Th1, l'activation et la cytotoxicité des LT (Goc et al., 2014b).

Ainsi, les fortes densités de DC matures favorisent l'infiltration des LT CD8⁺ et la mise en place de réponses immunitaires anti-tumorales. Les patients DC-Lamp^{high} ont une survie plus longue que les patients DC-Lamp^{low}, quel que soit le stade de la maladie (stades précoces, avancés et métastatiques) (Dieu-Nosjean et al., 2008 ; Goc et al., 2014a).

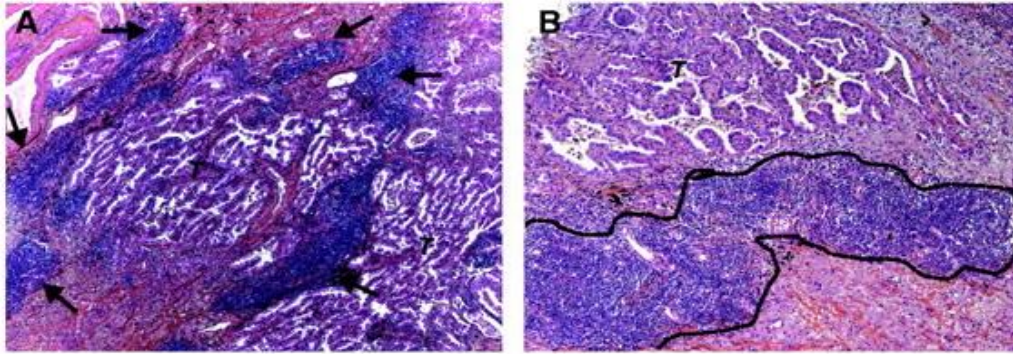


Figure 8. Présence de TLS au sein des tumeurs pulmonaires de type NSCLC (Dieu-Nosjean et al., 2008).

Les contre-colorations hématoxyline éosine indiquent la présence de TLS (indiquées par les flèches) à proximité des cellules tumorales, essentiellement au niveau du front d'invasion de la tumeur (T).

D'autres laboratoires se sont également intéressés à l'impact des TLS sur la survie de patients présentant différents types de tumeurs solides et métastatiques (**Tableau 5**). Différentes approches de quantification ont été réalisées, soit par immunohistochimie ou bien à partir de signatures transcriptomiques. Concernant les marqueurs d'immunohistochimie, les diverses populations cellulaires présentes dans les TLS ont été ciblées. Les marqueurs CD3, CD4 ou encore CD8 sont utilisés pour définir les LT. Les marqueurs CD20 et CD19 sont très largement utilisés pour définir les LB (Hennequin et al., 2016). Les DC activées peuvent également être détectées grâce à l'expression des molécules CD83 et CD86 (McMullen et al., 2010). Concernant les HEV, le ciblage de l'adressine périphérique PNA_D reste le principal marqueur utilisé. Les FDC présentes au sein du CG des TLS sont détectées en utilisant les marqueurs CD21 et CD23. Concernant les signatures transcriptomiques, elles sont essentiellement fondées sur les chimiokines lymphoïdes ou bien les transcrits spécifiques des LB et LT (Coppola et al., 2011).

Quelle que soit la technique de quantification utilisée, la présence de TLS est associée à un bon pronostic dans la grande majorité des tumeurs (**Tableau 5**). C'est le cas dans le mélanome, le cancer du côlon, le cancer du sein, les cancers de la cavité orale, et les tumeurs gastriques. Une

exception réside dans un sous-type du cancer du foie (patients HCV⁺ non alcoolo-dépendants) où les TLS sont de mauvais pronostic. En effet, ils serviraient alors de niche pour les progéniteurs de cellules tumorales hépatiques (Finkin et al., 2015). Toutefois, la valeur pronostique des TLS reste controversée lorsque l'ensemble des carcinomes hépatocellulaires est analysé. Une récente étude a démontré en effet que la présence de TLS serait associée à un faible risque de rechute après exérèse. Cela suggère que la présence de TLS intra-tumoraux favoriserait l'établissement d'une réponse anti-tumorale *in situ* (Calderaro et al., 2019).

Tableau 5. Valeur pronostique des TLS au sein des tumeurs primaires et métastatiques (adapté de Sautès-Fridman et al., 2016).

Tumeurs	Type de cancer	Stades	TLS (IHC)	TLS (gènes)	Valeur pronostique	Références
Primaire	Cancer du sein	I-III	PNAd	–	+	(Martinet et al., 2011)
		I-III	DC-Lamp	–	+	(Martinet et al., 2013)
		I-III	–	LTfh, Th1 CXCL13	+	(Gu-Trantien et al., 2013)
	HER-2 ⁺	I-III	HE + TILs	-	+	(Liu et al., 2017)
	Cancer colorectal	I-IV	HE	–	+	(Väyrynen et al., 2014)
		ND	DC-Lamp	–	+	(Remark et al., 2013)
		I-IV	CD3, CD83	–	+	(McMullen et al., 2010)
		II	CD3	–	+	(Caro et al., 2014)
		III	CD3	–	+	(Caro et al., 2014)
		0-IV	–	12 chimiokines	+	(Coppola et al., 2011)
		I-IV	–	CXCL13 & CD20	+	(Bindea et al., 2013)
	Cancer gastrique	Tous	CD20	–	+	(Hennequin et al., 2016)
		I-III	–	Th1 et CD20	+	(Hennequin et al., 2016)
		I-IV	LB, LT, FDC, HEV	-	+	(Sakimura et al., 2017)
	NSCLC	I-II	DC-Lamp	–	+	(Dieu-Nosjean et al., 2008)

		I-IV	DC-Lamp	–	+	(Goc et al., 2014b)
		III avec neo-adj- chemo	DC-Lamp, CD20	–	+	(Germain et al., 2014)
	Oral SCC	Tous	–	CD3, CD20, CD21, BCL6, PNAd	+	(Wirsing et al., 2014)
	Mélanome	I-III	DC-Lamp	–	+	(Ladányi et al., 2007)
		IV	–	12 chimiokines	+	(Messina et al., 2012)
		II-IV	CD8, CD20	–	+	(Cabrita et al., 2020) (Helmink et al., 2020)
	Cancer du pancréas	Tous	HE	–	+	(Hiraoka et al., 2015)
	Cancer du rein	Tous	DC-Lamp	–	+	(Giraldo et al., 2015)
	Cancer du foie	Tous (HCV)	HE	12 chimiokines	–	(Finkin et al., 2015)
Tous (HCC)		HE	12 chimiokines	+	(Calderaro et al., 2019)	
	Sarcome	I-III	CD20, CD3, DC-Lamp	MCP counter	+	(Petitprez et al., 2020)
Secondaire	CRC (poumon)	ND	DC-Lamp	–	+	(Remark et al., 2013)
	CRC (foie)	Tous	CD20	–	+	(Meshcheryakova et al., 2014)

Abréviations : CRC, cancer colorectal ; HE, hématoxyline éosine ; HCC, hepatocellular carcinoma ; HCV virus de l'hépatite C ; HER-2, Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 ; LTfh, lymphocyte T folliculaire helper ; NSCLC, non-small-cell lung cancer ; PNAd, peripheral node addressin ; SCC, squamous cell carcinoma.

Par ailleurs, la présence de différents stades de maturation de TLS chez les patients atteints de tumeurs pulmonaires de type épidermoïdes a été décrite (Siliņa et al., 2018). Trois stades ont été décrits :

- Stade de TLS précoce (*early-follicle-like*, EFL) (**Fig. 9**) composé d'agrégats de LT et LB dépourvus de centres germinatifs (CD21⁺) et de FDC (CD23⁺).
- Stade de maturation, *primary-follicle-like* (PFL), composé d'un CG dépourvu de FDC.
- Stade dit de *secondary-follicle-like* (SFL) où les TLS contiennent à la fois des LB, LT, des CG et des FDC.

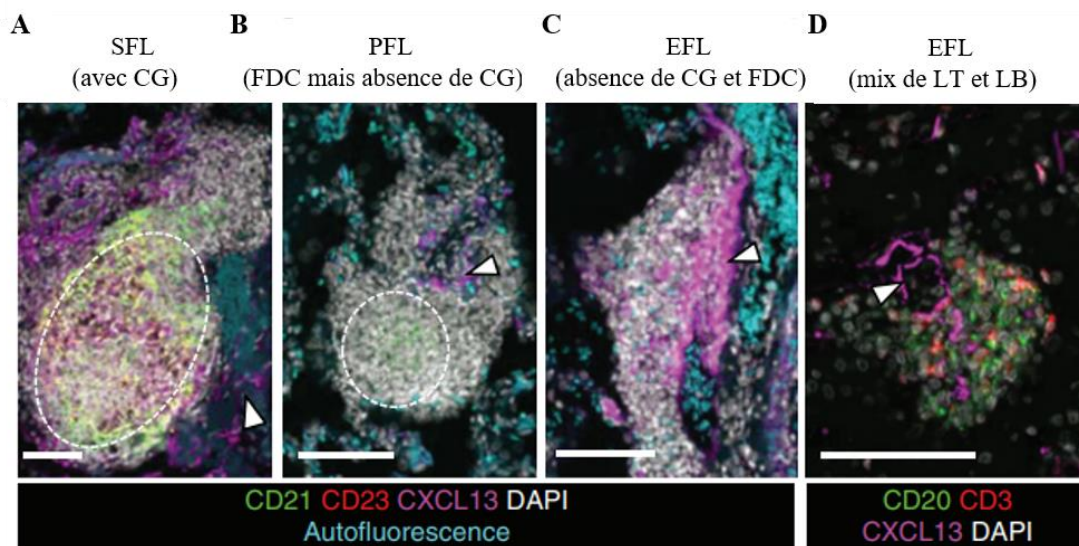


Figure 9. Différents stades de maturation des TLS dans les carcinomes épidermoïdes pulmonaires (Siliņa et al., 2018).

Marquages par immunofluorescence des différents stades de maturation des TLS réalisés sur des coupes sériées de patients présentant des tumeurs épidermoïdes pulmonaires. (A) Le stade le plus mature, appelé « secondary-follicle-like (SFL) » est caractérisé par la présence d'un centre germinatif (cercle blanc, cellules B CD23⁺) et de cellule folliculaire dendritique (ou follicular dendritic cells, FDC) (CD21⁺). (B) Le second stade de maturation intermédiaire, appelé « primary-follicle-like (PFL) » est caractérisé par la présence de FDC (cercle blanc) et l'absence de centres germinatifs. (C-D) Le stade le moins mature, ou « early-follicle-like (EFL) », est caractérisé par la présence de LT (CD3⁺) et LB (CD20⁺). Les différentes flèches blanches représentent la chimiokine CXCL13 associée aux vaisseaux sanguins. Barres d'échelle, 100 μm. Abréviations : CG, centre germinatif ; EFL, early-follicle-like ; FDC, cellules folliculaires dendritiques ; PFL, primary-follicle-like ; SFL, secondary-follicle-like.

Dans cette étude, l'ensemble des stades était présent dans des proportions similaires ; cependant, seule la présence de SFL-TLS impactait positivement la survie des patients.

En ce qui concerne les cancers oraux, deux types de TLS ont également été décrits, les TLS classiques et les TLS non-classiques (Wirsing et al., 2014). Dans cette étude, les TLS classiques présentaient un CG et un maillage de FDC ; à l'opposé, les TLS non-classiques, présentaient des FDC diffuses, ainsi qu'un CG absent et/ou diffus.

Concernant l'impact de ces divers TLS sur la survie, les patients ayant des TLS classiques, ou bien les deux types de TLS, présentaient une meilleure survie en comparaison avec les patients ayant des TLS non-classiques. Dans les hépatocarcinomes, différents stades de maturation des TLS ont également été identifiés (agrégats lymphoïdes, follicules primaires et secondaires). La présence de follicules primaires et secondaires a été associée de plus à un faible risque de récurrence (Calderaro et al., 2019).

Toutefois ces études présentent des limites. La première d'entre elles est liée à l'organisation dynamique des TLS au cours du temps. En effet les TLS considérées comme immatures au moment de l'analyse peuvent être considérées en fait comme des TLS en cours de maturation. La seconde limitation est liée à l'effet coupe lors des analyses. En effet, en fonction du niveau de coupe, un TLS mature peut apparaître comme un TLS immature et vice versa.

2.3.2 Réponses adaptatives anti-tumorales et TLS

2.3.2.1 Cellules dendritiques et lymphocytes T

Différentes populations de DC sont trouvées au sein des tumeurs. D'une part, les DC immatures sont présentes dans des territoires distincts : les cellules de Langerhans immatures sont trouvées majoritairement dans les massifs tumoraux, tandis que pDC et les DC interstitielles immatures sont présentes exclusivement dans le stroma, comme cela a été montré dans les tumeurs NSCLC (Sautès-Fridman et al., 2011). D'autre part, les DC matures, exprimant DC-Lamp, sont uniquement localisées au sein de la zone T des TLS (Dieu-Nosjean et al., 2008), à l'exception des tumeurs *clear cell Renal Cell Carcinoma* (ccRCC) où sont retrouvées des cellules dendritiques DC-Lamp⁺ en dehors des TLS (Giraldo et al., 2015). L'expression spécifique de ce marqueur au sein de la zone T en fait un marqueur clef des TLS. Ces cellules DC-Lamp⁺ ont un impact considérable sur le micro-environnement immunitaire. Ainsi, dans les tumeurs NSCLC, la densité de cellules DC-Lamp⁺ façonne l'infiltrat immunitaire. Les tumeurs DC-Lamp^{high} ont une forte densité de LT CD8⁺,

ce qui a été associé à un meilleur pronostic chez les patients NSCLC et les patientes présentant des tumeurs de l'ovaire, comparativement aux tumeurs DC-Lamp^{low} (Goc et al., 2014b) (Truxova et al., 2018). De plus, il faut souligner qu'un infiltrat de LT CD8⁺ important, mais associé à une faible densité de DC DC-Lamp⁺ (DC-Lamp^{low} CD8^{high}), a été corrélé avec un mauvais pronostic (Goc et al., 2014b ; Truxova et al., 2018). L'analyse détaillée du compartiment LT CD8⁺ a démontré la présence de LT CD8⁺ activés (CD38⁺ CD69⁺) et effecteurs mémoires (CD45RA⁻ CCR7⁻ CD27^{+/-} CD28^{+/-}), accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la cytotoxicité. Ces données suggèrent qu'une réponse tumorale adaptative se développe *in situ*. De plus, au sein de la zone T, des LTfh ont également été identifiés. De plus, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la polarisation Th1 a été observée (Remark et al., 2013 ; Gu-Trantien et al., 2013 ; Goc et al., 2014b ; Hiraoka et al., 2015 ; Hennequin et al., 2016 ; Truxova et al., 2018). Cette sous-population de LT joue un rôle clef dans la différenciation des LT CD8⁺ ainsi que dans la maturation des LB en LB mémoires et en plasmocytes. Dans le cancer du sein, les LTfh permettent un recrutement massif des LT et LB via la sécrétion de CXCL13 (Gu-Trantien et al., 2013). L'ensemble de ces données sont en faveur de l'établissement d'une réponse anti-tumorale adaptative au sein des TLS. Toutefois, une autre sous-population de LT immuno-suppressive est retrouvée au sein des TLS, les LTreg. Dans le cancer du sein, les LTreg (CD4⁺ FOXP3⁺ CD25^{high} CD127^{low}) présents dans les TLS sont activés au contact de DC matures, présentent un répertoire restreint et sont associés à un mauvais pronostic (Gobert et al., 2009). Le phénotype d'activation de ces LTreg suggère qu'ils ont été activés par les antigènes tumoraux présentés par les DC. Faisant écho à ces observations, la déplétion des LTreg dans un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire induit un accroissement du nombre de TLS et une augmentation de l'activation des DC se traduisant par l'expression accrue des molécules de co-stimulation (CD80, CD86), favorisant ainsi l'expansion des LT menant à l'élimination des cellules tumorales (Joshi et al., 2015).

2.3.2.2 Lymphocytes B

Le rôle des LB infiltrant les tumeurs demeure controversé. Bien que leur présence soit associée à un bon pronostic, les LB peuvent être à la fois pro- et anti-tumoraux.

Au sein des TLS, en plus des DC matures, les LB occupent le rôle de CPA. Les LB capturent efficacement les antigènes tumoraux grâce à leur BCR, les appréhendent puis les chargent sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les peptides sont ensuite présentés aux TCR des LT, ce qui favorise le développement des réponses anti-tumorales.

Des LB, dont un pourcentage significatif était organisé sous forme de TLS, ont été retrouvés dans le stroma à proximité des massifs tumoraux dans le mélanome et leur nombre a été associé à une meilleure survie des patients (Ladányi et al., 2011). Les LB sont également capables de moduler la différenciation des LT en produisant divers types de cytokines immunomodulatrices. Les LB favorisent la différenciation des LT en lymphocytes Th1 (via l'IL-12 et l'IFN- γ) et Th2 (via l'IL-4 et l'IL-13) ce qui est en faveur de la mise en place d'une réponse anti-tumorale (Shen and Fillatreau, 2015). Cependant, dans d'autres cas, les LB acquièrent un phénotype de B régulateurs et favorisent la progression tumorale via l'expansion des LTreg, suite à leur production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou encore le TGF- β (Inoue et al., 2006 ; Olkhanud et al., 2011).

Dans les tumeurs NSCLC, mon équipe a démontré que différents stades de maturation des LB étaient présents au sein des TLS. Comme le montre la **Figure 10**, des LB proliférants (Ki67⁺), des LB naïfs, ainsi que des plasmocytes (CD138⁺) ont été détectés (Germain et al., 2014). Ces données mettent en évidence le fait que les LB présents dans les TLS peuvent se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

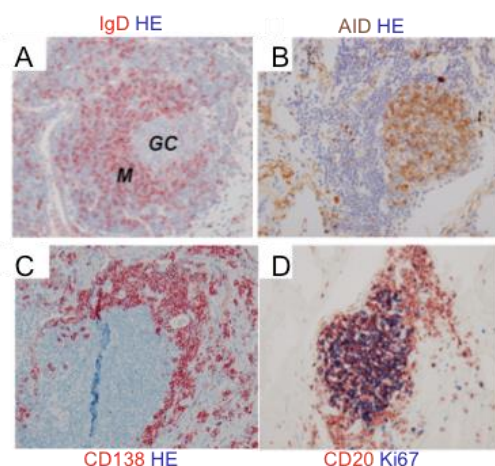


Figure 10 . Les différentes sous-populations de LB au sein des TLS (Germain et al., 2014).

Caractérisation des sous-populations de LB par immunohistochimie dans les TLS de patients NSCLC. (A) Visualisation de LB naïfs IgD⁺ (rouge) entourant un centre germinatif. (B) Expression par les LB du centre germinatif de l'enzyme AID (marron). (C) Détection de plasmocytes et plasmablastes CD138⁺ (rouge) à la périphérie des TLS et dans le stroma tumoral. (D) Présence de LB (CD20, rouge) proliférants (ki67, bleu). Grossissement $\times 200$. Abréviations : M, manteau ; GC, germinal center.

La même étude a montré de plus qu'une forte densité de LB folliculaires était corrélée positivement avec une survie à long terme des patients traités par chimiothérapie, quel que soit le stade de la maladie (précoce et avancé). La combinaison de l'évaluation de la densité de LB et de DC mature a permis l'identification d'un groupe de patients ayant la survie la plus longue (Germain et al., 2014).

Dans le mélanome, l'analyse des gènes codant les immunoglobulines à partir de microdissections des zones B des TLS a mis en évidence la présence de transcrits d'IgG et IgA (Cipponi et al., 2012). Des résultats similaires ont également été observés dans le cancer du sein (Garaud et al., 2018). Toutefois, la classe des immunoglobulines secrétées dans les tumeurs pourrait signifier une activité anti- ou pro-tumorale : dans le cancer de la prostate, une forte présence d'IgA est associée à une faible densité de LT CD8⁺ et à une progression tumorale (Shalapour et al., 2015). Dans le cancer du sein, les IgA n'ont pas d'impact sur la survie mais ont été corrélés à la présence des TLS (Garaud et al., 2018). Dans cette même étude, les IgG ont été associées à une diminution de l'infiltrat de LT CD8⁺ ainsi qu'à une diminution de la survie.

Une autre étude menée dans le cancer de l'ovaire a démontré la présence de plasmocytes et d'IgG associés à une forte infiltration de LT CD8⁺ et CD4⁺, ainsi qu'à une surexpression de gènes impliqués dans la cytotoxicité (Kroeger et al., 2016). Ces disparités entre sous-classes d'immunoglobulines peuvent en partie être expliquées par des aptitudes différentes dans le mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire anticorps-dépendante (ADCC).

Très récemment, il a été montré que la présence de LB et de LT CD8⁺ infiltrant des tumeurs métastatiques de mélanome, organisés sous forme de TLS, était associée à une amélioration de la survie (Cabrita et al., 2020). Dans les sarcomes, la présence de LB au sein des TLS est également associée à une bonne valeur pronostique ainsi qu'à une réponse favorable à l'immunothérapie anti-*immune check point* (ICP) (Petitprez et al., 2020). Des observations similaires ont été rapportées en ce qui concerne des mélanomes métastatiques et des tumeurs rénales (renal cell carcinoma, RCC) (Helmink et al., 2020). Dans ces dernières maladies, les sujets répondeurs aux immunothérapies anti-ICP présentent une signature génétique de TLS. De plus, une expansion clonale et la présence de LB mémoires ont également été observées (Helmink et al., 2020). Ces observations consolident la cible thérapeutique que peuvent représenter les diverses composantes des TLS dans le développement de réponses anti-tumorales.

2.4 La genèse des TLS

2.4.1 Les cellules impliquées

Outre leurs similarités anatomiques, les TLS et les SLO partagent de nombreuses caractéristiques de leur organogenèse. En effet, de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires nécessaires à la mise en place des SLO le sont également pour les TLS. Comme nous l'avons décrit ci-dessus, la première étape de la genèse des SLO est l'interaction entre les LT_i et les cellules stromales. L'importance des LT_i reste cependant très controversée au sein de la communauté scientifique en ce qui concerne la genèse des TLS : des travaux utilisant des modèles murins K.O. [(ROR γ t^{-/-}), (Id2^{-/-})], dépourvus de LT_i, ont montré que les animaux présentaient des TLS suite à une infection virale (Rangel-Moreno et al., 2011) remettant en cause le rôle des LT_i dans le développement des TLS. À contrario, d'autres modèles murins caractérisés par une déficience en LT_i (ROR γ t^{-/-}) ont montré que les animaux ne développaient aucun SLO ni TLS (Meier et al., 2007). Notons de plus que la surexpression d'IL-7 est marquée par un nombre plus élevé de LT_i et par un développement accru de GL, de PP ainsi que de TLS au niveau du pancréas et des glandes salivaires (Meier et al., 2007).

Les LT_i appartiennent à l'un des sous-groupes des *innate lymphoid cells type 3* (ILC3). Au sein de ce groupe, des ILC3 exprimant le *natural cytotoxicity receptor* (NCR) ont été retrouvées au sein des TLS des tumeurs NSCLC (Carrega et al., 2015). Les NCR⁺-ILC3 sont activées via une voie dépendante de la signalisation NKp44 après détection d'antigènes tumoraux. Les ILC3 produisent alors des interleukines (dont l'IL-2, l'IL-8, l'IL-22) et du TNF- α permettant l'activation de cellules endothéliales, notamment en augmentant l'expression de molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1) favorisant le recrutement de lymphocytes conduisant à la mise en place des TLS. Dans cette étude (Carrega et al., 2015), une présence importante de NCR⁺-ILC3 a de plus été associée à une survie prolongée des patients. Les ILC3 expriment la neuropiline de type 1 (Shikhagaie et al., 2017) tout comme les neurones, les cellules de l'endothélium vasculaire (Fantin et al., 2013) et d'autres cellules immunitaires (LTreg, LT CD4⁺, pDC) (Roy et al., 2017). *In vitro*, cette sous-population partage différentes caractéristiques avec les LT_i, telles que l'expression de molécules d'adhérence (VCAM-1/ICAM-1) et a été retrouvée dans les poumons de fumeurs ainsi que de patients atteints de broncho-pneumopathie obstructive chronique (BCPO), suggérant un rôle au sein de l'angiogenèse et/ou l'initiation de la mise en place des TLS observés chez ces patients.

D'autres sous-types cellulaires peuvent se substituer aux LTi. Dans un modèle de rejet de greffe chez le rat, les macrophages de type M1 semblent jouer ce rôle en exprimant fortement la $LT\alpha_3$ ainsi que le $TNF-\alpha$ au niveau des artères (Guedj et al., 2014). Les monocytes peuvent également jouer le rôle de LTi. En effet, il a été montré que, dans un modèle murin d'athérosclérose, l'interaction entre les monocytes et les cellules musculaires lisses médiales de l'aorte abdominale via l'expression du récepteur de la lymphotoxine $LT\beta R$, induit la libération de chimiokines (CXCL13, CCL21, CXCL16) permettant la mise en place de TLS (Gräbner et al., 2009).

Deux autres populations cellulaires peuvent également remplacer les LTi : c'est le cas des cellules Th17. Ces dernières partagent avec les LTi, le facteur de transcription $ROR\gamma t$ ainsi que l'expression membranaire de la lymphotoxine ($LT\alpha_1/\beta_2$). Un modèle d'infection pulmonaire (Rangel-Moreno et al., 2011) et un modèle d'encéphalomyélite expérimentale (Peters et al., 2011), ont montré que la mise en place des TLS chez la souris était dépendante de l'IL-17. Enfin, l'une des autres sous-populations pouvant induire des TLS semblent être les LB. Un modèle murin de colite infectieuse, où le gène codant $ROR\gamma t$ est invalidé (dépourvus de LTi et de Th17), a montré que la mise en place des TLS était sous le contrôle des LB, de façon dépendante de la lymphotoxine $LT\alpha_1/\beta_2$ (Lochner et al., 2011).

Le rôle des cellules stromales dans la genèse des TLS a été également étudié. Zhu et al. ont montré que des injections par voie sous-cutanée de cellules stromales dérivant des GL induisent des TLS et permettent le développement de réponses anti-tumorales, dans un modèle de xénogreffe de cellules tumorales du colon (MC-38) (Zhu et al., 2018).

2.4.2 Les molécules impliquées

Chez l'homme, diverses signatures de chimiokines impliquées dans la genèse des SLO comme celle des TLS ont été décrites. Dans le cancer colorectal, des études transcriptomiques ont identifié 12 chimiokines associées au développement de TLS et à bon pronostic sur la survie des patients, de façon indépendante du stade de la maladie (Coppola et al., 2011). Parmi ces chimiokines, une partie est impliquée dans le recrutement des LT et LB (CCL19, CCL21 et CXCL13), l'autre étant majoritairement impliquée dans le recrutement des monocytes et des DC (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8 et CCL19). Dans les tumeurs NSCLC, des microdissections de TLS ont permis d'identifier la présence de chimiokines lymphoïdes telles que CXCL13, CCL17, CCL22, ainsi qu'une interleukine, l'IL-16 (de Chaisemartin et al., 2011). Les souris dont le gène codant CXCL13

a été invalidé, sont cependant capables de développer des TLS suite à une infection virale. Toutefois, la zone B des TLS est alors fortement réduite. De façon similaire, les souris dont les gènes codant les chimiokines CCL19 et CCL21 ont été invalidés, développent aussi des TLS, mais avec une zone T fortement réduite. Ces trois chimiokines semblent donc indispensables pour le recrutement et la fonctionnalité des LB et LT au sein des TLS (Rangel-Moreno et al., 2007). Une autre étude suggère que le premier élément impliqué dans la genèse des TLS serait l'IL-17. Cette dernière serait produite par les LT CD4⁺ et induirait la production de CXCL13 et CCL19 qui induiraient alors le recrutement des LT et LB de façon indépendante des LT_i (Rangel-Moreno et al., 2011).

Tout comme dans le cas des SLO, la lymphotoxine, aussi bien sécrétée (LT α_3) que membranaire (LT $\alpha_1\beta_2$), semble indispensable à la genèse des TLS. La surexpression de la LT α_3 au niveau du foie et du pancréas se traduit par le développement d'une inflammation associée à la formation de TLS (Kratz et al., 1996). La perte de la signalisation LT $\alpha_1\beta_2$ /LT β R abroge le développement des TLS, la différenciation des HEV et la libération de chimiokines (Luther et al., 2000). Ce couple de médiateurs (LT $\alpha_1\beta_2$ /LT β R) serait essentiel au développement ainsi qu'au maintien des TLS, notamment via la maturation des HEV. Le ligand alternatif de LT β R, LIGHT joue également un rôle critique dans la genèse des TLS. Dans le cancer du sein, une forte expression de LIGHT a été retrouvée au sein des TLS (Gantsev et al., 2013).

2.4.3 Les high endothelial venules (HEV)

Les HEV jouent un rôle essentiel dans le recrutement des cellules immunitaires au sein des SLO. Ces vaisseaux sont localisés au sein du stroma de nombreuses tumeurs solides (cancer du sein, du colon, des voies aériennes supérieures, mélanome) et sont les seuls associés à un bon pronostic (Martinet et al., 2011 ; Wirsing et al., 2018 ; Bento et al., 2015). En effet, la glycoprotéine PNAd présente à la surface des HEV interagit avec l'intégrine CD62L exprimée à la membrane des LT et LB présents au sein des TLS. Cette interaction permet d'une part le recrutement des cellules immunitaires de la périphérie vers la tumeur et, d'autre part, l'initiation de réponses adaptatives. Dans le cancer du sein, les DC matures représentent la source majeure de LT $\alpha_1\beta_2$ qui active la différenciation et assure le maintien des HEV qui expriment à leur surface le LT β R (Martinet and Girard, 2013). Dans un modèle ectopique d'inflammation de la thyroïde via la chimiokine CCL21, la formation des HEV est sous le contrôle des interactions DC/LT CD4⁺ dépendante de CCR7 et du LT β R (Marinkovic et al., 2006). Les LT CD8⁺ infiltrant la tumeur et les cellules NK sont également capables d'induire l'expression de PNAd à la surface des HEV via la production d'IFN- γ (Peske et al., 2015).

Dans les tumeurs NSCLC, les HEV colocalisent avec les TLS et sont associés à un recrutement intense de LB et LT notamment cytotoxiques (Chaisemartin et al., 2011 ; Goc et al., 2014b). Les mécanismes régulant la mise en place des HEV au sein des tumeurs représentent donc des cibles thérapeutiques prometteuses pour l'éradication de ces dernières.

2.4.4 L'implication du système nerveux

Le système nerveux semble être impliqué autant dans la genèse des SLO que dans celle des TLS. Une étude a démontré la présence de fibres cholinergiques à proximité des BALT chez le rat (Cavallotti et al., 2004) . Une autre étude a démontré que la stimulation des fibres sensorielles au niveau des bronches suite à une infection virale chez le rat induit le recrutement de monocytes et de LT CD4⁺ (Auais et al., 2003). Cette étude a montré que les LT trouvés dans ces BALT exprimaient fortement le récepteur neurokinine 1 de la substance P, médiateur principal de la nociception. L'utilisation de capsaïcine, antagoniste du récepteur à la neurokinine 1, empêche le recrutement des LT CD4⁺ et des monocytes dans les TLS.

L'ablation chirurgicale du nerf vague (un composant du système parasympathique) dans un modèle murin d'inflammation du colon est associée à une diminution marquée de la production de CXCL13 ainsi que de la formation des TLS [désignés alors sous le nom de tissus lymphoïdes

tertiaires (TLT)], de façon indépendante de la signalisation $LT\alpha_1\beta_2/LT\beta R$ (Olivier et al., 2016). La destruction des fibres sympathiques dans ce modèle inflammatoire n'a cependant pas d'impact sur la formation des TLT. Cette étude est la seule ayant rapporté un rôle direct du SNP dans la formation des TLT dans un modèle inflammatoire. Ces données sont en faveur d'un potentiel rôle du système parasympathique dans le développement et la fonctionnalité des tissus lymphoïdes. Les éléments connus à ce jour dans la mise en place des TLS sont représentés **Figure 11** (Sautès-Fridman et al., 2019).

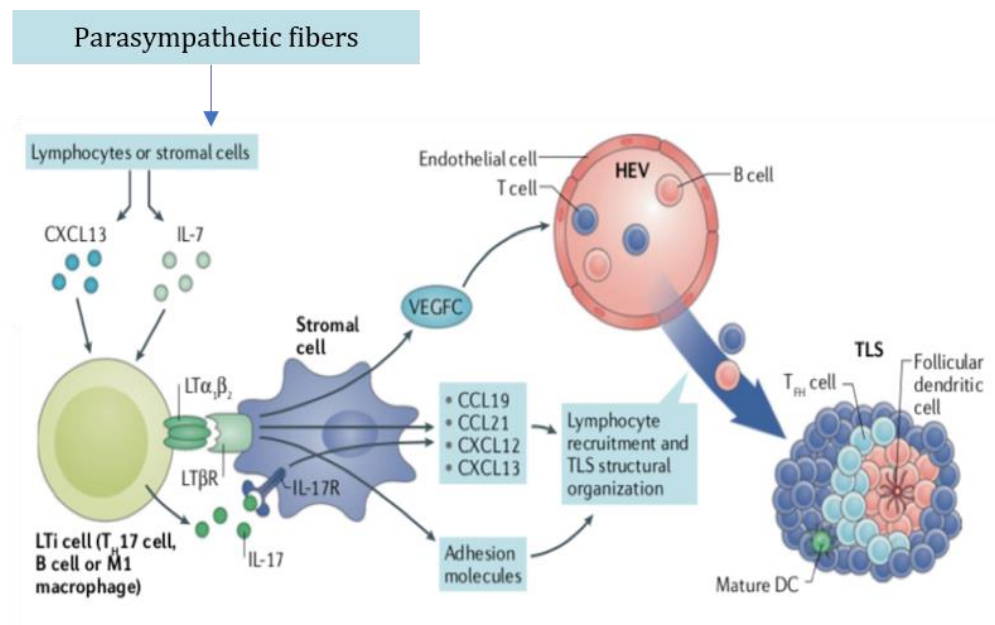


Figure 11. Genèse des TLS (adapté de Sautès-Fridman et al., 2019).

La genèse des TLS présente des similitudes avec celle des SLO. La production de CXCL13 et de l'IL-7 par les lymphocytes, les cellules stromales. Par ailleurs, les fibres parasympathiques peuvent favoriser la libération de la chimiokine CXCL13 par les cellules stromales, induit le recrutement des LTi au site inflammatoire. Diverses populations cellulaires peuvent se substituer aux LTi : c'est le cas des LT Th17, des LB ou encore des macrophages. Ces cellules initiatrices interagissent avec les cellules stromales, qui sont comparables aux cellules stromales organisatrices du tissu lymphoïde dans les SLO grâce à $LT\alpha_1\beta_2$ et à son récepteur $LT\beta R$. Cette voie de signalisation induit la sécrétion de divers facteurs tels que le VEGF favorisant ainsi le développement des HEV, ainsi que la sécrétion de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, MADCAM-1). L'action combinée de la signalisation de la lymphotoxine et de la sécrétion d'IL-17 par les cellules LTi conduit à la production de diverses chimiokines (CCL19, CCL21, CXCL13, CXCL12). Ensemble, ces chimiokines induisent l'expression de $LT\alpha_1\beta_2$ par les lymphocytes et leur recrutement via les HEV et régissent ensuite leur organisation en zones B et T. Une partie des LT $CD4^+$ se polarisent en cellules auxiliaires folliculaires. Abréviations: DC, dendritic cell; HEV, high endothelial venule ; LTi, lymphoid tissue inducer ; T_{FH} , follicular helper T lymphocyte; TLS, tertiary lymphoid structure.

2.5 TLS et thérapies anti-cancéreuses

2.5.1 Impact positif des TLS dans les cancers

Des essais cliniques ont mis en évidence le rôle des TLS dans les réponses cliniques aux chimiothérapies, notamment dans le cancer du sein. L'étude transcriptomique d'une cohorte de 996 patientes a mis en évidence une corrélation entre la présence de LT_{fh}, localisés dans les TLS, et la prédiction d'une réponse anti-tumorale (Gu-Trantien et al., 2013). Ce résultat a été confirmé par l'étude d'autres cohortes. Notamment, en 2018, l'analyse de biopsies de cancer du sein avant traitement a mis en évidence le fait que des densités élevées de LT et LB étaient associées à une réponse complète après traitement, suggérant un rôle positif des TLS (Denkert et al., 2018). Dans les mélanomes, les patients ayant des TLS (Stowman et al., 2018) sont de bons répondeurs aux anticorps inhibiteurs de *programmed death 1* (PD-1) (Eroglu et al., 2018). Des résultats similaires ont également été observés dans les tumeurs NSCLC, suite à une chimiothérapie conventionnelle ou utilisant des anticorps inhibiteurs de PD-1 (Remark et al., 2016 ; Cottrell et al., 2018). Des thérapies combinatoires alliant anticorps anti-PD-1 et inhibiteurs de l'angiogenèse dans des modèles de cancer du sein et du pancréas induisent l'expression de HEV et de TLS (Allen et al., 2017). Toutefois, ces thérapies combinatoires sont utilisées avec précaution car elles induisent des effets secondaires. Ceux-ci sont traités par corticostéroïdes mais qui abrogent le développement des TLS au sein des tumeurs pulmonaires épidermoïdes (Siliņa et al., 2018).

L'induction thérapeutique de TLS prend tout son sens dans le cadre de tumeurs très peu infiltrées, qualifiées de désert immunitaire comme le *pancreatic ductal adenocarcinoma*. Dans ce cancer, l'utilisation d'un vaccin thérapeutique a permis le développement de TLS seulement deux semaines à l'issue de la vaccination permettant une meilleure survie des patients (Lutz et al., 2014). L'induction thérapeutique de TLS dans le cancer semble donc permettre une meilleure réponse suite à divers traitements anti-cancéreux et pourrait convertir des tumeurs résistantes en tumeurs répondeuses aux thérapies.

2.5.2 Induction des TLS à des fins thérapeutiques

Les réponses intra-tumorales générées au sein des TLS et la valeur pronostique de ces dernières, en font des cibles thérapeutiques d'intérêt. De nombreux essais précliniques ont été réalisés afin de permettre leur induction en ciblant des molécules clés de la genèse des TLS. Ces molécules ont également été testées en combinaison avec d'autres immunothérapies. Les molécules principalement ciblées dans ces études sont celles appartenant à la famille du TNF- α , les lymphotoxines ainsi que la molécule LIGHT.

Une étude a montré que le traitement avec un anticorps monoclonal agoniste du LT β R (CBE11) dans un modèle préclinique de carcinome colorectal empêchait la croissance tumorale et favorisait l'infiltrat lymphocytaire (Lukashev et al., 2006). Dans cette même étude, l'anticorps CBE11 a diminué la taille de la tumeur, a favorisé l'infiltrat des cellules immunitaires et a amélioré la survie des animaux ayant reçu des xénogreffes préparées à partir de biopsies humaines de carcinome colorectal. Une autre étude s'est focalisée sur la LT α_3 , avec l'utilisation d'une protéine de fusion LT α -anticorps (ch14.18-LT α). Son utilisation dans le mélanome chez la souris a conduit à une réduction de la croissance tumorale avec la mise en place de TLS et la détection d'une réactivité contre des antigènes [TRP 2 (180-188)] par les LT. Ces observations suggèrent qu'un apprêtement antigénique a eu lieu et a permis l'activation de LT ainsi que leur expansion clonale au sein de la tumeur (Schrama et al., 2001).

Un autre modèle murin a montré que l'expression de LIGHT par les cellules de fibrosarcomes (Ag104) a généré le rejet des tumeurs implantées. Ces rejets ont été associés à une production accrue de CCL21 et de la molécule d'adhérence MADCAM-1 ainsi qu'au recrutement massif de LT CD8⁺ (Yu et al., 2004) via LT β R et HVEM. Dans un modèle de tumeur du pancréas (RIP-Tag 5), l'injection de la molécule LIGHT fusionnée à un peptide vasculaire (*vascular targeting peptide* : VTP) a induit d'une part, une normalisation des vaisseaux tumoraux les rendant perméables aux agents thérapeutiques, d'autre part, la formation de TLS. Par ailleurs, l'injection de LIGHT-VTP a également conduit à une meilleure réponse aux traitements par anticorps anti-PD-1 et anti-cytotoxique *T-lymphocyte associated protein 4* (anti-CTLA-4) (Johansson-Percival et al., 2017).

Quelques études se sont intéressées à cibler d'autres acteurs que les molécules clés de la genèse des TLS. Une étude a notamment ciblé les DC afin de favoriser la présentation antigénique. Ces cellules ont été transfectées pour leur faire exprimer le facteur de transcription *T cell-specific T box transcription factor* (T-bet) et injectées directement dans les tumeurs : un ralentissement considérable de la croissance tumorale a été alors observé (Chen et al., 2013). Cette observation a été associée à celle d'un recrutement massif de cellules NK, de LT CD8⁺ et de LB, accompagné du développement concomitant de TLS. Il semblerait de plus que ce phénomène soit dépendant de l'IL-36 γ (Weinstein et al., 2017).

3. Le système nerveux périphérique au sein du microenvironnement tumoral

3.1 Caractéristiques générales du système nerveux périphérique

Le système nerveux se divise en deux parties, la partie centrale, qui regroupe l'encéphale et la moelle épinière, et la partie périphérique. Cette dernière est divisée en deux parties, la partie autonome et la partie somatique. La partie somatique innerve les muscles squelettiques. Elle est responsable du contrôle volontaire des mouvements. La partie autonome se divise en trois parties distinctes, le système sympathique, le système parasympathique et le système entérique (Fig. 12). La partie sympathique et parasympathique, se présentent toutes les deux sous la forme de chaînes ganglionnaires.

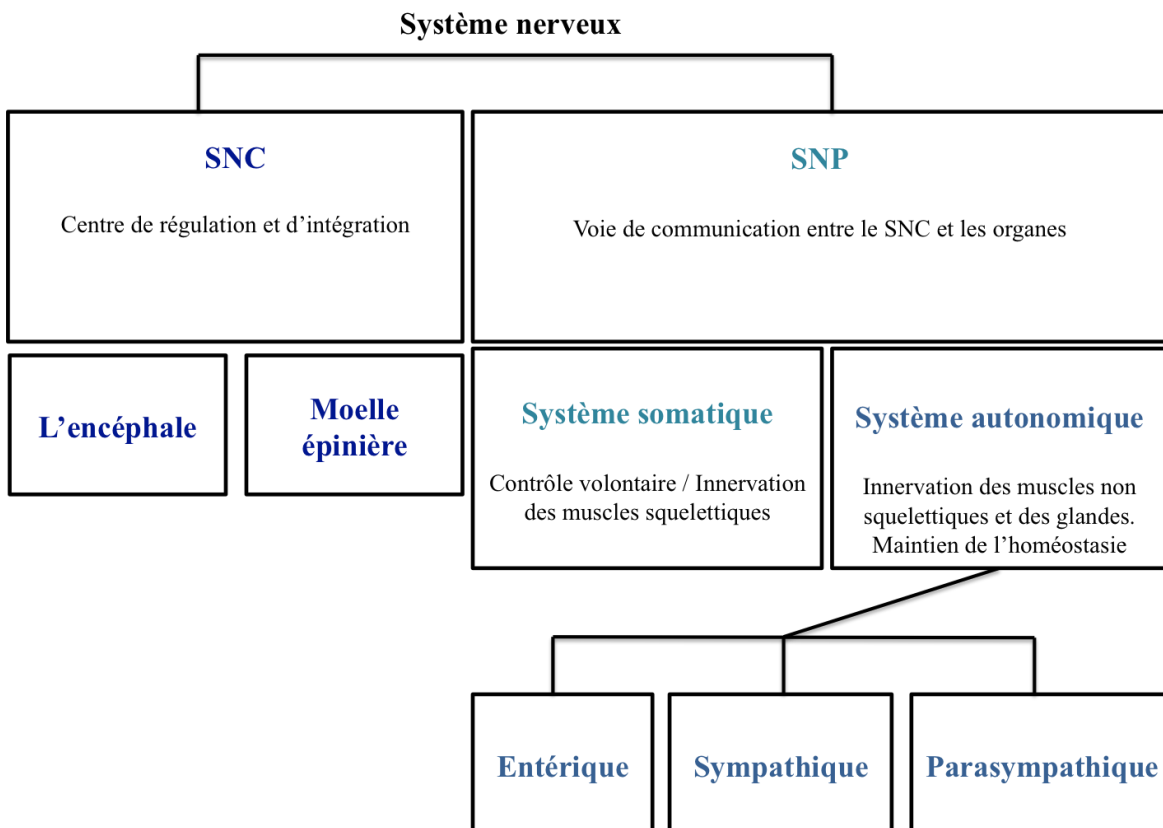


Figure 12. Les différents acteurs du système nerveux et leurs fonctions.

Le système nerveux se divise en deux composantes : une composante dite centrale (regroupant l'encéphale et la moelle épinière) et une composante dite périphérique. Cette dernière composante se subdivise elle-même en système somatique (contrôle volontaire) et système autonome. La partie autonome regroupe les systèmes entérique, sympathique et parasympathique. Abréviations : SNC, système nerveux central ; SNP, système nerveux périphérique.

Les premiers neurones (préganglionnaire) ont leurs corps cellulaires au sein de la corne latérale de la moelle épinière et se projettent vers les ganglions para-et-prévertébraux (Basso et al., 2019). À ce niveau, le neurotransmetteur libéré en direction du second neurone (post-ganglionnaire) est l'acétylcholine (ACh) (**Fig. 13**). Ce neurotransmetteur se fixe aux récepteurs nicotiniques. Le neurone post-ganglionnaire, innerve directement sa cible (vaisseaux sanguins, poumons, rate, cœur, viscères) et libère principalement la noradrénaline (NA). Ce neurotransmetteur agit sur les récepteurs α et β adrénergiques afin de réguler les fonctions homéostatiques. Une exception concerne les glandes surrénales, dans lesquelles les cellules chromaffines sont directement innervées par les fibres sympathiques et libèrent de la NA et de l'adrénaline (Elenkov et al., 2000). D'une façon plus générale, les neurotransmetteurs rattachés aux fibres sympathiques sont regroupés sous le terme des catécholamines et regroupent l'adrénaline, la NA et la dopamine.

Concernant le système parasympathique, les neurones sont généralement représentés par le nerf vague. Les corps cellulaires de ces neurones sont localisés au niveau du noyau dorsal moteur et projettent directement vers leur cible ou à leur proximité (Basso et al., 2019). Au niveau de leur cible, une synapse cholinergique est alors réalisée vers les neurones post-ganglionnaires, qui à leur tour libèrent également de l'acétylcholine. Les effets dus à l'ACh au niveau des organes sont relayés par les récepteurs muscariniques. Une autre composante du système parasympathique est représentée par des neurones cholinergiques dont les corps cellulaires sont localisés au niveau de la partie sacrée de la moelle. Ces neurones sont en contact avec les fibres post-ganglionnaires au niveau des ganglions pelviens et sont impliqués dans la régulation de la reproduction, ainsi que dans les fonctions physiologiques de la prostate et du colon (Basso et al., 2019). Dans ce manuscrit nous focalisons notre attention uniquement sur les fibres sympathiques et parasympathiques, la partie incluant le système sensoriel ne sera pas abordée.

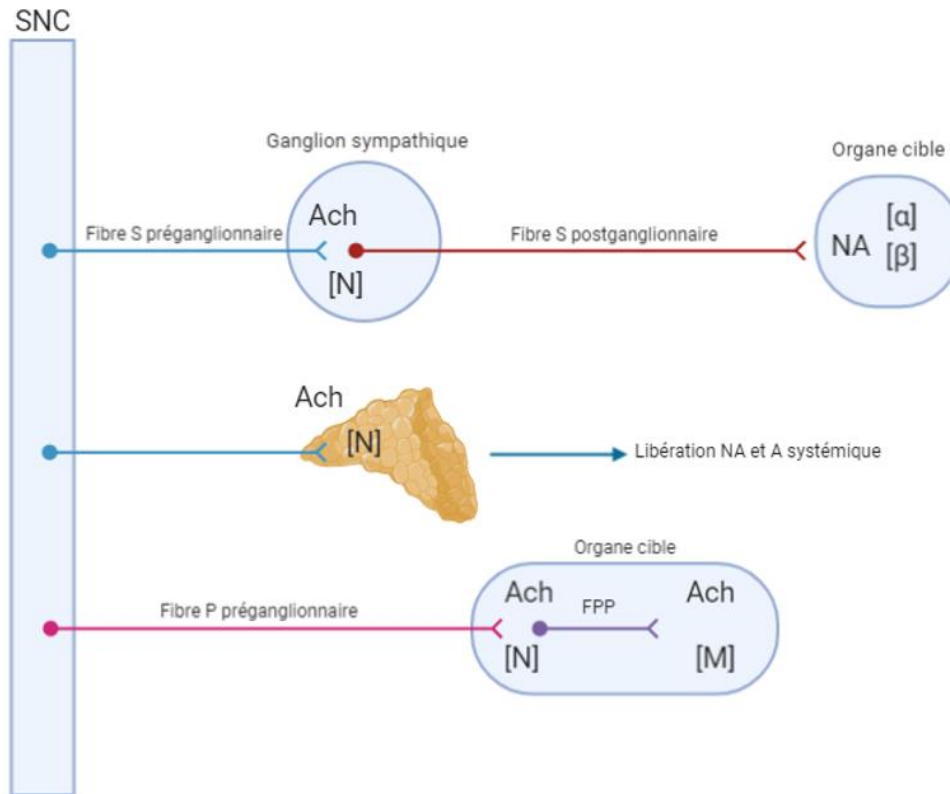


Figure 13. Morphologie et acteurs des systèmes sympathique et parasympathique du SNP.

Les premiers neurones du système sympathique (formant les fibres préganglionnaires) ont leurs corps cellulaires dans la corne latérale de la moelle épinière et projettent en direction du second neurone (post-ganglionnaire). A ce niveau, l'ACh est libérée et se fixe aux récepteurs nicotiniques. Le neurone post-ganglionnaire innerve directement son tissu cible (vaisseaux sanguins, poumons, rate, cœur, viscères) et libère majoritairement de la noradrénaline. Cette dernière agit sur les récepteurs α et β adrénergiques. Une exception concerne les glandes surrénales, où les cellules chromaffines innervées directement par les fibres sympathiques libèrent de la noradrénaline et de l'adrénaline. Concernant le système parasympathique, les corps cellulaires des neurones sont localisés au niveau du noyau dorsal moteur et projettent directement vers leur cible ou à leur proximité. Au niveau de leur cible, une synapse cholinergique est alors réalisée vers les neurones post-ganglionnaires, qui à leur tour libèrent également de l'acétylcholine (ACh). Les effets dus à l'ACh au niveau des organes passent par les récepteurs muscariniques. Abréviations : A, adrénaline ; ACh, acétylcholine ; [N], récepteur nicotinique ; [M], récepteur muscarinique ; NA, noradrénaline ; $[\alpha]$, récepteur alpha adrénergique ; $[\beta]$, récepteur beta adrénergique ; FFP, fibre parasympathique postganglionnaire ; P, parasympathique ; S, sympathique.

3.2 Dialogue croisé entre SNP et cellules immunitaires

Les systèmes immunitaires et nerveux partagent de nombreux éléments en commun. En effet, des récepteurs de l'immunité innée tels que les récepteurs de l'IL-1 β ou encore du TNF- α sont exprimés par les fibres nerveuses afférentes (Niijima, 1996 ; Goehler et al., 1999).

Réciproquement, les récepteurs de nombreux neurotransmetteurs, tels que les récepteurs adrénergiques (β - α) et les récepteurs cholinergiques (muscariniques et nicotiniques), sont exprimés à la surface des monocytes, des LT, des LB et des DC (Kawashima et al., 2015). Les cellules immunitaires sont également capables de synthétiser et de libérer des neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine (Rosas-Ballina et al., 2011 ; Kawashima et al., 2012). Les systèmes immunitaire et nerveux semblent agir de concert dans la détection des agents pathogènes ainsi que dans la mise en place de réponses inflammatoires.

3.2.1 Les fibres parasympathiques et les cellules immunitaires

L'implication du système parasympathique dans la réponse immunitaire a été décrite pour la première fois sous la forme du « réflexe de l'immunité » (Tracey, 2002 ; Pavlov and Tracey, 2015), permettant un contrôle de l'inflammation survenant en réponse à des toxines émises par des bactéries. La reconnaissance de stimuli pro-inflammatoires [IL-1 β , TNF- α , *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), ou encore l'adénosine triphosphate (ATP)] par les fibres parasympathiques afférentes, entraîne la libération d'acétylcholine par les fibres parasympathiques efférentes. Cette molécule, qui se fixe à la sous-unité α -7 du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (α 7-nAChR) présent à la surface des macrophages [trouvés dans le foie (cellules de Küpffer), le tractus intestinal, le pancréas et les reins], inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par ces derniers (Okusa et al., 2017). Ce n'est qu'ultérieurement que le rôle de la rate dans ce processus a été mis en lumière. En 2006, une étude a montré que des animaux ayant subi une splénectomie présentaient une diminution de leurs capacités anti-inflammatoires (Huston et al., 2006). Cependant, la rate n'ayant pas d'innervation parasympathique, deux hypothèses ont été émises : la première stipule que le nerf vague aurait la capacité d'activer le nerf splénique (branche sympathique) responsable d'une libération accrue de NA au niveau de cet organe. La NA serait alors capable d'activer les LT mémoires (CD4^{high} CD62^{low}) producteur d'ACh permettant ainsi l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires par les macrophages (Rosas-Ballina et al., 2011). La seconde hypothèse propose que la stimulation du nerf vague entraînerait le recrutement de LT CD4⁺ producteur d'ACh directement au niveau de la rate. Les terminaisons sympathiques du nerf splénique seront alors stimulées via des récepteurs nicotiniques permettant la sécrétion de NA et la stimulation de récepteurs β adrénergiques à la surface des macrophages. Cette dernière étape semble être à l'origine de l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Martelli et al., 2014a).

Parallèlement à la description du réflexe inflammatoire, des équipes se sont intéressées à la fonction des récepteurs muscariniques trouvés à la surface des cellules immunitaires (**Tableau 6**). *In vitro*, l'acétylcholine module la prolifération des LT (Qiu et al., 1995). Des études menées chez des animaux dont les gènes codant les récepteurs cholinergiques muscariniques de type 1 et 5 (Chrm1, Chrm5) ont été invalidés, exposés à l'ovalbumine, ont montré que ces animaux présentaient des taux sériques d'IgG totales plus faibles que ceux des souris contrôles. De plus, la production d'IL-6 par les splénocytes de ces animaux était réduite comparativement aux souris contrôle. Cependant, aucune différence n'a été rapportée concernant le taux sérique total d'IgM entre ces animaux K.O. et contrôles. Ces observations suggèrent que les récepteurs Chrm1 et Chrm5 ne sont pas impliqués dans la génération d'anticorps mais pourraient contribuer à la commutation de classe (Fujii et al., 2007).

Concernant les DC, le traitement cholinergique *in vitro* augmente l'expression d'OX40L, un marqueur d'activation des DC, ce qui facilite les interactions entre CPA et acteurs de l'immunité adaptative (Liu et al., 2010).

Tableau 6. Expression des récepteurs muscariniques au sein des principales populations de cellules immunitaires (adapté de Verbout and Jacoby, 2012).

Cellules immunitaires	Récepteurs muscariniques					Espèces	Références
	1	2	3	4	5		
Lymphocytes	+	+	+	+	+	Homme	(Tayebati et al., 2002)
	+	+	+	+	+	Souris	(Ricci et al., 2002)
Monocytes	+	+	+	+	-	Homme	(Pahl et al., 2006)
	+	+	+	+	+	Souris	(Kawashima et al., 2007)
Macrophages	+	+	+	-	-	Homme	(Profita et al., 2005)
	+	+	+	+	+	Souris	(Kawashima et al., 2007)
Cellules dendritiques	-	-	+	+	+	Homme	(Liu et al., 2010)
	+	+	+	+	+	Souris	(Kawashima et al., 2007) (Ma et al., 2007)

Une étude très récente a démontré que la présence de fibres parasympathiques est associée à une diminution de l'expression d'ICP (PD-1, *programmed death-ligand 1* (PD-L1)) à la surface des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs ainsi que de FOXP3 dans des modèles murins de cancer du sein (Kamiya et al., 2019).

3.2.2 Fibres sympathiques et cellules immunitaires

L'impact des fibres sympathiques sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral a récemment gagné en intérêt. En effet, la signalisation β -adrénergique augmente l'expression des gènes impliqués dans la polarisation des macrophages M2 (Lamkin et al., 2016). Ces derniers favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) via la sécrétion des matrix métallopeptidase 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9), ainsi que l'angiogenèse, et sont pro-tumoraux. Les catécholamines favorisent également la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-

1 β ou le TNF- α par les macrophages (Black et al., 2002). Des études *in vivo* ont démontré que le système beta-adrénergique augmente l'infiltration des macrophages (*tumor-associated macrophages*, TAM) dans le cancer du sein, ainsi que le développement de métastases (Qin et al., 2015).

Concernant les cellules dendritiques, les catécholamines semblent avoir des effets opposés en fonction du récepteur impliqué. En effet, elles peuvent agir comme facteur chimioattractant et favoriser la migration des DC via le récepteur $\alpha 1$ (Maestroni, 2000). A l'inverse, elles peuvent supprimer leur migration via le récepteur adrénergique β_2 en favorisant la production des interleukines IL-10 et IL-12 (Maestroni and Mazzola, 2003). Par ailleurs, dans un modèle murin de lymphome, il a été montré que la signalisation β adrénergique supprime l'activité des LT CD8⁺. Cet effet est induit par une diminution de la production de l'IFN- γ et de l'expression des molécules de co-stimulation CD28 et 4-1BB (CD137) (Nissen et al., 2018). Enfin, il a été décrit dans un modèle leucémique, l'administration de catécholamines inhibe l'activité des cellules NK (Inbar et al., 2011).

L'ensemble de ces données met en avant le rôle inhibiteur des fibres sympathiques dans l'établissement des réponses immunitaires adaptatives au sein du microenvironnement tumoral.

3.3 Système nerveux autonome et tumeurs

L'implication du système autonome dans la cancérogenèse provient des observations cliniques entre stress et progression tumorale (Antoni et al., 2006 ; Armaiz-Pena et al., 2013). Divers modèles murins ont montré que le stress favorise la progression tumorale dans le cancer du sein, de l'ovaire ou encore dans les tumeurs de la prostate (Palm et al., 2006 ; Thaker et al., 2006 ; Sloan et al., 2010). L'utilisation de β -bloquants permet de diminuer ce phénomène (Pasquier et al., 2013).

3.3.1 Effets sur la réparation de l'ADN

La signalisation β -adrénergique induit également une instabilité chromosomique qui pourrait conduire à l'initiation des tumeurs. En effet, le système sympathique s'opposerait aux mécanismes de réparation de l'ADN (Cole et al., 2015) (**Fig. 14**). Ces effets semblent dus à l'activation de la voie AKT qui conduit à l'expression de l'*ubiquitine E3 murine double minute 2* qui, à son tour, dégrade la protéine p53 empêchant ainsi le mécanisme de réparation de l'ADN (Hara et al., 2011 ; Hara et al., 2013).

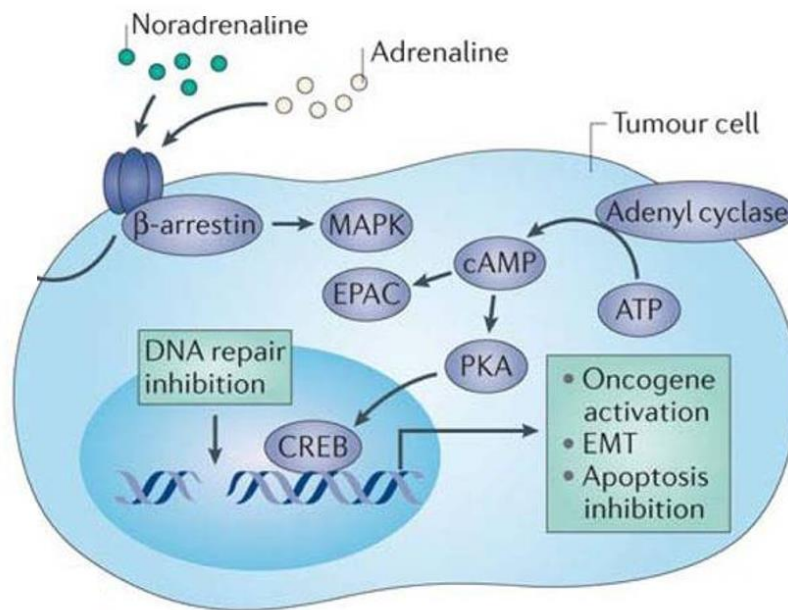


Figure 14. L'effet pro-tumoral du système sympathique (Cole et al., 2015).

Les fibres nerveuses sympathiques sont capables en libérant de la noradrénaline d'agir sur les cellules tumorales qui expriment les récepteurs β -adrénergiques. La stimulation de ces derniers régule l'expression de différents gènes via l'activation de multiples voies de transduction comme celle des MAPK et dont certaines mettent en jeu l'adényl cyclase, l'AMPc ou la PKA qui phosphoryle des facteurs de transcription comme CREB. Ces différents effets favorisent *in fine* la progression tumorale en s'opposant aux mécanismes de réparation de l'ADN, à l'apoptose, et en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et ainsi la dissémination des cellules tumorales. Abréviations : AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; ATP, adénosine triphosphate ; CREB c-AMP response Element-binding protein ; EMT, transition épithélio-mésenchymateuse ; EPAC, exchange factor directly activated by cAMP ; MAPK, mitogen-activated protein kinases ; PKA, protéine kinase A.

3.3.2 Effets sur les oncogènes

L'activation des récepteurs β -adrénergiques peut stimuler l'expression des oncogènes Src et HER-2 : ainsi, suite à l'activation de ces récepteurs β -adrénergiques présents à la surface de cellules du cancer du sein (MCF7), le facteur de transcription STAT3 est activé, et accroît alors l'expression de l'oncogène HER-2 en se fixant sur le promoteur du gène codant pour cette molécule (Shi et al., 2011).

3.3.3 Effets sur la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

Certaines données de la littérature sont en faveur de l'implication du système sympathique dans l'EMT. L'EMT est un processus au cours duquel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent un nouveau phénotype, mésenchymateux. Ce dernier confère aux cellules tumorales des propriétés migratoire et invasive favorisant leur dissémination en périphérie.

La signalisation adrénergique induirait l'activation des facteurs de transcription de la famille SNAIL, impliqués dans l'EMT. Par ailleurs, le traitement *in vitro* des cellules d'adénocarcinome du nasopharynx en présence de NA est responsable de l'expression des MMP-2 et MMP-9, favorisant l'invasion des lames basales bordant les épithéliums (Yang et al., 2006).

3.3.4 Effets sur l'apoptose

La signalisation β adrénergique induit une résistance aux mécanismes pro-apoptotiques. Cet effet est dû à l'inhibition des molécules de la famille de Bcl-2 (BAD) impliquées dans la cascade pro-apoptotique (Sastry et al., 2007).

3.4 Fibres nerveuses au sein du microenvironnement tumoral

3.4.1 Le système autonome, initiateur des tumeurs

Les fibres nerveuses sont présentes dans l'ensemble de l'organisme afin de maintenir les fonctions physiologiques. Lors de la carcinogenèse, elles sont détournées de leur fonction principale par les cellules cancéreuses et favorisent le développement tumoral. Au cours de la dernière décennie, deux études pionnières ont mis en avant l'impact du système autonome au sein des tumeurs.

La première étude menée, en utilisant un modèle murin de tumeur de la prostate, a démontré la présence des deux composantes du système autonome dans la cancérogenèse (Magnon et al., 2013). Les phases précoces du développement tumoral seraient liées à la présence des fibres

sympathiques : l'initiation de la tumeur est inhibée à la suite de la délétion de ces fibres de façon pharmacologique ou génétique. Cet effet pro-tumoral est induit par l'expression des récepteurs β_2 - et β_3 -adrénergiques par les cellules stromales (**Fig. 15**). Très récemment, la même équipe a montré dans le même modèle murin que l'initiation de la neurogenèse, ainsi que la progression des adénocarcinomes de la prostate, étaient liées à la présence de précurseurs neuronaux exprimant la doublecortine (DCX) (Mauffrey et al., 2019). Chez l'adulte, la neurogenèse s'effectue dans deux zones, le gyrus denté dans l'hippocampe et dans la zone sous-ventriculaire (SVZ). Les précurseurs DCX⁺ localisés dans la SVZ infiltreraient les lésions néoplasiques de la prostate et initieraient à la fois la mise en place *de novo* des fibres nerveuses sympathiques et la progression tumorale. Afin de soutenir son développement, la tumeur épuiserait les niches neurogènes du cerveau en attirant les progéniteurs. Toutefois les mécanismes inducteurs de la libération de ces progéniteurs ne sont pas connus à ce jour. Chez les patients, la présence des précurseurs DCX⁺ est associée à des stades avancés et impacte négativement la survie (Mauffrey et al., 2019).

Les fibres parasympathiques prendraient le relais dans les phases plus tardives du développement tumoral et seraient impliquées dans la mise en place des métastases (Magnon et al., 2013). La dissémination des cellules tumorales serait due au récepteur muscarinique de type 1 exprimé par les cellules stromales (Chrm1). Lors des régulations physiologiques, ces deux systèmes, sympathique et parasympathique, ont des actions antagonistes ; dans le cadre du cancer, ils semblent agir de concert dans la progression tumorale. Chez les patients, la présence des fibres sympathiques et parasympathiques [identifiées avec le marqueur *tyrosine hydroxylase* (TH) et le *vesicular acetyl choline transporter* (VACHT) respectivement] corrèle avec un haut score de Gleason (une classification des stades du cancer de la prostate) et à un mauvais pronostic (Magnon et al., 2013).

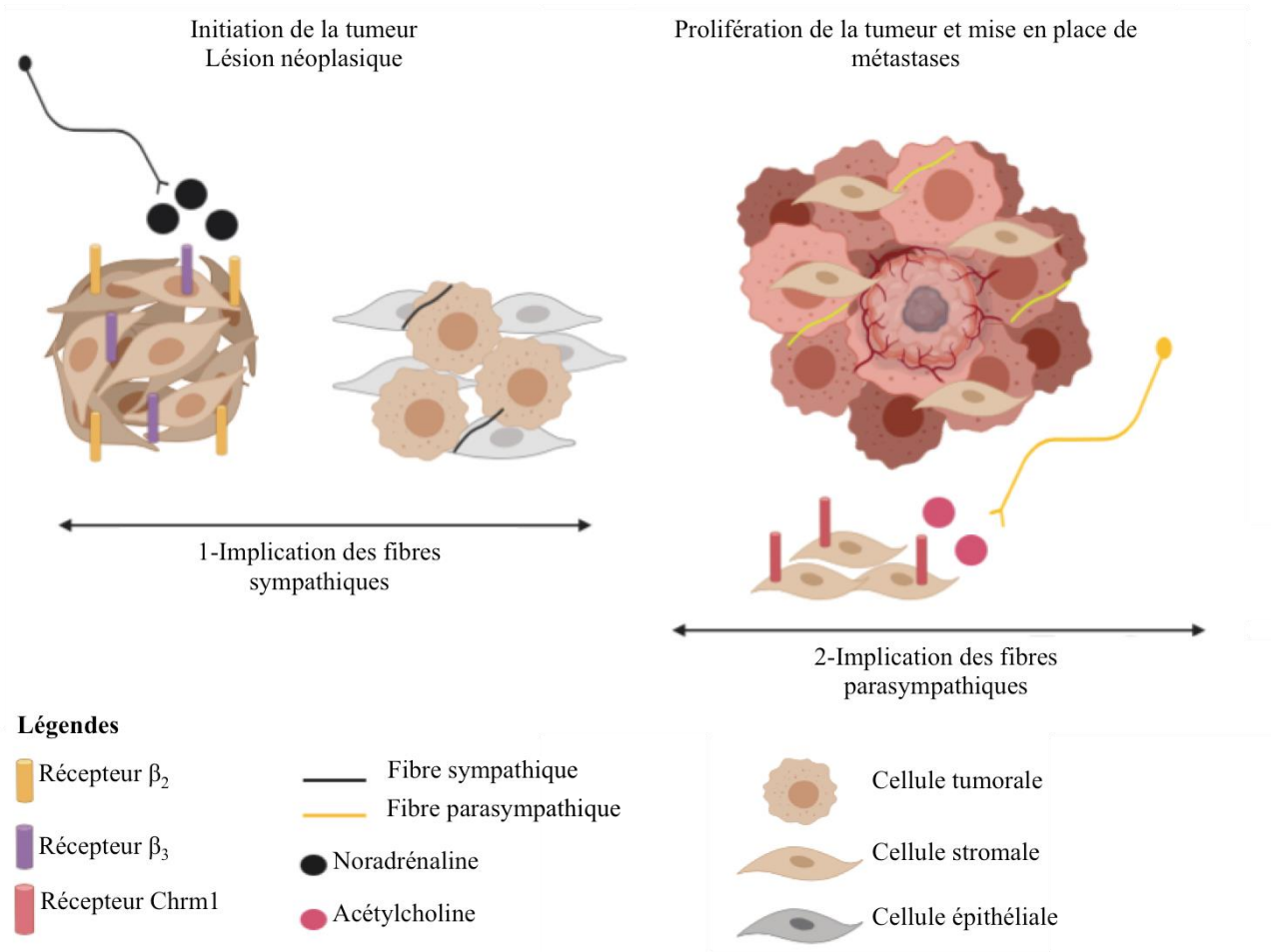


Figure 15. L'implication des fibres nerveuses dans le cancer de la prostate (adapté de Magnon et al., 2013).

Dans les lésions néoplasiques des tumeurs de la prostate, les fibres sympathiques libèrent de la noradrénaline qui active les récepteurs adrénergiques β_2 et β_3 exprimés par les cellules stromales. Cette activation favorise le développement tumoral. Plus tardivement au cours de celui-là, les fibres parasympathiques infiltrent la tumeur et libèrent de l'acétylcholine qui promeut également la prolifération des cellules tumorales et leur dissémination métastatique. Ces effets s'exercent par l'intermédiaire du récepteur muscarinique Chrm1.

La seconde étude a été menée avec des tumeurs gastriques (Zhao et al., 2014). Dans cet environnement, l'innervation parasympathique contrôle la prolifération des cellules épithéliales gastriques (exprimant le récepteur muscarinique de type 3, Chrm3), cette fonction s'étendant aux cellules tumorales correspondantes. La suppression des fibres parasympathiques par action pharmacologique (via des injections de botox) ou bien chirurgicale [bilatérale (*bilateral vagotomy with pyloroplasty*) ou unilatérale (*unilateral vagotomy*)] induit une diminution de la croissance

tumorale. Toujours dans cette étude, la délétion génétique du récepteur Chrm3 inhibe la croissance tumorale.

En ce qui concerne les tumeurs NSCLC, une seule étude datant de 2016 a rapporté la présence de fibres autonomiques (Shao et al., 2016). Dans cette étude, les fibres sympathiques TH ont été localisées autour de la tumeur, tandis que les fibres parasympathiques (identifiées via le marqueur VACHT) ont été trouvées dans la tumeur. Dans les deux cas, la présence de ces fibres a été associée à un mauvais pronostic, quel que soit le stade de la maladie. Toutefois, le lien éventuel entre ces fibres et l'infiltrat tumoral n'a pas été exploré.

3.4.2 Système autonome et croissance tumorale

Les cellules tumorales adjacentes aux fibres présentent une prolifération plus importante que celles situées à distance, suggérant l'existence d'un dialogue entre les deux (Ayala et al., 2004). Les molécules libérées par les fibres (*nerve growth factor*, NGF ; neurotransmetteurs : ACh, NA) sont utilisées par les cellules tumorales pour leur prolifération (Hayakawa et al., 2017). Ainsi, dans les cancers du sein et de l'ovaire, la signalisation adrénergique via le récepteur β_2 favorise la croissance tumorale. De plus, les catécholamines moduleraient également les capacités migratoires des cellules tumorales de cancer du sein et du colon. Les catécholamines favorisent par ailleurs la production des interleukines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) par les cellules tumorales (Nilsson et al., 2007 ; Shahzad et al., 2010).

Plusieurs données démontrent l'implication du système parasympathique dans le contrôle de la croissance tumorale. Les cellules épithéliales et stromales expriment à leurs surfaces les récepteurs muscariniques (Chrm1 à Chrm5) et les adénocarcinomes dérivant de ces cellules suggèrent que la signalisation cholinergique joue un rôle important dans la progression tumorale : l'expression des récepteurs muscariniques par les cellules de diverses tumeurs solides a été associée à la croissance et à la migration de ces cellules tumorales (Shah et al., 2009) (**Tableau 7**).

En ce qui concerne les tumeurs NSCLC, le récepteur Chrm3, surexprimé par les cellules tumorales, est associé à un mauvais pronostic (Lin et al., 2014). Par ailleurs, les cellules tumorales *small-cell lung cancer* (SCLC) expriment également l'ensemble de la machinerie nécessaire à la synthèse et à la libération de l'acétylcholine, suggérant que de telles cellules sont capables de stimuler de façon autocrine leur croissance (Song et al., 2007 ; Spindel, 2012). Enfin, la sous-unité $\alpha 7$ -nAChR est exprimée par les cellules de NSCLC et promeut leur prolifération (Grozio et al., 2008).

Tableau 7. Expression des récepteurs muscariniques dans les tumeurs solides (adapté de Shah et al., 2009).

Récepteurs muscariniques	Type de cancer	Actions	Références
Chrm3	Cancer du sein	Prolifération Angiogenèse	(Español et al., 2002) (Español et al., 2007)
Chrm3	Cancer du colon	Prolifération Survie	(Cheng et al., 2008)
Chrm3	Cancer du poumon	Prolifération	(Song et al., 2007) (Lin et al., 2014)
	SCLC		
	NSCLC		
Chrm3	Cancer de l’ovaire	Diminution de la survie	(Oppitz et al., 2002)
Chrm1/ Chrm3	Cancer du pancréas	ND	(Chien and Warren, 1985) (Ackerman et al., 1989)
Chrm1/Chrm3/ Chrm2	Cancer de la prostate	Prolifération	(Rayford et al., 1997)
Chrm3/ Chrm5	Mélanome	Migration	(Boss et al., 2005)
Chrm1/ Chrm3/ Chrm5	Tumeur gastrique	ND	(Kodaira et al., 1999)

Abréviations : ChrmX (récepteur cholinergique muscarinique de type 1, 2, 3, 4 et 5) ; ND, non déterminé ; NSCLC, non-small cell lung cancer ; SCLC, small-cell lung cancer.

En plus des neurotransmetteurs, d’origine neuronale ou non, les molécules de guidance axonale jouent également un rôle au sein de la carcinogenèse. C’est le cas des nétrines, notamment la nétrine-1 dont le rôle pro-tumoral a été démontré dans les tumeurs du colon, du cancer du sein et des adénocarcinomes pancréatiques. Dans les tumeurs colorectales, la nétrine-1 favorise la

tumorigenèse en inhibant l'apoptose induite par les récepteurs, *deleted in colorectal cancer* et *uncoordinated 5 homolog* (Bernet et al., 2007).

Concernant les tumeurs NSCLC, la nétrine-1 est surexprimée chez 47% des patients. Cette surexpression est associée à une résistance à l'apoptose (Delloye-Bourgeois et al., 2009).

3.4.3 Néoangiogenèse dans les tumeurs

L'angiogenèse est un processus indispensable au développement embryonnaire et à la réparation tissulaire. En condition physiologique, des contacts très étroits existent entre les fibres nerveuses et le réseau vasculaire. Les fibres sympathiques se meuvent dans l'organisme en suivant les artères, attirées par des facteurs attracteurs libérées par ces dernières, telles que l'artémine ou encore la neurotrophine (Larrivée et al., 2009). Au sein du microenvironnement tumoral, la croissance des cellules tumorales est telle qu'un environnement hypoxique se met en place. Afin de palier à ses besoins nutritifs croissants, la tumeur développe alors un nouveau réseau vasculaire. Ce dernier se développe à partir de vaisseaux préexistants via les cellules endothéliales et des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse (Dvorak et al., 2005 ; Chakroborty et al., 2009). En condition physiologique, un équilibre s'établit entre facteurs pro- et anti-angiogéniques, alors que, dans les situations tumorales, cet équilibre est perdu, ce qui se traduit par la formation de vaisseaux anormaux ayant une perméabilité accrue (Chakroborty et al., 2009). L'implication des fibres nerveuses au sein du processus de l'angiogenèse est principalement due aux fibres sympathiques. La présence des récepteurs β adrénergiques à la surface des cellules endothéliales permet à la noradrénaline et l'adrénaline d'induire une néo-angiogenèse (Hondermarck and Jobling, 2018). Par ailleurs, les catécholamines favorisent aussi la néoangiogenèse par les cellules tumorales : la noradrénaline et l'adrénaline activent à la surface des cellules tumorales les récepteurs β adrénergiques qui induisent la production du *vascular epidermal growth factor* (VEGF). Ces phénomènes ont été observés *in vivo*, dans le cancer de l'ovaire, mais également *in vitro* avec des cellules de mélanome. Une autre molécule pro-angiogénique est également induite par la signalisation β adrénergique, l'IL-6. Dans le cancer de l'ovaire, la présence d'IL-6 corrèle avec le degré de néovascularisation (Chakroborty et al., 2009).

La dopamine, autre messager des fibres sympathiques, inhibe la néoangiogenèse dans les tumeurs. Contrairement aux neurotransmetteurs cités précédemment, la dopamine ne promeut pas la libération de facteurs pro-angiogéniques mais, à l'inverse, réduit la signalisation du *vascular epidermal growth factor receptor 2* (VEGFR-2) (Sarkar et al., 2008). Cela est possible grâce à

l'expression du récepteur D2 dopaminergique à la surface des cellules endothéliales dans la tumeur, également exprimés à la surface des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les animaux dont le gène codant ce récepteur a été invalidé, présentent une néoangiogenèse accrue ainsi qu'une importante progression tumorale (Chakroborty et al., 2009). Plus précisément, la dopamine empêcherait la phosphorylation du VEGFR-2 au niveau des cellules endothéliales présentes dans le microenvironnement tumoral, mais également au niveau des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. La mobilisation des précurseurs endothéliaux de la moelle se fait en différentes étapes, en présence de VEGF et des MMP, qui permettent la mobilité de ces cellules. Ces phénomènes, favorisés par la NA, sont inhibés par la dopamine.

Le système parasympathique joue également un rôle au niveau de la néoangiogenèse tumorale. Ce processus se ferait via la production d'arginase et de prostaglandine par les cellules tumorales, qui activeraient le promoteur du gène codant le VEGF dans les cellules endothéliales (de la Torre et al., 2005).

Les récepteurs nicotiniques jouent également un rôle dans l'angiogenèse tumorale. En effet, la production des facteurs pro-angiogéniques (VEGF ; *platelet-derived growth factor* ; *fibroblast growth factor*) est augmentée par la nicotine (Schuller, 2009). Différents récepteurs favorisent la néoangiogenèse. Dans les tumeurs pulmonaires, cet effet est induit par l'expression de la sous-unité $\alpha 7$ -nAChR à la surface des cellules endothéliales (Brown et al., 2012), tandis que dans les cancers du sein, c'est la sous-unité $\alpha 9$ du récepteur nicotinique à l'acétylcholine ($\alpha 9$ -nAChR) qui serait impliquée (Lee et al., 2010).

3.4.4 Les fibres nerveuses, un moyen de dissémination des cellules tumorales

Classiquement, les cellules tumorales utilisent diverses voies de propagation afin de se disséminer, notamment les systèmes vasculaire et lymphatique. Décrit initialement dans le cancer de la prostate, l'invasion péri-neurale (PNI) est un processus au cours duquel les cellules tumorales utilisent les fibres nerveuses afin de se propager. les cellules tumorales peuvent en effet s'agréger autour des fibres et/ou infiltrer les trois compartiments de la gaine nerveuse (épinèvre, périnèvre et endonèvre) (Liebig et al., 2009). La présence d'une invasion péri-neurale dans le cancer de la prostate est associée à un mauvais pronostic chez les patients (Ayala et al., 2004 ; Liebig et al., 2009 ; Zareba et al., 2017). Cette présence a été également détectée dans d'autres tumeurs solides et a systématiquement été associée à un mauvais pronostic lié à un risque accru de rechute. C'est

le cas pour les tumeurs du pancréas, gastriques, colorectales, ainsi que dans le cancer du sein et des voies biliaires (**Tableau 8**).

Dans les tumeurs NSCLC, l'impact des invasion péri-neurales sur la survie s'est avéré être discordant en fonction des études. Selon Sayar et al. (2004), les PNI sont associées à un mauvais pronostic. Deux autres études ont par contre montré que les invasion péri-neurales n'ont pas d'impact sur la survie (Poncelet et al., 2008 ; Yilmaz et al., 2011). Cette discordance pourrait s'expliquer par la taille des cohortes ainsi que par la différence de stades étudiés [stades avancés (III) vs stades précoces (I-II)].

Les mécanismes responsables de la mise en place des invasion péri-neurales semblent impliquer certaines chimiokines. C'est notamment le cas de la chimiokine CXCL12 et de son récepteur CXCR4 dans les tumeurs du pancréas. Chez les patients, leur présence est corrélée positivement avec le développement des invasion péri-neurales. L'inhibition de cet axe abroge de plus la dissémination des cellules tumorales ainsi que l'invasion du nerf sciatique (Xu et al., 2015).

Une autre chimiokine a également été identifiée pour son rôle dans la mise en place des invasion péri-neurales. Diverses cellules tumorales telles que celles du pancréas (Miknyoczki et al., 2002), du sein (André et al., 2006), surexpriment le récepteur CX3CR1, dont le ligand, la neurotactine, est exprimé par des fibres nerveuses. L'activation de son récepteur par la neurotactine favorise la dissémination des cellules tumorales.

Tableau 8. Valeur pronostique des invasions périneurales dans les tumeurs solides (adapté de Bapat et al., 2011).

Types de cancers	Stades	Impact sur la survie	Références
Cancer du pancréas	Tous	Négatif	(Pour et al., 2003)
Cancer tête et cou	I, II, III	Négatif	(Haddad and Shin, 2008)
Cancer de la prostate	Tous	Négatif	(Liebig et al., 2009), (Ayala et al., 2004)
Cancer colorectal	II	Négatif	(Huh et al., 2010)
Cancer du sein	I, II, III	Négatif	(Cowan et al., 1997)
Cancer des voies biliaires	Tous	Négatif	(Marchesi et al., 2010)
Cancer de l'estomac	Tous	Négatif	(Scartozzi et al., 2006), (Duraker et al., 2003)
Carcinome épidermoïde de l'œsophage	Tous	Négatif	(Kurtz et al., 2005)
Cholangiosarcome	Tous	Négatif	(Shirai et al., 2008)
NSCLC	I-II	Sans pronostic	(Yilmaz et al., 2011), (Poncelet et al., 2008)
	Tous	Négatif	(Sayar et al., 2004)

Abréviations : ND, non déterminé ; NSCLC, non-small cell lung cancer.

3.4.5 Les cellules tumorales et l'induction de l'axonogenèse

La mise en place des métastases via les fibres nerveuses était jusqu'à présent la seule interaction connue entre les cellules tumorales et les fibres nerveuses. En 2008, un nouveau mécanisme a été introduit, l'axonogenèse/neurogenèse. Ces mécanismes permettent la mise en place de nouvelles terminaisons nerveuses grâce aux divers facteurs de croissance libérés par les cellules tumorales (Ayala et al., 2008).

De façon générale, les molécules impliquées dans l'axonogenèse appartiennent à la famille des neurotrophines et regroupent le *brain-derived nerve factor* (BDNF), les neurotrophines 3, 4, 5 (NT-3, NT-4 et NT-5), le NGF, ainsi que GDNF (Chilton, 2006). Ce processus d'axonogenèse a initialement été décrit dans le cancer de la prostate *in vivo* et *in vitro*. Les cellules tumorales induisent une croissance axonale via la libération de la sémaphorine 4 F (S4F). Ce processus est enrayé en présence de *small interfering RNA* (siRNA) dirigés contre S4F. Chez les patients, le nombre de neurones est plus élevé que chez les individus sains, suggérant qu'une neurogenèse

pourrait également se développer à partir de cellules-souches grâce à S4F. De plus, la mise en place de ce nouveau réseau est associée à des hauts risques de récurrence tumorale (Ayala et al., 2008). Les cellules tumorales de cancer du sein *in vitro* favorisent également la mise en place des neurites des cellules neurales PC-12 via la sécrétion de NGF (Pundavela et al., 2015). Des analyses transcriptomiques, effectuées à partir de microdissection de biopsies de tumeurs du pancréas ont montré une augmentation des neurotrophines dans les cellules tumorales mais également au niveau des PNI. Toujours dans ces tumeurs, le GDNF et l'artémine ont été identifiés comme favorisant l'invasion des nerfs et la croissance tumorale (Ceyhan et al., 2006).

Une étude a récemment suggéré que les cellules tumorales pouvaient libérer ces molécules dans des exosomes (Madeo et al., 2018). De fait, l'administration *in vivo* d'inhibiteurs de la libération des exosomes diminue l'innervation *de novo* des tumeurs. Dans cette étude, il a été également montré que le facteur majeur impliqué dans la croissance des neurites et l'axonogenèse appartient à la famille des éphrines, l'éphrine B1 (Madeo et al., 2018).

Les cellules hématopoïétiques ont également été identifiées comme jouant un rôle dans ce mécanisme d'axonogenèse via la sécrétion d'un facteur de croissance hématopoïétique, le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF). Ce dernier s'est avéré être à la fois capable de favoriser la croissance des tumeurs de la prostate et le développement des neurites des fibres parasympathiques dans un modèle dépourvu de fibres sympathiques. De plus, la sécrétion de G-CSF a été associée à un recrutement massif de cellules myéloïdes suppressives au sein du microenvironnement (Dobrenis et al., 2015).

L'ensemble de ces données montre clairement la présence d'un dialogue entre les fibres nerveuses et les cellules tumorales. Ces dialogues apparaissent pro-tumoraux et mettent en place des boucles de rétroaction positive en faveur de la progression tumorale. Concernant l'impact de ces deux acteurs sur le recrutement des cellules immunitaires, un lien direct n'a pas été clairement démontré. Les différentes interactions possibles entre les trois systèmes sont résumées **Figure 16**.

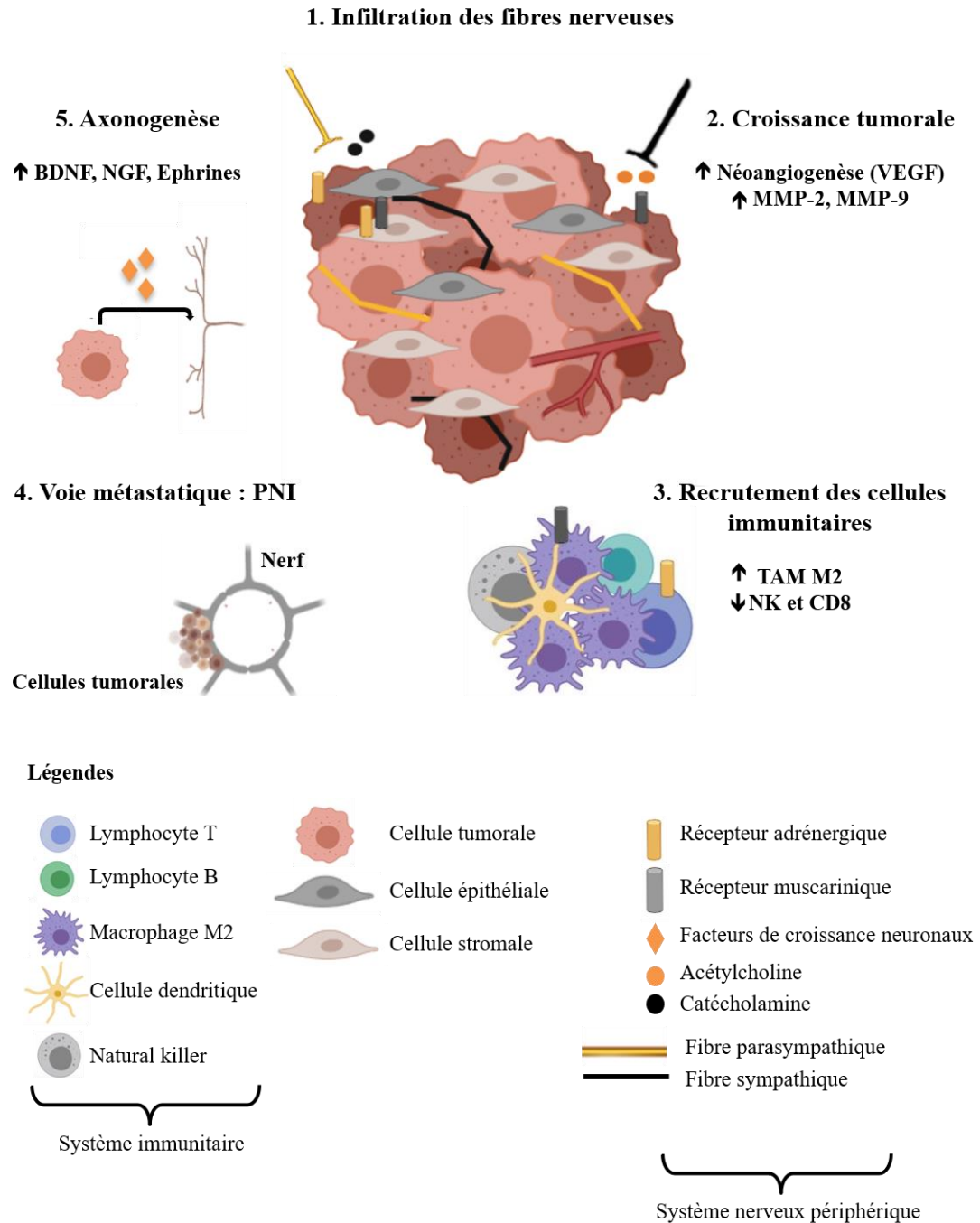


Figure 16. Interactions entre les composantes nerveuses, immunitaires et tumorales au sein du microenvironnement tumoral.

Les fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques infiltrent les tumeurs et sont désormais considérées comme de nouvelles composantes du microenvironnement tumoral. Elles favorisent la croissance tumorale en stimulant notamment l'angiogenèse tumorale via la production du VEGF et l'expression de métallopeptidases (MMP). Ces fibres jouent également un rôle dans le recrutement des populations immunitaires. En particulier, les fibres sympathiques favoriseraient le recrutement des macrophages de type M2 qui inhibent les réponses immunitaires tandis que ces fibres inhiberaient le recrutement des LT CD8⁺ et des cellules NK. Par ailleurs, l'expression des MMP favorisent la

dissémination des cellules tumorales, qui peuvent alors infiltrer les gaines des fibres nerveuses, menant au développement des PNI. Les cellules tumorales peuvent également emprunter ces fibres pour migrer à distance. Les cellules tumorales sont également capables de favoriser l'axonogenèse des fibres présentes en libérant divers facteurs de croissance tels que les éphrines, le BDNF et le NGF. Abréviations: BDNF, brain-derived nerve factor; NGF, nerve growth factor; PNI, invasion péri-neurale; TAM, tumor-associated macrophages; NK, cellule natural killer; MMP-2, matrix métallopeptidase 2; MMP-9, matrix métallopeptidase 9; VEGF, vascular epidermal growth factor.

3.5 Thérapies anti-cancéreuses ciblant le système nerveux

L'implication du système nerveux dans la cancérogenèse en fait une cible majeure pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques. De nombreuses tentatives ont été réalisées dans des explorations précliniques afin d'enrayer la progression tumorale et la mise en place de métastases.

3.5.1 L'utilisation des β -bloquants

Classiquement, les β -bloquants sont prescrits pour l'hypertension artérielle et les maladies cardiaques. Au regard de l'implication du système sympathique dans la cancérogenèse, des études rétrospectives ont été réalisées chez les patients ayant reçu des β -bloquants. Des données épidémiologiques chez les patients ayant des tumeurs de la prostate démontrent que l'administration de β -bloquants non sélectifs (propanolol) est en faveur d'un taux de mortalité moins élevé en comparaison avec les patients non traités (Grytli et al., 2013 ; Grytli et al., 2014). Des résultats similaires ont été observés pour d'autres cancers, tels que les cancers du sein et du pancréas et les mélanomes (Powe et al., 2010 ; Melhem-Bertrandt et al., 2011 ; Lemeshow et al., 2011).

En ce qui concerne les tumeurs NSCLC, des résultats similaires ont également été observés avec ces inhibiteurs, en association avec la radiothérapie. Les patients ayant bénéficié de cette thérapie combinatoire présentent en effet une meilleure survie globale comparativement à ceux n'ayant pas reçu d'inhibiteurs (Wang et al., 2013).

3.5.2 L'utilisation des inhibiteurs des récepteurs muscariniques

L'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs de récepteurs muscariniques a également été suggérée, de nombreuses cellules tumorales exprimant à leur surface ces récepteurs. Seules des études *in vitro* et précliniques ont été menées et ont rapporté un effet anti-tumoral d'inhibiteurs de Chrm3 [le (1,1-Diméthyl-4-diphénylacétoxy)piperédinium iodide, 4-DAMP), la darifénacine, (p-Fluoro-hexahydrosila-difenidol, p-F-HHSiD) (Song et al., 2007).

3.5.3 L'utilisation d'inhibiteurs des facteurs de croissance neuronaux

L'utilisation d'inhibiteurs ciblant le NGF ou le BDNF *in vitro* et dans des modèles précliniques interfère avec la croissance et la prolifération tumorale (Adriaenssens et al., 2008 ; Mantyh et al., 2010 ; Zage et al., 2011). Le ciblage d'autres molécules a également été suggéré, comme celles impliquées dans la guidance axonale, comme l'axe Slit/Robo. Cet axe de signalisation initialement impliqué dans la neurogenèse et la guidance axonale joue un rôle dans la progression tumorale. Dans des modèles murins, l'inhibition de cet axe abroge en effet la croissance tumorale ainsi que la néoangiogenèse tumorale (Wang et al., 2003).

Les nétrines pourraient également représenter des cibles thérapeutiques. L'utilisation de siRNA ciblant la nétrine-1 ou son récepteur est associée à une inhibition de la croissance tumorale ainsi qu'à une réduction du développement de métastases (Fitamant et al., 2008).

4. Le cancer du poumon

4.1 Épidémiologie

Les tumeurs pulmonaires représentent l'une des principales causes de mortalité et demeurent le cancer le plus fréquent. En 2018, 234 030 nouveaux cas ont été détectés aux Etats-Unis (Siegel et al., 2018). Cette maladie affectant aussi bien les hommes que les femmes est souvent détectée à des stades avancés (Stades III et IV selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé) et présente une survie à 5 ans de seulement 15% (de Groot et al., 2018).

D'un point de vue histologique, deux grands types de cancers pulmonaires sont décrits : une forme majoritaire, les tumeurs dites non-à-petites cellules (NSCLC, 85% des cas) et une forme minoritaire, les tumeurs à petites cellules (SCLC, 15% des cas). Du fait de la forte prévalence des tumeurs NSCLC, mon équipe s'est focalisée depuis de nombreuses années sur l'étude de ce sous-type histologique, composé d'adénocarcinomes, de carcinomes épidermoïdes et de carcinomes à larges cellules.

4.2 Étiologie des tumeurs pulmonaires

4.2.1 Le tabagisme

La première cause identifiée des tumeurs pulmonaires est le tabagisme. L'exposition au tabac, la durée et le nombre de paquets fumés augmentent considérablement le risque de développer une tumeur pulmonaire (Dela Cruz et al., 2011). En moyenne, un fumeur sur neuf risque de développer un cancer. Les effets nocifs du tabac sont liés à la présence de diverses substances carcinogènes telles que le goudron, les hydrocarbures, le chrome ou encore l'arsenic.

4.2.2 Les facteurs environnementaux

La seconde place des causes de tumeurs pulmonaires est occupée par le radon ; il serait en cause dans 10% des cas de tumeurs pulmonaires. Cet agent radioactif, présent sous forme de gaz inerte induit lors de sa désintégration des particules alpha pouvant induire des mutations de l'ADN (Krewski et al., 2005). Mais d'autres facteurs en cause sont rattachés à certaines activités professionnelles : c'est le cas de l'amiante et de la pollution aérienne par des particules de silice (Driscoll et al., 2005).

4.2.3 Facteurs génétiques

Des mutations dites « conductrices » (« drivers ») dans certains gènes ont été rapportées comme étant responsables de l'induction de tumeurs NSCLC. Parmi elles, des mutations de récepteurs à activité tyrosine kinase, comme *l'epidermal growth factor receptor* (EGFR). Entre 40 à 80% des tumeurs NSCLC présentent ce type de mutations induisant notamment des altérations de l'apoptose et du cycle cellulaire. D'autres mutations ont été rapportées dans les gènes BRAF (*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) et KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) (Paez et al., 2004 ; Shtivelman et al., 2014).

D'autres anomalies génétiques ont été identifiées, les réarrangements chromosomiques. Une fusion entre les gènes ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) et EML4 (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) est observée dans 6.7% des tumeurs NSCLC, mutuellement exclusive des mutations dans le gène codant l'EGFR (Soda et al., 2007).

Enfin, des études pan-génomiques ont identifié des locus liés au développement de tumeurs pulmonaires : le locus 15q25.1 contient les gènes codant les récepteurs cholinergiques nicotiques. Ces derniers étant associés à la sensibilité nicotinique, il a été suggéré qu'ils pourraient augmenter la dépendance au tabac et par conséquent l'exposition aux agents carcinogènes (Amos et al., 2008) ; le locus 5p15.33 qui code la transcriptase TERT (*human telomerase reverse transcriptase gene*) responsable du maintien des télomères (McKay et al., 2008).

4.3 Traitements

Pour les stades précoces de la maladie (I-II), les premiers traitements proposés sont l'exérèse partielle (pneumectomie) ou totale (lobectomie) de la tumeur suivie de radiothérapie et/ou de chimiothérapie à base de sels de platine.

Pour les stades les plus avancés (III-IV), des chimiothérapies plus ciblées telles que celles utilisant des inhibiteurs de tyrosine kinases, comme l'erlotinib ou le gefitinib (qui inhibent la phosphorylation intracellulaire de l'EGFR), sont proposées lorsque les cellules tumorales sont porteuses de mutations affectant l'EGFR (Paez et al., 2004).

Pour d'autres patients non-répondeurs aux inhibiteurs de tyrosine kinases ou bien ayant développé des résistances, des anticorps dirigés contre des molécules inhibitrices (ICP) de la réponse immunitaire sont proposées. Depuis quelques années, les anticorps inhibiteurs des molécules PD-1/PD-L1 comme le nivolumab ou le pembrolizumab sont autorisés pour traiter des patients présentant des tumeurs NSCLC (Garon et al., 2015). L'administration de ces anticorps

bloque l'interaction entre la protéine membranaire PD-1 exprimée par les cellules immunitaires et son ligand PD-L1 exprimé notamment par les cellules tumorales. Le but de ces thérapies est d'augmenter la réponse immunitaire en favorisant l'activation des lymphocytes cytotoxiques et la production de chimiokines pro-inflammatoires tout en diminuant l'activité des LT régulateurs. Toutefois, seulement 25% à 50% des tumeurs NSCLC expriment PD-L1 . Pour pallier ce problème, d'autres ICP sont ciblés à l'aide de nouveaux anticorps, en monothérapie ou en combinaison avec des anti-PD-L1. C'est le cas de l'anticorps ipililumab, dirigé contre la molécule CTLA-4, qui, combiné avec le nivolumab, a conduit récemment à des effets encourageants dans un essai de phase III (Hellmann et al., 2018). Une autre molécule, appelée *T-cell immunoglobulin and mucin domain-3*, TIM-3, est également ciblée en monothérapie [anticorps TSR-022 (Murtaza et al., 2016)].

Hypothèse et objectifs

Au sein du microenvironnement tumoral, les TLS sont des sites privilégiés pour l'établissement des réponses immunes adaptatives. Leur présence est associée à un meilleur pronostic chez les patients, ce qui en fait à terme d'intéressantes cibles thérapeutiques à manipuler. Pour mes travaux de thèse, au regard des similarités partagées avec les ganglions lymphatiques, j'ai émis l'hypothèse que **la mise en place des TLS ainsi que leur maintien résultaient d'un dialogue avec le système nerveux périphérique**. Plus précisément, j'ai fait l'hypothèse que les **fibres nerveuses présentes au sein du parenchyme pulmonaire lors d'une inflammation chronique pourraient être impliquées dans la genèse des TLS**.

Les objectifs de cette thèse ont donc été :

1) **d'étudier l'innervation des TLS au sein des tumeurs de patients présentant un cancer du poumon non-à-petites cellules (NSCLC)**. Pour ce faire, j'ai développé une approche d'imagerie 3D pour résoudre le problème posé par l'imagerie classique à deux dimensions qui rend difficile l'étude des interactions entre fibres nerveuses et cellules et structures du système immunitaire et ne permet pas de les localiser dans l'espace les uns par rapport aux autres. En collaboration avec le Dr Isabelle Brunet (Collège de France), j'ai adapté le marquage tridimensionnel iDISCO [(imaging of solvent-cleared organs (Renier et al., 2014 ; Renier et al., 2016))] aux biopsies tumorales incluses en paraffine (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded). Ce travail a permis de développer une approche qui permet désormais de déterminer la structure tridimensionnelle des TLS et leur éventuelle co-localisation avec des fibres nerveuses, tout en pouvant analyser les protéines et leurs modifications post-traductionnelles composant les biopsies FFPE utilisées pour cette imagerie.

2) **d'étudier l'impact de ces fibres nerveuses dans la formation et le maintien des TLS en utilisant deux modèles murins d'inflammation pulmonaire, l'un non tumoral, l'autre tumoral**. J'ai centré mes travaux sur l'impact des fibres nerveuses sympathiques dans la genèse des TLS au sein de ces modèles précliniques. J'ai analysé dans le modèle d'inflammation non tumoral la cinétique d'apparition et de disparition des TLS et le contrôle exercé par les fibres sympathiques sur leur formation. Le modèle tumoral que j'ai développé m'a permis non seulement d'évaluer l'impact de la délétion des fibres sympathiques par une approche pharmacologique non seulement sur la formation des TLS mais également sur le développement tumoral. Les résultats

de ces travaux sont présentés ci-dessous, l'un sous forme d'un manuscrit soumis à *Nature Communications*, l'autre d'un manuscrit en préparation.

Résultats

Manuscrit #1. *Tissue-Cleared 3D imaging followed by protein analysis: a single biopsy, multiple informations*

Présentation

Les techniques actuelles d'immunohistochimie et d'immunofluorescence ont beaucoup apporté à l'étude du microenvironnement tumoral. En particulier, grâce à ces techniques, des réponses ont été apportées concernant l'organisation des cellules immunitaires au sein des tumeurs. En 2008, mon équipe a ainsi démontré la présence de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) au sein des tumeurs pulmonaires de type NSCLC. De plus, de récents travaux ont montré l'infiltration de fibres nerveuses au sein de diverses tumeurs, telles que celle de la prostate ou encore les tumeurs gastriques (Magnon et al., 2013 ; Zhao et al., 2014). Cette nouvelle composante nerveuse se doit d'être intégrée dans les études du microenvironnement tumoral pulmonaire. Malgré les avancées considérables dans le domaine de l'immunohistochimie, les marquages de type 2D restent limités quant au type d'informations qu'ils peuvent apporter à cet égard.

Afin d'avoir une vision intégrée des interactions entre systèmes immunitaire, nerveux et vasculaire, nous avons donc choisi de développer des études tridimensionnelles sur des biopsies de patients NSCLC. En collaboration avec le Dr. Isabelle Brunet et son équipe, nous avons modifié le protocole standard iDISCO⁺ pour pouvoir étudier des échantillons humains et murins inclus en paraffine (FFPE, *formalin fixed paraffin-embedded tissues*). La technique iDISCO⁺ est classiquement utilisée sur des organes frais et fixés en paraformaldéhyde (PFA). Des modifications ont été apportées à ce protocole, notamment l'utilisation d'un démasquage antigénique pour certains marqueurs de cellules immunitaires (DC-Lamp) et nerveuses (*neurofilament heavy chain*, NF-H). Des extractions protéiques ont pu être couplées à l'issue de la transparence grâce à la sélection d'un tampon d'extraction optimisé, permettant la détection de protéines de hauts ou bas poids moléculaires, phosphorylées ou non. Nous avons nommé cette nouvelle technique associant immunomarquages et analyses de protéines piDISCO⁺ (*protein immunolabeling 3D imaging of solvent-cleared organs*).

Cette première partie de mon travail de thèse ouvre la voie à une analyse intégrée de l'architecture des tumeurs solides et des protéines les composant. A terme, il pourrait aider à orienter le traitement thérapeutique à partir d'un simple échantillon FFPE ainsi analysé. En effet, l'évaluation de l'infiltrat immunitaire et de l'architecture globale de la tumeur par marquages tridimensionnels, suivie d'une analyse protéique, pourraient fournir à terme, des informations sur l'évolution de la pathologie.

**Tissue-cleared 3D imaging followed by protein analysis:
a single biopsy for multiple information**

Safa Azar^{1#*}, Laïla Letaïef^{2,3,4#}, Guy Malkinson¹, Sabrina Martin¹, Pierre Validire⁵, Jean-Luc Teillaud^{2,3,4*}, Marie-Caroline Dieu-Nosjean^{2,3,4§*} and Isabelle Brunet^{1§*}

¹ Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS, INSERM, PSL Research University, 75231 Paris, France.

² Sorbonne Université UMRS1135, Faculté de Médecine Sorbonne Université, Paris, France, 75013 Paris, France

³ INSERM U1135, 75013 Paris, France

⁴ Laboratory “Immune Microenvironment and Immunotherapy”, Centre d’Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI-Paris, 75013 Paris, France

⁵ Department of Pathology, Institut Mutualiste Montsouris, 75014 Paris, France

#These authors contributed equally to this work

§Senior co-authors and corresponding authors

*** Corresponding authors**

***E-mails: marie-caroline.dieu-nosjean@inserm.fr ; isabelle.brunet@college-de-france.fr**

Abstract

Biomedical samples are commonly stored or directly used for histology examination that requires their inclusion in paraffin (FFPE). Genomic analyses, as well as protein composition and signaling pathway activation, have already proven to be useful in diagnostic and therapeutic choice. The emergence of tissue clearing techniques to visualize tissue remodeling makes it now possible to evaluate tissue composition and heterogeneity, particularly in oncology and neurobiology.

We propose here piDISCO⁺, a novel process that allows to assess, from one single sample, the three dimensional (3D) cellular and tissue architecture together with the biochemical protein content. piDISCO⁺ includes 3D-imaging of entire murine organs and lung tumor samples of patients following an iDISCO⁺-modified method adapted to FFPE samples, and the subsequent isolation and analysis of proteins and post-translational modifications. Our finding allows to extract both information from a single biopsy, and to ensure not to misinterpret results depending of biopsy heterogeneity. Overall, this optimized protocol makes it possible to scientists and clinicians to quantitatively link protein levels with tissue structure within a single biopsy.

Introduction

Formalin fixation followed by paraffin embedding (FFPE) is the standard method used in health institutions after surgery and biopsy removal. Clinicians rely on histological sections and their examination as a regular routine for diagnosis^{1,2}. However, over the last few years, tissue clearing methods have emerged to study large biological samples such as whole murine organs. Those techniques, like 3DISCO (3D imaging of solvent-cleared organs)³, iDISCO (immunolabeling-enabled 3D imaging of solvent-cleared organs)⁴, or CUBIC (clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis)⁵ among others, allow high resolution three-dimensional (3D) imaging of specimens from various organs, of perinatal mouse embryos (E14.5) or even of adult mouse or rat whole body⁶ with single-cell resolution. Further amelioration in the clearing tissue process to prevent the organ shrinkage observed with iDISCO has finally led to the setting of a second-generation technique, termed iDISCO⁺⁷.

These methods present several major advantages such as to reveal complex networks of interactions between different deep tissue structures such as vasculature, innervation and cell aggregates thanks to whole-mount immunolabeling of pre-defined molecular targets^{4,8}. Recently, it became possible to perform quantitative cellular analysis in large tissue volumes using clearing-enhanced 3D microscopy⁹. In addition, 3D imaging based on these new clearing methods may have the immense benefit of disclosing interactions between cancer cells and tumor microenvironment, allowing for a better comprehension of how heterogeneous cell populations and structures interact inside the tumor mass. 3D imaging performed in a tumor mouse model allowed recently the visualization of the brain microvasculature and of the route of invasion by glioblastoma cells as well as the quantification of certain brain vasculature characteristics (branching, lengths, diameter...) in the tumor core¹⁰. Another study has shown that 3D light-sheet microscopy of cleared solid tumors identifies phenotypic heterogeneity in angiogenesis and in the epithelial-to-mesenchymal transition at single-cell resolution in whole FFPE biopsy samples¹¹. The same authors also showed that staging of tumors and stratification of patient prognosis could be determined with higher accuracy with this tumor phenotyping technique.

Thus, 3D imaging makes it possible to investigate the architecture of solid tumors by allowing deep imaging of whole tissues. It could bring new insights in our understanding of biological processes by allowing a high-resolution mapping of cell localization, a detailed characterization of cell phenotype and activation stage.

Nonetheless, whether this can be related to molecular tumor analyses is still a challenging issue. Genomic and RNA-based methods have been used to define molecular pathways and molecules involved in cancer initiation and development^{12,13} enabling the development of targeted therapy and personalized medicine. However, these techniques require tissue dissociation, preventing therefore to spatially relate the cellular and molecular components present within and around tumors. In addition, the human proteome exhibits massive post-translational modifications, making difficult to depict precisely the protein landscape¹⁴⁻¹⁷ when using RNA profiling. Similarly, DNA sequencing studies have highlighted a variety of patterns of tumor evolution at the DNA level that could reflect differences in tumor architecture¹⁸.

Thus, identifying where distinctive cell types are situated inside/around the tumor, which protein, eventually phosphorylated, as a marker of a given molecular pathway is expressed and how the different cellular and molecular networks are remodeled along tumor evolution is a major challenge for a better understanding of tumor progression and control. Furthermore, it has been reported that FFPE brain tissue from patients with Alzheimer's disease could be treated in a way that enables the proteomic analysis of neurons micro-dissected from these FFPE samples¹⁹. This study also showed that localized proteomics can be performed with FFPE tissue using multiple lysis methods on the same sample, including formic acid digestion useful when insoluble aggregates of proteins are present but incompatible with immunostainings, allowing the detection of different populations of proteins¹⁹. However, to date, no study has determined whether it is possible to use the same tissue sample to perform 3D reconstruction followed by protein characterization, an approach that can open new avenues for an integrated analysis of protein expression and cellular networks within tumors and in surrounding tissues as tumor microenvironment is highly heterogeneous from one area to another.

Here, we present a workflow that makes it conceivable to perform an in-depth spatial and molecular characterization of FFPE in mouse and human, normal and tumor tissues. Entire murine organs and lung tumor samples of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) were first 3D-imaged by ultramicroscopy following an iDISCO⁺-modified method adapted to FFPE samples (that we termed piDISCO⁺). This allowed the spatial localization of nerve fibers and immune cells, in addition to vasculature, in normal tissues (brain, spleen and kidney) and in lung tumor samples. Tertiary lymphoid structures (TLS) which exhibit similarity with lymph nodes and develop in most solid tumors in particular lung tumors²⁰ could be also visualized and localized in the latter samples

using piDISCO⁺. Importantly, the FFPE samples submitted to the clearing technique used for piDISCO⁺ imaging could be then successfully processed using an adapted protocol to extract and analyze proteins exhibiting low or high molecular weights, eventually phosphorylated. Thus, this workflow represents a useful tool to (i) decipher the 3D architecture of various structures within solid FFPE tumors and follow-up its evolution along tumor progression and cancer treatment and (ii) integrate this architecture with the protein landscape of the same FFPE samples.

Results

3D imaging and comparison of mouse PFA-fixed vs FFPE samples.

First, we examined whether the tissue clearing of mouse FFPE samples can be used for 3D imaging. The clearing step was based on the iDISCO⁺ protocol⁷, but optimized to perform 3D immunostaining of FFPE samples followed by protein extraction (hereafter termed “protein immunolabeling 3D imaging of solvent-cleared organs”, piDISCO⁺). In this piDISCO⁺ protocol, an antigen retrieval step can be included if mandatory for some primary antibodies.

Before applying the optical clearing technique, deparaffinization at 70°C followed by overnight incubation with Clearene solution at room temperature (RT) and ethanol bathes were used to guarantee the entire removal of paraffin. Since formalin fixation and the subsequent paraffinization procedure compress the texture of the biopsy, incubation times for both primary and secondary antibody labeling were extended by one additional day per antibody incubation time, as compared to the classical iDISCO⁺ protocol, to ensure a better antibody penetration into the tissue (Fig. 1a and see the Methods section). Then, we examined whether clearing paraffin-embedded samples provoked changes in tissue structure and immunostaining characteristics in comparison with PFA-fixed piDISCO⁺ cleared samples.

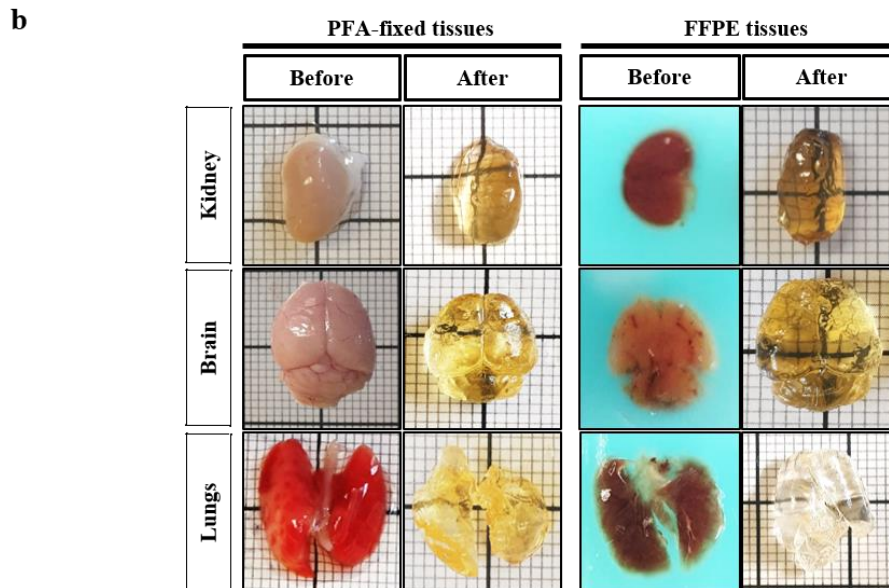
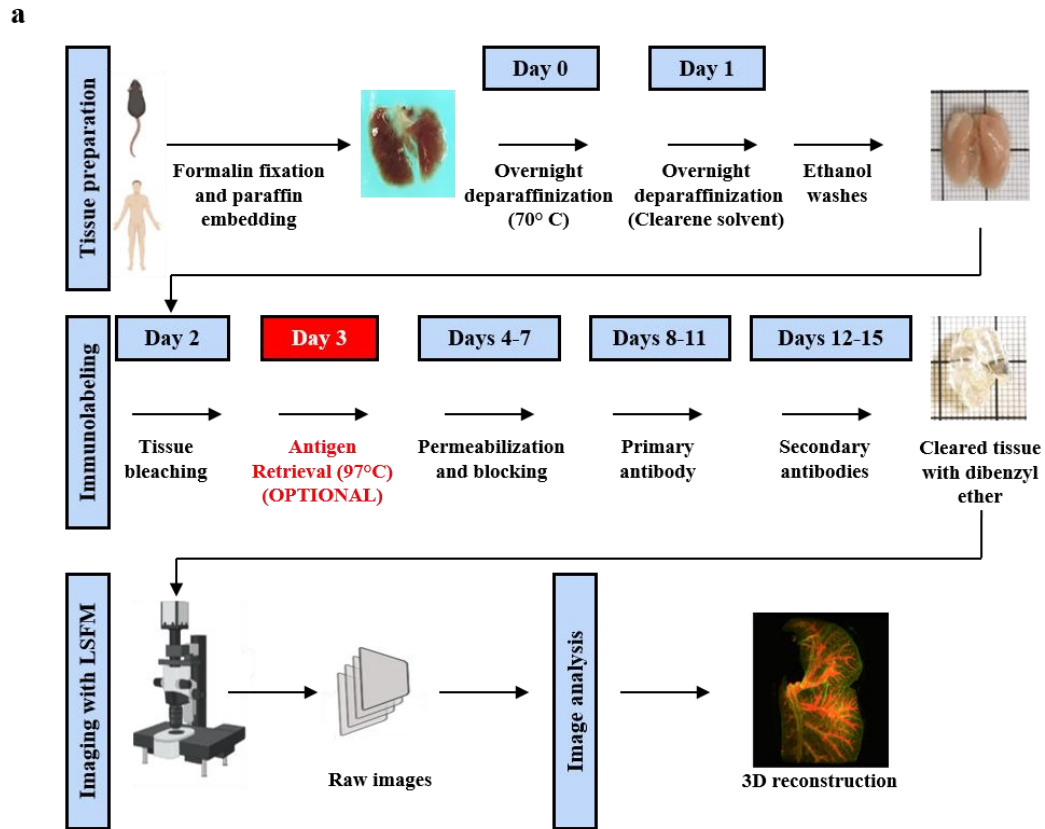


Figure 1. Overview of the clearing workflow. **a**, Presentation of the piDISCO⁺ protocol suitable for human and mouse FFPE samples; **b**, Murine kidney, brain and lungs before and after optical clearing with the piDISCO⁺ protocol for PFA-fixed tissues and FFPE tissues.

At the gross anatomical level, neither structural artifacts such as tissue deterioration nor a significant shrinkage or swelling were detected in any of the fixed tissues (kidney, brain, and lungs) in both conditions (Fig. 1b). Alpha smooth muscle actin (α -SMA, a marker of myofibroblasts surrounding blood vessels) staining of both PFA-fixed and FFPE murine kidneys, was performed using the piDISCO⁺ protocol. Using light-sheet fluorescence microscopy (LSFM), 3D images acquired were reconstructed. As shown in Fig. 2a,c, kidney vascularization was intact in cleared tissues that were preserved in either PFA-fixed or FFPE samples (Supplementary videos 1 and 2). The tissues showed similar patterns of vascularization (Fig. 2a,c), uncovering the various subdivisions from the renal artery to smaller arterioles, with the same level of detail visible in both conditions. At higher magnification, single smooth muscle cells were visible in FFPE samples (Fig. 2b, red arrows).

The total area and the entire volume of the α -SMA immunolabeling were then quantified with the Imaris software. No significant difference was identified between both types of samples (Fig. 2d), showing that both fixation and pre-clearing (removal of paraffin) treatments do not affect the outcome of the staining.

These results were further confirmed on the vasculature pattern on another well described circulatory structure, the circle of Willis, in PFA-fixed or FFPE mouse brains. Arterial anastomosis at the base of the brain was distinguishable whatever the fixation protocol used (PFA-fixed or FFPE tissue) (Fig. 2e) (Supplementary videos 3 and 4). Qualitatively, the overall structure of the circle of Willis was visible, including the posterior communicating arteries and the middle cerebral arteries. In addition, antibody penetration depth (at least 400 μ m) was similar in both samples (Fig. 2f) in cerebral cortical tissue.

Since the technique reveals a strong conservation of the general anatomical structures and of antigen expression and recognition in paraffin-embedded tissues, only FFPE samples were analyzed in subsequent 3D imaging.

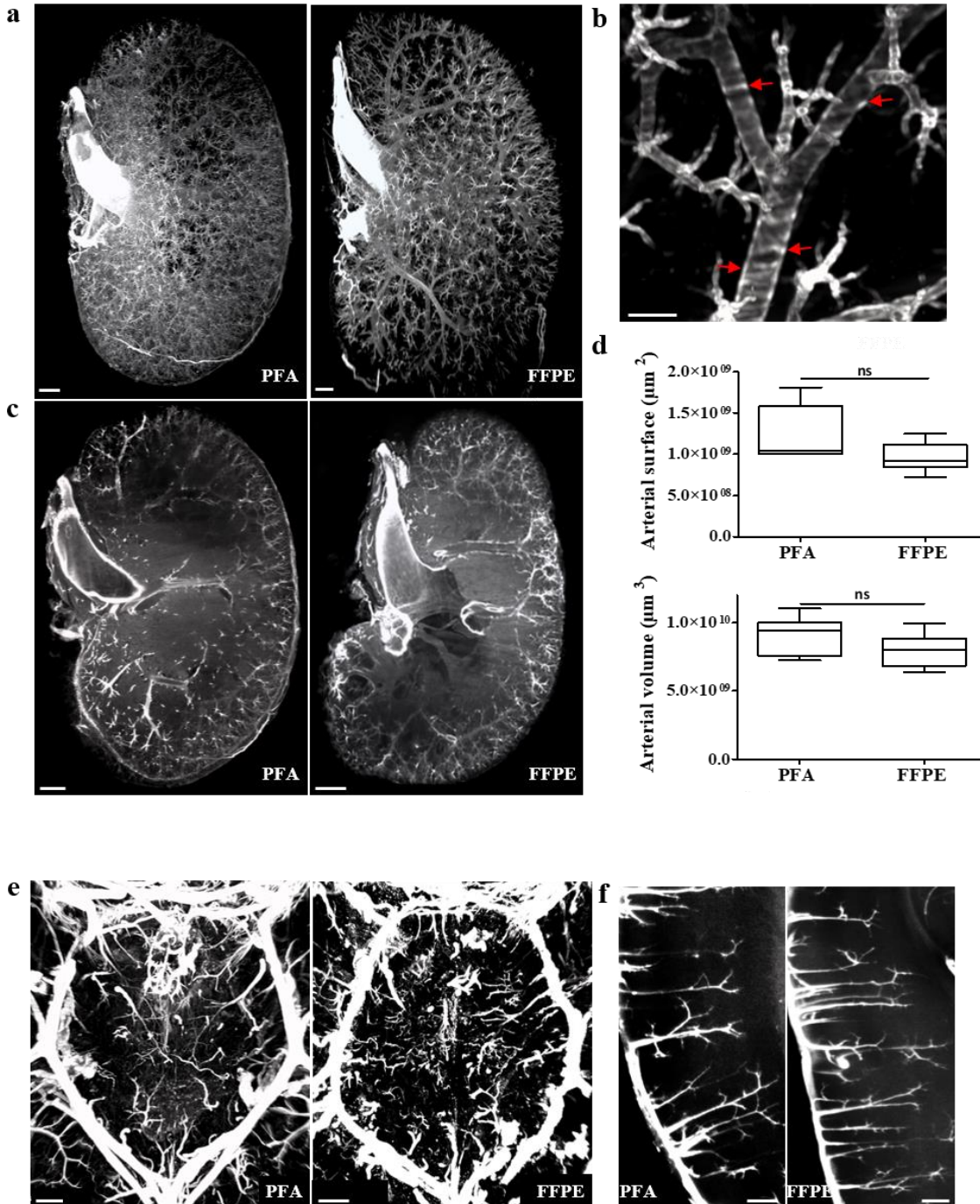


Figure 2. Integrity of vascular structures following tissue clearing of PFA-fixed or FFPE mouse tissues. **a**, 3D view of α -SMA staining in PFA-fixed kidneys (left panel) and FFPE kidneys (right panel); **b**, Magnification of FFPE kidney showing an α -SMA⁺ vessel wall. Arrows point to smooth muscle cells in vessel walls; **c**, Optical sections at an imaging depth of 600 μ m (left panel, PFA-fixed kidney and right panel, FFPE kidney); **d**, Quantification plots of kidneys α -SMA⁺ areas (upper graph) and volumes (lower graph) from both types of tissues (n= 8 for PFA-fixed kidneys and n= 5 for FFPE kidneys). Data are represented as mean $\pm$ SEM. ns: not significant. The two-tailed Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. **e**, 3D view of α -SMA labeling in the circle of Willis of PFA-fixed (left panel) and FFPE (right panel) brains; **f**, Optical sections of the cerebral cortex of PFA-fixed (left panel) and FFPE (right panel) brains. Scale bars: **a**, **c**, **e**, 500 μ m; **b**, 100 μ m; **f**, 200 μ m.

3D imaging of human FFPE biopsies.

piDISCO⁺ clearing was then performed on human FFPE tissues (i.e. lungs from patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) collected between 4 to 7 years ago as well as cortex, lungs and tonsils) to evaluate the level of cellular details visible when the piDISCO⁺ protocol is used, even on samples collected years ago. In this setting, tissue immunolabelling should not exhibit a decreased antigenicity as studies have reported stable antigenicity of tissue sections from blocks over different periods following embedding²¹.

Immunostaining of α -SMA revealed vascular patterns of the lung tissue of NSCLC patients (Fig. 3a; left panel, 3D imaging; right panel: 2D imaging with red arrows indicating small arteriole vessels and asterisk a large bronchiole; see also Supplementary video 5). The expression of tyrosine hydroxylase (TH), a marker of the sympathetic nervous fibers^{22,23} that plays a key role in lung function and neuroinflammation responses^{24,25,26} was then surveyed. Thin TH⁺ fibers were found close to α -SMA⁺ vasculature, surrounding arteries as expected (Fig. 3b, indicated by arrows)²⁷. piDISCO⁺ also allowed the detection of CD20⁺ B cells in lung tumors (Fig. 3c) and their localization and 3D organization in tertiary lymphoid structures (TLS) (Fig. 3c, right panel) as previously reported in lung tumor from NSCLC patients²⁸.

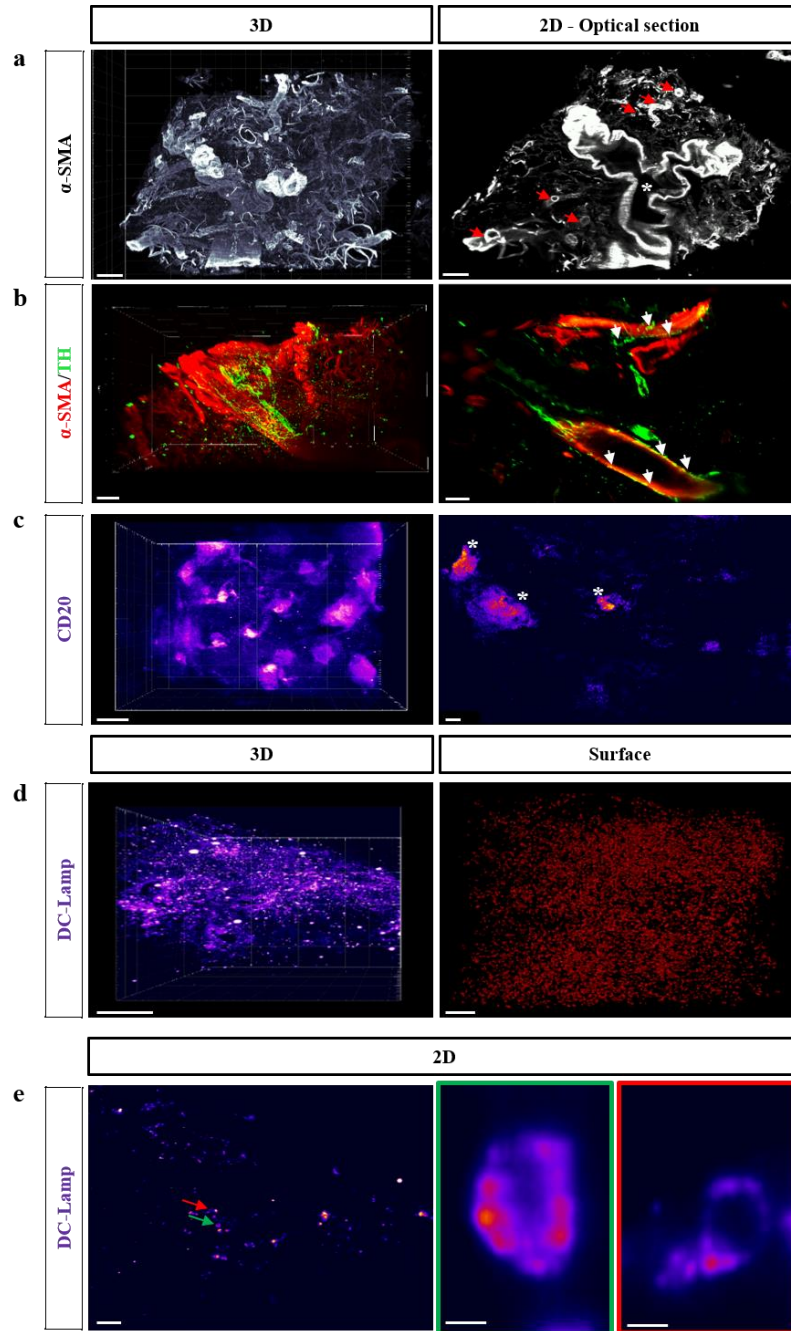


Figure 3. 3D imaging of cleared FFPE-fixed human lungs. 3D and 2D views of LSFM data from non-tumor distant **a**, **b**, **d**, and **c**, tumor lung specimens of NSCLC patients. 2D views are single plans from the 3D imaging. **a**, α -SMA staining represented in white. Asterisks show the bronchial spaces delimited with α -SMA staining. Red arrows show vascular staining. **b**, TH (green)/ α -SMA (red) staining. White arrows designate TH⁺ fibers in direct contact with α -SMA stained vessels. **c**, CD20 staining is represented in pseudo-colors that reflect the intensity of the labeling (from low density in purple to high density in white). TLS-B cells are highlighted by asterisks (right panel) **d**, 3D DC-Lamp immunostaining. The right panel represents the surface created for background subtraction using sphericity threshold to filter the noise due to bronchial and vascular empty spaces. **e**, 2D DC-Lamp immunostaining obtained after surface reconstruction. Red and green arrows indicate DC-Lamp⁺ cells. Scale bars: **a,b,c:** 3D imaging, 300 μ m, 2D optical sections: 100 μ m; **d**, 100 μ m; **e**, left panel, 50 μ m, middle and right panels, 5 μ m.

The clearing protocol also allowed the detection of CD20⁺ B cell follicles in the close vicinity of TH⁺ sympathetic nerve fibers in human palatine tonsils (Fig. 4 a,b and Supplementary video 6).

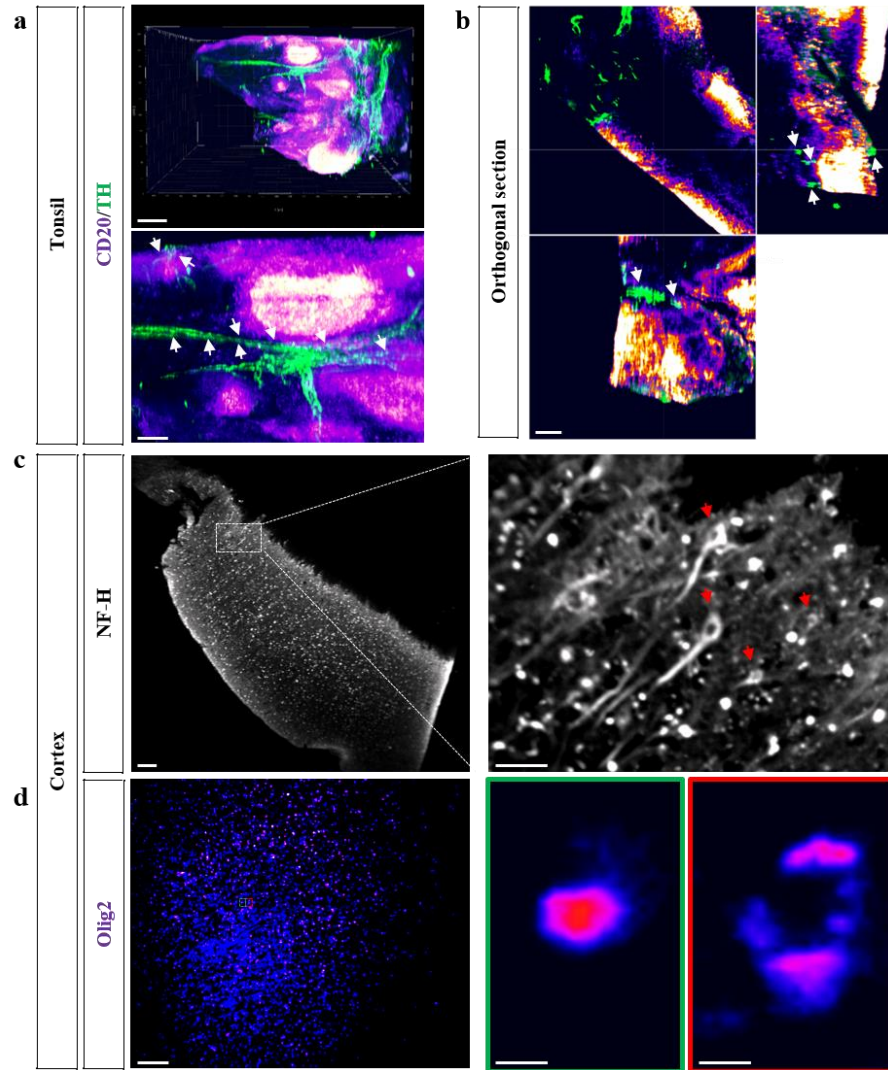


Figure 4. 3D representation and computational reconstruction of cleared FFPE human tonsil and cortex. **a, b,** 3D view of CD20⁺ cells (from low density in purple to high density in white) and TH (green) immunostaining in human tonsil. The lower panel (**a**) and the orthogonal sections (**b**) show close contacts between CD20⁺ B cell follicles and TH⁺ sympathetic nerve fibers. **c,** 3D image of human cortex NF-H⁺ neurons (white). The right panel is a magnification of the boxed area indicated on the left panel. It shows a distinguishable profile of NF-H neurons cell body and neuronal fibers (red arrows); **d,** Olig2 immunostaining in human cortex (from low density in purple to high density in red). Red-contoured box shows a cytoplasmic localization of Olig2. Green-contoured box shows a nuclear and perinuclear expression of Olig2. Scale bars: **a,** upper panel, 300 μ m, lower panel, 150 μ m; **b,** 150 μ m; **c,** left panel, 150 μ m, right panel, 50 μ m; **d,** left panel, 50 μ m; right panel, 5 μ m.

Cell morphology and organization resembled significantly to what was observed in 2D sections staining without FFPE treatment (Supplementary Fig. 2).

The ability to detect subcellular structures was illustrated using various human tissue samples and antibodies that required antigen retrieval. An antigen retrieval step was therefore inserted into the workflow before staining by antibodies known to be sensitive to formalin fixation that leads to antigen masking. A piDISCO⁺ protocol including the antigen retrieval step (Fig.1a) allowed the detection with a high resolution of DC-Lamp molecules within intracellular vesicles of type II pneumocytes in lung (Fig. 3d, lower right panels). The efficacy of the piDISCO⁺ protocol including antigen retrieval was also illustrated using human cortex samples. Neuro-filament heavy chain (NF-H) was stained following antigen retrieval (Fig. 4c and Supplementary video 7). Neuronal cell bodies and axons were also detected (Fig. 4c, white arrows in right panel) while the control tissue not subjected to antigen retrieval did not reveal any positive staining for NF-H (Supplementary Fig. 1). Magnification of the boxed area indicated on the left panel of fig.4c shows NF-H neurons cell body and fibers (red arrows) in the right panel. Lastly, glial progenitor cells exhibited the Olig2 transcription factor and were distinguishable within the tissue, uncovering with a sub-cellular resolution nuclear and cytoplasmic localization of Olig2 (Fig. 4d).

Altogether, these data establish that this clearing method adapted to FFPE tissues, with or without antigen retrieval, enable an excellent preservation of human tissues, even years after their collection and storage. It paves the way to the use of archived human FFPE tissue blocks for immunolabeling and 3D imaging possibly followed by protein analysis.

Protein quality after extraction from FFPE cleared tissues.

Linking anatomical structures to protein quantification and activity is a major goal to achieve an integrated view of tissue organization and functions. Thus, we established a protocol allowing qualitative and semi-quantitative analysis of proteins ranging from low to high molecular weights, extracted from FFPE tissues submitted to clarification using piDISCO⁺ protocol (Fig. 5a). Murine lung tissues were used to set up the protocol. They were processed with various extraction solutions in combination with different extraction steps (Table 1).

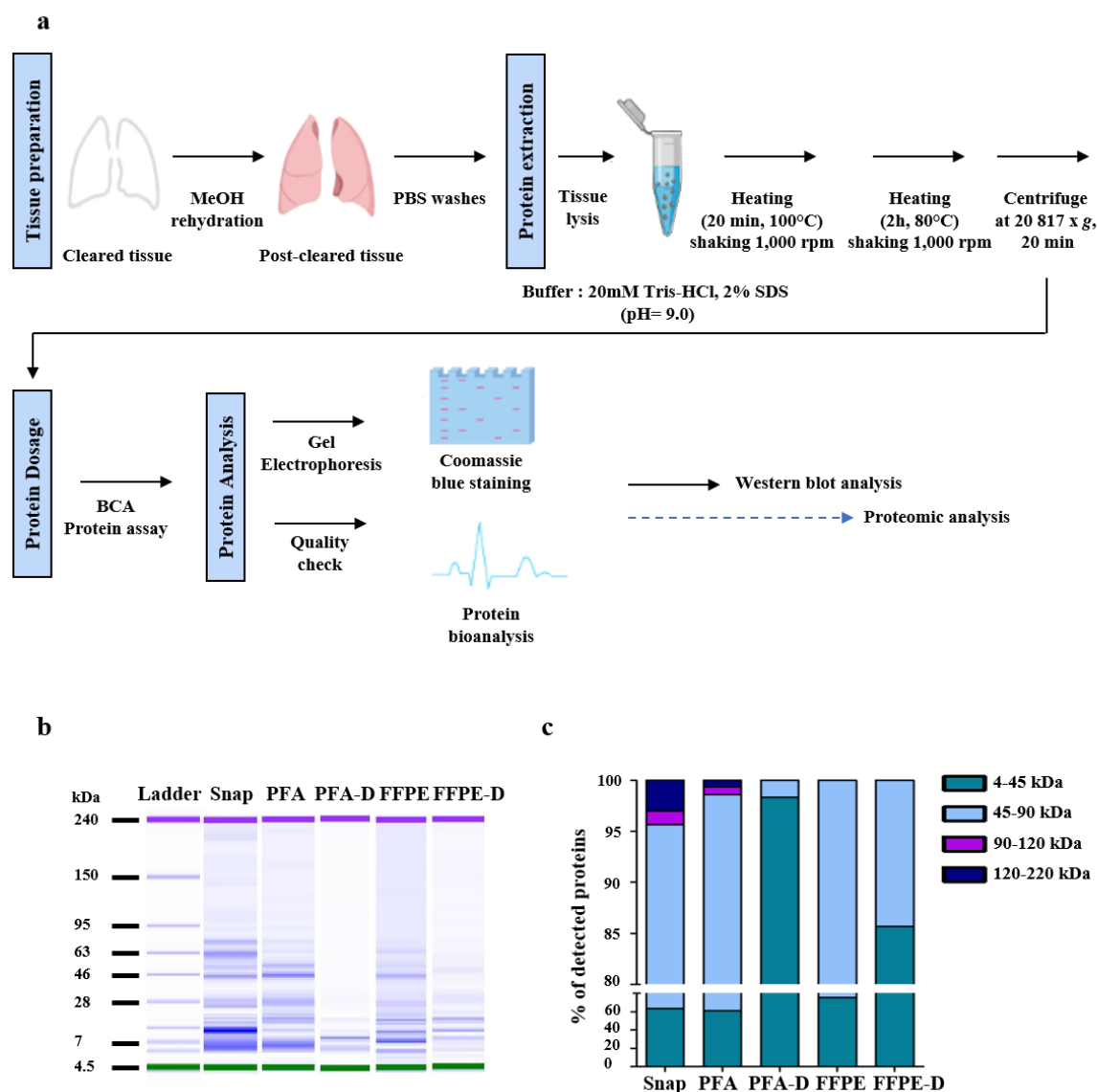


Figure 5. Extraction workflow and quality control of proteins from piDISCO⁺ cleared human and murine tissues. **a**, Schematic representation of the most efficient method (#15) for protein extraction and analysis. **b**, Size analysis of proteins extracted with method #15 from fresh (Snap), PFA-fixed (indicated as PFA) or FFPE murine lungs before and after (indicated as -D) clearing using an Agilent Bioanalyser (left panel). **c**, Percentages of proteins were stratified into four categories according to their molecular weights among total proteins extracted from fresh, PFA-fixed and FFPE murine lungs before and after clearing using Agilent Biolanalyser.

Since the last step of piDISCO⁺ ends with a dehydration, cleared FFPE samples were rehydrated in decreasing methanol baths (90 to 10% MeOH) (Fig. 5a). Rehydrated cleared FFPE tissues were then incubated in one of eight tested different extraction buffers, heated with 1,000 rpm shaking at 100°C for 20 min with a further incubation at 80°C for 2 min or not, as further heating results in higher amounts of extracted peptides and proteins^{29,30} (Table 1). Coomassie blue staining of SDS-PAGE gels revealed more intense bands with lysate samples submitted to the 80°C heating step as compared to non-80°C heated rehydrated tissues (data not shown). Overall, testing all the different conditions showed that method #15 (Table 1) was the most efficient to obtain the highest protein extraction yield with a large molecular weight ranges from FFPE-cleared samples. We then compared mouse lung FFPE samples submitted or not to piDISCO⁺ with PFA-fixed also submitted or not to piDISCO⁺ and with snap-freeze fresh tissues using the method #15 (Fig. 5b,c). As expected, snap-freeze fresh tissues showed the protein profile with the highest range of molecular weights. Protein profiles revealed also a similar pattern in samples treated by PFA or FFPE (Fig. 5b). Interestingly, following piDISCO⁺ clearing, PFA samples exhibited a dramatic drop in the content of proteins with molecular weights higher than 45 kDa (from 40% to 2%) (Fig. 5c). By contrast, cleared FFPE samples still contained 15% of proteins with molecular weights comprised between 45 and 90 kDa (Fig. 5c). Thus, piDISCO⁺ FFPE samples are usable to quantify and analyze proteins contrary to cleared PFA-fixed tissues.

Comparison of protein yields after antigen retrieval.

Antigen retrieval (AR) is an important step to break the protein cross-links formed by formalin fixation and thereby uncover hidden antigenic sites³¹⁻³³. In the present work, we have shown the importance of AR for several antibodies in the modified piDISCO⁺ workflow (Fig. 3d and 4d, Supplementary Fig. 1). Thus, whether this antigen retrieval step modifies protein extraction yields and quality, following clearing, was next examined. Proteins were extracted from FFPE-cleared murine lung and brain tissues that had been previously subjected to low pH and high pH antigen retrieval, respectively, and from FFPE-cleared tissues not subjected to antigen retrieval.

Although quality control check on Coomassie blue-stained gels demonstrated a similar profile of proteins, protein yields from tissues treated for AR were significantly lower than those of proteins extracted from tissues not subjected to AR (Supplementary Fig. 3).

Protein detection, modification and phosphorylation profiling.

After establishing that the selected extraction method (#15 in Table 1) exhibited high protein yields, western blots were performed. We first tested piDISCO⁺ FFPE samples from murine lungs to evaluate α -SMA presence. Western blot analysis showed a similar band between FFPE and piDISCO⁺ FFPE cleared tissues in comparison to fresh murine lungs (Fig. 6a). Semi-quantification of α -SMA using GAPDH detection showed no significant difference between FFPE and piDISCO⁺ FFPE-cleared samples from murine lungs as compared to each other (Fig. 6b).

However, post-translational modifications profile, which is very informative in biopsies for therapeutic purposes, might be lost due to the clearing process. Thus, we assessed the expression of the total tyrosine phosphorylation in samples from murine lungs. Most of the p-tyrosine phosphorylation was found to be preserved in both FFPE and piDISCO⁺ FFPE-cleared tissues in comparison to fresh lung tissue (Fig. 6c). We then examined whether sumoylation, an intracellular post-translational modification that leads to the covalent attachment of SUMO proteins to other proteins, could be still detected in murine FFPE-cleared lung tissues. SUMO-2 blotting revealed well-resolved bands (from 20 kDa) (Fig. 6d), indicating that post-translational covalent protein sumoylation can be detected in piDISCO⁺ tissues.

We also tested piDISCO⁺ extracted human proteins from lung tumor biopsies of five patients with NSCLC. The p-ERK protein could be equally detected by western blot in all the tumor lung samples tested. A marked difference of α -SMA expression level was observed in the tumor lung sample of one patient while the four others exhibited the same level of α -SMA, possibly due to tumor vascularization heterogeneity (Fig. 6e). Finally, piDISCO⁺-cleared lung samples from two of these five NSCLC patients were tested to compare phosphorylation levels between normal and adjacent tumor lung tissue from the same patient. Western blot analyses showed a noticeable difference in the levels of total tyrosine phosphorylation between normal and tumor lung piDISCO⁺-cleared tissues from the same patient, with a large increase of tyrosine phosphorylation within tumor tissue as expected (Fig. 6f).

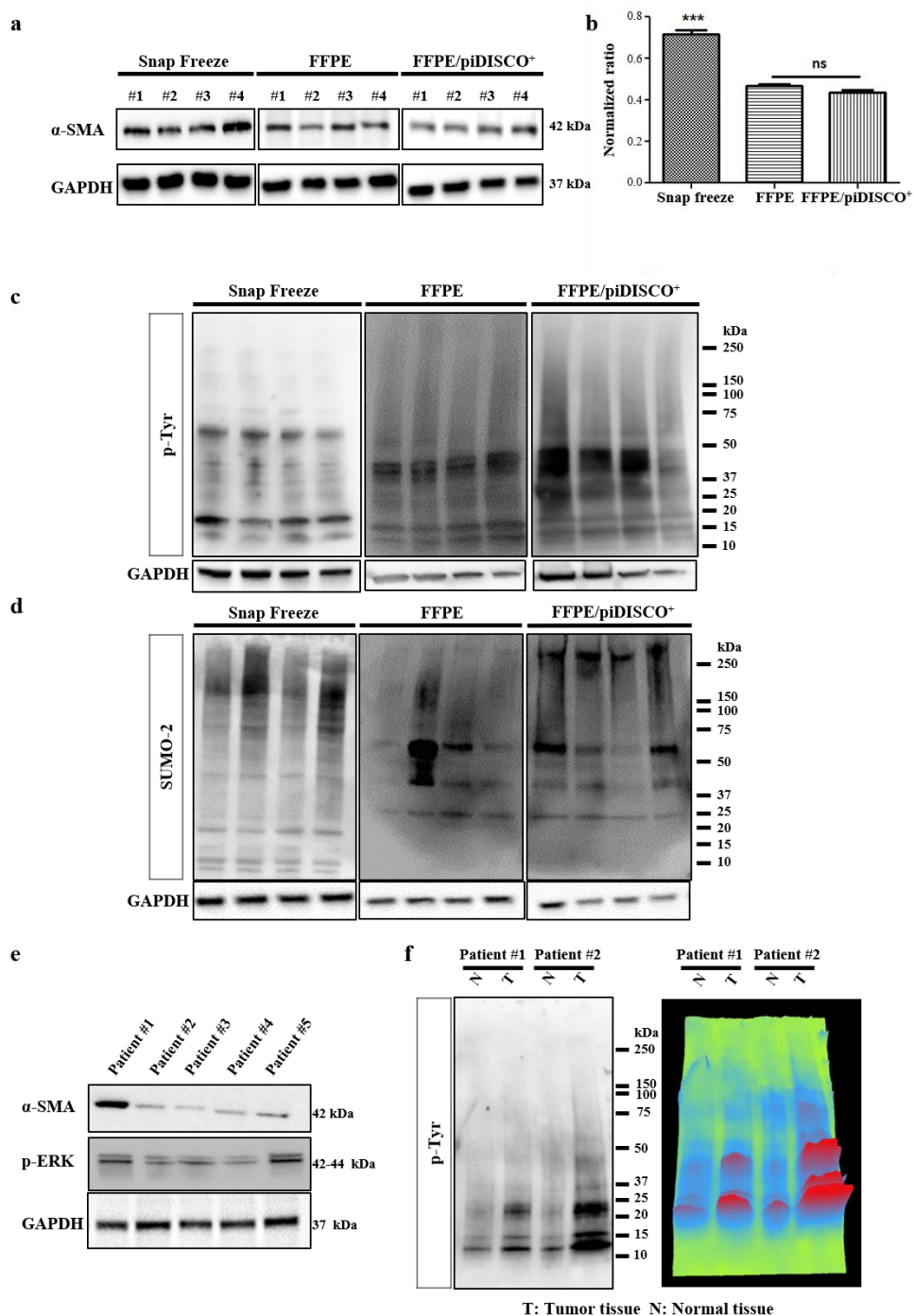


Figure 6. Protein and pTyr-protein assessment by western blot from piDISCO⁺ FFPE-cleared tissues. **a**, Western blot of α -SMA in snap-freeze, FFPE and piDISCO⁺ FFPE-cleared murine lungs; **b**, Quantification of α -SMA expression in murine lungs expressed as GAPDH-normalized ratio; **c**, Tyrosine-phosphorylated proteins from FFPE and FFPE-cleared murine lungs; **d**, Detection of SUMO-2 in snap freeze, FFPE and piDISCO⁺ FFPE-cleared murine lung tissues; **e**, Expression of α -SMA, phospho-ERK and GAPDH in piDISCO⁺ FFPE-cleared lung samples from NSCLC patients; **f**, Total tyrosine-phosphorylated proteins detected by western blot in two patients comparing normal versus tumor tissues (left panel) and 3D representation of heat map quantification of staining (right panel).

Discussion

In the past few years, cleared whole tissue imaging emerged as a potent tool to study the different structures inside organs^{34,35,36,37} and to unravel 3D networks, from cell-to-cell interaction to tissue remodeling. 3D imaging is therefore becoming a necessary method to apply on human tissues, in particular solid tumor, to understand the behavior of cancer cells and get an integrated view of their vascular, neuronal and immune microenvironments. In some cases, this approach represents a major advantage compared to 2D methods (that use tissue sections), notably when the cells of interest have a heterogeneous distribution (hot spots) and/or when the quality of the analysis largely depends on the cutting plane of the tissue (i.e. peripheral nerve fibers), making it difficult to extrapolate to the entire structure of the studied tissue.

The rarity of human tissues for research use and the small sizes of biopsies following surgical tissue resections impose a well-planned use of these samples. The goal of researchers and clinicians is to extract the maximum of information from one sample to decipher the diverse signaling pathways and proteins that play a role in the disease progression. Thus, the concomitant access to tissue reconstruction and characterization of protein levels and post-translational modifications represent a formidable tool to understand the underlying mechanisms that drive disease progression and/or therapeutic disease control.

Our work here presents an optimized combination of two different techniques, imaging and protein analyses of the same tissue sample. As a first step of the method depicted herein, tissue clearing followed by 3D reconstruction of FFPE tissue makes it possible to quantify immunostainings using appropriate software and algorithm. Also, the possibility of adding an antigen retrieval step allows the use of a wider panel of antibodies for a better characterization of the cellular and molecular microenvironment. The second step relies on an adequate protein extraction protocol from tissue samples that renders possible protein analysis after tissue clearing using the same stained sample. These two steps enable to collect anatomico-structural data but also data on protein involved in signaling pathways. Such a combination that requires only one single biopsy could help revealing complex processes occurring within tissues and establishing more precise diagnosis, paving the way for optimized clinical treatment in the context of personalized medicine.

We demonstrate here for the first time the possible re-use of the same tissue sample after a first step of clearing to perform protein extraction. Clearing protocols are based on the use of organic solvents that should not affect the general structure of proteins. Our results show that the quality and quantity of extracted proteins from piDISCO⁺ FFPE-cleared tissue is similar to uncleared samples. Thus, protein bonds induced by formalin fixation protects the tissue even after clearing and ensures a better protein extraction, a case not seen with the PFA-fixed tissues.

α -SMA quantification confirmed the power of the method described here to profile tissue in 3D and at the protein level. Thus, this method could provide a way to quantify structures visualized in 3D, a process that is still a technological lock for large cleared samples. Our results provide the exciting possibility to get an integrated view of the same sample both at the anatomical and protein levels. Taken together, all the results highlight the proposed workflow (Fig. 1a) as an essential routine method to disclose as much as possible of information concerning the biological profile of patients. We also demonstrate that old preserved biopsies could still provide valuable information concerning a given tissue or patient when using the piDISCO⁺ method. This can stand as a powerful tool to extract patient information from previous resections or biopsies (several years ago) and compare them to more recent biopsies from the same patient to study disease evolution, especially at different stages of progression in cancer. Although the experimental workflow presented herein ends with western blot analysis of phosphorylated and sumoylated proteins, it is also usable for more high-end proteomic technics such as mass spectrometry and RPPA analysis.

Methods

Mouse sample collection. Seven to 14-week-old female C57Bl/6 mice were purchased from Janvier laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) and kept under pathogen-free conditions at the animal facility (UMS 028, School of Medicine, Sorbonne University, Paris, France). All animal studies were performed in compliance with the European guidelines and with the approval of the Charles Darwin Ethics Committee for animal experimentation (Paris, France) (agreement N°: A75-13-20). The animals were sacrificed and tissues were collected, snap-freeze in liquid nitrogen and stored at -80°C or fixed in 4% paraformaldehyde and stored at 4°C. In parallel, other tissues were fixed in formalin and embedded in paraffin according to standard histological procedures⁴⁴. Paraffin blocks were stored at room temperature until analysis.

Human samples. FFPE non-tumor distant and lung tumor samples were obtained during surgical resection from the department of Pathology of Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France. NSCLC samples were obtained after informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its protocol approved by the local ethic and human investigation committee (nos. 2017-A03081-52). Human tonsil and cortex tissues were purchased from Geneticist (Glendale, California).

Immunostaining of tissue sections. FFPE human lung, cortex and tonsil sections of 4 µm-thick were deparaffinized at 70°C in 100% Clearane solvent (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) solution and washed in ethanol (EtOH) solution followed by methanol (MeOH) dehydration and slide submersion in ddH₂O. Some tissue sections were immersed either in citrate buffer pH 6.0 (Dako, Agilent Technologies, les Ulis, France; #GV80511-2) [low antigen retrieval (AR) solution] or in EDTA buffer pH 8.0 (Dako; #K800421-2) [high antigen retrieval (AR) solution] for 30 min at 97°C for antigen retrieval. After washing in PBS, tissue sections were then immersed in 100% MeOH solution or in PBS for 3 h at room temperature. Slides were then washed in PBS before blocking with Dako protein block (#X090930-2) for 30 min. Primary antibodies (Supplementary Table 2) were added for 1 h at room temperature. The slides were then washed in PBS-0.04% Tween 20 and incubated with revealing antibodies for 45 min at room temperature. Nuclei were stained with DAPI (ThermoFisher, Waltham, MA) and scanned with the Axio Scanner (Axio Scan.Z1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany).

Whole-tissue clearing - piDISCO⁺, immunolabeling and protein extraction. For tissue clearing, a modified iDISCO⁺ protocol (<https://idisco.info/idisco-protocol/>) was carried out on fresh and FFPE tissue samples. FFPE organs were deparaffinized overnight at 70°C. Then, each tissue was incubated two times in Clearene solvent for 1 h each followed by an additional overnight incubation with Clearene solvent followed by 100% EtOH washes to ensure total removal of paraffin. Freshly recovered organs were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C. PFA-fixed and FFPE samples were then dehydrated in serial MeOH solutions (1 h each; 20% MeOH; 40% MeOH; 60% MeOH; 80% MeOH; 100% MeOH), followed by an overnight incubation in 66% dichloromethane (DCM) (Sigma, Saint Louis, MO; #270997) / 33% MeOH solution at room temperature. After 2 washes in 100% MeOH, samples were bleached in chilled fresh 5% hydrogen peroxidase (H₂O₂), overnight at 4°C. Samples were then rehydrated in serial MeOH solutions (1 h each; 80% MeOH; 60% MeOH; 40% MeOH 20%) and PBS before immunolabeling. All tissues were incubated with primary antibodies for 4 days, except murine brains that were incubated for 7 days with α -SMA-Cy3 antibody (Sigma, Saint-Louis, MO; #C6198) (Supplementary Table 1) to insure a better penetration. For DC-Lamp and NF-H staining, tissues were first incubated in a water bath set at 97°C with citrate buffer pH 6.0 for antigen retrieval (low AR). The revealing antibodies (Supplementary Table 2) were then incubated for 4 days. In order to insure an optimum imaging and deposition on the sample holder, tissue samples with small volumes (such as human samples) were then included in 1.5% agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA; #16500-500). Tissue clearing was then carried out with MeOH dehydration (as described above) followed by a 3 h incubation with 66% DCM/ 33% MeOH. Next, the samples were washed in 100% DCM (2x15 min at RT) and incubated with dibenzyl ether (DBE).

Tissues imaging. Cleared tissues were then imaged using LSFM instrument (Ultramicroscope, LaVision BioTec, Bielefeld, Germany) supplied with an optimized macrozoom microscope (MVX-ZB10, Olympus France, Rungis, France). A customized sample holder was generated by LaVision BioTec to allow a better laser sheets exposure of the tissue. For brains, a metal-spiked pocket was used to clench the specimens. The excitation laser lines of 488, 561 and 647 nm were typically used. Z-step size was selected according to the thickness of the laser sheet. 3 μm images were recorded as the z-step size for α -SMA staining of kidneys, tonsils, lungs and cortex. The z-step size was 4 μm for brain α -SMA staining. Intracellular staining was recorded at 2 μm to insure a better visualization of antibody localization within the cells.

Data were collected in a 16-bit TIFF format. Raw data were converted using the Imaris file converter software 9.3.0 (Bitplane, Zurich, Switzerland) into ims. format and images were processed. Videos were created using Imaris 9.3.0 software (Bitplane).

Blood vessel quantification and Olig2 visualization using Imaris software. Kidney blood vessel areas and volumes were quantified using the Imaris software. Surface of α -SMA positive staining was constructed by smoothing the signaling using a median filter. Absolute intensity was chosen for reconstruction excluding all outer signals, thus eliminating all the background. Suitable thresholds were defined to produce the surface rendering. The final surface construction algorithm was saved and applied on the entirety of each data for PFA and FFPE kidneys and statistical values were extracted for both area and surface. Olig2 surface was created by smoothing the signaling and creation of mask. This mask is considered as a valuable function not on the entire image but only in a region of interest (ROI) in this case Olig2⁺ cells; a filter was then applied to riddle sphericity in order to subtract any non-cell background caused by the nature of the cortex (unperfused tissue) and the presence of lipofuscin as this cortical tissue was obtained from human [Geneticist (Glendale, California)].

Tissue preparation and pretreatment for protein extraction. Mice tissues (brain, kidney and lungs) used for protein extractions were all cleared using the piDISCO⁺ protocol. piDISCO⁺ cleared PFA and FFPE tissues were first washed with PBS without Mg⁺⁺/Ca⁺⁺ (PBS^{-/-}) overnight to remove DBE. Next, MeOH rehydration was performed as described above and samples were washed and incubated in PBS overnight. All the samples were weighed before the protein extraction step to use an adequate volume of protein extraction buffer to ensure high extraction yields.

Protein extraction. The rehydrated piDISCO⁺ cleared tissue samples were resuspended in an appropriate volume with extraction buffers (0.01g:100µL) (Table 1) and lysed using TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany). Samples were then boiled at 100°C for 30 min with 1000 rpm shaking followed by 2 h incubation at 80°C with 1000 rpm shaking using a thermomixer F1.5 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany). Lysates were centrifuged at 20,817 x *g* for 20 min at 4°C. Extraction buffers included (1) RPPA buffer: 1% Triton (wt/V), 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 100 mM Na pyruvate, 1 mM Na₃VO₄, 10% glycerol, 4x SDS⁴⁵, (pH 7.4); (2) 0.2% Zwittergent 3-16 (wt/V), 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 8.0)^{46,47}; (3) 100 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 4% SDS, (pH 9.0); (4) 0.5% PEG 20,000 (wt/V), 100 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 4% SDS (wt/V), (pH 8.0)⁴⁸; (5) 8 mM urea, 2 M theourea, 65 mM DTT, 83 mM Tris-HCl, 4% CHAPS (wt/V)^{49,50}, (pH 9.0); (6) 20 mM Tris-HCl, 2% SDS (wt/V), (pH 2.0); (7) 100 mM Tris-HCl, 2% SDS (wt/V), (pH 7.4); (8) 20 mM Tris-HCl, 2% SDS (wt/V), (pH 9.0).

Gel electrophoresis and Western Blots and Agilent Bionalyzer. Each tissue was weighed and protein extraction buffer was added at a 0.01 g to 100 µL ratio. After protein extraction, the concentration (mg/ml) of each lysate was determined using the BCA Protein Assay Kit (Millipore; #71285-3) that is a detergent-compatible formulation. The protein standards were prepared using the same lysis buffer as the samples. Yields (in µg) were calculated for each sample by dividing the calculated concentration of proteins to the extraction lysis buffer volume that tissue. Protein yields (µg per mg tissue) were then obtained by normalizing the obtained yield in µg to the weight of each tissue sample.

Samples were mixed with Laemmli buffer with 2-beta mercaptoethanol (3:1 V/V) and heated for 5 min at 95°C. 30 micrograms of proteins were separated by SDS-PAGE (4-15% Mini-Protean TGX Precast protein gel) (BioRad, Hercules, CA). Proteins electrophoresis was performed on samples lysed using the different extraction solutions. Gels staining was performed using Coomassie blue. Briefly, after electrophoresis, gels were incubated in Coomassie Blue R-250 staining solution and then incubated in destaining solution containing 10% EtOH and 7.5% acetic acid at room temperature for 3 h. Parallel gels were blotted onto 0.2 mm PVDF membranes (BioRad) and blocked with 5% nonfat dried milk or with 5% BSA in TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) for 2 h, then incubated overnight with a primary antibody at 4°C. After washing with TBST, peroxidase-conjugated revealing antibodies were incubated with the membranes for 1 h at room temperature. Proteins of interest

were then detected by chemiluminescence reaction (ECL). Data were captured with the Fusion FX imaging system (Vilber, Marne-la-Vallée, France) and quantified using Bio1D software (Vilber). 3D representation of western blot was captured using the Fusion software (Vilber). GAPDH detection level was used as a reference to normalize samples.

Percentage of total proteins based on their molecular weight after extraction from snap, PFA-fixed and FFPE murine lungs before and after clearing was determined using Agilent protein chip (Agilent technology, les Ulis, France, #5067-1515). Briefly, extracted proteins were subjected to denaturation (3.5 vol % 1M dithiothreitol) and heated for 5 min at 95°C. Then, denaturated proteins were loaded in a fluorescent gel in the chip. Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technology, les Ulis, France) carried out the lecture of fluorescence.

Statistical analysis. Values are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). GraphPad 6 (San Diego, CA) was used for statistical analysis. For the comparison of kidney α -SMA area and volume quantification, the two-tailed Mann–Whitney U-test was used. Kidney samples were encoded for blind imaging and data analysis. For Western blot α -SMA quantification, a One-way Anova test was used to compare GAPDH-normalized ratios. Statistical significance was accepted for $P < 0.05$. For the western blots, each experiment was replicated at least twice in the laboratory.

References

1. Holdhoff, M. *et al.* The consistency of neuropathological diagnoses in patients undergoing surgery for suspected recurrence of glioblastoma. *J. Neurooncol.* **141**, 347–354 (2019).
2. He, L., Long, L. R., Antani, S. & Thoma, G. R. Histology image analysis for carcinoma detection and grading. *Comput Methods Programs Biomed* **107**, 538–556 (2012).
3. Ertürk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* **7**, 1983–1995 (2012).
4. Renier, N. *et al.* iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* **159**, 896–910 (2014).
5. Susaki, E. A. *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**, 726–739 (2014).
6. Pan, C. *et al.* Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* **13**, 859–867 (2016).
7. Renier, N. *et al.* Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* **165**, 1789–1802 (2016).
8. Ertürk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat. Med.* **18**, 166–171 (2011).
9. Li, W., Germain, R. N. & Gerner, M. Y. Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (Ce3D). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E7321–E7330 (2017).
10. Lagerweij, T. *et al.* Optical clearing and fluorescence deep-tissue imaging for 3D quantitative analysis of the brain tumor microenvironment. *Angiogenesis* **20**, 533–546 (2017).
11. Tanaka, N. *et al.* Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. *Nature Biomedical Engineering* **1**, 796–806 (2017).
12. Raveh, E., Matouk, I. J., Gilon, M. & Hochberg, A. The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis – a proposed unifying theory. *Mol Cancer* **14**, (2015).
13. Baylin, S. B. & Jones, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 726–734 (2011).
14. Goel, R., Harsha, H. C., Pandey, A. & Keshava Prasad, T. S. Human Protein Reference Database and Human Proteinpedia as Resources for Phosphoproteome Analysis. *Mol Biosyst* **8**, 453–463 (2012).
15. Cox, J. & Mann, M. Is proteomics the new genomics? *Cell* **130**, 395–398 (2007).
16. Gholami, A. M. *et al.* Global proteome analysis of the NCI-60 cell line panel. *Cell Rep* **4**, 609–620 (2013).
17. Cusick, M. E. *et al.* Literature-curated protein interaction datasets. *Nat. Methods* **6**, 39–46 (2009).
18. Williams, M. J., Werner, B., Barnes, C. P., Graham, T. A. & Sottoriva, A. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat. Genet.* **48**, 238–244 (2016).
19. Drummond, E. S., Nayak, S., Ueberheide, B. & Wisniewski, T. Proteomic analysis of neurons microdissected from formalin-fixed, paraffin-embedded Alzheimer’s disease brain tissue. *Sci Rep* **5**, 15456 (2015).
20. Dieu-Nosjean, M.-C. *et al.* Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4410–4417 (2008).
21. Xie, R. *et al.* Factors Influencing the Degradation of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections. *J Histochem Cytochem* **59**, 356–365 (2011).
22. Lim, K.-C. *et al.* Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency

- of the sympathetic nervous system. *Nature Genetics* **25**, 209–212 (2000).
23. Mueller, R. A., Thoenen, H. & Axelrod, J. Increase in tyrosine hydroxylase activity after reserpine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **169**, 74–79 (1969).
 24. Irvani, M. M., Kashefi, K., Mander, P., Rose, S. & Jenner, P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* **110**, 49–58 (2002).
 25. Jenei-Lanzl, Z. *et al.* Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 444–451 (2015).
 26. Straub, R. H. *et al.* Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* **57**, 911–921 (2008).
 27. Brunet, I. *et al.* Netrin-1 controls sympathetic arterial innervation. *J Clin Invest* **124**, 3230–3240 (2014).
 28. Germain, C. *et al.* Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 832–844 (2014).
 29. Shi, S.-R., Liu, C., Balgley, B. M., Lee, C. & Taylor, C. R. Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *J. Histochem. Cytochem.* **54**, 739–743 (2006).
 30. Svensson, M. *et al.* Heat stabilization of the tissue proteome: a new technology for improved proteomics. *J. Proteome Res.* **8**, 974–981 (2009).
 31. Shi, S. R., Key, M. E. & Kalra, K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 741–748 (1991).
 32. Shi, S.-R., Liu, C. & Taylor, C. R. Standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: from experiments to hypothesis. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 105–109 (2007).
 33. Shi, S.-R., Shi, Y. & Taylor, C. R. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 13–32 (2011).
 34. Susaki, E. A. *et al.* Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nature Protocols* **10**, 1709–1727 (2015).
 35. Kuwajima, T. *et al.* ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* **140**, 1364–1368 (2013).
 36. Vigouroux, R. J., Belle, M. & Chédotal, A. Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. *Molecular Brain* **10**, 33 (2017).
 37. Yu, T., Qi, Y., Gong, H., Luo, Q. & Zhu, D. Optical clearing for multiscale biological tissues. *J Biophotonics* **11**, (2018).
 38. Ronci, M. *et al.* Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to MALDI-TOF imaging MS investigations. *Proteomics* **8**, 3702–3714 (2008).
 39. Yamashita, S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* **41**, 141–200 (2007).
 40. Hood, B. L. *et al.* Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 1741–1753 (2005).
 41. Guo, T. *et al.* Proteome analysis of microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 763–772 (2007).
 42. Sprung, R. W. *et al.* Equivalence of protein inventories obtained from formalin-fixed paraffin-embedded and frozen tissue in multidimensional liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry shotgun proteomic analysis. *Mol. Cell Proteomics* **8**, 1988–1998 (2009).
43. Chung, J.-Y. *et al.* A well-based reverse-phase protein array applicable to extracts from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Proteomics Clin Appl* **2**, 1539–1547 (2008).
 44. Slaoui, M. & Fiette, L. Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. *Methods Mol. Biol.* **691**, 69–82 (2011).
 45. Guo, H. *et al.* An efficient procedure for protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for reverse phase protein arrays. *Proteome Sci* **10**, 56 (2012).
 46. Shen, K., Sun, J., Cao, X., Zhou, D. & Li, J. Comparison of Different Buffers for Protein Extraction from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissue Specimens. *PLoS One* **10**, (2015).
 47. Méchin, V., Consoli, L., Guilloux, M. L. & Damerval, C. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *PROTEOMICS* **3**, 1299–1302 (2003).
 48. Atha, D. H. & Ingham, K. C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.* **256**, 12108–12117 (1981).
 49. Peach, M., Marsh, N. & Macphee, D. J. Protein solubilization: attend to the choice of lysis buffer. *Methods Mol. Biol.* **869**, 37–47 (2012).
 50. Malafaia, C. B. *et al.* Selection of a protein solubilization method suitable for phytopathogenic bacteria: a proteomics approach. *Proteome Sci* **13**, 5 (2015).

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr A. Joliot for discussions about the manuscript. We are also grateful to NSCLC patients enrolled in the present study. This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Sorbonne University, and the Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB) at the Collège de France. The light-sheet microscope used in this work was funded by the Leducq foundation. L.L. was supported first by a fellowship from the French ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (Ecole doctorale # 394) and then by a fellowship from “La Ligue contre le Cancer”. S.A. was supported by the “Agence Nationale pour la Recherche”.

Author contributions

S.A, J-L.T., M-C.D. and I.B. designed the study. S.A. and L.L. performed the experiments. P.V. provided NSCLC specimens. S.A. and S.M. performed the imaging. S.A. and G.M. performed the 3D image processing and analysis. S.A, L.L. and I.B., M.-C. D.-N. and J.-L.T. wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript text.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Main Figures Caption

Figure 1. Overview of the clearing workflow. **a**, Presentation of the piDISCO⁺ protocol suitable for human and mouse FFPE samples; **b**, Murine kidney, brain and lungs before and after optical clearing with the piDISCO⁺ protocol for PFA-fixed tissues and FFPE tissues.

Figure 2. Integrity of vascular structures following tissue clearing of PFA-fixed or FFPE mouse tissues. **a**, 3D view of α -SMA staining in PFA-fixed kidneys (left panel) and FFPE kidneys (right panel); **b**, Magnification of FFPE kidney showing an α -SMA⁺ vessel wall. Arrows point to smooth muscle cells in vessel walls; **c**, Optical sections at an imaging depth of 600 μ m (left panel, PFA-fixed kidney and right panel, FFPE kidney); **d**, Quantification plots of kidneys α -SMA⁺ areas (upper graph) and volumes (lower graph) from both types of tissues (n= 8 for PFA-fixed kidneys and n= 5 for FFPE kidneys). Data are represented as mean $\pm$ SEM. ns: not significant. The two-tailed Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. **e**, 3D view of α -SMA labeling in the circle of Willis of PFA-fixed (left panel) and FFPE (right panel) brains; **f**, Optical sections of the cerebral cortex of PFA-fixed (left panel) and FFPE (right panel) brains. Scale bars: **a**, **c**, **e**, 500 μ m; **b**, 100 μ m; **f**, 200 μ m.

Figure 3. 3D imaging of cleared FFPE-fixed human lungs. 3D and 2D views of LSFM data from non-tumor distant **a**, **b**, **d** and **c**, tumor lung specimens of NSCLC patients. 2D views are cutting plans from the 3D imaging. **a**, α -SMA staining represented in white. Asterisks show the bronchial spaces delimited with α -SMA staining. Red arrows show vascular staining. **b**, TH (green)/ α -SMA (red) staining. White arrows designate TH⁺ fibers in direct contact with α -SMA stained vessels. **c**, CD20 staining is represented in pseudo-colors that reflect the intensity of the labeling (from low density in purple to high density in white). TLS-B cells are highlighted by asterisks (right panel) **d**, 3D DC-Lamp immunostaining. The right panel represents the surface created for background subtraction using sphericity threshold to filter the noise due to bronchial and vascular empty spaces. **e**, 2D DC-Lamp immunostaining obtained after surface reconstruction. Red and green arrows indicate DC-Lamp⁺ cells. Scale bars: **a**,**b**,**c** : 3D imaging, 300 μ m, 2D optical sections: 100 μ m; **d**, 100 μ m; **e**, left panel, 50 μ m, right panels, 5 μ m.

Figure 4. 3D representation and computational reconstruction of cleared FFPE human tonsil and cortex. **a, b**, 3D view of CD20⁺ cells (from low density in purple to high density in white) and TH (green) immunostaining in human tonsil. The lower panel (**a**) and the orthogonal sections (**b**) show close contacts between CD20⁺ B cell follicles and TH⁺ sympathetic nerve fibers. **c**, 3D image of human cortex NF-H⁺ neurons (white). The right panel is a magnification of the boxed area indicated on the left panel. It shows a distinguishable profile of NF-H neurons cell body and neuronal fibers (red arrows); **d**, Olig2 immunostaining in human cortex (from low density in purple to high density in red). Red-contoured box shows a cytoplasmic localization of Olig2. Green-contoured box shows a nuclear and perinuclear expression of Olig2. Scale bars: **a**, upper panel, 300 μ m, lower panel, 150 μ m; **b**, 150 μ m; **c**, left panel, 150 μ m, right panel, 50 μ m; **d**, left panel, 50 μ m; right panel, 5 μ m.

Figure 5. Extraction workflow and quality control of proteins from piDISCO⁺ cleared human and murine tissues. **a**, Schematic representation of the most efficient method (#15) for protein extraction and analysis. **b**, Size analysis of proteins extracted with method #15 from fresh (Snap), PFA-fixed (indicated as PFA) or FFPE murine lungs before and after (indicated as -D) clearing using an Agilent Bioanalyser (left panel). **c**, Percentages of proteins were stratified into four categories according to their molecular weights among total proteins extracted from fresh, PFA-fixed and FFPE murine lungs before and after clearing using Agilent Biolanalyser.

Figure 6. Protein and pTyr-protein assessment by western blot from piDISCO⁺ FFPE-cleared tissues. **a**, Western blot of α -SMA in snap-freeze, FFPE and piDISCO⁺ FFPE-cleared murine lungs; **b**, Quantification of α -SMA expression in murine lungs expressed as GAPDH-normalized ratio; **c**, Tyrosine-phosphorylated proteins from FFPE and FFPE-cleared murine lungs; **d**, Detection of SUMO-2 in snap freeze, FFPE and piDISCO⁺ FFPE-cleared murine lung tissues; **e**, Expression of α -SMA, phospho-ERK and GAPDH in piDISCO⁺ FFPE-cleared lung samples from NSCLC patients; **f**, Total tyrosine-phosphorylated proteins detected by western blot in two patients comparing normal *versus* tumor tissues (left panel) and 3D representation of heat map quantification of staining (right panel).

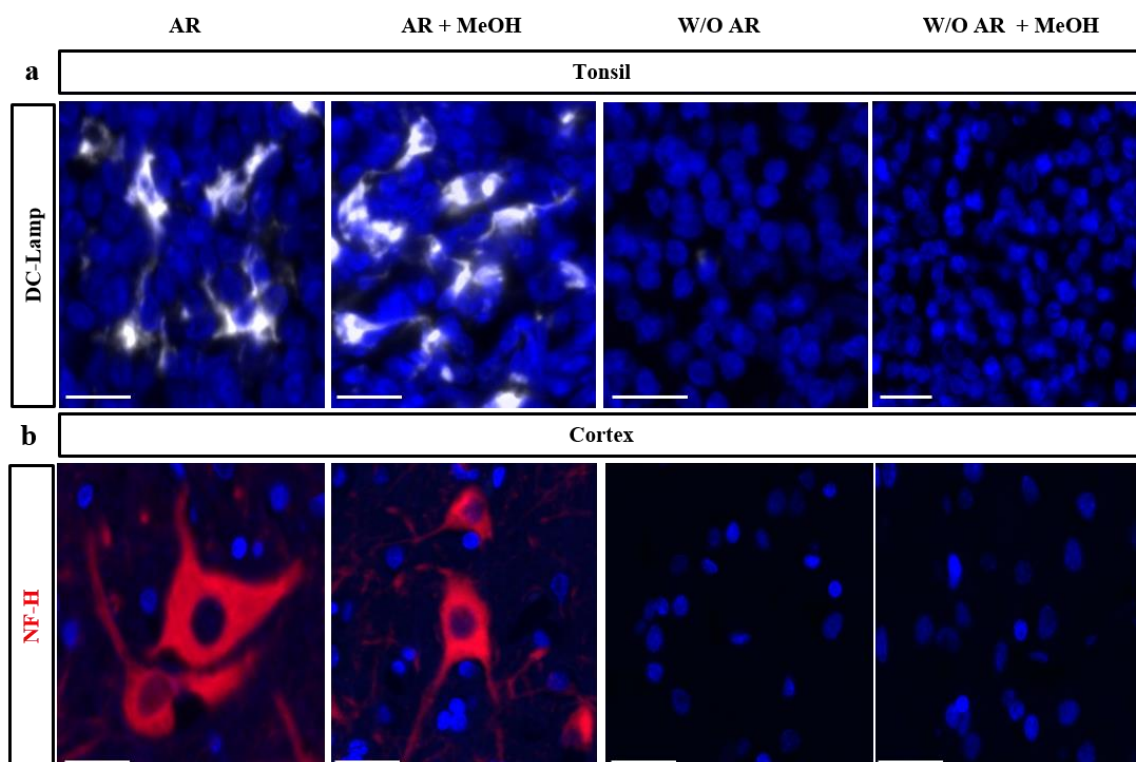
Table 1. Selection of the most efficient method of protein extraction from piDISCO⁺ tissues.

	Methods																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Rehydration Methanol																		
Rehydration Ethanol																		
RPPA buffer (pH 7.4)																		
0.2% Zwittergent 3-16, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)																		
100mM Tris-HCl, 100mM DTT, 4% SDS (pH 9.0)																		
0.5% PEG 20,000, 100mM Tris- HCl, 100mM DTT, 4% SDS (pH 8.0)																		
8mM urea, 2M Theourea, 65mM DTT, 83mM Tris-HCl, 4% CHAPS (pH 9.0)																		
20mM Tris-HCl, 2% SDS (pH 2.0)																		
100mM Tris-HCl, 2% SDS (pH 7.4)																		
20 mM Tris-HCl, 2% SDS (pH 9.0)																		
Heating at 80°C																		

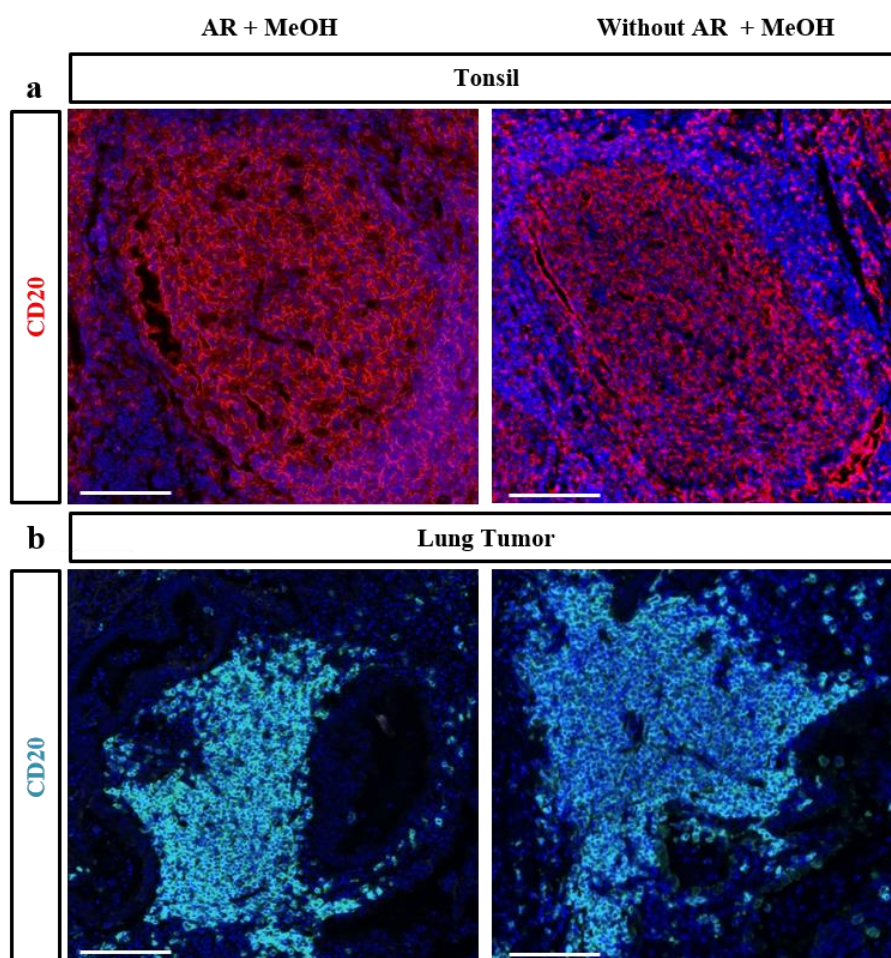
Additional information

Supplementary Figures and Tables

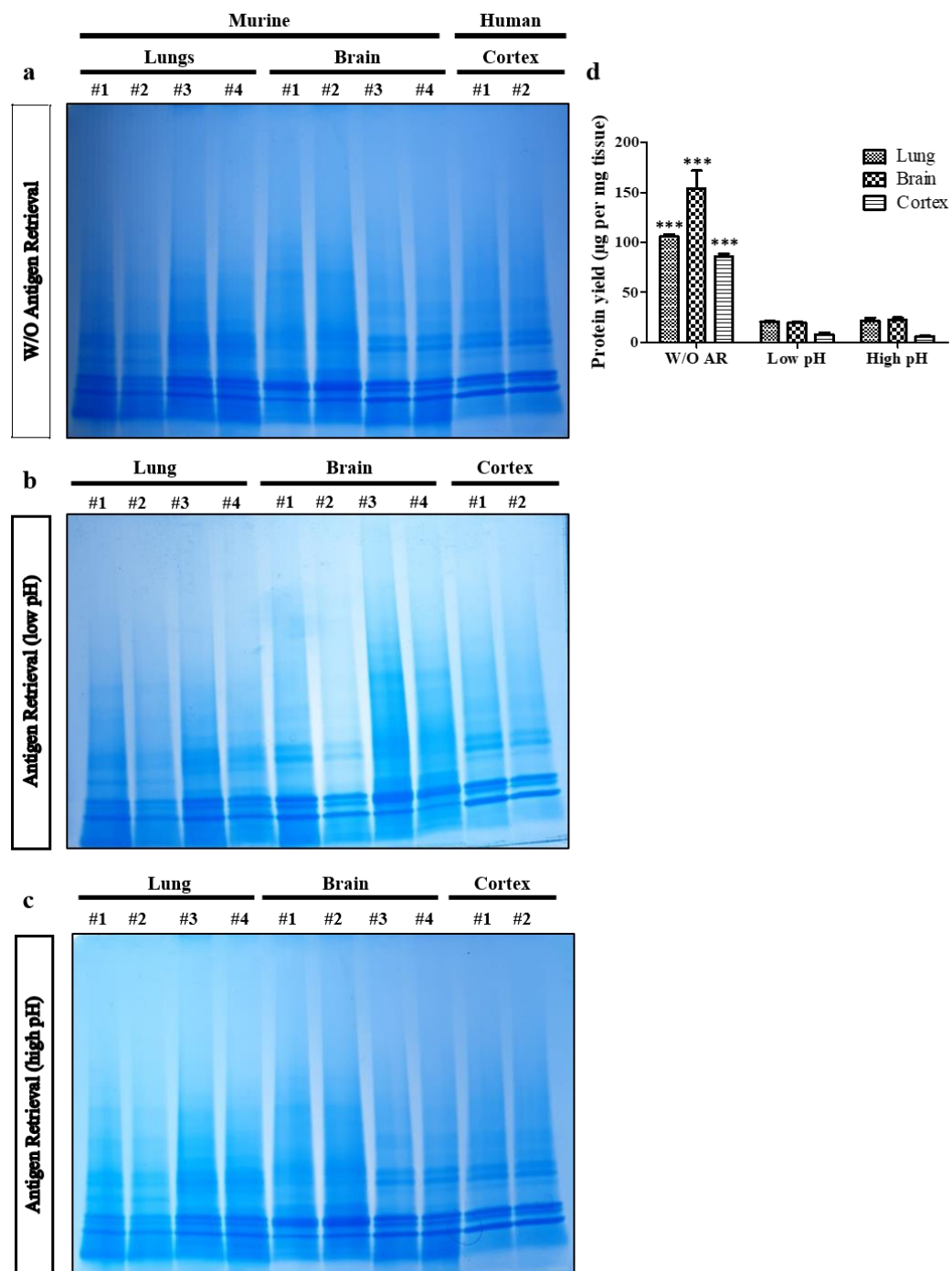
- Supplementary Figure 1. Antigen retrieval using FFPE tissue sections.
- Supplementary Figure 2. CD20 detection in FFPE sections with or without antigen retrieval.
-
- Supplementary Figure 3. Quality control of proteins extracted after antigen retrieval.
- Supplementary Table 1. List of primary antibodies used.
- Supplementary Table 2. List of secondary antibodies used.



Supplementary Figure 1. Antigen retrieval using FFPE tissue sections. FFPE sections from human palatine tonsils and cortex were deparaffinized and incubated with methanol (MeOH) or not. Antigen retrieval (AR) was then performed to assess the capacity of the antibodies tested to bind the relevant antigenic target present in piDISCO⁺ cleared tissues. **a**, Human tonsils stained with anti-DC-Lamp antibody. Faint staining was still detectable in some area of the entire section. **b**, Human cortex stained with anti-NF-H antibody. No staining was detected in the entire section. Scale bar: 20 μ m.



Supplementary Figure 2. CD20 detection in FFPE sections with or without antigen retrieval. FFPE sections from human palatine tonsils and lung tumor biopsy were deparaffinized and incubated with methanol (MeOH). Antigen retrieval (AR) was then performed or not to examine whether it was required for labeling with the anti-CD20 antibody. **a**, Human tonsils. **b**, Human lung cancer biopsy. Scale bar: 100 μ m.



Supplementary Figure 3. Quality control of proteins extracted after antigen retrieval. Proteins were extracted from murine and human FFPE tissues treated with the piDISCO⁺ protocol using the method #15. **a**, Coomassie blue staining shows similar profile in tissues not subjected to antigen retrieval during staining using the piDISCO⁺ protocol. Proteins extracted from tissues subjected to antigen retrieval at low pH (citrate buffer) or high pH (EDTA containing buffer) are shown in **b**, and **c**, respectively. **d**, Protein yields show a significant difference in the efficiency of protein extraction without antigen retrieval step compared to proteins extracted after antigen retrieval at low or high pH. Values are the average of biological replicates; standard error of the mean are shown.

Supplementary Table 1. List of primary antibodies used.

Primary Antibody	Technics			Antigen retrieval	Species	Reference	Distributor
	piDISCO ⁺	IF	WB				
α -SMA-Cy3	1/200	1/200	NA	NA	Mouse	C6198	Sigma (Saint-Louis, MO)
TH	1/200	1/200	1/1000	NA	Rabbit	AB152	Millipore (Saint Quentin-en-Yvelines, France)
CD20	1/200	1/70	NA	NA	Mouse	M0755	Dako (les Ulis, France)
NF-H	1/400	1/400	1/1000	YES	Rabbit	2836S	Cell Signaling (Leiden, Netherlands)
Olig2	1/400	NA	NA	NA	Rabbit	18953	IBL (Minneapolis, USA)
DC-Lamp	1/100	1/100	NA	YES	Rat	DDX0191	Eurobio Scientific (les Ulis, France)
GAPDH	NA	NA	1/3000	NA	Rabbit	TAB1001	Invitrogen (Carlsbad, CA)
α -SMA	NA	NA	1/1000	NA	Mouse	A5228	Sigma (Saint-Louis, MO)
p-TYR	NA	NA	1/1000	NA	Mouse	9411S	Cell Signaling (Leiden, Netherlands)
p-ERK	NA	NA	1/1000	NA	Rabbit	9910	Cell Signaling (Leiden, Netherlands)
SUMO-2	NA	NA	1/1000	NA	Mouse	AB8137	Abcam (Cambridge, UK)

Supplementary Table 2. List of secondary antibodies used.

Secondary antibody				
piDISCO ⁺				
Fluorochrome	Dilution	Species	Reference	Distributor
Alexa Fluor 647	1/400	Goat anti-rabbit	A-21244	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Alexa Fluor 555	1/400	Goat anti-mouse	A-21422	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Alexa Fluor 555	1/400	Donkey anti-rabbit	A-31572	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Alexa fluor 555	1/400	Donkey anti-rat	Ab15054	Abcam (Cambridge, UK)
IF				
Fluorochrome	Dilution	Species	Reference	Distributor
Alexa Fluor 647	1/400	Chicken anti-rat	A-21472	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Alexa Fluor 488	1/400	Goat anti-rat	A-11006	ThermoFisher (Courtaboeuf, France)
Alexa fluor 647	1/400	Goat anti-rabbit	A-27040	ThermoFisher (Courtaboeuf, France)
Alexa fluor 647	1/400	Donkey anti-mouse	A-31571	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Western Blot				
Conjugate	Dilution	Species	Reference	Distributor
Horseradish Peroxydase	1/4000	Rabbit anti-mouse	A-27025	ThermoFisher (Courtaboeuf, France)
Horseradish Peroxydase	1/4000	Goat anti-rabbit	AP307P	Millipore (Saint Quentin-en-Yvelines, France)

Electronic supplementary material

- **Supplementary video 1. Animated 3D rendering of α -SMA labeling in PFA-fixed mouse kidney.** 3D rendering using IMARIS software of α -SMA immunolabelling within a PFA-fixed mouse kidney cleared using the piDISCO⁺ protocol.
- **Supplementary video 2. Animated 3D rendering of α -SMA labeling in FFPE mouse kidney.** 3D rendering using IMARIS software of α -SMA immunolabelling within a paraffin-embedded mouse kidney cleared using the piDISCO⁺ protocol.
- **Supplementary video 3. Animated 3D rendering of α -SMA labeling in PFA-fixed mouse brain.** 3D rendering using IMARIS software of α -SMA immunolabelling within a PFA-fixed mouse brain cleared using the piDISCO⁺ protocol.
- **Supplementary video 4. Animated 3D rendering of α -SMA labeling in FFPE mouse brain.** 3D rendering using IMARIS software of α -SMA immunolabelling within a paraffin-embedded mouse brain cleared using piDISCO⁺ protocol.
- **Supplementary video 5. Animated 3D rendering of α -SMA labeling in FFPE human lung.** 3D rendering using IMARIS software of α -SMA immunolabelling within a paraffin-embedded human lung cleared using the modified piDISCO⁺ protocol.
- **Supplementary video 6. Animated 3D rendering of α -SMA or TH/CD20 labeling in FFPE human palatine tonsil.** 3D rendering using IMARIS software of α -SMA immunolabelling within a paraffin-embedded human palatine tonsil cleared using the piDISCO⁺ protocol.
- **Supplementary video 7. Animated 3D rendering of NF-H labeling in FFPE human cortex.** 3D rendering using IMARIS software of α -SMA immunolabelling within a paraffin-embedded human cortex cleared using the piDISCO⁺ protocol.

Discussion du Manuscrit #1

Au cours de la dernière décennie, les marquages tridimensionnels de type iDISCO ont fait leur apparition et ont permis l'étude de diverses interactions au sein d'organes entiers, aussi bien aux stades embryonnaire qu'adulte (Ertürk et al., 2012 ; Renier et al., 2014 ; Renier et al., 2016). Ces nouvelles techniques peuvent s'appliquer aux biopsies tumorales afin de comprendre les interactions survenant entre les cellules immunitaires, les systèmes vasculaires et nerveux. Ces techniques présentent un avantage considérable par rapport aux techniques classiques de marquages sur coupes. En effet, la distribution hétérogène des cellules ou encore le plan de coupe peuvent biaiser les informations obtenues à partir d'un même échantillon. Les biopsies tumorales, incluses en paraffine, sont des tissus rares et dans la plupart des cas, de petites pièces opératoires. Le but ultime, que se soit pour les cliniciens ou les chercheurs est donc d'en extraire le maximum d'informations.

Au cours de mon étude, nous avons développé une nouvelle technique, piDISCO⁺ combinant, pour la première fois, simultanément des marquages 3D de haute résolution et une analyse protéique à partir d'un *même* échantillon. Dans un premier temps, une étape de démasquage antigénique a été ajoutée, ce qui permet l'utilisation de divers anticorps permettant une caractérisation plus détaillée du microenvironnement tumoral. Dans un second temps, les extractions protéiques qu'il nous a été possible d'effectuer grâce à la mise au point d'un tampon d'extraction adéquat, a permis la détection de protéines de haut et bas poids moléculaire, phosphorylées ou non, éventuellement sumoylées, ouvrant la voie à l'analyse *in situ* de diverses voies de signalisation potentiellement dérégulées lors de la cancérogenèse. La qualité ainsi que la quantité des protéines extraites des échantillons FFPE après transparisation s'est avérée être semblable à celles des échantillons non-transparisés. Bien que nous ne montrions que des profils de protéines phosphorylées et sumoylées avec le protocole mis au point, des analyses protéiques plus poussées utilisant des techniques comme la spectrométrie de masse ou *la reverse phase protein assay* peuvent être ajoutées, conduisant à une cartographie protéique détaillée qu'il sera possible de combiner avec l'imagerie 3D. Cette possibilité de combiner imagerie 3D et protéomique pourrait ainsi aider à comprendre les interactions complexes ayant lieu au sein des tumeurs et contribuer à l'établissement de diagnostic plus précis, ouvrant la porte à la médecine personnalisée. De plus, l'archivage et la conservation des biopsies en paraffine et leur étude ultérieure par cette technique pourrait permettre un suivi des patients en termes d'évolution de la maladie au fil des années et d'efficacité du traitement.

Présentation

Au cours des deux dernières décennies, des avancées considérables ont été faites dans notre compréhension du microenvironnement tumoral. En 2008, Dieu-Nosjean et ses collègues ont montré pour la première fois que des TLS (alors désignées sous le nom de Ti-BALts pour « tumor-induced bronchus-associated lymphoid tissue ») étaient présentes au sein de tumeurs solides, les tumeurs pulmonaires NSCLC. Ce travail montra également que les patients présentant une forte densité de TLS avaient la meilleure survie (Dieu-Nosjean et al., 2008). Cette découverte fut saluée par un éditorial du *Journal of Clinical Oncology* (Coppola and Mulé, 2008). Il s'ensuivit une série d'études montrant que, dans la plupart des tumeurs solides, la présence de ces structures était associée à un bon pronostic (Sautès-Fridman et al., 2019). Les TLS se développent lors d'une inflammation et se composent d'une zone renfermant des LB, adjacente à une zone T, composée de LT et de DC matures. Le groupe de Dieu-Nosjean a d'ailleurs démontré, en 2014, que (A) la présence de LB dans les TLS était associée à une immunité protectrice chez les patients NSCLC et que la densité de ces LB représentait un marqueur pronostic de la survie des patients, travail qui fit également l'objet d'un éditorial dans *l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Randall and Kern, 2014) et (B) que les patients présentant une forte densité de TLS (TLS^{high}) avaient le plus faible risque de décès, quel que soit la densité des LT CD8⁺ (trouvés à la fois dans le stroma et dans la tumeur) (Goc et al., 2014b).

En plus de leur analogie structurale avec les structures lymphoïdes secondaires (SLO), les TLS partagent avec celles-là des caractéristiques de leur organogenèse. En effet, les chimiokines lymphoïdes ainsi que la lymphotoxine $\alpha_1\beta_2$ sont des molécules nécessaires à la formation des SLO et des TLS (cf. Introduction, paragraphes 1.3 et 2.4). Plusieurs travaux ont examiné l'impact de fibres nerveuses dans la formation des SLO (cf. Introduction, paragraphe 1.3.4) et leur rôle dans le développement des tumeurs, notamment de cancers de la prostate. Le système nerveux autonome, sympathique et parasympathique a notamment été mis en cause dans le contrôle de la croissance tumorale et de sa dissémination (Magnon et al., 2013) (Mauffrey et al., 2019). Cependant, aucune étude n'a examiné les relations tripartites existant entre fibres nerveuses, cellules tumorales et formation et maintenance des TLS. Nous avons

fait l'hypothèse que les fibres nerveuses sympathiques pourraient être impliquées dans la genèse des TLS, comme cela a été suggéré dans la mise en place des SLO. Deux modèles murins de formation de TLS dans les poumons ont été développés, le premier fondé sur des instillations intranasales de LPS, le second, utilisant une injection par voie intraveineuse de cellules tumorales syngéniques TC1 (contenant l'ADNc codant la luciférase et nommées pour cette raison TC1-Luc) dans des souris immuncompétentes. Ces deux modèles ont permis le suivi de la formation des TLS, notamment par imagerie, toujours en collaboration avec le laboratoire du Dr. Brunet (Collège de France) et de leur maintien ainsi que l'analyse de l'impact de l'ablation des fibres nerveuses sympathiques sur cette formation, par traitement par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). De plus, la mise en place du modèle tumoral a également permis d'évaluer l'impact de cette ablation sur la croissance tumorale. Par ailleurs, une première analyse comparative de la présence de fibres nerveuses dans des biopsies de tumeurs de deux patients présentant un NSCLC et ayant une densité soit élevée soit faible de TLS a été effectuée. Les résultats de ces études sont décrits ci-dessous sous la forme d'un manuscrit devant être bientôt soumis pour publication.

Sympathetic nerve fibers impact TLS formation in response to inflammation

Laila Letaïef^{1,2,3*}, Safa Azar^{4*}, Guy Malkinson⁴, Sabrina Martin⁴, Pierre Validire⁵, Jean-Luc Teillaud^{1,2,3§}, Isabelle Brunet^{4§°} and Marie-Caroline Dieu-Nosjean^{1,2,3§°}

¹ Sorbonne Université UMRS1135, Faculté de Médecine Sorbonne Université, Paris, France, 75013 Paris, France

² INSERM U1135, 75013 Paris, France

³ Laboratory “Immune Microenvironment and Immunotherapy”, Centre d’Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI-Paris, 75013 Paris, France

⁴ Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS, INSERM, PSL Research University, 75231 Paris, France.

⁵ Department of Pathology, Institut Mutualiste Montsouris, 75014 Paris, France

*These authors contributed equally to this work

§Senior co-authors

°corresponding authors

Address correspondence to:

isabelle.brunet@college-de-france.fr ; marie-caroline.dieu-nosjean@inserm.fr

Abstract:

Tertiary lymphoid structures are ectopic lymphoid organs that develop in non-lymphoid tissues at sites of chronic inflammation. These lymphoid structures confer a more favorable outcome in cancer patients, possibly thanks to the establishment of *in situ* adaptive anti-tumor responses. However, little is known about their formation and maintenance. In secondary lymphoid organs, the nerve fibers contribute to the formation of these organs, but the exact role of innervation in the development of TLS is still unknown. The present study explores the role of sympathetic nerve fibers in lung TLS formation using mouse models of transient inflammation and cancer. We show that lung TLS are rapidly formed upon intranasal injection of lipopolysaccharide and that their density is markedly reduced following chemical sympathetic nerve fibers deletion by 6-hydroxydopamine. We demonstrate also that the chemical removal of the sympathetic nerve fibers in tumor-bearing mice results in a marked decrease of TLS density, while lymphoid aggregates are detected. In both models, TLS were found to be located close to high endothelial venules (HEV) that are absent when nerve fibers are depleted and no TLS are detected. Human biopsies from NSCLC patients showed a marked reduction of TH⁺ sympathetic fibers and an increase of newly formed fibers in tumor exhibiting a high density of TLS in comparison to tumors with few TLS. Taken together, our data demonstrate that sympathetic nerve fibers are needed for TLS formation, possibly through their role in the presence of HEV.

Key words: lung inflammation, non-small cell lung cancer (NSCLC), sympathetic nerve fibers, tertiary lymphoid structures.

Abbreviations : 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; α -SMA, alpha-smooth muscle actin; DCM, dichloromethane; DCX, doublecortin; FFPE, formalin-fixed paraffin embedded; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HEV, high endothelial venule; iBALT, inducible bronchus-associated lymphoid tissue; ICP, immune checkpoint; iDISCO, immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs; LFSM, light-sheet fluorescent microscopy; LPS, lipopolysaccharide; MVA, modified vaccinia virus Ankara; NF-H, neurofilament heavy chain; NF-L, neurofilament light chain; NSCLC, non-small cell lung cancer; PFA, paraformaldehyde; PNAd, Peripheral Node Addressin; TLS, tertiary lymphoid structure; TH, tyrosine hydroxylase; TLT, tertiary lymphoid tissue; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Introduction

Tumor microenvironment has been extensively studied during the last decade. In 2008, we published the first report indicating the presence of tertiary lymphoid structures (TLS) within solid tumors, namely lung tumors from patients suffering Non-Small cell lung cancer (NSCLC), and reported that this presence is associated with a better clinical outcome of the patients ⁽¹⁾. Since then, a large number of reports have established that TLS presence is related to a better survival in most of the solid tumors that have been examined ⁽²⁾. TLS are localized within tumor stroma and are ectopic lymph-node like structures ⁽³⁾ containing B cells, T cells and mature dendritic cells, making them remarkable structures where anti-tumor adaptive immune responses can develop. A strong tumor infiltration of Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells combined with a high density of TLS-associated mature DC, a hallmark of TLS, has been shown to correlate with the lowest risk of death of NSCLC patients ⁽⁴⁾⁽⁵⁾. Also, we showed that TLS-B cell density represents an important prognostic biomarker for NSCLC survival and that antibodies against tumor antigens are produced when sorted tumor-infiltrating B cells from TLS^{high} tumors are activated *in vitro* ⁽⁶⁾.

Moreover, nerve fibers have emerged as a highly active component of tumor microenvironment. The presence of nerve fibers has been shown in many tumors such as prostate, pancreas, gastric, breast, skin and colon cancer ⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾. The peripheral nervous system is composed of two main branches, the somatic and autonomic branches. The latter is further divided in sympathetic and parasympathetic components. Under physiological conditions, these two components act antagonistically to regulate homeostatic features. The sympathetic branch prepares for dangerous situations by provoking a rapid increase of blood flow to lungs and skeletal muscles associated with the suppression of the gastro-intestinal activity. On the opposite, the parasympathetic branch, is more active during rest by decreasing muscle contractility and heart beat while activating gastrointestinal function ⁽¹²⁾. By contrast, it has been suggested that they act together in a sequential manner to favor tumor initiation and progression. In prostate cancer, sympathetic fibers trigger tumor initiation *via* the engagement of β adrenergic receptors expressed by stromal cells. Then, parasympathetic fibers promote tumor progression and metastasis by activating muscarinic signaling in stromal cells ⁽⁷⁾. Recently, Mauffrey et al. have also shown that neural progenitors expressing doublecortin (DCX⁺) from the brain are able to infiltrate prostate tumor, favoring the generation of adrenergic neurons and tumor progression ⁽¹³⁾. The cross-talk between nerve and cancer cells

is also marked by the release by tumor cells of growth factors involved in the axonogenesis of infiltrating nerve fibers ^{(14) (15)}.

However, the autonomic system has not been always associated with a poor clinical outcome. A recent study has reported that parasympathetic fibers are associated with a good prognosis in breast cancer and a downregulation of ICP molecules ⁽¹⁶⁾, while sympathetic fibers were associated with a poor prognosis. Their presence correlated with a strong expression of immune checkpoint (ICP) molecules ⁽¹⁶⁾.

Still, the functional relationship between immune cells and nerve fibers within tumor microenvironment has not been established yet. Only one study conducted in mice harboring a dextran sulfate sodium-induced colitis showed that the absence of parasympathetic fibers provoked by pharmacological ablation or surgery disturbs the formation of tertiary lymphoid tissue (TLT) ⁽¹⁷⁾. Of note, in this model, the ablation of the sympathetic branch had no impact on the formation of TLT ⁽¹⁷⁾.

In the present study we examined the involvement of sympathetic fibers in the development of TLS triggered by lung inflammation provoked by intranasal injections of lipopolysaccharide (LPS) or by intravenous injection of lung tumor cells in mice. We show that the sympathetic branch removal by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in mice markedly impairs TLS density in both models and favors tumor growth development. When examining human biopsies from NSCLC patients, we also observed a reduction of TH⁺ sympathetic fibers and an increase of newly formed fibers in a tumor exhibiting a high density of TLS in comparison to tumors with few TLS (TLS^{high} vs TLS^{low}). Taken together these results demonstrate the positive impact of sympathetic nerve fibers on TLS development and its involvement in lung tumor growth control.

Results

1. Induction of TLS following LPS intranasal injection

First, bronchus-associated TLS were induced in a chronic inflammation setting using intranasal instillation of LPS. Adult female mice received a single intranasal injection daily for 5 days. Lung removal was performed at D11, D18 and D25 following the first injection of LPS (Fig. 1a). Hematoxylin and eosin counterstaining showed the presence of TLS in the close vicinity of bronchus and blood vessels, both at D11 and D18 (Fig. 1b. upper and middle panel). No TLS could be detected at D25 (Fig. 1b. lower panel).

To assess which endpoint will be the most suitable for the subsequent experiments aimed at analyzing TLS induction in different experimental settings, we first quantified TLS density in the whole lung of each animal. A significant decrease of TLS density for each mouse at each time point (Fig. 1c, upper panel) and of the corresponding density mean value for each mouse (Fig. 1c, lower panel) was observed between D11 and D18 (p -value=0.0182, t -test). TLS were larger at D11 than at D18 while absent at D25 (Fig. 1b). Thus, in the following experiments, lungs were analyzed at D11 after the first LPS injection.

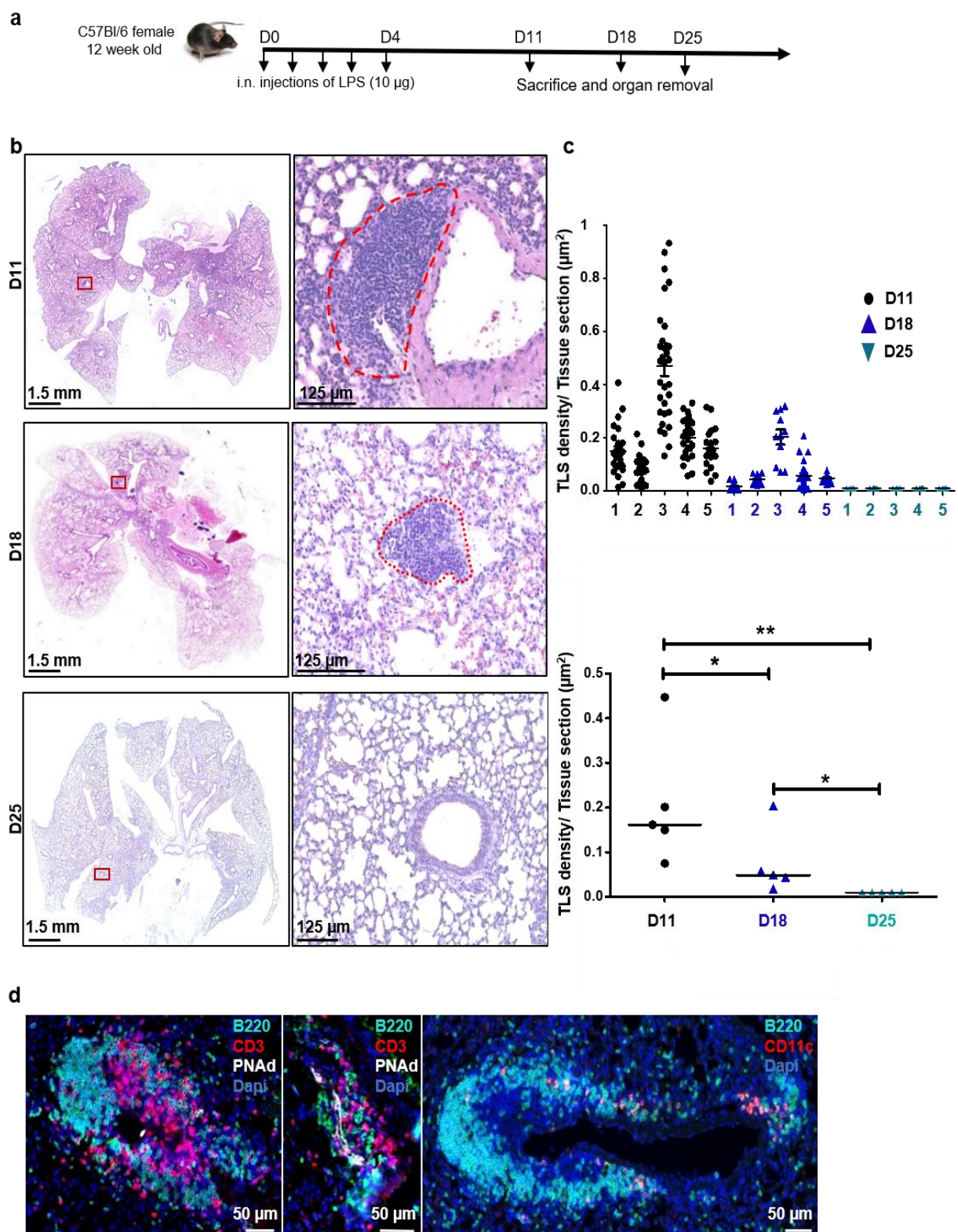


Figure 1. Transient induction of TLS following LPS intranasal injection. **a**, mice were intranasally injected daily for five days and lungs were harvested at D11 (n=5), D18 (n=5) and D25 (n=5) following LPS injection. **b**, lungs were formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) and sections were analyzed for TLS presence by hematoxylin and eosin counterstaining at D11, D18 or D25 post-intranasal injections. Middle panels represent magnification of TLS for each endpoint. **c**, quantitative analyses of TLS density per mouse at each time point (upper panel). Mean values per group of animals are indicated in the lower panel (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; two-tailed Student's t -test) and bars represent the mean value per day for each group. The presence of TLS detected when using hematoxylin and eosin counterstaining was confirmed by immunofluorescence. **d**, Sections from lungs from mice exhibiting LPS-induced inflammation show PNAd⁺ high endothelium venules (HEV) in the close vicinity of TLS composed of B cells (B220⁺, appears in light blue or green depending of the cell density and the superposition with nuclei staining (Dapi in blue); T cells (CD3⁺, red) and dendritic cells (CD11c⁺, red).

2. Cellular contents of LPS-induced TLS in lungs

We then analyzed TLS cell content by multiplexed immunofluorescence staining. Figure 1d shows the presence of a B-cell area containing B220⁺ B cells (Fig. 1d, all panels) close to a CD3⁺ T-cell area (Fig. 1d, left and middle panels) as well as of CD11c⁺ dendritic cells (Fig. 1d, right panel). Moreover, PNA⁺ *high endothelial venules* (HEV) which are specialized vessels that allow immune cells recruitment from the circulation and whose presence has been correlated with that of TLS ⁽¹⁸⁾, were also detected (Fig. 1d, left and middle panels). Thus, intranasal instillation of LPS induces TLS that harbor all the cellular components involved in the development of adaptive immune responses.

3. Depletion of sympathetic peripheral fibers following injection of 6-OHDA

We then examined the impact of 6-OHDA that specifically deletes sympathetic peripheral fibers on LPS-induced TLS ⁽¹⁹⁾. First, the impact of the injection of 6-OHDA on nerve fibers of naïve C57Bl/6 mice was examined. Figure 2a shows the experimental design that was adapted from previous reports ⁽⁷⁾⁽²⁰⁾. A full removal of tyrosine hydroxylase (TH⁺) sympathetic fibers was observed in mouse ears at D30 as previously described and still at D41 in comparison to untreated mice that did not receive 6-OHDA (Fig. 2b). Thus, D30 was selected as the starting point for LPS instillation and D41 for TLS examination [11 days later as determined when analyzing the kinetics of TLS formation and maintenance in this setting (Fig. 1b)].

To assess whether the drug did not cross the blood brain barrier, western blots revealing the presence of TH (62 kDa), a specific marker of sympathetic fibers, were performed on brain extracts of 6-OHDA-treated mice. The level of TH in the brain was not modified following 6-OHDA injections, indicating that the drug did not enter into the brain. As expected, a decrease of TH expression in both lung and kidney of treated mice as compared to control mice was observed (Fig. 2c). Also, ELISA showed a considerable drop in catecholamine levels in the plasma of 6-OHDA-treated mice, indicating that there was no longer a release of neurotransmitters from sympathetic origin and, hence, suggesting a massive destruction of sympathetic fibers in these animals (Fig. 2d).

Then, to ensure that the denervation did not alter the overall structure of the lungs, hematoxylin and eosin counterstaining was performed on lung tissue sections. Of note, the calibers of bronchus and blood vessels - either small (Fig. 2e, upper right panel) or large (Fig. 2e, lower right panel) - were not affected. 3-D imaging using the iDISCO⁺ technique ⁽²¹⁾ made it possible to visualize the sympathetic innervation of PFA-fixed lungs from untreated (Fig. 2f,

upper left panel) and 6-OHDA-treated animals (Fig. 2f, lower left panel) (see also supplemental videos 1 & 2). Since only PFA-fixed lungs were analyzed, the 3D staining iDISCO⁺ technique was used and not the one that we adapted for biopsies fixed and embedded in paraffin (Azar, Letaïef et al., see manuscript #1). Hence, lungs from untreated mice showed a full innervation of the vascular α -SMA⁺ network (Fig. 2f, upper left and middle panel). By contrast, sympathetic fibers could be detected only scarcely in some areas of lungs of 6-OHDA-treated mice at D41 (Fig. 2f, right panel). Only a few TH⁺ fibers remained around bronchus.

We also examined the impact of TH⁺ fiber loss on immune compartments of secondary lymphoid organs (*e.g.* spleen) by flow cytometry. No difference in the percentages of B cells, T cells (naïve, effector and memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells), macrophages, dendritic cells and granulocytes was observed in 6-OHDA-treated mice as compared to control mice (Supplementary Figures 1 to 4).

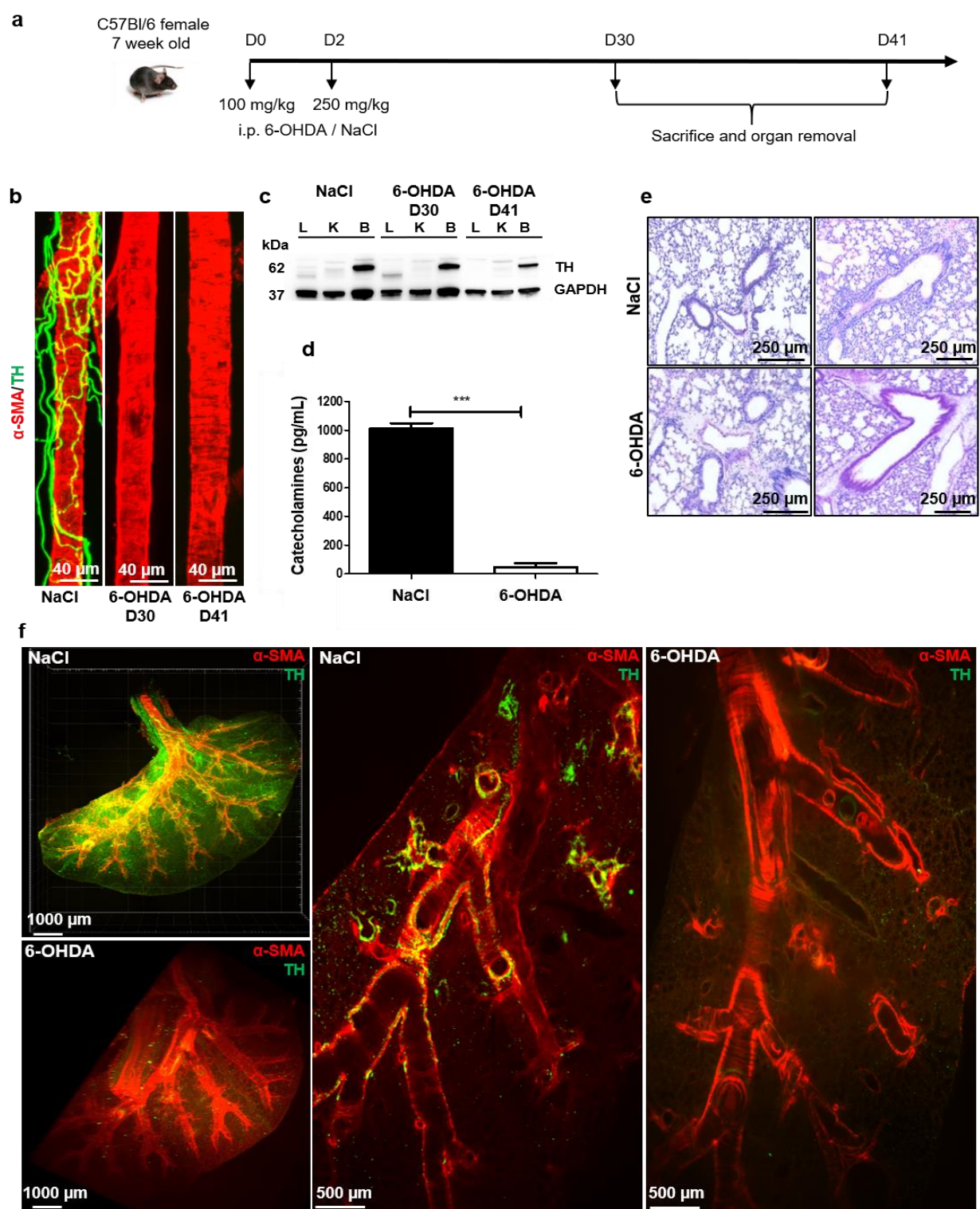


Figure 2. Depletion of sympathetic peripheral fibers following injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **a**, mice received intraperitoneal injections of NaCl or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) at D0 and D2 ($n=3$ for each group). Lungs were then harvested at D30 and D41. **b**, whole mount staining of ears for α -SMA (smooth muscle actin, red) and TH (tyrosine hydroxylase, green) of NaCl-injected and 6-OHDA-treated mice at D30 and D41. **c**, western blot detection of TH and GAPDH present in tissue extracts from brain (B), lung (L) and kidney (K) of NaCl-injected and 6-OHDA-treated animals at D30 and D41. **d**, catecholamine dosage from plasma of NaCl-injected and 6-OHDA-treated animals at D41 ($***p=0.002$; two-tailed Student's t -test). Histogram bars represent the S.E.M. of duplicate ELISA values from NaCl-injected ($n=9$) and 6-OHDA-treated ($n=4$) animals. **e**, hematoxylin and eosin counterstaining of FFPE lung sections of NaCl-injected (upper panel) and 6-OHDA-treated animals at D30 (lower panel). **f**, 3D and 2D views of light-sheet fluorescent microscopy (LSFM) data from lungs of NaCl-injected and 6-OHDA-treated mice at D41 for TH (green) and α -SMA (red) staining.

4. 6-OHDA depletion of lung sympathetic fibers impairs TLS presence in LPS-treated mice

Based on these results, 6-OHDA-treated mice then received intranasal instillation of LPS. Mice were sacrificed at D41 [e.g. 11 days after the first LPS intranasal injection when no fibers could be detected in 6-OHDA-treated mouse ears (Fig. 2b)] (Fig. 3a). A full sympathetic denervation in ears of these animals was verified (data not shown). As already shown (Fig. 1b), FFPE sections showed the presence of large TLS in control mice that received LPS (Fig. 3b, upper right panel, G2 (i.p. NaCl i.n. LPS)). Strikingly, when visual examination was performed (see materials and methods) the 6-OHDA treatment induced a dramatic drop in TLS density with large areas cleared of any TLS (Fig. 3b, lower right panel, G4: i.p. 6-OHDA i.n. LPS), and with small lymphoid aggregates detected in some mice. An example of lymphoid aggregate is shown in the inset of the lower right panel of Figure 3b (G4: i.p. 6-OHDA i.n. LPS). The quantification of TLS density confirmed this marked decrease following sympathetic fibers ablation (P-value = 0.0427, t-test) (Fig. 3c).

To examine whether the difference observed between 6-OHDA-treated and untreated mice could be due to an impairment of immune cell recruitment, we analyzed the presence of B cells (B220⁺) and T cells (CD3⁺) in the lung parenchyma (Fig. 3d, middle and lower panel). Multiplexed immunofluorescence showed that B and T cells are scattered in the proximity of bronchioles of 6-OHDA-treated mice receiving LPS (Fig. 3d, lower panel) whereas control mice showed fully organized TLS (Fig. 3d, upper panel). Importantly, no PNA⁺ HEV was detected in lung tissue sections in 6-OHDA mice (Fig. 3d, lower panel).

Interestingly, the number of B cells and of T cells was similar (Fig. 3e.), suggesting that the removal of sympathetic fibers does not alter the recruitment of immune cells but rather impacts their aggregation into TLS.

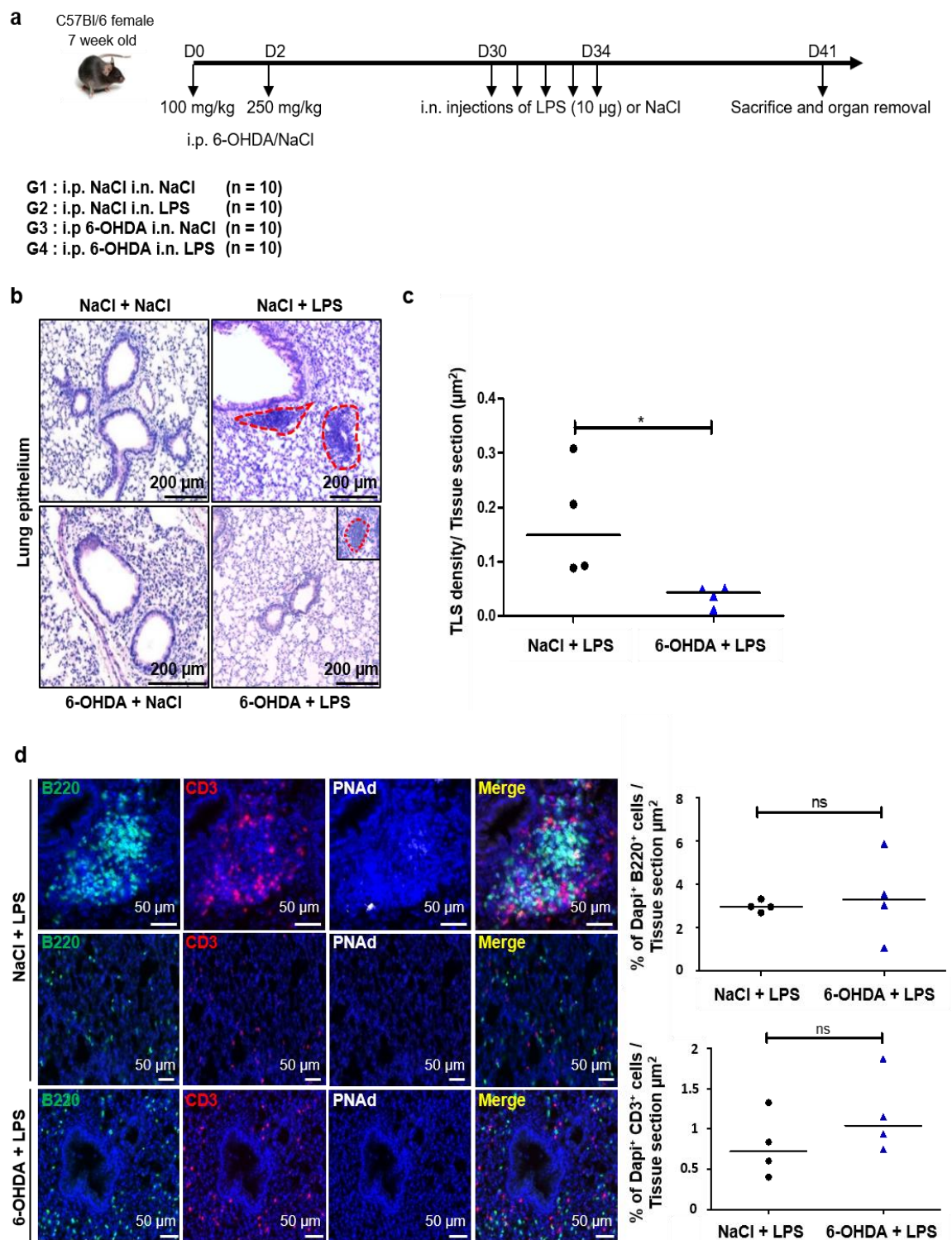


Figure 3. 6-OHDA depletion of lung sympathetic fibers impairs TLS presence in LPS-treated mice. **a**, mice received intraperitoneal (i.p.) injections of either NaCl [groups 1 and 2 (G1, G2)] or 6-OHDA at D0 and D2 [groups 3 and 4 (G3, G4)] and then intranasal (i.n.) daily injections of LPS (G2, G4) or NaCl (G1, G3) from D30 to D34 (n=10 for each group). **b**, Hematoxylin and eosin counterstaining at D41 of lungs from mice treated either with NaCl (upper panel) or 6-OHDA (lower panel) and with or without LPS (right and left panel respectively). **c**, Quantitative analyses of TLS density per group (* $P < 0.05$; two-tailed Student's t -test). Each bar represents the mean value of TLS density for each group of animals. Serial cuts from the whole lung were analyzed for quantification. **d**, Immunofluorescence staining showing TLS composed of B220⁺ B cells, CD3⁺ T cells, PNAd⁺ HEV in G2 mice (i.p. NaCl followed by i.n. LPS; upper panels) and of B220⁺ B cells, CD3⁺ T cells in the periphery of TLS in G2 animals (middle panels). No TLS were detected by B cells, T cells and HEV immunofluorescent staining in lungs from treated mice (G4, i.p. 6-OHDA followed by i.n. LPS) (lower panels). **e**, Quantification of B220⁺ B cells (upper panel) and CD3⁺ T cells (lower panel) in the whole section outside TLS of lungs from both G2 (NaCl + LPS) and G4 (6-OHDA + LPS) mice. Each bar represents the mean value of B and T cell percentages for each group of animals.

5. 6-OHDA depletion of lung sympathetic fibers favors tumor growth and TLS presence

We then studied the impact of sympathetic fibers on both TLS formation and tumor growth using a tumor model in which mice received an intravenous injection (i.v.) of mouse lung adenocarcinoma TC1 cells (termed TC1-Luc as these cells express luciferase) (Fig. 4a). This setting enables to induce a high density of large TLS in the vicinity of tumor mass (Supplementary Figure 5c-e). TC1-Luc tumor cells were i.v. infused into NaCl-injected (G2) or 6-OHDA-treated (G4) mice. Control mice were not injected with tumor cells and included one group of animals receiving only NaCl (G1) and one treated with 6-OHDA (G3). TH⁺ fiberloss in ears and lungs was assessed as a control of 6-OHDA efficacy of removing sympathetic fibers (Supplementary Figure 6). First, tumor growth monitoring was assessed twice a week by measurement of bioluminescence (Fig. 4a). Bioluminescence analysis of lungs allowed the classification of the animals into three groups (small/medium/large tumors) depending on total radiance (Fig. 4b). NaCl-injected mice exhibited small (16.7%), medium (50%) and large (33.3%) tumors (Fig. 4c). By contrast, small tumors were no longer observed in 6-OHDA-treated mice (Fig. 4c). Only medium and large tumors were detected in nearly the same proportions (54.5% vs 45.4%). This result suggests that the depletion of TH⁺ sympathetic fibers parallels an acceleration of tumor growth.

Second, immunohistochemistry analyses showed a significantly lower density of TLS in 6-OHDA-treated mice than in NaCl-injected tumor-bearing mice (P-value, 0.006) (Fig. 4e, left panel). Poorly organized lymphoid aggregates (LA) were observed in hematoxylin/eosin stained tissue sections of 6-OHDA-treated mice (Fig. 4d, lower left panel), not detectable in NaCl-injected tumor-bearing mice that showed TLS (Fig. 4d, upper left panel). B and T cells could be detected by immunofluorescence in both NaCl-injected and 6-OHDA-treated mice. These cells could be observed within well-defined TLS in mice that had received only NaCl while they were mostly found in LA in 6-OHDA-treated animals (Fig. 4d, upper and lower middle panels). Strikingly, PNAd⁺ HEV were not detected in 6-OHDA-treated animals (animals exhibiting TLS/LA and LA; Fig. 4d, lower right panel) in contrast to NaCl-injected mice (Fig. 4d, upper right panel). Control groups of mice that did not receive TC1-Luc cells did not show any TLS or LA (data not shown).

TC1-Luc tumor-bearing mice that received i.p. injection of either NaCl or 6-OHDA were then ranked according to TLS density. Three groups were defined. The first group exhibited a TLS density with a mean value above 0.2%, the second group a density with a mean value between 0.05% and 0.12% and the third with a density with a mean value below 0.05%

(Supplementary Figure 7). By contrast, tumors from control NaCl-injected mice exhibited only TLS. On the opposite, 6-OHDA-treated mice exhibited a majority of lymphoid aggregates (LA) (57.14%) with some tissue sections exhibiting both TLS and LA (28.57%) and more rarely TLS (14.28 %) (Fig. 4e, right panel).

Overall, the depletion of TH⁺ sympathetic nerve fibers is associated with a higher lung tumor burden and a large decrease in TLS formation.

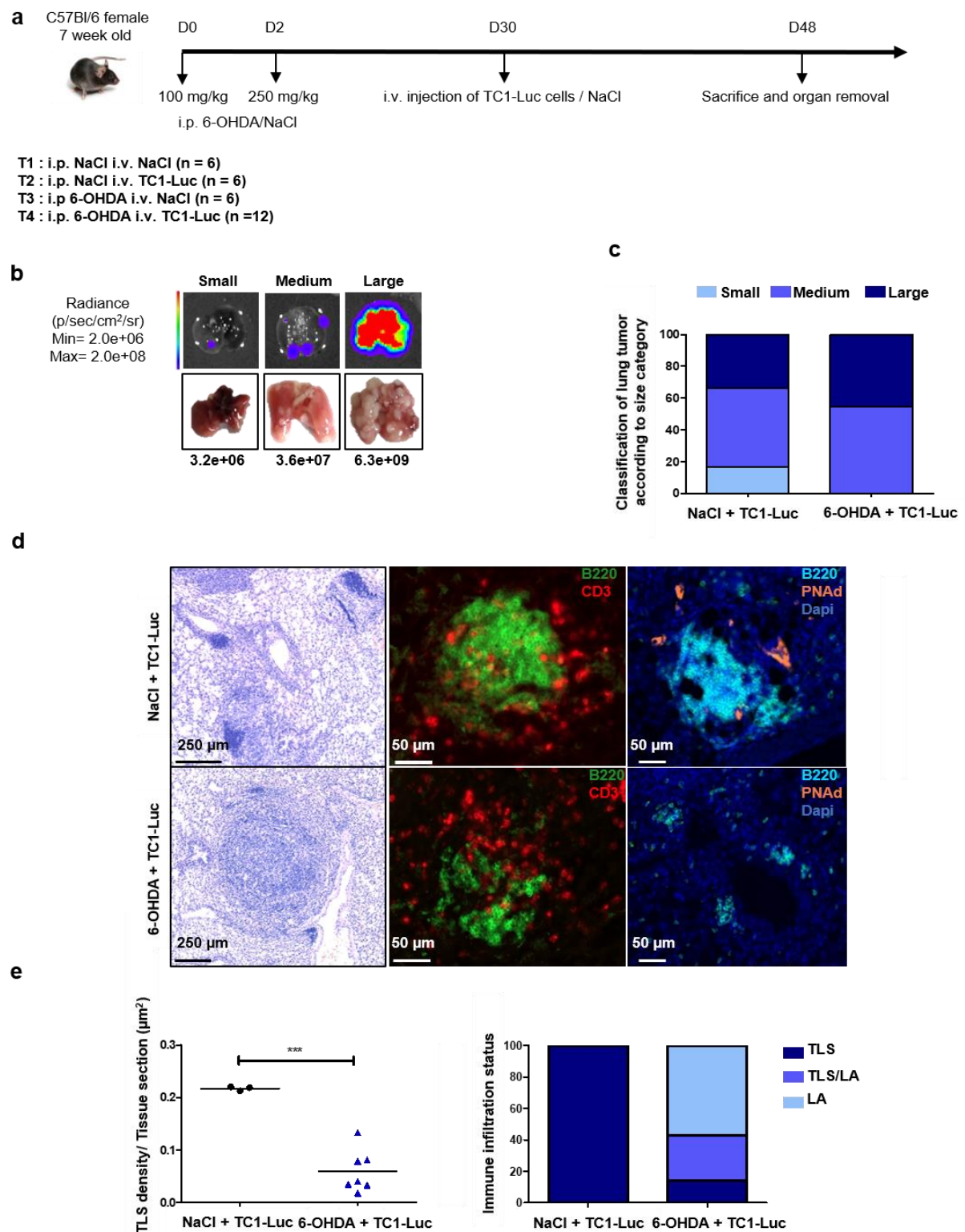


Figure 4. Ablation of TH⁺ sympathetic nervous fibers impact tumor growth and TLS formation. **a**, C57Bl/6 mice received NaCl (T2, n=6) or 6-OHDA T4 (n=12) before TC1-Luc intravenous injection. **b-c**, Classification of lung tumor burden according to total flux (photons/second/cm²) obtained with IVIS monitoring after lung retrieval from NaCl- and 6-OHDA-treated animals. Tumors were classified as small (total flux: 3.2×10^6 p/s/cm²), medium (total flux: 3.6×10^7 p/s/cm²) and large (total flux: 6.3×10^9 p/s/cm²). **d**, Hematoxylin and eosin counterstaining of lungs from NaCl- (T2) and 6-OHDA- (T4) treated mice (left panels); immunofluorescence staining of B cells (B220⁺) and T cells (CD3⁺) (middle panels) and of HEV (PnAd⁺) and B cells (B220⁺) (right panels) in lungs from NaCl- (T2) and 6-OHDA- (T4) treated mice. The lower left panel shows the presence of small lymphoid aggregates close to a large tumor mass. **e**, Quantitative analyses of TLS density per group of mice (T2: NaCl-injected mice; T4: 6-OHDA-treated mice) (**p=0.0002; two-tailed Student's *t*-test). Each dot represents the mean value of the density count of about 30 tissue sections from one mouse. Each bar represents the mean value of TLS density for each group of animals (left panel) and status classification [TLS/lymphoid aggregates (LA)] according to TLS and LA quantification (right panel).

6. NSCLC tumor with a high density of TLS is associated with a decrease of TH⁺ sympathetic fibers and an increase of newly formed NF-L⁺ fibers

We then examined tumor biopsies from two patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC) with a high and low TLS density (TLS^{high} and TLS^{low}). The segregation between TLS^{high} and TLS^{low} tumors was defined by previous quantification based on dendritic cells (DC-Lamp⁺) staining, B cells (CD20⁺) and T cells (CD8⁺) counts (number of cells/mm²).

First, a 3D imaging of NSCLC FFPE biopsies was performed using a piDISCO⁺ protocol developed in our laboratories (Azar et al., submitted). A high density of TLS was observed in lung biopsy of TLS^{high} tumor using CD20⁺ B cell marker (Fig. 5a, left panel). A few numbers of TLS were observed in close vicinity to TH⁺ fibers (Fig. 5a, middle panel), while TH⁺ fibers were not detected close to other TLS (Fig. 5a, right panel).

We then performed a western blot experiment to compare the amount of TH⁺ nerve fibers present in NSCLC tumors with a high and low TLS density (TLS^{high} vs TLS^{low}). Both tumor and distant tissue were examined. A marked decrease of TH innervation between distant and tumor tissues was observed in TLS^{high} sample. TLS^{low} sample also showed a difference but to a lesser extent (Fig. 5b). The same difference was observed with NF-H⁺ (neurofilament heavy chain) mature nerve fibers (Fig. 5b). Strikingly, newly formed fibers (NF-L, neurofilament light chain) were strongly increased in highly infiltrated TLS^{high} tumors as compared to all the other samples (Fig. 5b).

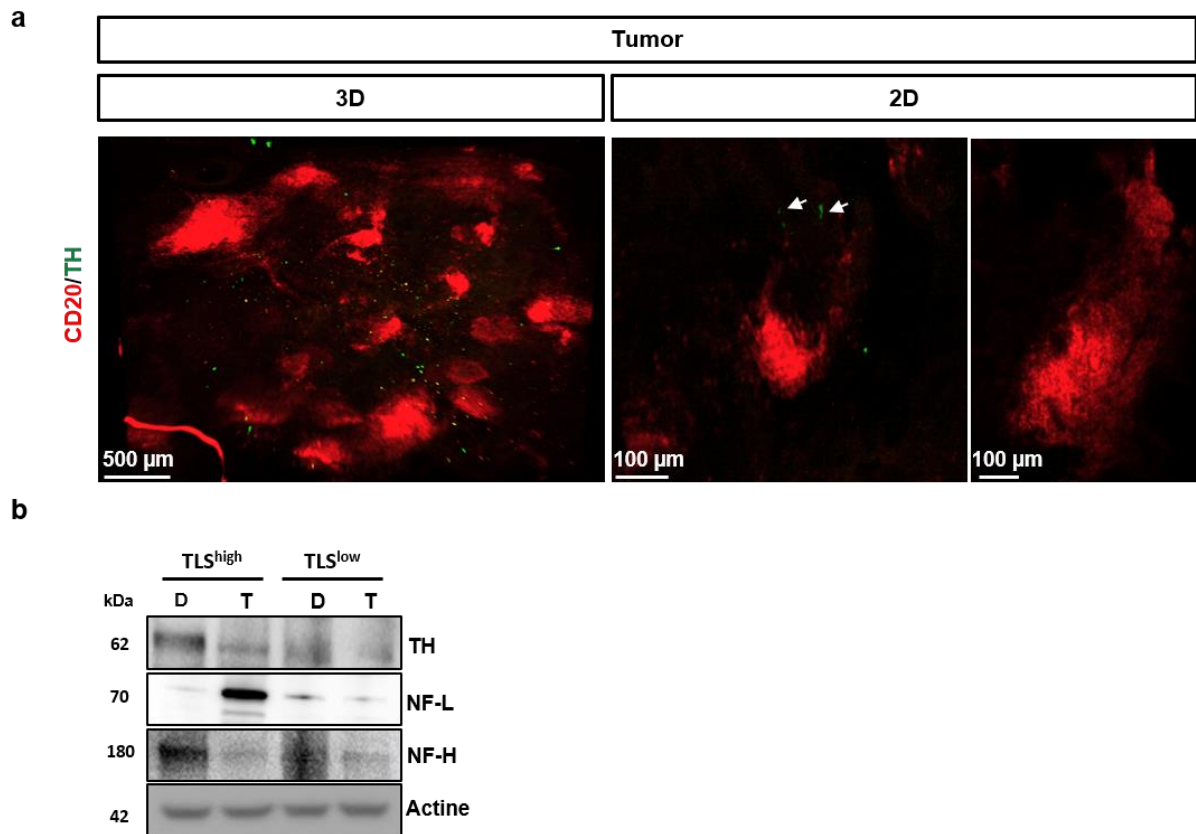


Figure 5. Analysis of nerve fibers and TLS within NSCLC biopsies. a, CD20 (red) /TH (green) staining of tissue section of a TLS^{high} tumor biopsy of one NSCLC patient. 3D and 2D views of LSFM. White arrows designate the presence of TH⁺ fibers. **b,** Expression of actin, TH, NF-L (neurofilament light chain), and NF-H (neurofilament heavy chain) molecules in tumor biopsies from two NSCLC patients (TLS^{high}; TLS^{low}). Abbreviations: D, distant lung tissue; T, lung tumor tissue.

Discussion

Induction of bronchus-associated TLS can be achieved through different protocols including viral or bacteria infections. Intranasal injection of virus [such as the non-replicative modified vaccinia virus Ankara (MVA)] or of a mix of LPS and influenza virus have been used to induce TLS (also termed iBALT, inducible bronchus-associated lymphoid tissue) ⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾. Intratracheal injection of agarose beads containing bacteria that allows a continuous delivery of inflammatory stimuli has been also used ⁽²⁵⁾. We show here that a daily intranasal LPS instillation during 5 days provokes a rapid appearance of TLS in lungs from adult immune-competent mice. TLS could be detected in large numbers 11 days after the first LPS instillation. A marked decrease in the number of these structures was then observed one week later and TLS were no longer present in lungs examined 20 days after the last instillation. These LPS-induced TLS appeared to be highly organized tertiary structures, exhibited a B cell area, a T cell zone, and dendritic cells, although we did not investigate the presence of germinal centers within the B cell area. In addition, HEV could be detected in their close proximity. It has been reported by Rangel-Moreno et al. ⁽²⁴⁾ that LPS instillation followed by influenza virus infection leads to the formation of TLS that are present three weeks after the last LPS administration but only in neonates animals. No TLS (termed by the authors iBALT) were observed at that time in adult mice undergoing the same treatment, confirming that TLS are transitory structures. The intravenous injection of TC1-Luc tumor cells also triggered the appearance of TLS in lungs that accompanied tumor growth until the animals were sacrificed. These two experimental settings show a striking concomitance between the presence of an inflammatory process, either transient (LPS) or permanent (tumor growth), within lungs and the presence of TLS, indicating that their formation and maintenance are strictly regulated by the lung microenvironment.

One of the hallmark of the lung microenvironment is the presence of nerve fibers, in particular sympathetic TH⁺ fibers. Although other types of nerve fibers are also present in lungs ⁽²⁶⁾, we focused our study first on sympathetic fibers because of their reported role in the early stage of tumor development *via* the engagement of β adrenergic receptors expressed by stromal cells, at least in prostate cancer ⁽⁷⁾. The TH⁺ fibers appeared to be present both in the vicinity of TLS and in areas where no TLS are observed both in human TLS^{high} NSCLC tumor (Fig. 5a) and in TC1-Luc tumor-bearing mice (data not shown).

Following the chemical depletion of TH⁺ fibers, we observed a drastic reduction of the density of TLS induced by LPS instillation. However, in a model of experimental colitis, the surgical lesion of sympathetic mesenteric nerve plexus had no impact on the formation of

tertiary lymphoid tissue (TLT) ⁽¹⁷⁾. These different results could be related to the pattern of innervation of the organ studied and to the type (surgical or chemical) and location of the nerve lesion that is induced. For instance, the reduction in the presence of TLT in vagotomized mice only occurred in the proximal and not the distal colon, these animals having the vagal innervation surgically ablated only to the proximal colon ⁽¹⁷⁾.

Interestingly, B and T cells were present within lung parenchyma in the same proportion in 6-OHDA-treated mice and control NaCl-injected mice. However, in 6-OHDA-treated mice, immune cells were not able to form TLS and small lymphoid aggregates were detected in some areas of the tissue sections. In a model of local inflammatory pain, it has been shown that sympathetic fibers are in a close proximity of subcutaneous blood vessels and up-regulate the vascular expression of ICAM-1 ⁽²⁷⁾. In the same study, the up-regulation of ICAM-1 was associated with an enhanced recruitment of opioid peptide-containing leukocytes. The chemical destruction of TH⁺ fibers by 6-OHDA impaired both the expression of ICAM-1 on vessels and leukocytes recruitment ⁽²⁷⁾. Thus, we can hypothesised that the quasi-absence of TLS observed in 6-OHDA-treated mice instilled with LPS or injected with tumor cells may be due to a decreased expression of adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1, MADCAM-1 needed for secondary lymphoid organs formation ⁽²⁸⁾. It remains to be investigated.

Another striking consequence of 6-OHDA treatment is the lack of detectable HEV (PNAd⁺), in mice instilled with LPS or injected with tumor cells (for mice exhibiting TLS/LA and LA). HEV allow the recruitment of immune cells thanks to the interaction of PNAd with CD62L expressed on the surface of immune cells. HEV exhibit a specific expression of a set of genes not expressed by other endothelial cells from blood vessels, encoding fucosyltransferase 7 (FUT7) and N-acetylglucosamine 6-O-sulphotransferase 2 (GlcNAc6ST2) ⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾. The fine-tuned coordination of the expression of these enzymes allows an efficient and specific expression of PNAd in HEV. Interestingly, sympathetic innervation promotes arterial endothelial fate and is involved in artery efficacy ⁽³¹⁾. Thus, one can hypothesized that sympathetic innervation, through the release of neurotransmitters could impact HEV maturation, which would account for the lack of detectable HEV in tissue sections of lungs from 6-OHDA-treated mice.

Moreover, HEV maturation also involves DC. It has been shown that CD11c⁺ DC, *via* the production of VEGF and through lymphotoxin (LT $\alpha_1\beta_2$) signalization, enables the maturation of HEV ^{(29) (32)}. Of note, CD11c⁺ DC could be still detected in lung tissue sections from 6-

OHDA-treated mice even though HEV could not be observed in the samples. However, it is not known whether these DC are immature resident cells unable to induce HEV maturation. In human clear-cell renal cell carcinoma, a large part of DC-Lamp⁺ DC have been found outside TLS and are likely not mature, as shown by the low expression of MHC Class II molecules and the absence of CD8⁽³³⁾.

Remarkably, the TH⁺ sympathetic fiber ablation resulted in a clear enhancement of TC1-Luc lung tumor burden. This could be related to the large decrease in the number of TLS that is associated with the depletion of sympathetic TH⁺ nerves in this experimental setting. Following TH⁺ fiber destruction, mostly lymphoid aggregates are observed in tissue sections from 6-OHDA-treated animals, while TLS are rare and exhibit small size. However, the orthotopic model that we used herein is marked by a rapid tumor growth. Thus, it is barely comparable to the human setting where NSCLC usually develop over long periods of time. The use of p53 K.O. / K-ras mutated mice that develop lung tumors^{(34) (35)} could be an interesting alternative model to investigate the effect of sympathetic depletion on TLS in a context where the tumor growth is slow. However, this mouse model suffers from severe limitations (number of animals that effectively develop tumour and heterogeneous kinetics of tumor development) that render the 6-OHDA treatment difficult to use.

By contrast, it has been reported that the chemical or surgical deletion of these fibers and by genetic deletion of stromal β_2 - and β_3 -adrenergic receptors prevents the early phases of tumor development and dissemination in two mouse models of prostate cancer⁽⁷⁾. However, the first model used the human prostate PC3 tumor cells injected into immunodeficient mice that are unable to develop TLS and adaptive anti-tumor immunity. The second model used transgenic mice that have been genetically manipulated to mimic the development of prostate cancer over a long period of time (2 weeks until 3-6 months) from a prostatic intraepithelial neoplasia to invasive adenocarcinoma. It is not known whether TLS are detected in the tumors of these animals that were not examined with regard to their anti-tumor immunity. The presence of TLS in patients with prostate adenocarcinoma has been rarely documented so far. Seventeen patients have been investigated and TLS detected by immunohistochemistry (IHC)⁽³⁶⁾. This study showed that they were associated with tumor regression (reviewed in 33). Thus, one can hypothesize that sympathetic nerve fibers have a dual opposite effect. On the one hand, at least in some cancer types such as prostate cancer, they favor tumor growth and dissemination. The densities of sympathetic and parasympathetic nerve fibers in prostate adenocarcinoma specimens from 43 patients has been associated with poor clinical outcomes⁽⁷⁾. On the other

hand, they participate to the genesis of TLS, either directly by cognate or non-cognate interaction with LT α cells and/or indirectly by acting on HEV maturation. The balance between these two roles would ultimately drives pro- or anti-tumor effect of these sympathetic fibers. Finally, the 3D imaging of tumor biopsies from NSCLC patients with a high and low TLS density (TLS^{high} and TLS^{low}) showed the presence of TH fibers in the proximity of CD20 B cells. We have also observed by 3D imaging that TH fibers are in proximity of B cell follicles within tonsil (Azar et al., submitted), enabling a possible cross-talk between immune cells and nerve fibers. In control mice, we were able to detect three types of TLS. The first type did not receive any input of TH fibers, the second one was close to these fibers, and finally in the last one, TH fibers colocalizes with B cells (data not shown). In treated mice, TLS were seen when TH fibers were not efficiently destroyed. In the human biopsies studied, we were also able to detect the presence of newly formed fibers in highly infiltrated tumors in comparison to tumors with low infiltrate.

Overall, we showed herein that sympathetic fibers are strongly involved in the development and maintenance of TLS in pulmonary tissue subjected to inflammatory processes. It paves the way to further studies to decipher the cellular and molecular mechanisms involved in TLS - nerve fibers cross-talk.

Material & Methods

Mouse sample collection. Seven to 14-week-old female C57Bl/6 mice were purchased from Janvier laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) and kept under pathogen-free conditions at the animal facility (UMS 028, School of Medicine, Sorbonne University, Paris, France). All animal studies were performed in compliance with the European guidelines and with the approval of the Charles Darwin Ethics Committee for animal experimentation (Paris, France) (agreement N°: A75-13-20). The animals were sacrificed, blood and tissues were collected, either frozen or fixed and embedded in paraffin according to standard histological procedures. Paraffin blocks were stored at room temperature until analysis.

Intranasal instillation of LPS. C57Bl/6 mice were anaesthetized with a ketamine/xylazine (100 mg/kg, Vibrac, France; 16 mg/kg, Bayer, La Garenne-Colombes, France, respectively) solution administrated intraperitoneally (i.p.) (0.1 ml per 10 g of weight). Then, either LPS

(Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, # L4130) or NaCl solutions were instilled daily by drops into nostrils for 5 days.

Sympathetic nervous branch removal via 6-hydroxydopamine (6-OHDA). C57Bl/6 mice were administrated i.p. NaCl or 6-OHDA solutions (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO; # 162957) at D0 (6-OHDA at 100 mg/kg) and D2 (6-OHDA at 250 mg/kg). Then, at D30, they received intranasal (i.n.) instillations of LPS or NaCl as described above.

Cell line. TC-1-Luc cells, kindly provided by Pr. Eric Tartour [Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Paris], were cultured in RPMI 1640 medium (Thermofisher, Waltham, MA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2mM L-Glutamine (Thermofischer), 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Thermofisher) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere.

In vivo tumor model. C57Bl/6 mice were injected with 5x10⁴ TC-1-Luc cells in the venous tail. Mice were monitored every 2–3 days for tumor progression, individual weight and behavior. Lung tumor growth was monitored by assessing luciferase activity. Mice were i.p. injected with D-luciferin (150 mg/kg, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) and bioluminescence images were acquired using an IVIS (Caliper Life Sciences, Perkin Elmer). Luciferase expression was then analyzed with the Living Image software 4.2 (Caliper Sciences, Perkin Elmer). Mice were sacrificed when body weight loss reached more than 20% or/and when they showed respiratory alterations, or when bioluminescence signals were saturated. The total flux (photons/sec/cm²) of bioluminescence was used to follow lung tumor growth.

Spleen analysis by flow cytometry. Spleen from control and 6-OHDA-treated mice were harvested 30 days following i.p. injection. Spleens were then crushed on a 100µm filter on ice, and centrifuged (260 x g, 10 min, 4°C). After removing supernatant, red blood cells were lysed with an ACK (ammonium-chloride-potassium) buffer [1 min, room temperature (RT)]. Blood lysis was stopped by adding PBS 0.5% BSA 2 mM EDTA buffer. Then, cells were counted, centrifuged (460 x g, 2 min, 4°C) and FcγRIIb, FcγRIII and FcγRIV were blocked by incubation with the anti-mouse FcγR 2.4G2 antibody. Cells were centrifuged (460 x g, 2 min, 4°C), washed twice with PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA and incubated with an

antibody mix (Supplementary Table 1) for 30 min at 4°C. Centrifugation and washes were carried out before cell fixation with paraformaldehyde (PFA) 0.5% (10 min, RT). Before fluorescence acquisition [LSR II, Becton Dickinson (BD), Le Pont de Claix, France], cells were centrifuged (460 x *g*, 2 min, 4°C) and resuspended in PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA.

Hematoxylin and eosin tissue staining. Formalin-fixed paraffine embedded (FFPE) lung sections of 4 µm-thick were deparaffinized in 100% clearane (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL; #3803600) and rehydrated in graded ethanol (100%, 90%, 70%, 50%). They were then immersed in hematoxylin (Dako, Agilent Technologies, les Ulis, France; #CS700), water and in eosin (Thermofisher, #71204). All slides were scanned with a Nanozoomer (Hamamatsu, Massy, France) and analyzed with the NDPviewer software (Hamamatsu). For each animal, the whole lung was analyzed.

Immunofluorescence staining. For TLS staining (using B220, CD3, PNAd, CD11c as markers), a multiplexed staining (tyramid signal amplification, TSA, Thermofisher) was used. Briefly, FFPE lung sections were deparaffinized in 100 % clearane and rehydrated in graded ethanol (100%, 90%, 70%, 50%). They were then immersed in citrate buffer pH 6.0 (Dako, Agilent Technologies; #GV80511-2) for antigen retrieval for 30 min at 97°C. Endogenous peroxidase was inhibited in 3% hydrogen peroxide in distilled water for 15 min. Slides were then washed before blocking with Dako protein block (Dako, Agilent Technologies; #X090930-2) for 30 min. The first staining was carried out using the rat anti-mouse B220 (BioLegend, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France) for 1 h at room temperature. Lung sections were then incubated with secondary rat HRP-ready-to-use (Eurobio, les Ulis, France) antibody polymers for 45 min at room temperature. Then, fluorescent-labeled tyramides (AF488, Thermofisher) were used as a substrate for HRP reaction. Unspecific binding was eliminated by immersion of slides in citrate buffer pH 6.0 at 97°C for 10 min. Sections were then blocked for 30 minutes before starting the second (anti-CD3, Novus Biologicals, Centennial, CO) and third staining (anti-PNAd, BD or anti-CD11c, Invitrogen, Carlsbad, CA) as mentioned for the first staining. Relevant secondary HRP-conjugated antibodies were used depending on the species origin of primary antibodies. Nucleus were stained with DAPI (Thermofisher; #D1306) and scanned with the Axio Scanner (Axio Scan.Z1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). All the antibodies used for the immunofluorescence staining are listed in Supplementary Table

2 and Table 3.

Method for TLS and B and T cell quantification. For TLS quantification, serial slides from the whole lung were analyzed using NDP viewer software. About 100 tissue slides/whole lung were prepared and about 30 slides stained with hematoxylin/eosin were analyzed for TLS content. The number and the size of TLS were reported manually [(TLS density/Tissue section) (expressed in μm^2)] (Hamamatsu). For the tissue quantification of B and T lymphocytes labelled by immunofluorescence, the Visiopharm software (Le Bouscat, France) was used.

Whole mount staining of ears. Ears were separated and only the part showing vasculature was kept and fixed in PFA 4% for 30 min. After three washes in PBS, the non-specific binding was blocked by incubation of the ears in 0.1 M Tris-HCl/0.3 M NaCl, Blocking (Perkin Elmer) (pH 7.4) containing 0.5% Triton X-100 (TBNT) for 4 h at RT. The anti-TH antibody (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was then added and incubated overnight at 4°C. α -SMA-cy3 antibody (Sigma-Aldrich) and secondary antibodies (donkey anti-rabbit IgG-AF647, Invitrogen) were then incubated after at least three washes with 0.1 M Tris-HCl/0.3 M NaCl (pH 7.4) containing 0.5% Triton X-100 (TNT) for 4 h. Ears were mounted in Dako fluorescent medium (Agilent Technologies, #S3023) and images were acquired with the Zeiss Axioimager Z2 Apotome (Carl Zeiss Microscopy). All antibodies used are listed in the Supplementary Tables 2 and 3.

iDISCO⁺ for mouse and human tissue samples. To analyze mouse lungs, we used the iDISCO technique as previously described⁽³⁷⁾. Briefly, lungs were fixed in PFA 4% and were dehydrated in graded methanol (20%, 40%, 60%, 80%, 100%, each one for 1 h at room temperature), then washed twice in methanol 100% and cooled at 4°C. Lungs were then incubated in 66% dichloromethane (DCM) 33% methanol overnight under agitation at 4°C and washed again twice in 100% methanol at 4°C (1 h each). Lungs were then bleached in 5% hydrogen peroxide solution overnight at 4°C, rehydrated with graded methanol (80%, 60%, 40%, 20%, each one for 1 h at room temperature) and washed twice in PTx.2 (0.01 M PBS with 0.2% Triton X-100, 2 x1 h) at room temperature. Permeabilization was then carried out for two days at 37°C under agitation with 0.01 M PBS with 0.2% Triton X-100, 20% DMSO and 0.3 M glycine. Non-specific binding sites were blocked with 0.2% Triton X-100, 10% DMSO and 5% of donkey serum by incubation for two days at 37°C under agitation. Following

blocking, lungs were incubated with the first antibody (anti-TH) diluted in 0.01 mM PBS, 0.2% Tween-20, 10 mg/ml heparin, 5% DMSO and 3% of heat-inactivated donkey serum, for 3 days at 37°C under agitation. Lungs were then washed several times and incubated overnight with 0.01 mM PBS, 0.2% Tween-20, and 10 mg/ml heparin (PTwH) before adding α -SMA-cy3 antibody (Sigma-Aldrich) and secondary antibody (donkey anti-rabbit IgG-AF647, Invitrogen) for 3 days at 37°C under agitation. After staining, lungs were washed several times with PTwH and incubated overnight with PTwH at room temperature. For clearing, lungs were dehydrated in graded methanol and incubated again with 66% DCM for 3 h at room temperature and washed twice in 100% DCM before storing in di-benzyl-ether. For NSCLC biopsies, we used the modified protocol (piDISCO⁺) developed in our laboratories (Azar et al., submitted). All the antibodies used in this section are listed in the Supplementary Tables 2 and 3.

Imaging for 3D staining. All samples were acquired with a Light sheet microscope (Ultramicroscope, LaVision BioTec, Bielefeld, Germany). The excitation laser lines of 561 and 647 nm were used. Z-step size of 3 μ m was used for lung imaging. All data were collected in a 16-bit TIFF format. Then, raw data were converted using the Imaris file converter software (Bitplane, Zurich, Switzerland) into ims. Images and videos were created using Imaris 9.3.0 software (Bitplane).

Western Blot. Protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay Kit (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France; #71285-3). Samples were then mixed with Laemmli buffer with 2-beta mercaptoethanol (3:1 V/V) and heated for 5 min at 95°C. 30 micrograms of proteins were separated by SDS-PAGE (4-15% Mini-Protean TGX Precast protein gel) (BioRad, Hercules, CA). Gels were then blotted onto 0.2 mm PVDF membranes (BioRad) and blocked with 5% dried milk in TBST (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) for 2 h. Membranes were incubated overnight with a primary antibody at 4°C. After washing with TBST, peroxidase-conjugated revealing antibodies were incubated with membranes for 1 h at room temperature. The detection of proteins was carried out by chemiluminescence reaction (ECL). Data were captured with the Fusion FX imaging system (Vilber, Marne-la-Vallée, France). All the antibodies used in this section are listed in the Supplementary Tables 2 and 3.

Catecholamine dosage. Mouse blood collection was carried out in heparin tubes, centrifuged (15 min at 425 x g, room temperature), and plasma were collected and kept at -80°C before

use. Catecholamines dosage was performed using the ELISA kit ABIN772979 (Antibodies-Online, Aachen, Germany). Briefly, 100 µl plasma were added in each well and 50 µl anti-catecholamine-HRP conjugates were added and incubated at 37°C for 1 h. After washing (1X wash solution) and drying, substrates A and B (50 µl each) were added in each well and incubated at 37°C for 20 min. The stop solution was then added before O.D._{450nm} reading. A control standard curve was used to determine catecholamine concentrations in plasma.

Human Non-Small-Cell-Lung-Cancer (NSCLC) tumors. FFPE non-tumor distant and lung tumor samples were obtained from two NSCLC patients during surgical resection from the department of Pathology of Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France. Informed consent was obtained from these patients that were included in a study performed in accordance with the Declaration of Helsinki, whose protocol had been approved by the local ethic and human investigation committee (nos. 2017-A03081-52).

Statistical analysis. For statistical analyses, GraphPad Prism software (Version 7.0) (GraphPad, San Diego, CA) was used. Statistical significance of differences between mean values was determined using a two-tailed Student's *t*-test. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

References

1. Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Sep 20;26(27):4410–7.
2. Dieu-Nosjean M-C, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol Rev*. 2016 May;271(1):260–75.
3. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
4. Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TKD, Lupo A, Klein C, Knockaert S, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells. *Cancer Res*. 2014 Feb 1;74(3):705–15.
5. Remark R, Becker C, Gomez JE, Damotte D, Dieu-Nosjean M-C, Sautès-Fridman C, et al. The Non–Small Cell Lung Cancer Immune Contexture. A Major Determinant of Tumor Characteristics and Patient Outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Feb 15;191(4):377–90.
6. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 1;189(7):832–44.
7. Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science*. 2013 Jul 12;341(6142):1236361.
8. Peterson SC, Eberl M, Vagnozzi AN, Belkadi A, Veniaminova NA, Verhaegen ME, et al. Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Cell Stem Cell*. 2015 Apr 2;16(4):400–12.
9. Stopczynski RE, Normolle DP, Hartman DJ, Ying H, DeBerry JJ, Bielefeldt K, et al. Neuroplastic changes occur early in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2014 Mar 15;74(6):1718–27.
10. Zhao C-M, Hayakawa Y, Kodama Y, Muthupalani S, Westphalen CB, Andersen GT, et al. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Sci Transl Med*. 2014 Aug 20;6(250):250ra115.
11. Pundavela J, Roselli S, Faulkner S, Attia J, Scott RJ, Thorne RF, et al. Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Mol Oncol*. 2015 Oct;9(8):1626–35.
12. Hanoun M, Maryanovich M, Arnal-Estapé A, Frenette PS. Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer. *Neuron*. 2015 Apr 22;86(2):360–73.
13. Mauffrey P, Tchitchek N, Barroca V, Bemelmans A, Firlej V, Allory Y, et al. Progenitors from the central nervous system drive neurogenesis in cancer. *Nature*. 2019 May;569(7758):672–8.
14. Madeo M, Colbert PL, Vermeer DW, Lucido CT, Cain JT, Vichaya EG, et al. Cancer exosomes induce tumor innervation. *Nat Commun*. 2018 Oct 16;9(1):1–15.

15. Hayakawa Y, Sakitani K, Konishi M, Asfaha S, Niikura R, Tomita H, et al. Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. *Cancer Cell*. 2017 09;31(1):21–34.
16. Kamiya A, Hayama Y, Kato S, Shimomura A, Shimomura T, Irie K, et al. Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. *Nat Neurosci*. 2019 Aug;22(8):1289–305.
17. Olivier BJ, Cailotto C, van der Vliet J, Knippenberg M, Greuter MJ, Hilbers FW, et al. Vagal innervation is required for the formation of tertiary lymphoid tissue in colitis. *Eur J Immunol*. 2016 Oct;46(10):2467–80.
18. Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie J-J, et al. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res*. 2011 Sep 1;71(17):5678–87.
19. Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C, Basbaum AI. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1986 Dec;6(12):3423–9.
20. Grebe KM, Takeda K, Hickman HD, Bailey AM, Embry AC, Bennink JR, et al. Cutting Edge: Sympathetic Nervous System Increases Proinflammatory Cytokines and Exacerbates Influenza A Virus Pathogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jan 15;184(2):540–4.
21. Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, et al. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1789–802.
22. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):927–34.
23. Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, et al. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J Exp Med*. 2009 Nov 23;206(12):2593–601.
24. Rangel-Moreno J, Carragher DM, Garcia-Hernandez M de la L, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, et al. The development of inducible Bronchus Associated Lymphoid Tissue (iBALT) is dependent on IL-17. *Nat Immunol*. 2011 Jun 12;12(7):639–46.
25. Martin C, Thévenot G, Danel S, Chapron J, Tazi A, Macey J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo. *Eur Respir J*. 2011 Oct;38(4):939–46.
26. Belvisi MG. Overview of the innervation of the lung. *Curr Opin Pharmacol*. 2002 Jun;2(3):211–5.
27. Mousa SA, Shaqura M, Brendl U, Al-Khrasani M, Fürst S, Schäfer M. Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain. *Brain Behav Immun*. 2010 Nov;24(8):1310–23.
28. van de Pavert SA, Mebius RE. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*. 2010 Sep;10(9):664–74.

29. Moussion C, Girard J-P. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature*. 2011 Nov 13;479(7374):542–6.
30. Girard J-P, Moussion C, Förster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2012 Nov;12(11):762–73.
31. Pardanaud L, Pibouin-Fragner L, Dubrac A, Mathivet T, English I, Brunet I, et al. Sympathetic Innervation Promotes Arterial Fate by Enhancing Endothelial ERK Activity Novelty and Significance. *Circ Res*. 2016 Aug 19;119(5):607–20.
32. Webster B, Ekland EH, Agle LM, Chyou S, Ruggieri R, Lu TT. Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells. *J Exp Med*. 2006 Aug 7;203(8):1903–13.
33. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019 Jun;19(6):307–25.
34. DuPage, M., Dooley, A. L. & Jacks, T. Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nat. Protoc*. 4, 1064–1072 (2009).
35. Joshi, N. S. et al. Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses. *Immunity* 43, 579–590 (2015).
36. García-Hernández M de la L, Uribe-Urbe NO, Espinosa-González R, Kast WM, Khader SA, Rangel-Moreno J. A Unique Cellular and Molecular Microenvironment Is Present in Tertiary Lymphoid Organs of Patients with Spontaneous Prostate Cancer Regression. *Front Immunol*. 2017;8:563.
37. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):896–910.

Acknowledgments

This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Sorbonne University, and the Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB) at the Collège de France. The light-sheet microscope used in this work was funded by the Leducq foundation. L.L. was supported first by a fellowship from the French ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (école doctorale # 394) and then by a fellowship from “La Ligue contre le Cancer”. S.A. was supported by the “Agence Nationale pour la Recherche”.

Author contributions

L.L., S.A., J.-L.T., M.-C.D.N. and I.B. designed the study. L.L. and S.A. performed the experiments. P.V. provided NSCLC specimens. S.A. and S.M. performed the imaging. L.L., M.-C.D.-N., I.B., and J.-L.T. wrote the manuscript. S.A. reviewed the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript text.

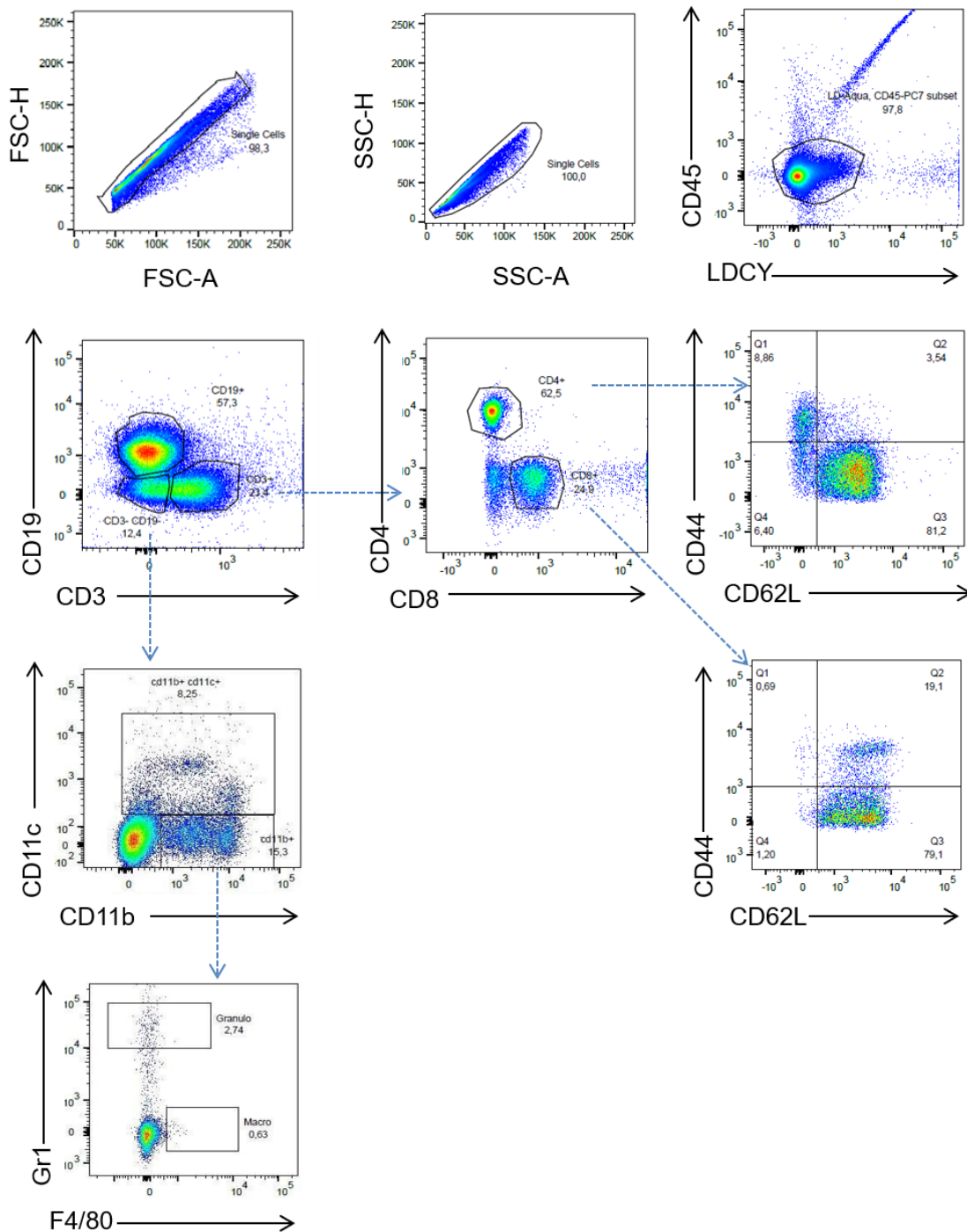
Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

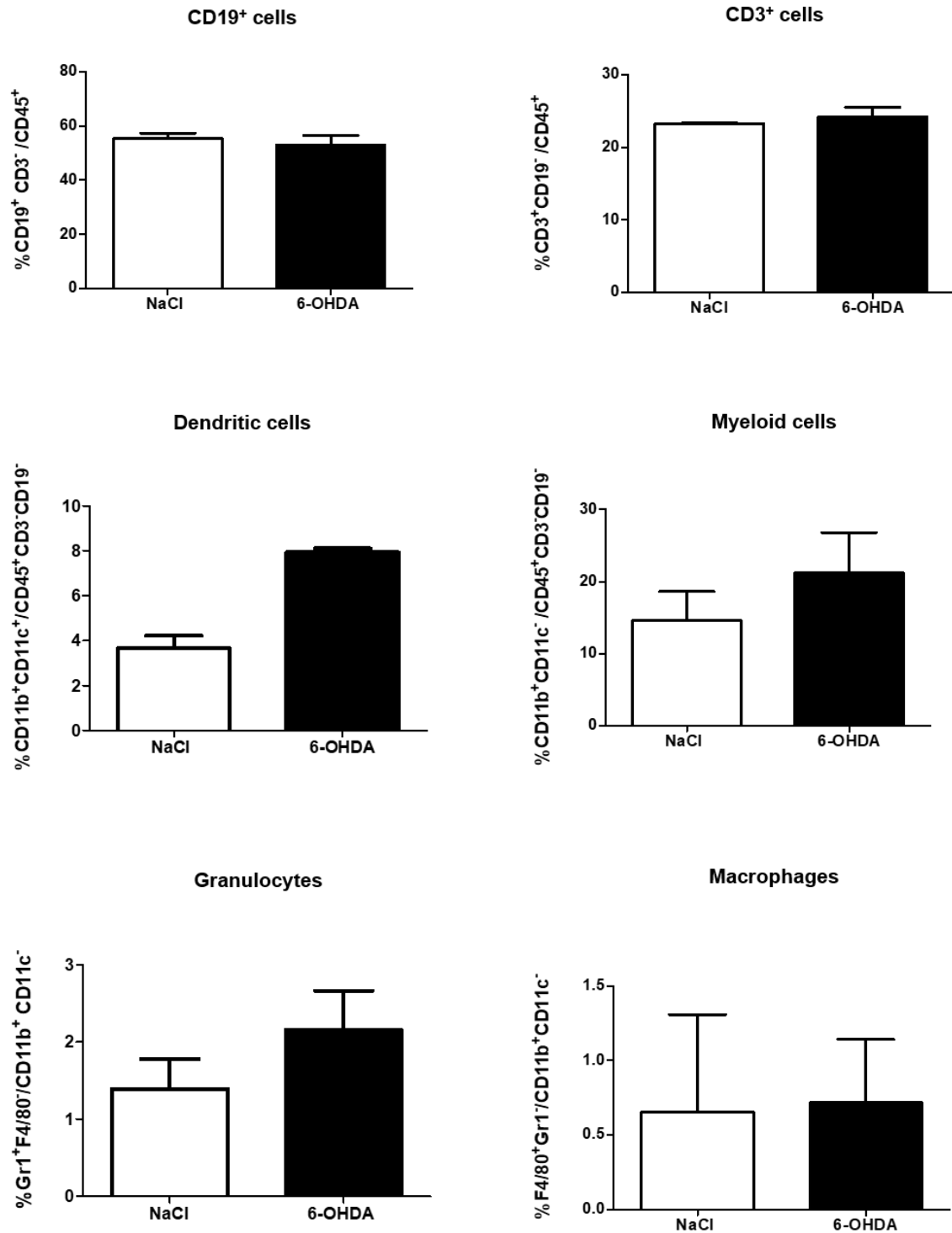
Supplementary Figures & Tables

- Supplementary Fig.1. Gating strategy for the evaluation of immune cells in the spleen of immunocompetent C57Bl/6 mice.
- Supplementary Fig. 2. Immune cells analysis of the spleen following TH fibers deletion by 6-OHDA injections.
- Supplementary Fig. 3. CD8 T cells compartment of the spleen following TH fibers deletion by 6-OHDA injections.
- Supplementary Fig. 4. CD4 T cells compartment in the spleen following TH fibers deletion by 6-OHDA injections
- Supplementary Fig. 5. Setting of the lung tumor model.
- Supplementary Figure 6. Validation of TH fibers loss following 6-OHDA treatment in the tumor model.
- Supplementary Fig. 7. Quantitative analysis of lung TLS density.

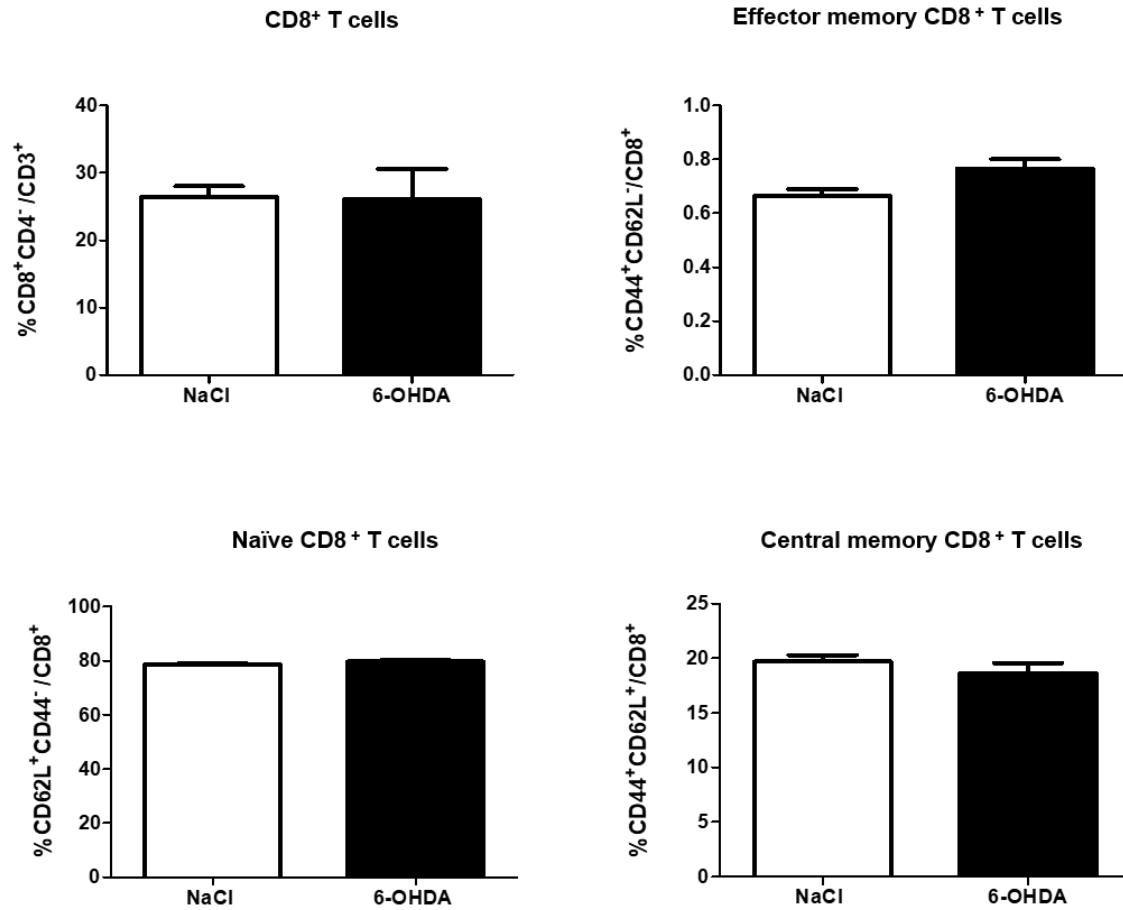
- Supplementary Table 1. Antibodies used for flow cytometry.
- Supplementary Table 2. Primary antibodies used to analyze tissue section.
- Supplementary Table 3. Secondary antibodies used.



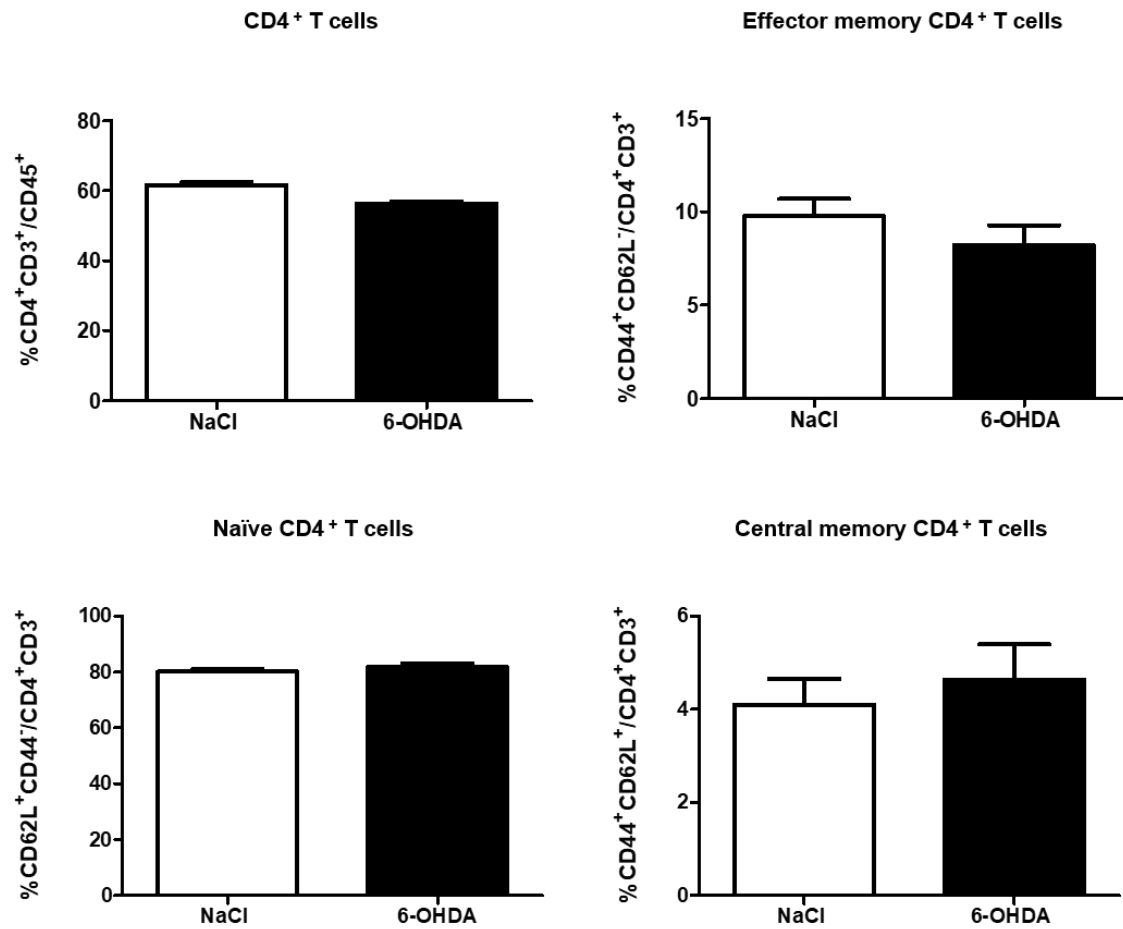
Supplementary Figure 1. Gating strategy for phenotyping immune cells in the spleen of immunocompetent C57Bl/6 mice. Lymphocyte population was gated on a forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) plot followed by LDCY exclusion to identify alive cells. B and T cells were identified as CD19⁺ and CD3⁺ cells, respectively. The T cell subset was further divided in CD8⁺ and CD4⁺ T cells. Among these populations, effector memory (CD44^{high}CD62L^{low}) (Q1), central memory (CD44^{high}CD62L^{high}) (Q2) and naïve (CD44^{low}CD62L^{high}) (Q3) were gated based on the expression of CD62L and CD44. Among CD19⁺CD3⁻ population, myeloid cells were defined as CD11c⁻CD11b⁺ cells whereas dendritic cells were identified as CD11b⁺CD11c⁺ cells. Within the myeloid cell subset, macrophages and granulocytes were defined as F4/80⁺Gr1⁻ and F4/80⁺Gr1⁺ cells, respectively.



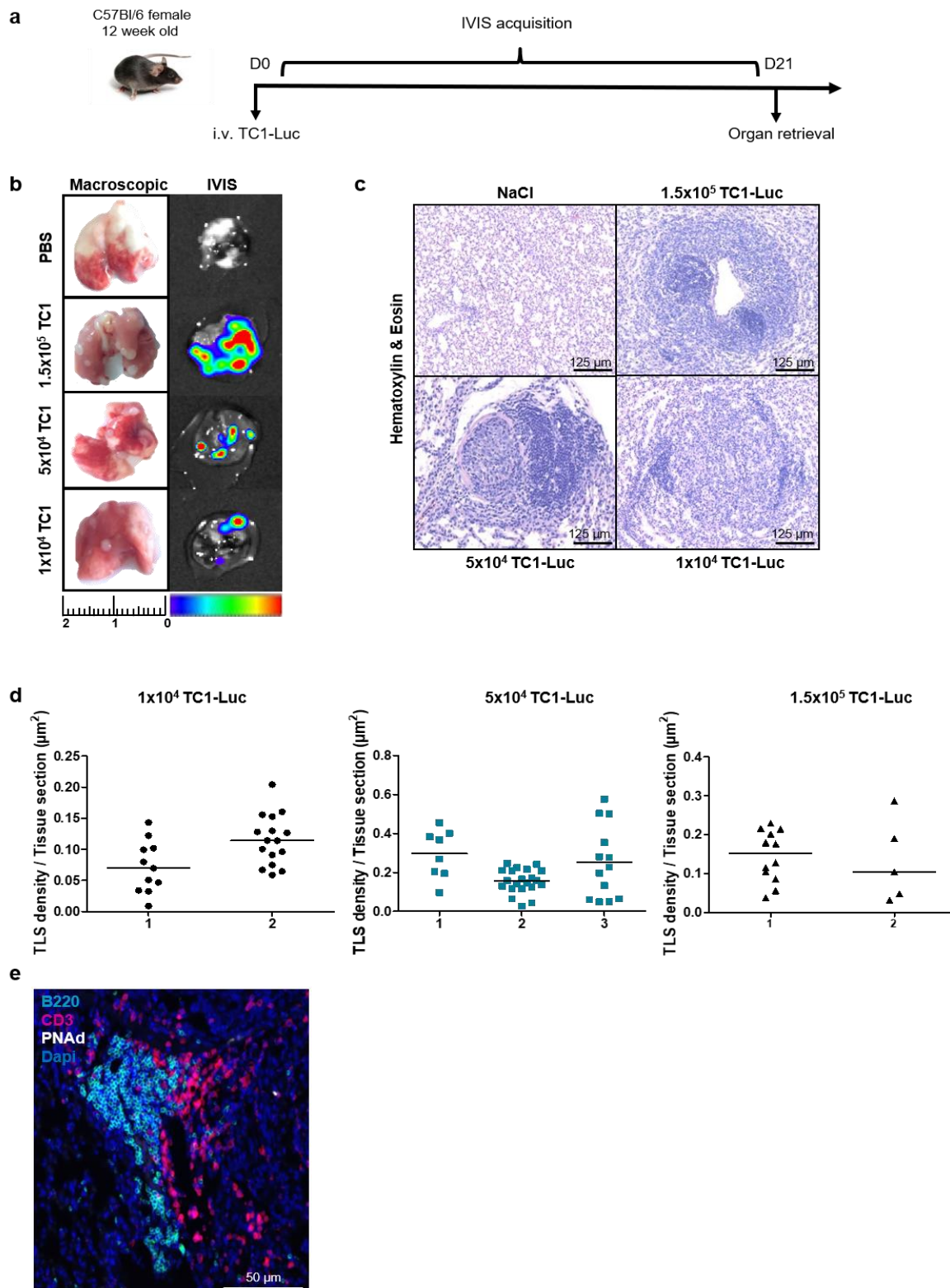
Supplementary Figure 2. Phenotypic analysis of spleen cells following sympathetic TH⁺ fiber deletion by 6-OHDA treatment. Immunocompetent mice received either NaCl or 6-OHDA intraperitoneal injections at D0 (100 mg/kg) and D2 (250 mg/kg). Spleens were then retrieved at D30 for flow cytometry analysis. Percentages of immune cell subsets among CD45⁺ cells are represented for NaCl-injected (n=2) and 6-OHDA mice (n=3). Histogram bars represent the S.E.M. of values obtained from NaCl-injected (n=2) and 6-OHDA-treated (n=3) animals.



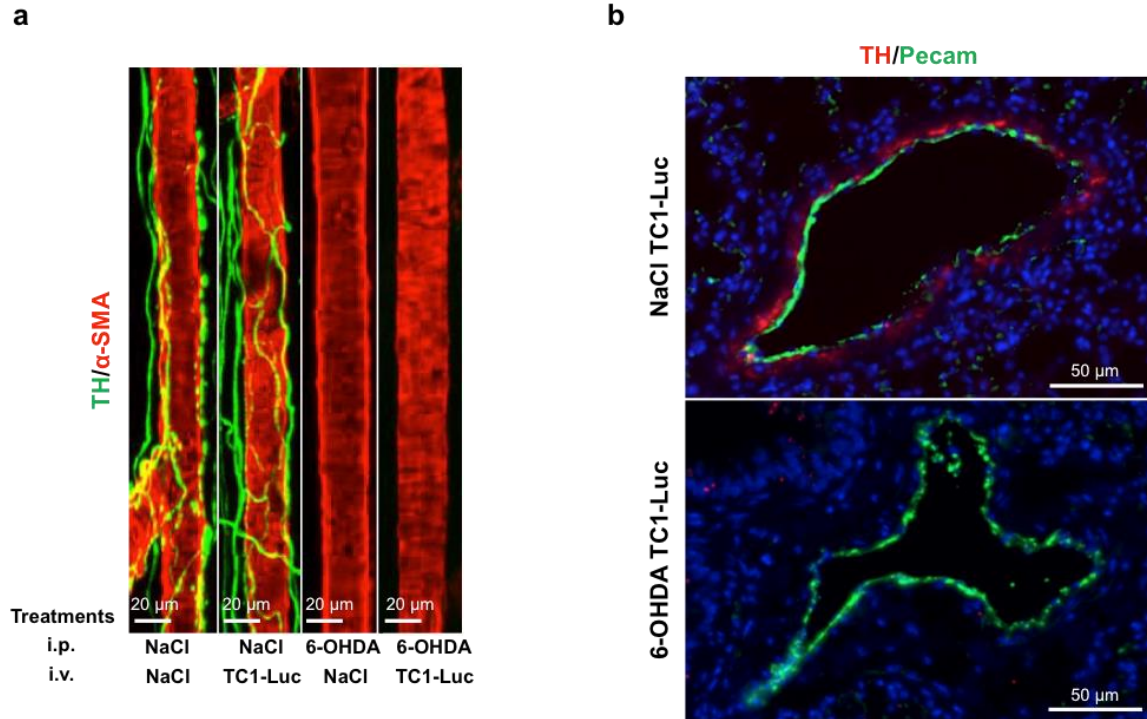
Supplementary Figure 3. Splenic CD8⁺ T cell subsets following TH⁺ fiber deletion by 6-OHDA treatment. Percentages of effector memory, central memory and naïve CD8⁺ T cells among total CD8⁺ T cells represented for NaCl-injected (white bars, n=2) and 6-OHDA treated mice (black bars, n=3). Histogram bars represent the S.E.M. of values obtained from NaCl-injected (n=2) and 6-OHDA-treated (n=3) animals.



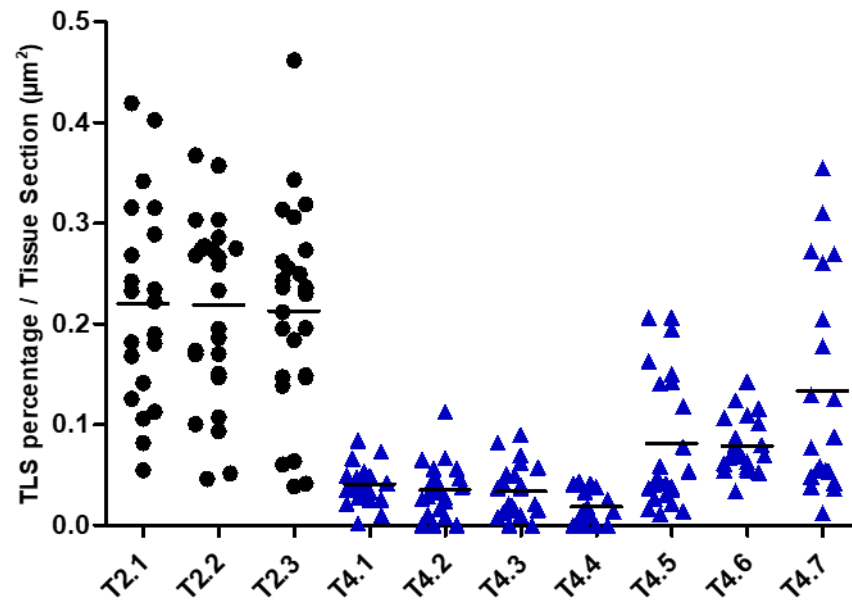
Supplementary Figure 4. Splenic CD4⁺ T cell subsets following TH⁺ fiber deletion by 6-OHDA treatment. Percentages of central memory, effector memory and naïve CD4⁺ T cells among total CD4⁺ CD3⁺ T cells are represented for NaCl-injected (white bars, n=2) and 6-OHDA-treated mice (black bars, n=3). Histogram bars represent the S.E.M. of values obtained from NaCl-injected (n=2) and 6-OHDA-treated (n=3) animals.



Supplementary Figure 5. Experimental setting of the TC1-Luc lung tumor model. **a**, C57Bl/6 mice received intravenous injection (i.v.) of either NaCl or TC1-Luc cells (1.5×10^5 , $n=2$; 5×10^4 , $n=3$; 1×10^4 , $n=2$) at D0. **b**, tumor progression was analyzed by the measurement of D-luciferin bioluminescence. Lungs were retrieved at D21 and subjected to bioluminescence that showed a TC1-Luc dose-dependent tumor growth. **c**, lungs were then fixed and embedded in paraffin for hematoxylin and eosin counterstaining and examined for TLS presence. Large TLS could be detected in lungs from mice that received 1.5×10^5 or 5×10^4 TC1-Luc cells; **d**, quantification of TLS in FFPE lung tissue section from mice that received i.v. injection of various numbers of TC1-Luc cells. Each mouse is indicated by arabic numeral in abscissa. Bars represent the mean values of TLS density. **e**, detection of TLS by immunofluorescence staining of B cells (B220), T cells (CD3), and HEV (PNAf).



Supplementary Figure 6. Assessment of TH⁺ fiber loss following 6-OHDA treatment of TC1-Luc tumor-bearing mice. C57Bl/6 mice received intraperitoneal (i.p.) injection of either NaCl (n=6) or 6-OHDA (n=12) at D0 and D2. TC1-Luc cells (5×10^4) were injected intravenously (i.v.) at D30. **a**, ears were analyzed by whole mount staining for α -SMA (smooth muscle actin, red) and TH (tyrosine hydroxylase, green) expression. **b**, FFPE lungs were stained with anti-TH and anti-PECAM-1 (CD31, a pan-endothelial cell marker) antibodies.



Supplementary Fig. 7. Quantitative analysis of lung TLS density in TC1-Luc tumor-bearing mice. Quantitative analysis of lung TLS density per mouse at D18 following TC1-Luc cell i.v. injection with (T4) (n=7) or without (T2) (n=3) sympathetic TH⁺ fiber deletion by 6-OHDA treatment. Bars represent mean values for each group.

Supplementary Table 1. Antibodies used for flow cytometry.

Antibody	Fluorochrome	Host	Final dilution	Clone	Distributor
CD11c	BV421	Hamster IgG1	1/200	HL3	BD biosciences
CD3	BV650	Rat IgG2	1/100	17A2	BD biosciences
CD11b	FITC	Rat IgG2	1/150	M1/70	BD biosciences
CD19	PerCP/Cy5.5	Rat IgG2	1/100	1D3	Biolegend
CD45	Pe/Cy7	Rat IgG2	1/800	30-F11	Biolegend
Gr1	PE	Rat IgG2	1/150	1A8	Diagomics
F4/80	AF700	Rat IgG2	1/100	BM8	Biolegend
CD62L	BV605	Rat IgG2	1/100	MEL-14	Biolegend
CD4	PE-Texas Red	Mouse IgG2	1/100	S3.5	Thermofisher
CD44	APCeF780	Rat IgG2	1/100	IM7	ebiosciences
CD8	APC	Mouse IgG1	1/100	SK1	Biolegend

Supplementary Table 2. Primary antibodies used.

Primary Antibodies against	Technics			Antigen retrieval	Species	Reference	Distributor
	iDISCO	IF	WB				
α -SMA-Cy3	1/200	1/200	NA	NA	Mouse	C6198	Sigma
CD20	1/200	1/70	NA	NA	Mouse	M0755	Dako
GAPDH	NA	NA	1/3000	NA	Rabbit	TAB1001	Invitrogen
B220	1/250	1/250	NA	YES*	Rat	103201	Biolegend
Actine	NA	NA	1/1000	NA	Rabbit	A2066	Sigma
CD11c	1/100	NA	NA	YES	Mouse	MA11C5	Invitrogen
PNAd	1/100	NA	NA	YES	Rat	553370	BD biosciences
CD3	NA	1/70	NA	YES	Rabbit	NB-600-1441	Novus biological
NF-L	NA	NA	1/1000	YES	Rabbit	2837S	Cell signaling
NF-H	NA	NA	1/1000	YES	Mouse	2838S	Cell signaling
TH	1/200	1/200	1/1000	NA	Rabbit	AB152	Millipore
CD31 (Pecam)	NA	1/200	NA	YES	Rat	553370	BD pharmingen

**Antigen retrieval was carried out only for 2D section stainings*
 NA : not applicable

Supplementary Table 3. Secondary antibodies used.

Secondary antibody				
iDISCO				
Fluorochrome	Dilution	Species	Reference	Distributor
Alexa Fluor 647	1/400	Goat anti-rabbit	A21206	Invitrogen
Alexa Fluor 555	1/400	Goat anti-mouse	A21424	Invitrogen
Alexa Fluor 555	1/400	Donkey anti-rabbit	A31572	Invitrogen
Alexa fluor 555	1/400	Donkey anti-rat	A21434	Invitrogen
IF				
Alexa Fluor 647	1/400	Chicken anti-rat	A21472	Invitrogen
Alexa Fluor 488	1/400	Goat anti-rat	A11006	Thermofisher
Alexa fluor 647	1/400	Goat anti-rabbit	A27040	Thermofisher
Alexa fluor 647	1/400	Donkey anti-rabbit	A31573	Thermofisher
Alexa fluor 647	1/400	Donkey anti-mouse	A31571	Invitrogen
HRP polymers and tyramides				
Polymers HRP *	NA	Goat anti-mouse	K400111-2	Dako
Polymers HRP*	NA	Goat anti-rabbit	K400311-2	Dako
Polymers HRP*	NA	Goat anti-rat	MP-7404-50	Eurobio
AF488	1/400	NA	B40953	Thermofisher
AF647	1/400	NA	B40958	Thermofisher
AF546	1/400	NA	B40954	Thermofisher
Western Blot				
HRP*	1/4000	Rabbit anti-mouse	A27025	Thermofisher
HRP*	1/4000	Goat anti-rabbit	AP307P	Millipore

* Horse radish peroxidase

Electronic supplementary material

- **Video 1—Animated 3D rendering of α -SMA and TH in PFA-fixed control lung**

3D rendering using IMARIS software of α -SMA and TH immunolabelling within a PFA-fixed mouse lung using iDISCO protocol.

- **Video 2— Animated 3D rendering of α -SMA and TH in PFA-fixed 6-OHDA-treated lung**

3D rendering using IMARIS software of α -SMA and TH immunolabelling within a PFA-fixed 6-OHDA-treated mouse lung using iDISCO protocol.

Discussion du manuscrit #2

Afin d'étudier le rôle occupé par des fibres nerveuses sympathiques dans l'induction des TLS, j'ai développé deux modèles précliniques. Le premier, fondé sur des injections intranasales de LPS, a permis de visualiser la présence transitoire des TLS. Ces dernières étaient visibles 11 jours et 14 jours après la première instillation, mais alors de taille réduite. Ces TLS ne sont plus détectées 21 jours après, témoignant du caractère transitoire, et dépendant d'un stimulus inflammatoire, de la présence de ces structures. Le second modèle, un modèle tumoral reposant sur l'injection par voie intraveineuse de cellules TC1 exprimant la luciférase (TC1-Luc), a permis d'obtenir une présence massive de TLS accompagnant la croissance tumorale jusqu'au sacrifice des animaux. Dans les deux modèles, les TLS se sont avérées être des TLS matures, composées de LB, de LT à proximité desquels des HEV ont été détectées.

Dans ces deux modèles, la formation des TLS a été fortement impactée par l'ablation chimique des fibres nerveuses sympathiques. L'analyse du tissu pulmonaire des animaux ayant subi cette ablation et ayant reçu des instillations intranasales de LPS ont montré une absence quasi-totale de TLS, accompagnée par l'apparition de quelques agrégats lymphoïdes et par l'absence de HEV détectables. Il est intéressant de souligner que, par contre, différentes situations ont été observées chez les animaux porteurs de tumeurs pulmonaires TC1-Luc et donc soumis à un processus inflammatoire s'inscrivant dans la durée et qui pourrait être d'une nature cellulaire et moléculaire différente de celui induit par le LPS. Dans ce modèle tumoral, différents « stades » de formation ou de déstructuration de TLS ont été observés : de façon majoritaire des agrégats lymphoïdes, semblables à ceux observés dans le modèle utilisant le LPS, sont détectés, mais également quelques TLS, ainsi que des situations plus mixées où des TLS et des agrégats lymphoïdes sont trouvés dans la même tumeur. Comme dans le cas de l'inflammation induite par du LPS chez des animaux traités par la 6-OHDA, les HEV sont absentes. La déléation des fibres sympathiques perturbe donc la mise en place des TLS dans ces deux modèles précliniques, éventuellement du fait d'un défaut de maturation des HEV. Soulignons de plus que le pourcentage de LB et LT dans les poumons provenant de souris traitées par la 6-OHDA est resté similaire à celui trouvé dans les souris contrôles, suggérant que le recrutement des cellules immunitaires n'est pas impacté par cette absence de HEV et s'est effectué éventuellement via des vaisseaux lymphatiques.

Par ailleurs, suite à la déplétion des fibres sympathiques TH⁺, les tumeurs obtenues se sont avérées être majoritairement de moyenne et grande taille, alors que, chez les animaux contrôles,

des tumeurs de petites tailles ont été également observées en sus des tumeurs de tailles moyennes et grandes. Une hypothèse expliquant cette observation d'une croissance tumorale plus rapide en absence de fibres nerveuses sympathiques, est que l'absence de TLS accompagnant l'ablation des fibres conduit à l'absence de l'élaboration d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

Enfin, l'analyse comparative de deux biopsies NSCLC, l'une riche en TLS (TLS^{high}), l'autre pauvre (TLS^{low}), a montré tout d'abord une diminution de l'innervation par des fibres sympathiques lorsque le tissu tumoral est comparé au tissu pulmonaire à distance de la tumeur, ce phénomène étant observé dans les deux biopsies mais plus marqué avec la biopsie riche en TLS. C'est également le cas lorsque est analysée la présence de fibres nerveuses matures (NF-H⁺). Par contre, une présence très accrue de fibres nerveuses nouvellement formées (NF-L⁺) est détectée dans la biopsie riche en TLS par rapport à celle faiblement infiltrée (TLS^{low}). Ces observations demandent évidemment à être renforcées, tout comme celle indiquant qu'une proximité étroite entre TLS (mis en évidence par le marquage des lymphocytes B) et fibres sympathiques TH⁺ peut parfois être observée. Toutes ces observations renforcent l'hypothèse d'un dialogue croisé entre cellules immunitaires, TLS, HEV et fibres nerveuses.

Cette étude montre que les fibres sympathiques sont fortement impliquées dans la présence ou l'absence des TLS dans le parenchyme pulmonaire soumis à des processus inflammatoires. Elle ouvre la voie à d'autres études pour déchiffrer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le dialogue entre TLS et fibres nerveuses.

Discussion

L'étude du microenvironnement tumoral au cours des deux dernières décennies, a permis de mieux comprendre les interactions entre cellules tumorales et immunitaires. Les TLS ont été observées au sein de nombreux types de tumeurs solides, et ont été associées à un meilleur pronostic chez les patients dans la très grande majorité des études. Ces observations, sont en lien direct avec le développement de réponses immunitaires observées dans le contexte des TLS dans des modèles infectieux pré-cliniques (Geurts van Kessel et al., 2009 ; Foo and Phipps, 2010). Ces données font des TLS de réelles cibles thérapeutiques. Les acteurs impliqués dans leur genèse sont variés. En effet, de nombreux éléments cellulaires (ex. LT CD4⁺, LT CD8⁺, LB, macrophages, cellules dendritiques, cellules NK, LT_i, neutrophiles) et moléculaires (ex. chimiokines, lymphotoxines) ont été décrits. En s'appuyant sur l'analogie morphologique existant entre TLS et GL, nous avons émis l'hypothèse que les fibres nerveuses, impliquées dans la genèse des GL, pourraient également pour celle des TLS (van de Pavert et al., 2009). Ces fibres agiraient en amont des facteurs décrits ci-dessus.

Au cours de mes trois années et demie de thèse, je me suis donc focalisée sur le rôle des fibres nerveuses dans la formation des TLS. Cette étude novatrice a permis d'analyser plus particulièrement les interactions entre les TLS et les fibres nerveuses sympathiques au sein d'un environnement inflammatoire. Cette thématique audacieuse a nécessité le développement de nouvelles approches au sein de notre équipe, notamment, le développement de deux modèles murins et d'une technique de marquages en 3D (en collaboration avec le Dr. Isabelle Brunet) adaptée à ces deux modèles (non-tumoral et tumoral) ainsi qu'une étude de biopsies NSCLC fixées et incluses en paraffine pour l'observation de l'innervation tumorale pulmonaire.

1. Induction transitoire de TLS au niveau pulmonaire via des instillations intranasales répétées de LPS

Divers modèles d'induction de TLS ont été décrits dans la littérature (ex. injections d'extraits bactériens ou de virus). L'étude de la cinétique de recrutement des cellules immunitaires suite à l'induction d'une inflammation nous apprend que les DC infiltrent le tissu enflammé au bout de 3 à 4 jours, suivies par la migration des LB et LT en moins d'une semaine (Halle et al., 2009). Nous avons opté pour un modèle simple et rapide fondé sur des injections intranasales répétées de LPS chez des souris sauvages adultes. Dans ce modèle, nous avons focalisé notre attention sur trois moments clefs de la cinétique d'infiltration des DC et des lymphocytes au niveau pulmonaire ; à J7 et J14 pour observer leur organisation en TLS, et à J21 pour étudier la persistance de ces structures lymphoïdes ectopiques. Les TLS étaient

visibles dans les poumons des souris à J7 et à J14, avec cependant une taille plus importante à J7. L'induction des TLS par le LPS témoigne de l'activation locale et efficace de cellules exprimant à leur surface TLR4 telles que les DC et les macrophages alvéolaires. Les TLS ainsi néoformées étaient composées d'une zone B, d'une zone T riche en DC, et des HEV.

Le fait que ces structures lymphoïdes aient disparu dans les poumons des souris traitées par le LPS à J21 témoigne de la plasticité des TLS. Leur présence n'est plus maintenue à partir du moment où l'inflammation pulmonaire était résorbée. Dans le modèle LPS de Rangel-Moreno *et al.*, les TLS étaient observables jusqu'à 10 semaines après exposition au LPS. Ces différences peuvent notamment s'expliquer par l'âge des souris. Dans leur modèle, les souris étaient à un stade néonatal, alors que, dans le présent modèle, elles ont 13 semaines et sont donc adultes. Toutefois, dans leur étude, les TLS étaient observables chez des souris dépourvues de cellules LTi. La néogenèse des TLS était dépendante de l'IL-17 libérée par les LT CD4⁺. Ainsi, l'IL-17 promeut la libération de CXCL13 et de CCL19 de façon indépendante de la signalisation par la lymphotoxine $\alpha_1\beta_2$ permettant le recrutement et l'organisation des LT et LB en TLS (Rangel-Moreno *et al.*, 2011). Pour autant, l'implication des cellules LTi dans l'induction des TLS n'est pas à exclure. En effet, la fréquence des cellules LTi étant bien plus élevée au stade néonatal comparativement au stade adulte, elles pourraient permettre une induction et une persistance plus longue des TLS au stade néonatal. Cette capacité serait progressivement perdue au cours du développement de l'animal avec la mise en place d'autres mécanismes d'induction de TLS au stade adulte.

2. Destruction des fibres sympathiques par la 6-OHDA et impact sur les SLO

Classiquement, la destruction des fibres nerveuses sympathiques au sein de modèles précliniques est réalisée de façon pharmacologique par l'injection de la neurotoxine 6-OHDA (Levine *et al.*, 1986) (Zhou *et al.*, 1998) (Grebe *et al.*, 2009). La 6-OHDA est activement et sélectivement transportée par les récepteurs de la noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses où elle va induire la production de radicaux libres qui vont détruire de façon irréversible les terminaisons sympathiques (Kostrzewa and Jacobowitz, 1974). La 6-OHDA diffuse dans l'ensemble des tissus, à l'exception du SNC protégé par la barrière hémato-encéphalique.

Dans notre modèle, nous avons validé la destruction périphérique des fibres sympathiques par western blot, imagerie et ainsi que par dosage des catécholamines. Dans le cas des western blot (réalisés avec des extraits protéiques provenant de poumon, de rein et de cerveau) et de

l'imagerie (réalisée au niveau des oreilles et des poumons), nous avons validé la perte de ces fibres par l'absence de détection de la molécule TH, un marqueur des fibres sympathiques, chez les souris traitées par la 6-OHDA. La TH était présente dans le SNC à des niveaux d'expression comparables aux souris non traitées. Par ailleurs, la persistance des fibres parasympathiques a été confirmée par immunofluorescence au niveau pulmonaire à l'aide du marquage pan-neuronal $\beta 3$ -tubuline, validant à nouveau la spécificité de cette neurotoxine. Un autre paramètre que nous avons également étudié est la présence des catécholamines regroupant les principaux neurotransmetteurs du système sympathique (NA, adrénaline, dopamine). Par dosage ELISA, le taux de catécholamines est drastiquement diminué dans le sang périphérique des souris traitées 6-OHDA par rapport aux souris non traitées ayant reçu du NaCl. L'ensemble de ces résultats valide le système d'étude, la sélectivité d'action de la 6-OHDA sur les fibres nerveuses sympathiques périphériques par rapport au SNC.

Des études suggèrent que les fibres sympathiques en contact étroit avec les LB, les LT et les macrophages spléniques (Felten et al., 1987) pourraient réguler leurs fonctions immunitaires. Les fibres sympathiques pourraient en effet moduler la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) par les macrophages (Martelli et al., 2014a). Nous n'avons pas observé de différences majeures de répartition des populations de LB, LT, macrophages, DC, granulocytes ou de cellules myéloïdes dans la rate des souris traitées par la 6-OHDA comparativement aux souris contrôles (NaCl). Nos résultats sont en accord avec l'étude de Grebe *et al.* (Grebe et al., 2009). Le fait que la destruction des fibres TH⁺ n'impacte pas l'organisation de la rate suggère qu'elles ne semblent pas nécessaires au maintien de ces populations en l'absence de condition inflammatoire. Il pourrait être envisageable d'étudier le niveau d'expression des marqueurs d'activation, de co-stimulation et d'ICP de ces populations en situation inflammatoire afin de comparer le statut d'activation de ces contingents immunitaires en présence *versus* absence de fibres nerveuses sympathiques au sein des SLO.

3. Impact des fibres sympathiques sur la formation des TLS dans un modèle d'inflammation transitoire

Le rôle des fibres nerveuses sympathiques a largement été étudié lors de l'élaboration des réponses immunitaires suite à des infections virales. Il a été démontré que la dénervation du système sympathique périphérique abolit les réponses primaires et mémoires dépendantes des LT CD8⁺ lors de l'infection par le virus de l'Herpès simplex HSV (Leo and Bonneau, 2000) alors qu'elle favorise le recrutement local des LT CD8⁺ lors de l'infection par le virus de la

grippe (virus Influenza) (Grebe et al., 2009). Ces différences peuvent notamment s'expliquer par des différences au niveau des protocoles expérimentaux. En effet, la dénervation a été réalisée post-infection dans le modèle par le HSV et pré-infection avec le virus Influenza, cette dernière situation correspondant à notre protocole expérimental.

Dans le modèle d'inflammation transitoire induit par le LPS, l'infiltrat global intrapulmonaire de LB et LT est semblable entre les souris pré-traitées par la 6-OHDA *versus* les souris contrôles (NaCl). En revanche, le parenchyme pulmonaire des souris traitées 6-OHDA puis par le LPS ne présente que de petits agrégats de cellules immunitaires (pas de TLS) comparé aux souris contrôles (NaCl puis LPS). Contrairement aux souris traitées NaCl puis LPS, les souris traitées 6-OHDA puis LPS ne présentent pas de HEV au niveau pulmonaire. Le fait que nous n'ayons pas détecté de cellules immunitaires organisées en TLS après sympathectomie chimique peut être la résultante de différents mécanismes comme un défaut de maturation des HEV ou encore une altération de l'expression des molécules d'adhérence.

Les HEV matures et fonctionnelles expriment à leur surface PNAd. L'expression de cette adressine est un processus faisant intervenir la participation finement régulée de diverses enzymes telles que la fucosyltransférase 7 (FUT7) ou encore la GlcNAc6ST2 (Moussion and Girard, 2011) (Girard et al., 2012). Dans notre modèle 6-OHDA/LPS, l'absence de HEV caractérisée par l'absence de marquage PNAd suggère qu'elles sont immatures et/ou non fonctionnelles et que les fibres sympathiques pourraient intervenir dans leur processus de différenciation et de leur maintien de leur phénotype HEV. Par exemple, les fibres sympathiques pourraient réguler positivement l'expression de ces diverses enzymes conduisant à l'expression de PNAd par les cellules endothéliales.

En plus de l'expression de PNAd, la signalisation par la lymphotoxine $\alpha_1\beta_2$ est importante pour le développement des HEV matures et fonctionnelles. Des expériences *in vitro* démontrent que les DC et les cellules endothéliales des HEV interagissent entre elles *via* l'axe $LT\alpha_1\beta_2$ / $LT\beta R$ (Moussion and Girard, 2011). En l'absence de DC, les HEV perdent leur statut mature et le recrutement des lymphocytes circulants au sein des GL est fortement perturbé. Par ailleurs, la déplétion des DC impacte négativement la formation des TLS (Halle et al., 2009). Enfin, les DC représentent une source potentielle de VEGF qui joue un rôle dans la prolifération des HEV (Wendland et al., 2011). Chez les souris traitées par la 6-OHDA puis par le LPS, la présence de DC $CD11c^+$ a été observée en l'absence de HEV et de TLS (résultats non montrés). Il serait intéressant d'étudier l'état d'activation de ces DC car un niveau faible d'expression des

molécules de co-stimulation pourrait potentiellement expliquer un défaut de « dialogue » avec les LT et LB et, par conséquent, conduire à l'absence de TLS.

Un autre aspect important concernant la formation des TLS est l'expression de la $LT\alpha_1\beta_2$ par les DC, où son absence pourrait expliquer l'absence de TLS, ceci restant à être déterminé. En plus de $LT\alpha_1\beta_2$, la lymphotoxine sécrétée $LT\alpha_3$, le $TNF-\alpha$ sont également associés à la formation de TLS (Kratz et al., 1996; Guedj et al., 2014). A notre connaissance, il n'a pas été démontré que les fibres nerveuses sympathiques sont capables de réguler l'expression des lymphotoxines membranaire et sécrétée, ou bien de leurs récepteurs.

Une étude a démontré le rôle des fibres sympathiques sur la régulation de l'expression des molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1) à la surface des cellules endothéliales et le recrutement des lymphocytes (Scheiermann et al., 2012). Dans un modèle chronique de douleur, la délétion des fibres sympathiques est associée à une réduction de l'expression vasculaire d'ICAM-1 ainsi qu'à une diminution du recrutement de leucocytes (Mousa et al., 2010). On peut supposer qu'un mécanisme similaire ait lieu concernant les HEV et en bloquant leur maturation conduirait à une incapacité à développer des TLS, même en situation inflammatoire (LPS). Toutefois, nous n'avons pas constaté d'altération de la présence de cellules immunitaires au sein du parenchyme pulmonaire dans le modèle 6-OHDA/LPS, suggérant que le recrutement des cellules immunitaires circulantes pourrait se faire via d'autre(s) voie(s) comme par exemple les vaisseaux lymphatiques afférents, et que cette(ces) voie(s) d'entrée dans les poumons ne semble(nt) pas être altérée(s) par l'absence des fibres sympathiques.

L'absence de HEV dans les poumons des souris traitées par la 6-OHDA puis le LPS, suggèrent également que la signalisation adrénergique pourrait promouvoir la maturation des HEV de façon dépendante -ou non- de la signalisation des lymphotoxines, soit en régulant positivement l'expression de molécules d'adhérence (ex. PNAd, ICAM-1) ou bien en sécrétant des facteurs pro-angiogénique (ex. VEGF).

Le LPS est capable d'activer les fibres sympathiques (nerfs splénique et splanchnique) (Martelli et al., 2014b), qui en retour libèrent de façon accrue de la NA et de l'adrénaline (Zhou and Jones, 1993). Il a été démontré que la NA régule la libération cyclique des cellules souches hématopoïétiques à partir de la moelle osseuse, ainsi que l'expression de CXCL12, et que la destruction des fibres sympathiques par la 6-OHDA bloque la libération de ces cellules souches hématopoïétiques (Méndez-Ferrer et al., 2008). En effet, la NA libérée localement au sein de

la moelle osseuse agirait sur les cellules stromales exprimant le récepteur β_3 , ce qui induirait une régulation négative de CXCL12, permettant la libération des cellules souches (Méndez-Ferrer et al., 2008). Dans notre modèle d'étude, on pourrait suggérer que la NA ainsi libérée pourrait agir de façon directe et/ou indirecte et induire le recrutement des cellules immunitaires exprimant les récepteurs adrénergiques au sein de l'épithélium pulmonaire. Ce mécanisme s'ajouterait au recrutement conventionnel des cellules immunitaires par les chimiokines lymphoïdes (CCL19, CCL21 et CXCL13).

Il faut également noter que les cellules immunitaires expriment également des récepteurs impliqués dans la signalisation cholinergique (ex. Chrm1-5) (Verbout and Jacoby, 2012). La persistance des fibres parasympathiques malgré le traitement 6-OHDA indique qu'elles ne semblent pas participer à la formation des TLS. Ce résultat semble discordant avec la seule étude démontrant l'implication des fibres parasympathiques -et non sympathiques- dans l'établissement des TLS (Olivier et al., 2016). Ces discordances peuvent s'expliquer par le fait que la densité des fibres nerveuses est dépendante de l'organe, avec une complexité marquée au niveau intestinal (innervation sympathique, parasympathique et entérique). De plus, le modèle d'inflammation [dextran sodium sulfate au niveau intestinal vs LPS au niveau pulmonaire] et la méthode utilisée pour la destruction des fibres nerveuses (chirurgicale vs pharmacologique) sont très différents dans les deux études (Olivier et al. *versus* notre étude, respectivement).

Dans les modèles d'inflammation pulmonaire provoquée par le virus influenza, la destruction des fibres TH^+ induit une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le recrutement des monocytes, des neutrophiles et des cellules NK (Grebe et al., 2010). Faisant écho à ces observations, dans un modèle tumoral B16 et *Lewis lung carcinoma* (LLC) exprimant l'ovalbumine, il a été démontré que la sécrétion de la lymphotoxine $LT\alpha_3$ par les cellules NK et/ou les $LT\ CD8^+$ régulait positivement l'expression de PNAd *via* le récepteur TNFR2 présent à la surface des cellules endothéliales, et par voie de conséquence favorisait la maturation des HEV (Peske et al., 2015). Une autre étude a suggéré que les TLS pourraient se mettre en place *via* les neutrophiles (Foo et al., 2015), une hypothèse pouvant également s'ajouter aux diverses explications aboutissant à l'absence de TLS chez les souris traitées par la 6-OHDA puis par le LPS.

En conclusion, dans le présent modèle d'inflammation transitoire due aux administrations intranasales de LPS, nous avons observé un recrutement des LB et LT au sein du parenchyme

pulmonaire sans organisation en TLS chez des souris pré-traitées par la 6-OHDA. En effet, nous n'observons qu'une dispersion de LB et de LT ainsi que des agrégats lymphoïdes. Cela suggère que les fibres sympathiques interviennent soit comme **agent de maturation des HEV** via l'expression des **molécules d'adhérence** (ex. ICAM-1/VCAM-1) indépendamment ou non des lymphotoxines, soit en **sécrétant des facteurs pro-angiogéniques**, soit en promouvant un **environnement pro-inflammatoire** et une **action chimiotactique** permettant le recrutement de diverses populations (ex. DC, cellules NK, neutrophiles) pouvant avoir un rôle dans la maturation des HEV.

Enfin, la présence de la branche parasympathique ne semble pas être capable de compenser l'absence de la branche sympathique sur l'induction de la formation des TLS.

4. Rôle des fibres sympathiques dans la croissance tumorale

Les résultats du modèle tumoral TC1 montrent que l'on observe préférentiellement des tumeurs de moyennes à grandes tailles en absence de fibres sympathiques. En effet, suite à la dénervation de celles-ci, des tumeurs de petites tailles n'ont pas été observées (petites tumeurs : 0 *versus* 17% ; tumeurs moyennes : 55% *versus* 50% ; grandes tumeurs : 45% *versus* 33% chez les souris 6-OHDA/TC1-luc et les souris contrôles NaCl/TC1-Luc, respectivement). Or, les fibres sympathiques sont généralement associées à un mauvais pronostic dans divers cancers. La dénervation des branches sympathique et/ou parasympathique dans les modèles précliniques ralentit considérablement la croissance tumorale (Zhao et al., 2014) (Magnon et al., 2013). Une étude récente s'est intéressée à l'impact des deux branches du SNP dans le développement du cancer du sein. Dans ce modèle, la délétion génétique des fibres sympathiques inhibe la croissance tumorale (Kamiya et al., 2019). Cet effet a été associé à l'expression de la NA. À contrario, la stimulation des fibres parasympathiques inhibe la croissance tumorale (Kamiya et al., 2019). Le statut pro- ou anti-tumoral des deux branches du système autonome sur la croissance tumorale reste cependant très controversé. Ces controverses peuvent être liées au fait que la densité de fibres nerveuses est dépendante de l'organe au sein duquel la tumeur se développe (tumeurs de la prostate, gastrique, du sein). Nos résultats semblent en contradiction avec ces études. Cela, pourrait notamment s'expliquer par un éventuel blocage de la formation des TLS au sein du modèle tumoral TC1 avec pour conséquence une abrogation des réponses adaptatives anti-tumorales.

Contrairement au premier modèle inflammatoire (6-OHDA⁺/LPS), trois scénarios ont été observés dans les poumons des souris pré-traitées par la 6-OHDA et ayant été injectées par voir

intraveineuse avec des cellules de la lignée TC1 : des TLS (14%), un mixte de TLS et d'agrégats lymphoïdes (sans HEV ; TLS-LA, 29%), ou seulement des agrégats lymphoïdes (LA, 57%).

Contrairement au modèle LPS, le modèle tumoral présente une inflammation chronique donc non transitoire. De plus, le microenvironnement tumoral, par l'induction de cytokines pro-inflammatoires, pourrait également contribuer au recrutement des lymphocytes. Ces données semblent suggérer qu'au sein d'une situation inflammatoire chronique, telle qu'une tumeur, les fibres sympathiques contribuent mais ne sont pas les seules actrices permettant l'induction des TLS.

L'absence de HEV dans les poumons (TLS-LA et LA) des souris 6-OHDA/TC1 suggère que les cellules immunitaires ont été recrutées *via* les vaisseaux lymphatiques afférents et/ou à partir du parenchyme pulmonaire adjacent. Des résultats préliminaires de marquages 3D au sein des tumeurs contrôles (NaCl/TC1) démontrent que les TLS peuvent être à distance, à proximité ou directement au contact des fibres sympathiques (données non montrées), cette dernière situation étant également observée dans les amygdales. Les tumeurs pulmonaires des souris pré-traitées par la 6-OHDA présentent des fibres sympathiques résiduelles localisées à proximité des quelques TLS observées.

Une étude très récente s'est intéressée à l'impact des fibres sympathiques et parasympathiques dans des modèles de cancer du sein et de leur impact sur la régulation des ICP exprimées par les TILs CD4⁺ et CD8⁺ (Kamiya et al., 2019). De façon intéressante, ils ont trouvé une proximité entre les fibres TH⁺ et les LT CD4⁺ et CD8⁺ exprimant des ICP (PD-L1/PD-1) (Kamiya et al., 2019). Ces observations sont en faveur d'un rôle inhibiteur des fibres sympathiques dans le développement de réponses anti-tumorales. Toutefois, dans cette étude, ces observations reposent uniquement sur un suivi de la croissance tumorale et de marquages histologiques. Aucun test de fonctionnalité n'a été entrepris afin de déterminer si ces LT CD4⁺ et CD8⁺ étaient immuno-supprimés et dépourvus de fonctions effectrices.

Par ailleurs, dans leur étude, Kamiya *et al.* utilisent divers moyens afin de d'induire la délétion des fibres sympathiques. La suppression des fibres TH⁺ de façon génétique et non pharmacologique (via des antagonistes non-sélectifs : propranolol, phentolamine) est plus efficace sur l'inhibition de la croissance tumorale. Dans notre modèle tumoral, il pourrait être intéressant d'utiliser une délétion génétique et d'observer l'effet sur la croissance tumorale, la formation des TLS et éventuellement le statut d'activation des cellules immunitaires exprimant les ICP.

Un autre point intéressant est l'utilisation de la lignée TC1 dans un modèle orthotopique. De ce fait, cette dernière est largement utilisée pour l'étude des carcinomes pulmonaires. De plus, cette lignée, qui croît très rapidement, a permis l'induction de TLS. Toutefois, le fait que nous observions une tendance à développer des tumeurs de tailles moyennes et larges en l'absence de fibres TH⁺ pourrait suggérer une action directe des fibres sympathiques sur les cellules tumorales. En effet, les cellules des cancers mammaires ainsi que les cellules stromales au sein des lésions néoplasiques des tumeurs de la prostate expriment les récepteurs β_2 et β_3 adrénergiques (Cakir et al., 2002) (Magnon et al., 2013). Il serait ainsi intéressant d'analyser l'expression des récepteurs β adrénergiques par les cellules TC1 et stromales pulmonaires. Par ailleurs, nous aurions pu vérifier l'expression des récepteurs β adrénergiques par RT-PCR au sein de diverses cellules tumorales utilisées pour les modèles tumoraux pulmonaires telle que la lignée LLC et observer les effets sur la croissance tumorale et l'induction de TLS avec et sans fibres TH⁺.

5. Les marquages tridimensionnels, nouvelle méthode d'exploration du microenvironnement tumoral

Au cours des dernières années, l'imagerie tridimensionnelle a subi un essor considérable pour l'étude d'organes entiers (Renier et al., 2014). L'application de cette technique aux tumeurs solides permettrait de mieux comprendre les interactions entre les cellules tumorales, immunitaires et les fibres nerveuses. Dans certaines situations, cette approche représente un avantage majeur par rapport aux méthodes d'immuno-marquages classiques en 2D. En effet, lorsque les cellules d'intérêt ont une distribution hétérogène et/ou lorsque la qualité de l'analyse (immuno)histologique dépend du plan de coupe (e.g. les fibres nerveuses), alors l'imagerie 3D semble être la meilleure option.

Par ailleurs, la rareté des tissus humains destinés à la recherche ainsi que la taille des biopsies imposent une utilisation bien optimisée de ces derniers. Afin de palier à ces limitations, nous avons développé en collaboration avec l'équipe du Dr. I. Brunet (Collège de France, Paris) une technique innovante que nous avons nommé piDISCO⁺ alliant imagerie tridimensionnelle à partir de la technique iDISCO⁺ (Renier et al., 2016) et des extractions protéiques. Afin de s'adapter aux contraintes liées aux immunomarquages réalisés à partir de biopsies NSCLC fixées et incluses en paraffine, un démasquage antigénique a été ajouté, permettant l'utilisation d'un plus large éventail d'anticorps primaires pour une meilleure caractérisation du

microenvironnement. La deuxième étape de notre protocole consiste en l'extraction de protéines à partir des biopsies préalablement imagées à l'aide d'un tampon approprié. La combinaison de ces deux techniques, permet l'analyse des protéines, souvent dérégulées lors de la cancérogenèse. Dans notre étude, nous avons détecté les protéines phosphorylées et sumoylées. Il serait tout à fait envisageable d'étudier d'autres voies de signalisation altérées lors de la cancérogenèse (K-ras, p53) ou encore de réaliser des analyses protéiques plus poussées (ex. spectrométrie de masse, *reverse phase protein assay*).

Grâce à cette technique piDISCO⁺, nous avons pu détecter pour la première fois des TLS en 3D au sein de biopsies NSCLC. Ces TLS étaient à proximité des fibres sympathiques. La visualisation des fibres nerveuses au sein des tumeurs pulmonaires est en accord avec la seule étude ayant rapporté la présence du système autonome au sein de cette pathologie maligne (Shao et al., 2016).

Nous avons par ailleurs, de façon très préliminaire, observé une expression plus importante de TH dans les poumons distants non-tumoraux comparativement aux tumeurs pulmonaires des patients NSCLC quel que soit leur statut immunitaire. Ce résultat est en accord avec l'étude publiée dans le cancer du sein (Kamiya et al., 2019). Plus intéressant encore, la protéine TH semble plus exprimée au sein des tumeurs TLS^{high} par rapport aux tumeurs TLS^{low}. Cette observation chez l'homme, qui demande à être confortée, fait écho avec nos observations faites avec les modèles murins (LPS et tumoral). Ces données suggèrent que la présence des fibres TH⁺ semble corrélérer avec la formation des TLS.

Des expériences réalisées avec deux tumeurs NSCLC montrent que la protéine NF-L, marqueur de fibres nerveuses néoformées, est plus fortement exprimée dans la tumeur TLS^{high} comparativement à la tumeur TLS^{low}. La présence de ces fibres nouvellement formées, qui demande également à être confirmée, conduit à différentes interrogations et leur nature reste à caractériser (différenciation sympathique ou parasympathique). Première interrogation, les fibres néo-formées ont-elles favorisé la formation des TLS ? La seconde interrogation, les cellules immunitaires, par la libération de divers médiateurs, ont-elles favorisé le développement de nouvelles structures nerveuses à partir du réseau de fibres initial ? A cet égard, Madeo *et al.* ont démontré que les cellules tumorales étaient capables de libérer des facteurs de croissance neuronaux (ex. éphrine B1) par le biais d'exosomes et ainsi favoriser l'innervation tumorale (Madeo et al., 2018). Le fait que nous observons ce phénomène dans la tumeur TLS^{high} comparativement à la tumeur TLS^{low} peut suggérer que les cellules immunitaires pourraient également jouer ce même rôle. Il serait pertinent de réaliser des co-

marquages d'exosomes et des cellules immunitaires afin d'observer cet éventuel phénomène, puis de caractériser les facteurs pouvant être libérés à ce niveau.

Il nous reste à inclure plus de patients NSCLC dans notre étude afin de consolider ces premiers résultats. Par ailleurs, les modèles pré-cliniques que j'ai développés vont permettre de poursuivre l'étude de l'impact des fibres nerveuses sympathiques sur la formation et le maintien des TLS *via* la caractérisation des acteurs moléculaires et cellulaires ainsi impliqués.

L'importance des TLS comme marqueur pronostique, marqueur prédictif de la réponse à différentes (immuno)thérapies et comme cibles thérapeutiques chez les patients cancéreux ne fait qu'augmenter l'intérêt porté sur la fonction immunitaire des TLS associées aux tumeurs.

Conclusion et perspectives

Cette étude a mis en évidence un lien entre les fibres nerveuses sympathiques et les TLS en situation inflammatoire dans les poumons. Nous avons démontré que l'absence des fibres sympathiques conduit à un défaut d'organisation des cellules immunitaires intra-pulmonaires en TLS après instillations intranasales de LPS, suggérant que ces fibres pourraient avoir un impact positif sur la néogénèse des TLS. Pour démontrer cette hypothèse, on pourrait comparer l'effet d'agonistes adrénergiques délivrés spécifiquement au niveau pulmonaire chez les animaux dépourvus de fibres sympathiques périphériques *versus* des animaux contrôles. Dans le cas des animaux sans fibres sympathiques, il serait intéressant de voir si l'on parvient à réverser le phénotype obtenu, à savoir induire la formation des TLS après administration de LPS. Chez les souris contrôles, on pourrait examiner si le nombre et la taille des TLS sont augmentés en réponse au LPS.

Dans les situations pour lesquelles les TLS sont associées à une aggravation de la maladie telles que les maladies auto-immunes et les rejets de greffe, on pourrait administrer des β bloquants (ex. propranolol, nadolol) afin de bloquer les récepteurs de l'adrénaline et de la NA, et par voie de conséquence la formation potentielle des TLS dans des modèles précliniques. Dans ce cas, l'état général (ex. symptômes cliniques, survie) et les paramètres immunologiques (ex. état d'activation des cellules immunitaires, densité de TLS) des souris devraient être améliorés.

Dans le modèle tumoral TC1, nous avons observé que la suppression des fibres sympathiques était associée à une désorganisation de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral avec la présence de rares TLS comparé aux souris contrôles. Il sera important de corrélérer cette observation avec la croissance tumorale et la survie des animaux. De même, il serait pertinent de comparer le statut d'activation des cellules immunitaires et le profil cytokinique dans les souris porteuses de tumeurs et traitées par la 6-OHDA en les comparant à des souris contrôles afin de caractériser l'impact de l'absence des fibres sympathiques dans le microenvironnement tumoral. De plus, il serait intéressant d'évaluer si, dans ces conditions, la réponse anti-tumorale est impactée en suivant la spécificité des réponses cellulaire et humorale contre un antigène exprimé par la lignée TC1 (HPV16 E7).

Il pourrait également être pertinent de tester d'autres lignées tumorales pulmonaires (e.g. LLC) ou encore d'utiliser des modèles de souris génétiquement modifiées permettant

l'induction endogène de tumeurs pulmonaires [(DuPage et al., 2009), ex. p53-/- et K-ras mutés], et d'étendre cette investigation à des organes autres que le poumon afin de tester la robustesse de nos observations.

Par ailleurs, dans nos modèles précliniques, un défaut de formation de HEV a également été mis en évidence en l'absence de fibres sympathiques, suggérant un possible défaut de maturation de ces vaisseaux lié soit à des altérations de l'expression des molécules d'adhérence, ou bien, à la libération de facteurs pro-angiogéniques ou encore, à une signalisation de la lymphotoxine. Concernant l'expression des molécules d'adhérence, des cultures *in vitro* de cellules de lignées endothéliales, en présence ou non de catécholamines, ou bien de facteurs de croissance neuronaux (ex. NGF, BDNF), pourrait donner quelques éléments de réponse. De plus, il serait intéressant d'utiliser des modèles de souris déficientes pour la lymphotoxine, ou bien des antagonistes de cette signalisation pour déterminer si les fibres sympathiques peuvent induire la maturation des HEV *via* une signalisation indépendante de l'axe de la lymphotoxine.

Nous avons observé des co-localisations étroites entre les fibres sympathiques et les LB au sein de l'amygdale humaine. Des résultats préliminaires indiquent que ces contacts étroits sont également visibles dans le modèle tumoral TC1 chez des souris sauvages et dans une tumeur NSCLC d'un patient TLS^{high}. Une caractérisation fine du statut de différenciation et d'activation des LB en contact étroit avec les fibres sympathiques permettrait de préciser la nature de ce dialogue inter-cellulaire et des possibles conséquences fonctionnelles sur les LB. La visualisation de telles interactions chez l'homme a nécessité l'adaptation des techniques d'imagerie en 3D (iDISCO⁺). En plus de cette optimisation pour des échantillons humains et murins frais ou FFPE, nous avons couplé cette technique à une méthode d'extraction et de quantification de protéines. Ainsi, notre technique intitulée piDSICO⁺ pourra servir de base à des analyses combinées du microenvironnement tumoral en 3D avec un profil protéomique pour des études rétrospectives et prospectives. Dans notre étude, nous avons focalisé notre attention sur des protéines phosphorylées et sumoylées ; il pourrait-être envisageable de réaliser de la spectrométrie de masse pour une analyse plus fine des profils protéiques.

Nos résultats suggèrent que le marqueur NF-L de fibres nerveuses immatures est foretemnt exprimé dans les tumeurs TLS^{high} comparativement aux tumeurs TLS^{low} de deux patients NSCLC. Cette donnée suggère une corrélation, voire l'existence d'une interaction, entre les cellules immunitaires organisées en TLS et les fibres nerveuses immatures dans les tumeurs NSCLC. Ce résultat sera à confirmer sur un plus grand nombre de tumeurs pulmonaires. Par

ailleurs, il est connu qu'un dialogue entre les cellules tumorales et les fibres nerveuses peut conduire à l'axonogenèse. De la même façon, des facteurs de croissance, éventuellement libérés par les cellules immunitaires, pourraient également favoriser l'axonogenèse des fibres déjà présentes dans le microenvironnement tumoral. La nature, ainsi que les mécanismes menant à la libération de ces éventuels facteurs restent à déterminer.

Dans cette étude, notre attention s'est focalisée sur une branche du système autonome. Il serait intéressant d'étudier les effets du système nerveux parasympathique sur la formation et le maintien des TLS, la différenciation des HEV, la croissance tumorale ainsi que son impact chez les patients. Ces travaux pourraient conduire à l'identification de nouvelle(s) cible(s) moléculaire(s) impliquée(s) dans la formation des TLS et applicable(s) au plan clinique.

Annexe

Revue pour l'association française d'histologie

Evolution vers la 3^{ème} dimension pour une meilleure compréhension du microenvironnement immunitaire dans les tumeurs

Auteurs :

Letaïef Laïla¹, Azar Safa², Brunet Isabelle², Hélène Kaplon³, Teillaud Jean-Luc¹ et Dieu-Nosjean Marie-Caroline^{1*}

¹ Sorbonne Université UMRS1135, INSERM U1135, Laboratoire “Microenvironnement Immunitaire et Immunothérapie”, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Faculté de Médecine Sorbonne Université, 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

² Centre interdisciplinaire de recherche biologique, Collège de France, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France

³ Sorbonne Université UMRS 1138, INSERM U1138, Université Paris Descartes, Laboratoire "Cancer et Immunité anti-tumorale", Centre de Recherche des Cordeliers; 15 rue de l'école de Médecine, 75006 Paris, France.

Correspondance :

Dr. Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Ph.D.

Laboratoire “Microenvironnement Immunitaire et Immunothérapie », Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris),

Sorbonne Université UMRS 1135, INSERM U1135, Faculté de Médecine Sorbonne Université
91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Téléphone : +33-1-40-77-81-01, E-mail: marie-caroline.dieu-nosjean@inserm.fr

ABSTRACT

The analysis of the tissue microenvironment provides an almost endless amount of information for researchers and clinicians. The very recent advances in immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) techniques have made it possible to better understand the complexity of the tissue microenvironment, particularly in cancers. Through several instances developed in lung cancer, the limits of IHC/IF have been pushed back, allowing to answer questions such as: Is the level of *in situ* organization of the immune infiltrate related to patient survival? Have all the cellular dialogues been described at the tumor site? Is it possible to characterize the interactions between different major systems such as the nervous, vascular and immune systems in a tumor? IHC and IF have found their place by providing answers of primary importance in understanding the tumor microenvironment and its inter-patient heterogeneity. The histo-technology is in deep transformation since counter-staining was first developed, with now multiplex stainings in 2 dimensions on tissue section and more recently the 3rd dimension on whole samples. Other technological advances are already underway with the combination of the IHC/IF with other existing techniques, providing even more research data at the individual level, be it single patients or single cells for instance.

KEY WORDS

Tumor immunology, multiplex staining, 3D-imaging, tertiary lymphoid structure, innervation, vascularization

RESUME

L'analyse du microenvironnement d'un tissu fournit une manne d'informations quasiment illimitées pour les chercheurs et les cliniciens. Les avancées très récentes des techniques d'immunohistochimie (IHC) et d'immunofluorescence (IF) ont permis de mieux appréhender la complexité du microenvironnement tissulaire notamment dans les cancers. Au travers de plusieurs exemples développés dans les cancers du poumon, les limites de l'IHC/IF ont été repoussées pour mieux répondre à des questions comme : est-ce que le niveau d'organisation *in situ* de l'infiltrat immunitaire est relié à la survie des patients ? Est-ce que tous les dialogues cellulaires ont été décrits au site tumoral ? Quid des interactions entre différents grands systèmes tels que les systèmes nerveux, vasculaire et immunitaire dans une tumeur ? C'est ainsi que l'IHC et l'IF ont trouvé toute leur place en apportant des éléments de réponses majeures dans la compréhension du microenvironnement tumoral et de son hétérogénéité inter-patient. L'histo-technologie est en pleine révolution depuis les colorations, les simples marquages aux multiplexages en 2 dimensions sur coupes puis vers la 3^{ème} dimension sur échantillons entiers. D'autres avancées technologiques sont déjà en marche avec la combinaison de l'IHC/IF à d'autres techniques existantes pour toujours plus de recherche d'informations à l'échelle individuelle.

MOTS CLES

Immunologie des tumeurs, marquage multiplexe, imagerie 3D, structure lymphoïde tertiaire, innervation, vascularisation

INTRODUCTION

Le microenvironnement des tumeurs est un milieu extrêmement complexe de par son hétérogénéité inter-individu et au sein d'une même tumeur et du fait de son perpétuel remodelage au cours du temps, sans compter l'impact des traitements sur son évolution. L'analyse du microenvironnement tumoral représente ainsi une source d'informations majeures pour mieux comprendre la nature des interactions et les communications entre les cellules qui le composent, qu'elles soient d'origine tumorale, immunitaire, stromale, vasculaire ou encore nerveuse. Dans une tumeur détectable macroscopiquement, la combinatoire d'interactions entre deux cellules quasi « statiques » est considérable, à laquelle s'ajoute les contacts *de facto* « transitoires » avec des cellules en train de migrer dans le tissu.

Un éventail très large de techniques comme la génomique, la transcriptomique, la cytométrie de flux multi-paramétrique et la protéomique, permet d'étudier la biologie des cellules du microenvironnement tumoral avec des résolutions allant aujourd'hui jusqu'à l'échelle unicellulaire. Ces techniques sont également complémentaires avec l'histologie, l'immunohistochimie (IHC) et l'immunofluorescence (IF), seules ces dernières permettant de rendre remarquablement compte de la localisation et donc des interactions existantes entre les cellules du microenvironnement tumoral.

Au travers de différents exemples concrets, nous aborderons comment l'IHC et l'IF ont été d'un apport considérable pour mettre en évidence des communications intercellulaires jamais décrites auparavant.

RESULTATS/DISCUSSION

1. De la puissance des métadonnées à la simplicité de l'observation sur des coupes de tissus

Les bases de données représentent un outil exceptionnel pour obtenir la puissance statistique nécessaire à l'analyse simultanée de plusieurs paramètres. C'est ainsi que Gentles et ses collaborateurs ont analysé la valeur pronostique de 22 populations immunitaires infiltrant des tumeurs (de 25 types de cancers solides) sur environ 5 800 patients (1). Cette méta-analyse a clairement mis en lumière que certaines populations immunitaires étaient très souvent associées au pronostic vital (soit bon, soit mauvais) des patients. Parmi les populations immunitaires intra-tumorales au pronostic favorable, se trouvent les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes B naïfs, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et les lymphocytes T CD4⁺ folliculaires-helper (Tfh). Il était ainsi surprenant d'observer ces populations au site de la tumeur étant donné qu'elles sont classiquement détectées dans les organes lymphoïdes secondaires. L'IHC nous a permis de détecter la présence de ces populations immunitaires dans les cancers du poumon non-à-petites cellules (NSCLC). Plus remarquable encore, nous avons observé que, chez certains patients, ces cellules immunitaires s'organisaient en structures lymphoïdes ectopiques encore appelées structures lymphoïdes tertiaires (TLS) par analogie structurale avec les organes lymphoïdes secondaires (2,3). Avec la mise au point de doubles marquages immunohistochimiques sur des coupes sériées de tumeurs pulmonaires fixées et incluses en paraffine (FFPE), nous avons mis en évidence que les lymphocytes ségrégeaient distinctement en deux zones au sein d'une TLS, une zone T riche en lymphocytes T CD3⁺ et en DC matures DC-Lamp⁺, adjacente à une zone B riche en lymphocytes B CD20⁺, en cellules Tfh CD4⁺PD-1⁺ et en cellules folliculaires dendritiques CD21⁺ (4). Grâce à cette analyse fine des TLS par IHC, nous avons pu démontrer que la seule différence entre les TLS et les ganglions en termes de composition cellulaire était l'absence de cellules NK au sein des TLS (5).

2. De l'observation à la valeur pronostique des TLS associées aux tumeurs

Du fait que les ganglions assurent une fonction essentielle dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives, la très forte similitude (composition et organisation cellulaire) des TLS avec les ganglions lymphatiques amenait la question de la fonction immunitaire des TLS dans un contexte tumoral. L'analyse d'un seul paramètre tel que l'expression de CD3, de CD20 ou encore de DC-Lamp par IHC ne permettait pas de quantifier respectivement les lymphocytes T, B ou les DC matures sélectivement présentes dans les TLS. Le développement de multi-

marquages sur coupes FFPE de tumeurs, combiné à la quantification assistée par un logiciel d'analyse d'images, nous a permis de compter ces trois contingents immunitaires au sein des TLS et d'en déterminer une densité cellulaire (nombre de cellules rapporté par surface tumorale totale en lecture pleine lame) sur de grandes cohortes de patients NSCLC. Il est incontestable que le développement de logiciels d'analyse d'images a représenté une avancée majeure en termes de reproductibilité des quantifications cellulaires faites ; cependant, il faut souligner que, même si c'est la machine qui travaille, cette étape est très critique et chronophage pour l'opérateur avec les phases « d'éducation » du logiciel puis du contrôle qualité post-analyse. L'ensemble de ces étapes est aujourd'hui automatisable sous l'œil avisé d'un anatomo-pathologiste, et la fiabilité des résultats en est encore meilleure. L'utilisation d'un ou plusieurs de ces marqueurs TLS (DC-Lamp et/ou CD20) nous a permis de stratifier les patients NSCLC en au moins deux groupes à savoir les patients riches en TLS (TLS^{fort}) et les patients pauvres en TLS (TLS^{faible}), et de montrer pour la première fois que l'espérance de vie des patients TLS^{fort} était beaucoup plus longue que celle des patients TLS^{faible}, même aux stades les plus avancés de la maladie (2,4,6).

Aujourd'hui, la molécule CD8 semble être l'un des biomarqueurs les plus prédictifs de la survie des patients dans la majorité des cancers solides. Nous avons confirmé la valeur pronostique de CD8 par IHC sur une large cohorte de patients NSCLC. Il est notable que la quasi-totalité des tumeurs TLS^{fort} présentent également un infiltrat T CD8⁺ fort suggérant que les TLS sont un site important pour l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ *in situ* (7). En revanche, la réciproque n'est pas vraie, à savoir qu'il existe des tumeurs NSCLC présentant un (très) fort infiltrat de lymphocytes T CD8⁺ mais une faible densité de TLS. La présence de ce dernier groupe de patients CD8^{fort} TLS^{faible} nous a incités à comparer la valeur pronostique de l'infiltrat T CD8⁺ dans le contexte des TLS. La combinaison de ces deux marqueurs a mis en évidence le fait qu'à densité de cellules T CD8⁺ égale et élevée, la survie des patients était bien plus longue chez ceux présentant une forte densité de TLS (CD8^{fort} TLS^{fort}) par rapport à ceux ayant une faible densité de TLS (CD8^{fort} TLS^{faible}) sur deux séries rétrospectives de 108 patients NSCLC de stades IIIB traités par chimiothérapie et de 140 patients opérés de métastases pulmonaires (7,8). Ainsi, la valeur pronostique favorable des lymphocytes T CD8⁺ est conditionnée par la présence des TLS. L'une des hypothèses actuellement testées est que les TLS seraient un site clé pour « l'éducation » des cellules T CD8⁺ contre la tumeur. Les TLS présenteraient donc un avantage fonctionnel par rapport aux organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions drainant la tumeur. Des expériences chez l'animal seront nécessaires

pour comprendre la contribution de chacune de ces organisations lymphoïdes au cours du processus tumoral.

3. De l'imagerie tissulaire pour découvrir de nouveaux dialogues cellulaires

L'essor récent des techniques multiplex en IHC et en IF sur tissus FFPE permet aujourd'hui d'étudier de nombreux paramètres sur une même coupe de tissu. Des interactions jamais décrites ont pu ainsi être observées dans différentes régions du microenvironnement tumoral. A titre d'exemple, notre équipe a très récemment montré que, dans certaines tumeurs NSCLC, des lymphocytes T CD8⁺ pouvaient former des synapses immunologiques avec des plasmocytes (Kaplun *et al.*, manuscrit soumis pour publication). Par des triples marquages (CD8/Ki-67/IgA ou IgG) en IF sur des coupes de tumeurs pulmonaires FFPE, il est possible de visualiser des lymphocytes T CD8⁺ proliférants, au contact de plasmocytes IgA⁺ et IgG⁺. Nous avons, par la suite, réussi à reproduire cette situation *ex vivo* à partir de cellules T CD8⁺ et de plasmocytes intra-tumoraux autologues. L'analyse approfondie du dialogue entretenu entre ces deux populations immunitaires au niveau du stroma tumoral permettra de définir sa nature et si ce dialogue ouvre la voie à une approche thérapeutique où il serait possible d'optimiser les fonctions cytotoxiques des cellules T CD8⁺ et, par voie de conséquence, l'efficacité de la réponse anti-tumorale.

4. Repousser les limites de l'imagerie : le passage de la 2^{ème} vers la 3^{ème} dimension

Le multiplexage des marquages sur des coupes uniques de tissus parfois très rares a de façon indéniable permis d'accroître nos connaissances fondamentales, comme cela est illustré ci-dessous. Notre équipe a toutefois été confrontée aux limites des marquages en 2 dimensions lorsque nous avons voulu étudier l'interaction entre les systèmes nerveux, vasculaire et immunitaire chez les patients NSCLC. En effet, la détection des différents types de fibres nerveuses est très aisée dans un tissu qui en contient beaucoup. Cela devient beaucoup plus complexe, voire hasardeux dans un organe qui en contient potentiellement très peu et pour lesquelles l'orientation du plan de coupe aura un impact sur la lecture du marquage. Les marquages IF réalisés à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs neuronaux ont mis en évidence quelques cellules isolées de morphologie arrondie dans le stroma tumoral. Après avoir reproduit ces résultats dans plusieurs tumeurs NSCLC, nous avons conclu qu'il était justement impossible d'affirmer la présence de fibres nerveuses dont le plan de coupe aurait été transversal plutôt que la présence de cellules d'origine non neuronale et positives pour ces

marqueurs neuronaux. Pour palier aux limitations des marquages en 2D, nous avons co-développé avec l'équipe du Dr. I. Brunet (Collège de France, Paris) une technique de multimarquages IF en 3D applicable à des blocs FFPE de fragments d'organe frais ou déjà traités (FFPE), humains ou murins. Nous avons optimisé la technique i-DISCO (9), ce qui nous a permis d'avoir un plus grand choix d'anticorps primaires pour les marquages et de raccourcir la durée de l'ensemble de la méthode (Azar *et al.*, manuscrit soumis pour publication). Brièvement, l'échantillon est déparaffiné puis réhydraté progressivement (J2) avant de suivre une étape de démasquage antigénique à la chaleur (J3, étape facultative dépendante de l'anticorps primaire). Les pré-traitements peuvent ensuite prendre entre 1 à 4 jours avant d'incuber l'échantillon avec les anticorps primaires (J8-11) puis secondaires (J12-15). L'échantillon est ensuite transparaïsé avant d'être imagé à l'aide d'un microscope de type Light Sheet. Un traitement des images est alors nécessaire afin d'obtenir le meilleur ratio signal/bruit de fond. Vient enfin le travail de reconstruction des images traitées pour visualiser le(s) marquage(s) de l'organe en 3D. Ce protocole a été validé dans différents organes de densités et de structures très différentes (ex. cerveau, amygdales, poumons, reins), chez l'homme comme chez la souris. Dans tous les cas, il a été possible de suivre des marquages sur plusieurs centaines de micromètres vers l'intérieur du bloc d'organe avec une résolution inférieure à l'échelle de la cellule (ex. marquage SMA pour la visualisation de l'arbre vasculaire allant jusqu'aux ramifications secondaires au niveau des alvéoles des poumon de souris, Fig. 1). Grâce à ce développement technologique, nous avons pu visualiser simultanément en 3D l'innervation, la vascularisation et l'infiltrat immunitaire du poumon tumoral chez des patients et dans un modèle murin de tumeur pulmonaire (Letaïef *et al.*, article en préparation).

CONCLUSION

L'IHC et l'IF connaissent une grande révolution avec une accélération des avancées technologiques tout au long de la dernière décennie. L'utilisation des anticorps dans quasiment tous les protocoles d'IHC/IF a révolutionné notre compréhension de l'architecture tissulaire qui était jusqu'alors fondée sur des colorations. Les simples marquages ont fait place aux multi-marquages. Au travers d'un dialogue continu, la technique et la science repoussent sans cesse les limites de l'histo-technologie pour répondre à des besoins toujours plus urgents. Le passage de l'imagerie 2D à l'imagerie 3D des marquages IF peut dans certains cas être une alternative intéressante. Des stratégies innovantes sont actuellement en cours de développement : elles visent surtout à combiner plusieurs technologies existantes comme par exemple la détection de molécules (protéines, lipides, sucres par IHC/IF), d'ARN et de phosphoprotéines au moyen d'empreintes faites à partir d'une même et unique coupe de tissu.

L'analyse du microenvironnement d'un tissu, en particulier dans un contexte physiopathologique représente une source remarquable d'informations. Elle permet de mettre en évidence des interactions cellulaires jusqu'alors jamais observées par d'autres approches, de discriminer des biomarqueurs par sous-région d'un tissu (ex., l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales *versus* les cellules immunitaires) ou encore d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, l'analyse *in situ* d'un tissu continuera l'enrichir nos connaissances et d'être mise au service des patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, Nair VS, Xu Y, Khuong A, Hoang CD, Diehn M, West RB, Plevritis SK, Alizadeh AA. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*, 2015, **21**, 938–945.
2. Dieu-Nosjean M-C, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, Chaisemartin L de, Lebecque S, Fridman W-H, Cadranel J. Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 4410–4417.
3. De Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, Cremer I, Fridman W-H, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean M-C. Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer. *Cancer Res*, 2011, **71**, 6391–6399.
4. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, Lepelley A, Becht E, Katsahian S, Bizouard G, Validire P, Damotte D, Alifano M, Magdeleinat P, Cremer I, Teillaud J-L, Fridman W-H, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean M-C. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, **189**, 832–844.
5. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Research*, 2011, **71**(16), 5412-5422.
6. Teillaud J-L and Dieu-Nosjean M-C. Tertiary lymphoid structures: an anti-tumor school for adaptive immune cells and an antibody factory to fight cancer? *Frontiers Immunol.*, 2017, **8**, 830.
7. Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TKD, Lupo A, Klein C, Knockaert S, de Chaisemartin L, Ouakrim H, Becht E, Alifano M, Validire P, Remark R, Hammond SA, Cremer I, Damotte D, Fridman W-H, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean M-C. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res*, 2014, **74**, 705–715.
8. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean M-C, Riquet M, Crozet L, Ouakrim H, Goc J, Cazes A, Fléjou J-F, Gibault L, Verkarre V, Régnard J-F, Pagès O-N, Oudard S, Mlecnik B, Sautès-Fridman C, Fridman W-H, Damotte D. Characteristics

and Clinical Impacts of the Immune Environments in Colorectal and Renal Cell Carcinoma Lung Metastases: Influence of Tumor Origin. *Clin Cancer Res*, 2013, **19**(15), 4079-4091.

9. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P & Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 2014, **159**, 896-910.

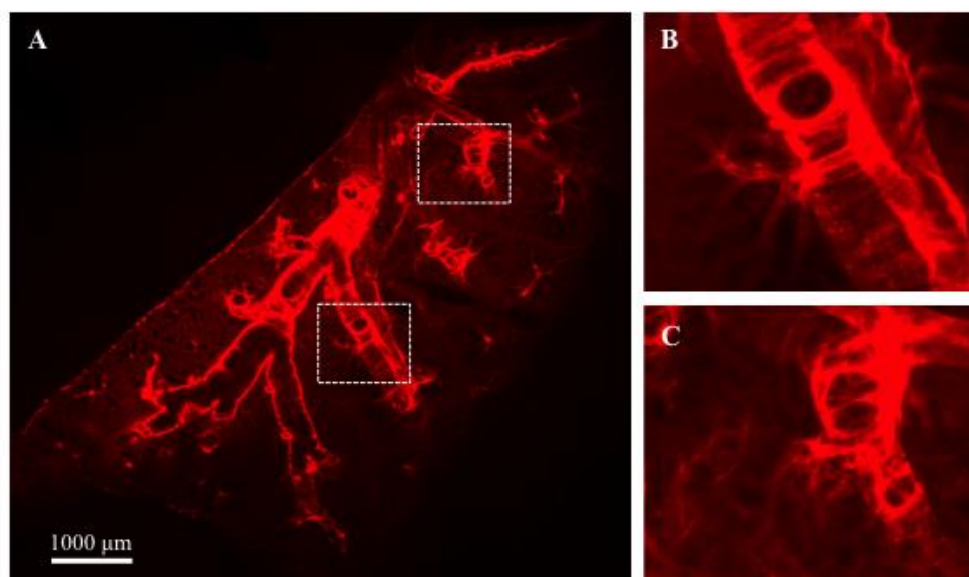
REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les anciens membres de l'équipe de Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Jérémy Goc, Claire Germain, Samantha Knockaert, Myriam Lawand ainsi que Christophe Klein (Centre d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) pour leur contribution aux résultats cités dans cette présente revue. Nous remercions également K. Steele et S.A. Hammond (AstraZeneca, Gaithersburg, MD, Etats-Unis) pour ce travail collaboratif. Nos remerciements s'adressent également aux cliniciens (Institut Mutualiste Montsouris, hôpital européen Georges Pompidou, hôpital Tenon et hôpital Cochin ; Paris, France) qui ont participé aux études dont certains résultats sont présentés ici, qu'ainsi aux patients inclus dans ces études.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Visualisation de la vascularisation pulmonaire à partir d'un poumon entier de souris

Le poumon frais d'une souris a été pré-traité, incubé en présence d'un anticorps anti-SMA (rouge) puis imagé *via* la nouvelle version de la technologie i-DISCO que nous avons développée. (B, C) sont des grossissements de (A).



Bibliographie

Ackerman, M.S., Roeske, W.R., Heck, R.J., Korc, M., 1989. Identification and characterization of muscarinic receptors in cultured human pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* 4, 363–370.

Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougél, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Hondermarck, H., 2008. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 346–351.

Aggarwal, B.B., Natarajan, K., 1996. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7, 93–124.

Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L.C., Rennert, P.D., Hynes, R.O., Baltimore, D., 2002. Requirement for the NF- κ B Family Member RelA in the Development of Secondary Lymphoid Organs. *J. Exp. Med.* 195, 233–244.

Allen, E., Jabouille, A., Rivera, L.B., Lodewijckx, I., Missiaen, R., Steri, V., Feyen, K., Tawney, J., Hanahan, D., Michael, I.P., Bergers, G., 2017. Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. *Sci. Transl. Med.* 9.

Aloisi, F., Pujol-Borrell, R., 2006. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 205–217.

Al-Shalan, H.A.M., Hu, D., Nicholls, P.K., Greene, W.K., Ma, B., 2019. Innervation and nerve-immune cell contacts in mouse Peyer's patches. *Histol. Histopathol.* 18158.

Amos, C.I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I.P., Gu, J., Eisen, T., Dong, Q., Zhang, Q., Gu, X., Vijayakrishnan, J., Sullivan, K., Matakidou, A., Wang, Y., Mills, G., Doheny, K., Tsai, Y.-Y., Chen, W.V., Shete, S., Spitz, M.R., Houlston, R.S., 2008. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat. Genet.* 40, 616–622.

Andre, F., Cabioglu, N., Assi, H., Sabourin, J.C., Delaloge, S., Sahin, A., Broglio, K., Spano, J.P., Combadiere, C., Bucana, C., Soria, J.C., Cristofanilli, M., 2006. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 17, 945–951.

Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hyman, P.L., Luther, S.A., Förster, R., Sedgwick, J.D., Browning, J.L., Lipp, M., Cyster, J.G., 2000. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309–314.

Antoni, M.H., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W., Dhabhar, F.S., Sephton, S.E., McDonald, P.G., Stefanek, M., Sood, A.K., 2006. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 6, 240–248.

Armaiz-Pena, G.N., Cole, S.W., Lutgendorf, S.K., Sood, A.K., 2013. Neuroendocrine influences on cancer progression. *Brain. Behav. Immun.* 30, S19–S25.

Armengol, M.P., Juan, M., Lucas-Martín, A., Fernández-Figueras, M.T., Jaraquemada, D., Gallart, T., Pujol-Borrell, R., 2001. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid

antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am. J. Pathol.* 159, 861–873.

Auais, A., Adkins, B., Napchan, G., Piedimonte, G., 2003. Immunomodulatory effects of sensory nerves during respiratory syncytial virus infection in rats. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L105–L113.

Ayala, G.E., Dai, H., Ittmann, M., Li, R., Powell, M., Frolov, A., Wheeler, T.M., Thompson, T.C., Rowley, D., 2004. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* 64, 6082–6090.

Ayala, G.E., Dai, H., Powell, M., Li, R., Ding, Y., Wheeler, T.M., Shine, D., Kadmon, D., Thompson, T., Miles, B.J., Ittmann, M.M., Rowley, D., 2008. Cancer-Related Axonogenesis and Neurogenesis in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 7593–7603.

Bai, C., Connolly, B., Metzker, M.L., Hilliard, C.A., Liu, X., Sandig, V., Soderman, A., Galloway, S.M., Liu, Q., Austin, C.P., Caskey, C.T., 2000. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1230–1235.

Banks, T.A., Rouse, B.T., Kerley, M.K., Blair, P.J., Godfrey, V.L., Kuklin, N.A., Bouley, D.M., Thomas, J., Kanangat, S., Mucenski, M.L., 1995. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J. Immunol.* 155, 1685–1693.

Bapat, A.A., Hostetter, G., Hoff, D.D.V., Han, H., 2011. Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 695–707.

Basso, L., Serhan, N., Tauber, M., Gaudenzio, N., 2019. Peripheral neurons: Master regulators of skin and mucosal immune response. *Eur. J. Immunol.* 49, 1984–1997.

Bento, D.C., Jones, E., Junaid, S., Tull, J., Williams, G.T., Godkin, A., Ager, A., Gallimore, A., 2015. High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncoimmunology* 4, e974374.

Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M.-M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J.-Y., Mehlen, P., 2007. Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 133, 1840–1848.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.H., Becker, C., Pagès, F., Speicher, M.R., Trajanoski, Z., Galon, J., 2013. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 39, 782–795.

Black, P.H., 2002. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* 16, 622–653.

Boss, A., Oppitz, M., Lippert, G., Drews, U., 2005. Muscarinic cholinergic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel 28: modulation of chemotaxis. *Clin. Exp. Dermatol.* 30, 557–564.

Brown, K.C., Lau, J.K., Dom, A.M., Witte, T.R., Luo, H., Crabtree, C.M., Shah, Y.H., Shiflett, B.S., Marcelo, A.J., Proper, N.A., Hardman, W.E., Eggleton, R.D., Chen, Y.C., Mangiarua, E.I., Dasgupta, P., 2012. MG624, an $\alpha 7$ -nAChR antagonist, inhibits angiogenesis via the Egr-1/FGF2 pathway. *Angiogenesis* 15, 99–114.

Browning, J.L., French, L.E., 2002. Visualization of Lymphotoxin- β and Lymphotoxin- β Receptor Expression in Mouse Embryos. *J. Immunol.* 168, 5079–5087.

Burnet, M., 1957. Cancer—A Biological Approach. *Br. Med. J.* 1, 841–847.

Cabrita, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Skaarup Larsen, M., Mitra, S., Johansson, I., Phung, B., Harbst, K., Vallon-Christersson, J., van Schoiack, A., Lövgren, K., Warren, S., Jirstrom, K., Olsson, H., Pietras, K., Ingvar, C., Isaksson, K., Schadendorf, D., Schmidt, H., Bastholt, L., Carneiro, A., Wargo, J.A., Svane, I.M., Jönsson, G., 2020. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*.

Cakir, Y., Plummer, H.K., Tithof, P.K., Schuller, H.M., 2002. Beta-adrenergic and arachidonic acid-mediated growth regulation of human breast cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 21, 153–157.

Calderaro, J., Petitprez, F., Becht, E., Laurent, A., Hirsch, T.Z., Rousseau, B., Luciani, A., Amadio, G., Derman, J., Charpy, C., Zucman-Rossi, J., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., 2019. Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 70, 58–65.

Cao, L., Liu, X., Lin, E.-J.D., Wang, C., Choi, E.Y., Riban, V., Lin, B., During, M.J., 2010. Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell* 142, 52–64.

Caro, G.D., Bergomas, F., Grizzi, F., Doni, A., Bianchi, P., Malesci, A., Laghi, L., Allavena, P., Mantovani, A., Marchesi, F., 2014. Occurrence of Tertiary Lymphoid Tissue Is Associated with T-Cell Infiltration and Predicts Better Prognosis in Early-Stage Colorectal Cancers. *Clin. Cancer Res.* 20, 2147–2158.

Carrega, P., Loiacono, F., Di Carlo, E., Scaramuccia, A., Mora, M., Conte, R., Benelli, R., Spaggiari, G.M., Cantoni, C., Campana, S., Bonaccorsi, I., Morandi, B., Truini, M., Mingari, M.C., Moretta, L., Ferlazzo, G., 2015. shi. *Nat. Commun.* 6, 8280.

Cavallotti, C., Tonnarini, G.F., Tranquilli Leali, F.M., 2004. Cholinergic innervation of BALT (bronchus associated lymphoid tissue) in rat. *Lung* 182, 27–35.

Ceyhan, G.O., Giese, N.A., Erkan, M., Kersch, A.G., Wente, M.N., Giese, T., Büchler, M.W., Friess, H., 2006. The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion. *Ann. Surg.* 244, 274–281.

- Chaisemartin, L. de, Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., Cremer, I., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., Dieu-Nosjean, M.-C., 2011. Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer. *Cancer Res.* 71, 6391–6399.
- Chakroborty, D., Sarkar, C., Basu, B., Dasgupta, P.S., Basu, S., 2009. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 69, 3727–3730.
- Chen, L., Taylor, J.L., Sabins, N.C., Lowe, D.B., Qu, Y., You, Z., Storkus, W.J., 2013. Extranodal induction of therapeutic immunity in the tumor microenvironment after intratumoral delivery of Tbet gene-modified dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* 20, 469–477.
- Cheng, K., Samimi, R., Xie, G., Shant, J., Drachenberg, C., Wade, M., Davis, R.J., Nomikos, G., Raufman, J.-P., 2008. Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G591–G597.
- Chien, J.L., Warren, J.R., 1985. Differentiation of muscarinic cholinergic receptors in acinar carcinoma of rat pancreas. *Cancer Res.* 45, 4858–4863.
- Chilton, J.K., 2006. Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev. Biol.* 292, 13–24.
- Cipponi, A., Mercier, M., Seremet, T., Baurain, J.-F., Théate, I., Oord, J. van den, Stas, M., Boon, T., Coulie, P.G., Baren, N. van, 2012. Neogenesis of Lymphoid Structures and Antibody Responses Occur in Human Melanoma Metastases. *Cancer Res.* 72, 3997–4007.
- Colbeck, E.J., Ager, A., Gallimore, A., Jones, G.W., 2017. Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease? *Front. Immunol.* 8.
- Cole, S.W., Nagaraja, A.S., Lutgendorf, S.K., Green, P.A., Sood, A.K., 2015. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 15, 563–572.
- Coppola, D., Mulé, J.J., 2008. Ectopic lymph nodes within human solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 4369–4370.
- Coppola, D., Nebozhyn, M., Khalil, F., Dai, H., Yeatman, T., Loboda, A., Mulé, J.J., 2011. Unique Ectopic Lymph Node-Like Structures Present in Human Primary Colorectal Carcinoma Are Identified by Immune Gene Array Profiling. *Am. J. Pathol.* 179, 37–45.
- Cottrell, T.R., Thompson, E.D., Forde, P.M., Stein, J.E., Duffield, A.S., Anagnostou, V., Rekhtman, N., Anders, R.A., Cuda, J.D., Illei, P.B., Gabrielson, E., Askin, F.B., Niknafs, N., Smith, K.N., Velez, M.J., Sauter, J.L., Isbell, J.M., Jones, D.R., Battafarano, R.J., Yang, S.C., Danilova, L., Wolchok, J.D., Topalian, S.L., Velculescu, V.E., Pardoll, D.M., Brahmer, J.R., Hellmann, M.D., Chaft, J.E., Cimino-Mathews, A., Taube, J.M., 2018. Pathologic features of response to neoadjuvant anti-PD-1 in resected non-small-cell lung carcinoma: a proposal for quantitative immune-related pathologic response criteria (irPRC). *Ann. Oncol.* 29, 1853–1860.

Cowan, W.K., Kelly, P., Sawan, A., Cunliffe, W.J., Henry, L., Higgs, M.J., Lunt, L.G., Young, J.R., Horne, C.H.W., Angus, B., 1997. The Pathological and Biological Nature of Screen-Detected Breast Carcinomas: A Morphological and Immunohistochemical Study. *J. Pathol.* 182, 29–35.

Cupedo, T., Mebius, R.E., 2003. Role of chemokines in the development of secondary and tertiary lymphoid tissues. *Semin. Immunol., Chemokines Regulation of Cell Trafficking and Lymphoid Organ Architecture* 15, 243–248.

de Groot, P.M., Wu, C.C., Carter, B.W., Munden, R.F., 2018. The epidemiology of lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 7, 220–233.

de la Torre, E., Davel, L., Jasnis, M.A., Gotoh, T., de Lustig, E.S., Sales, M.E., 2005. Muscarinic receptors participation in angiogenic response induced by macrophages from mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Breast Cancer Res.* 7, R345.

Dela Cruz, C.S., Tanoue, L.T., Matthay, R.A., 2011. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin. Chest Med.* 32.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.-M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., Bernet, A., 2009. Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 237–247.

Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B.I., Weber, K.E., Budczies, J., Huober, J., Klauschen, F., Furlanetto, J., Schmitt, W.D., Blohmer, J.-U., Karn, T., Pfitzner, B.M., Kümmel, S., Engels, K., Schneeweiss, A., Hartmann, A., Noske, A., Fasching, P.A., Jackisch, C., van Mackelenbergh, M., Sinn, P., Schem, C., Hanusch, C., Untch, M., Loibl, S., 2018. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 19, 40–50.

Deteix, C., Attuil-Audenis, V., Duthey, A., Patey, N., McGregor, B., Dubois, V., Caligiuri, G., Graff-Dubois, S., Morelon, E., Thaunat, O., 2010. Intra-graft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 5344–5351.

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

Dobrenis, K., Gauthier, L.R., Barroca, V., Magnon, C., 2015. Granulocyte colony-stimulating factor off-target effect on nerve outgrowth promotes prostate cancer development. *Int. J. Cancer* 136, 982–988.

Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J., Schuh, J., 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13, 2412–2424.

Drayton, D.L., Ying, X., Lee, J., Lesslauer, W., Ruddle, N.H., 2003. Ectopic LT $\alpha\beta$ Directs Lymphoid Organ Neogenesis with Concomitant Expression of Peripheral Node Addressin and a HEV-restricted Sulfotransferase. *J. Exp. Med.* 197, 1153–1163.

Driscoll, T., Nelson, D.I., Steenland, K., Leigh, J., Concha-Barrientos, M., Fingerhut, M., Prüss-Ustün, A., 2005. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am. J. Ind. Med.* 48, 419–431.

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

DuPage, M., Dooley, A.L., Jacks, T., 2009. Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nat. Protoc.* 4, 1064–1072.

Duraker, N., Sişman, S., Can, G., 2003. The significance of perineural invasion as a prognostic factor in patients with gastric carcinoma. *Surg. Today* 33, 95–100.

Dvorak, H.F., 2005. Angiogenesis: update 2005. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 1835–1842.

Eberl, G., Littman, D.R., 2003. The role of the nuclear hormone receptor ROR γ in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunol. Rev.* 195, 81–90.

Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, E.S., 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 52, 595–638.

Eroglu, Z., Zaretsky, J.M., Hu-Lieskovan, S., Kim, D.W., Algazi, A., Johnson, D.B., Liniker, E., Ben Kong, null, Munhoz, R., Rapisuwon, S., Gherardini, P.F., Chmielowski, B., Wang, X., Shintaku, I.P., Wei, C., Sosman, J.A., Joseph, R.W., Postow, M.A., Carlino, M.S., Hwu, W.-J., Scolyer, R.A., Messina, J., Cochran, A.J., Long, G.V., Ribas, A., 2018. High response rate to PD-1 blockade in desmoplastic melanomas. *Nature* 553, 347–350.

Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., Dodt, H.-U., 2012. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* 7, 1983–1995.

Español, A., Eiján, A.M., Mazzoni, E., Davel, L., Jasniz, M.A., Sacerdote De Lustig, E., Sales, M.E., 2002. Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines. *Int. J. Mol. Med.* 9, 651–657.

Español, A.J., de la Torre, E., Fiszman, G.L., Sales, M.E., 2007. Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression. *Life Sci.* 80, 2281–2285.

Fantin, A., Vieira, J.M., Plein, A., Denti, L., Fruttiger, M., Pollard, J.W., Ruhrberg, C., 2013. NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood* 121, 2352–2362.

Faustman, D.L., Davis, M., 2013. TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine. *Front. Immunol.* 4, 478.

Felten, D.L., Ackerman, K.D., Wiegand, S.J., Felten, S.Y., 1987. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *J. Neurosci. Res.* 18, 28–36, 118–121.

Finkin, S., Yuan, D., Stein, I., Taniguchi, K., Weber, A., Unger, K., Browning, J.L., Goossens, N., Nakagawa, S., Gunasekaran, G., Schwartz, M.E., Kobayashi, M., Kumada, H., Berger, M., Pappo, O., Rajewsky, K., Hoshida, Y., Karin, M., Heikenwalder, M., Ben-Neriah, Y., Pikarsky, E., 2015. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat. Immunol.* 16, 1235–1244.

Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.-M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.-Y., Bachelot, T., Bernet, A., Mehlen, P., 2008. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4850–4855.

Fitze, G., Cramer, J., Ziegler, A., Schierz, M., Schreiber, M., Kuhlisch, E., Roesner, D., Schackert, H.K., 2002. Association between c135G/A genotype and RET proto-oncogene germline mutations and phenotype of Hirschsprung's disease. *Lancet Lond. Engl.* 359, 1200–1205.

Foo, S.Y., Phipps, S., 2010. Regulation of inducible BALT formation and contribution to immunity and pathology. *Mucosal Immunol.* 3, 537–544.

Foo, S.Y., Zhang, V., Lalwani, A., Lynch, J.P., Zhuang, A., Lam, C.E., Foster, P.S., King, C., Steptoe, R.J., Mazzone, S.B., Sly, P.D., Phipps, S., 2015. Regulatory T cells prevent inducible BALT formation by dampening neutrophilic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 194, 4567–4576.

Förster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M., 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87, 1037–1047.

Fridman, W.-H., Dieu-Nosjean, M.-C., Pagès, F., Cremer, I., Damotte, D., Sautès-Fridman, C., Galon, J., 2013. The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 6, 117–122.

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., Galon, J., 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.

Frija-Masson, J., Martin, C., Regard, L., Lothe, M.-N., Touqui, L., Durand, A., Lucas, B., Damotte, D., Alifano, M., Fajac, I., Burgel, P.-R., 2017. Bacteria-driven peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 49.

Fujii, Y.X., Tashiro, A., Arimoto, K., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Fujii, T., Matsui, M., Kasahara, T., Kawashima, K., 2007. Diminished antigen-specific IgG1 and

interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J. Neuroimmunol.* 188, 80–85.

Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y., Kiyono, H., 2002. Initiation of NALT Organogenesis Is Independent of the IL-7R, LT β R, and NIK Signaling Pathways but Requires the Id2 Gene and CD3–CD4⁺CD45⁺ Cells. *Immunity* 17, 31–40.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Gantsev, S.K., Umezawa, K., Islamgulov, D.V., Khusnutdinova, E.K., Ishmuratova, R.S., Frolova, V.Y., Kzyrgalin, S.R., 2013. The role of inflammatory chemokines in lymphoid neoorganogenesis in breast cancer. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 67, 363–366. 7

Garaud, S., Zayakin, P., Buisseret, L., Rulle, U., Silina, K., de Wind, A., Van den Eyden, G., Larsimont, D., Willard-Gallo, K., Liné, A., 2018. Antigen Specificity and Clinical Significance of IgG and IgA Autoantibodies Produced in situ by Tumor-Infiltrating B Cells in Breast Cancer. *Front. Immunol.* 9.

Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.-J., Felip, E., Lee, J.-S., Hellmann, M.D., Hamid, O., Goldman, J.W., Soria, J.-C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R.Z., Zhang, J., Luncford, J.K., Rangwala, R., Lubiniecki, G.M., Roach, C., Emancipator, K., Gandhi, L., KEYNOTE-001 Investigators, 2015. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 2018–2028.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., Sharpe, A., 1994. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143–156.

Germain, C., Gnjjatic, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., Validire, P., Damotte, D., Alifano, M., Magdeleinat, P., Cremer, I., Teillaud, J.-L., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., Dieu-Nosjean, M.-C., 2014. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 832–844.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., Bergen, I.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Elewaut, D., Osterhaus, A.D.M.E., Hendriks, R., Rimmelzwaan, G.F., Lambrecht, B.N., 2009. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus–infected mice. *J. Exp. Med.* 206, 2339–2349.

Giraldo, N.A., Becht, E., Pagès, F., Skliris, G., Verkarre, V., Vano, Y., Mejean, A., Saint-Aubert, N., Lacroix, L., Natario, I., Lupo, A., Alifano, M., Damotte, D., Cazes, A., Triebel, F., Freeman, G.J., Dieu-Nosjean, M.-C., Oudard, S., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., 2015.

Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 3031–3040.

Girard, J.-P., Moussion, C., Förster, R., 2012. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 762–773.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., Perez, S., Pasqual, N., Faure, C., Ray-Coquard, I., Puisieux, A., Caux, C., Blay, J.-Y., Ménétrier-Caux, C., 2009. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 69, 2000–2009.

Goc, J., Fridman, W.-H., Hammond, S.A., Sautès-Fridman, C., Dieu-Nosjean, M.-C., 2014a. Tertiary lymphoid structures in human lung cancers, a new driver of antitumor immune responses. *Oncoimmunology* 3, e28976.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., Validire, P., Remark, R., Hammond, S.A., Cremer, I., Damotte, D., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., Dieu-Nosjean, M.-C., 2014b. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells. *Cancer Res.* 74, 705–715.

Goehler, L.E., Gaykema, R.P.A., Nguyen, K.T., Lee, J.E., Tilders, F.J.H., Maier, S.F., Watkins, L.R., 1999. Interleukin-1 β in Immune Cells of the Abdominal Vagus Nerve: a Link between the Immune and Nervous Systems? *J. Neurosci.* 19, 2799–2806.

Gommerman, J.L., Browning, J.L., 2003. Lymphotoxin/LIGHT, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 642–655.

Gould, S.J., Isaacson, P.G., 1993. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in human fetal and infant lung. *J. Pathol.* 169, 229–234.

Gräbner, R., Lötzer, K., Döpping, S., Hildner, M., Radke, D., Beer, M., Spanbroek, R., Lippert, B., Reardon, C.A., Getz, G.S., Fu, Y.-X., Hehlhans, T., Mebius, R.E., van der Wall, M., Kruspe, D., Englert, C., Lovas, A., Hu, D., Randolph, G.J., Weih, F., Habenicht, A.J.R., 2009. Lymphotoxin β receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J. Exp. Med.* 206, 233–248.

Gramaglia, I., Mauri, D.N., Miner, K.T., Ware, C.F., Croft, M., 1999. Lymphotoxin alphabeta is expressed on recently activated naive and Th1-like CD4 cells but is down-regulated by IL-4 during Th2 differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 162, 1333–1338.

Granger, S.W., Ware, C.F., 2001. Turning on LIGHT. *J. Clin. Invest.* 108, 1741–1742.

Grebe, K.M., Hickman, H.D., Irvine, K.R., Takeda, K., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2009. Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8⁺ T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5300–5305.

Grebe, K.M., Takeda, K., Hickman, H.D., Bailey, A.M., Embry, A.C., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2010. Cutting Edge: Sympathetic Nervous System Increases Proinflammatory Cytokines and Exacerbates Influenza A Virus Pathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 540–544.

Grozio, A., Paleari, L., Catassi, A., Servent, D., Cilli, M., Piccardi, F., Paganuzzi, M., Cesario, A., Granone, P., Mourier, G., Russo, P., 2008. Natural agents targeting the $\alpha 7$ -nicotinic-receptor in NSCLC: A promising prospective in anti-cancer drug development. *Int. J. Cancer* 122, 1911–1915.

Grytli, H.H., Fagerland, M.W., Fosså, S.D., Taskén, K.A., 2014. Association between use of β -blockers and prostate cancer-specific survival: a cohort study of 3561 prostate cancer patients with high-risk or metastatic disease. *Eur. Urol.* 65, 635–641.

Grytli, H.H., Fagerland, M.W., Fosså, S.D., Taskén, K.A., Håheim, L.L., 2013. Use of β -blockers is associated with prostate cancer-specific survival in prostate cancer patients on androgen deprivation therapy. *The Prostate* 73, 250–260.

Guedj, K., Khallou-Laschet, J., Clement, M., Morvan, M., Gaston, A.-T., Fornasa, G., Dai, J., Gervais-Taurel, M., Eberl, G., Michel, J.-B., Caligiuri, G., Nicoletti, A., 2014. M1 macrophages act as LT β R-independent lymphoid tissue inducer cells during atherosclerosis-related lymphoid neogenesis. *Cardiovasc. Res.* 101, 434–443.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., Veys, I., Haibe-Kains, B., Singhal, S.K., Michiels, S., Rothé, F., Salgado, R., Duvillier, H., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Bron, D., Larsimont, D., Piccart, M., Sotiriou, C., Willard-Gallo, K., 2013. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 123, 2873–2892.

Haddad, R.I., Shin, D.M., 2008. Recent advances in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1143–1154.

Halle, S., Dujardin, H.C., Bakocevic, N., Fleige, H., Danzer, H., Willenzon, S., Suezer, Y., Hämmerling, G., Garbi, N., Sutter, G., Worbs, T., Förster, R., 2009. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206, 2593–2601.

Hara, M.R., Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Grant, W., Towers, A.J., Williams, B., Lam, C.M., Xiao, K., Shenoy, S.K., Gregory, S.G., Ahn, S., Duckett, D.R., Lefkowitz, R.J., 2011. A stress response pathway regulates DNA damage through $\beta 2$ -adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature* 477, 349–353.

Hara, M.R., Sachs, B.D., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 2013. Pharmacological blockade of a $\beta(2)$ AR- β -arrestin-1 signaling cascade prevents the accumulation of DNA damage in a behavioral stress model. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 219–224.

Hayakawa, Y., Sakitani, K., Konishi, M., Asfaha, S., Niikura, R., Tomita, H., Renz, B.W., Tailor, Y., Macchini, M., Middelhoff, M., Jiang, Z., Tanaka, T., Dubeykovskaya, Z.A., Kim,

W., Chen, X., Urbanska, A.M., Nagar, K., Westphalen, C.B., Quante, M., Lin, C.-S., Gershon, M.D., Hara, A., Zhao, C.-M., Chen, D., Worthley, D.L., Koike, K., Wang, T.C., 2017. Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. *Cancer Cell* 31, 21–34.

Hellmann, M.D., Ciuleanu, T.-E., Pluzanski, A., Lee, J.S., Otterson, G.A., Audigier-Valette, C., Minenza, E., Linardou, H., Burgers, S., Salman, P., Borghaei, H., Ramalingam, S.S., Brahmer, J., Reck, M., O’Byrne, K.J., Geese, W.J., Green, G., Chang, H., Szustakowski, J., Bhagavatheeswaran, P., Healey, D., Fu, Y., Nathan, F., Paz-Ares, L., 2018. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N. Engl. J. Med.* 378, 2093–2104.

Helmink, B.A., Reddy, S.M., Gao, J., Zhang, S., Basar, R., Thakur, R., Yizhak, K., Sade-Feldman, M., Blando, J., Han, G., Gopalakrishnan, V., Xi, Y., Zhao, H., Amaria, R.N., Tawbi, H.A., Cogdill, A.P., Liu, W., LeBleu, V.S., Kugeratski, F.G., Patel, S., Davies, M.A., Hwu, P., Lee, J.E., Gershenwald, J.E., Lucci, A., Arora, R., Woodman, S., Keung, E.Z., Gaudreau, P.-O., Reuben, A., Spencer, C.N., Burton, E.M., Haydu, L.E., Lazar, A.J., Zapassodi, R., Hudgens, C.W., Ledesma, D.A., Ong, S., Bailey, M., Warren, S., Rao, D., Krijgsman, O., Rozeman, E.A., Peeper, D., Blank, C.U., Schumacher, T.N., Butterfield, L.H., Zelazowska, M.A., McBride, K.M., Kalluri, R., Allison, J., Petitprez, F., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., Hacohen, N., Rezvani, K., Sharma, P., Tetzlaff, M.T., Wang, L., Wargo, J.A., 2020. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* 1–7.

Hennequin, A., Derangère, V., Boidot, R., Apetoh, L., Vincent, J., Orry, D., Fraisse, J., Causeret, S., Martin, F., Arnould, L., Beltjens, F., Ghiringhelli, F., Ladoire, S., 2016. Tumor infiltration by Tbet⁺ effector T cells and CD20⁺ B cells is associated with survival in gastric cancer patients. *Oncoimmunology* 5, e1054598.

Hiraoka, N., Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Kanai, Y., Kosuge, T., Shimada, K., 2015. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 112, 1782–1790.

Hochman, P.S., Majeau, G.R., Mackay, F., Browning, J.L., 1995. Proinflammatory responses are efficiently induced by homotrimeric but not heterotrimeric lymphotoxin ligands. *J. Inflamm.* 46, 220–234.

Hondermarck, H., Jobling, P., 2018. The Sympathetic Nervous System Drives Tumor Angiogenesis. *Trends Cancer* 4, 93–94.

Hu, D., Nicholls, P.K., Claus, M., Wu, Y., Shi, Z., Greene, W.K., Ma, B., 2019. Immunofluorescence characterization of innervation and nerve-immune cell interactions in mouse lymph nodes. *Eur. J. Histochem.* 63.

Huh, J.W., Kim, H.R., Kim, Y.J., 2010. Prognostic value of perineural invasion in patients with stage II colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 2066–2072.

Humby, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Kelly, S., Blades, M.C., Kirkham, B., Spencer, J., Pitzalis, C., 2009. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.* 6, e1.

Husson, H., Lugli, S.M., Ghia, P., Cardoso, A., Roth, A., Brohmi, K., Carideo, E.G., Choi, Y.S., Browning, J., Freedman, A.S., 2000. Functional effects of TNF and lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$ on FDC-like cells. *Cell. Immunol.* 203, 134–143.

Huston, J.M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V.A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C.J., Foxwell, B., Tracey, K.J., Ulloa, L., 2006. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* 203, 1623–1628.

Inbar, S., Neeman, E., Avraham, R., Benish, M., Rosenne, E., Ben-Eliyahu, S., 2011. Do Stress Responses Promote Leukemia Progression? An Animal Study Suggesting a Role for Epinephrine and Prostaglandin-E2 through Reduced NK Activity. *PLOS ONE* 6, e19246.

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

Johansson-Percival, A., He, B., Li, Z.-J., Kjellén, A., Russell, K., Li, J., Larma, I., Ganss, R., 2017. De novo induction of intratumoral lymphoid structures and vessel normalization enhances immunotherapy in resistant tumors. *Nat. Immunol.* 18, 1207–1217.

Joshi, N.S., Akama-Garren, E.H., Lu, Y., Lee, D.-Y., Chang, G.P., Li, A., DuPage, M., Tammela, T., Kerper, N.R., Farago, A.F., Robbins, R., Crowley, D.M., Bronson, R.T., Jacks, T., 2015. Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses. *Immunity* 43, 579–590.

Kamiya, A., Hayama, Y., Kato, S., Shimomura, A., Shimomura, T., Irie, K., Kaneko, R., Yanagawa, Y., Kobayashi, K., Ochiya, T., 2019. Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. *Nat. Neurosci.* 22, 1289–1305.

Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., Vujanovic, N.L., 1999. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 5358–5366.

Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., 2012. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci.* 91, 1027–1032.

Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., Horiguchi, K., 2015. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *Int. Immunopharmacol., 4th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine* 29, 127–134.

Kawashima, K., Yoshikawa, K., Fujii, Y.X., Moriwaki, Y., Misawa, H., 2007. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci.* 80, 2314–2319.

Khader, S.A., Rangel-Moreno, J., Fountain, J.J., Martino, C.A., Reiley, W.W., Pearl, J.E., Winslow, G.M., Woodland, D.L., Randall, T.D., Cooper, A.M., 2009. In a Murine Tuberculosis Model, the Absence of Homeostatic Chemokines Delays Granuloma Formation and Protective Immunity. *J. Immunol.* 183, 8004–8014.

Kodaira, M., Kajimura, M., Takeuchi, K., Lin, S., Hanai, H., Kaneko, E., 1999. Functional muscarinic m3 receptor expressed in gastric cancer cells stimulates tyrosine phosphorylation and MAP kinase. *J. Gastroenterol.* 34, 163–171.

Koni, P.A., Flavell, R.A., 1998. A role for tumor necrosis factor receptor type 1 in gut-associated lymphoid tissue development: genetic evidence of synergism with lymphotoxin beta. *J. Exp. Med.* 187, 1977–1983.

Koni, P.A., Sacca, R., Lawton, P., Browning, J.L., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., 1997. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 6, 491–500.

Kooi, E.-J., Geurts, J.J.G., van Horssen, J., Bø, L., van der Valk, P., 2009. Meningeal inflammation is not associated with cortical demyelination in chronic multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 1021–1028.

Kostrzewa, R.M., Jacobowitz, D.M., 1974. Pharmacological Actions of 6-Hydroxydopamine. *Pharmacol. Rev.* 26, 199–288.

Kratz, A., Campos-Neto, A., Hanson, M.S., Ruddle, N.H., 1996. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J. Exp. Med.* 183, 1461–1472.

Krewski, D., Lubin, J.H., Zielinski, J.M., Alavanja, M., Catalan, V.S., Field, R.W., Klotz, J.B., Létourneau, E.G., Lynch, C.F., Lyon, J.I., Sandler, D.P., Schoenberg, J.B., Steck, D.J., Stolwijk, J.A., Weinberg, C., Wilcox, H.B., 2005. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiol. Camb. Mass* 16, 137–145.

Kroeger, D.R., Milne, K., Nelson, B.H., 2016. Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 3005–3015.

Kurtz, K.A., Hoffman, H.T., Zimmerman, M.B., Robinson, R.A., 2005. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 129, 354–359.

Ladányi, A., Kiss, J., Mohos, A., Somlai, B., Liskay, G., Gilde, K., Fejös, Z., Gaudi, I., Dobos, J., Tímár, J., 2011. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 60, 1729–1738.

- Ladányi, A., Kiss, J., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Mohos, A., Gaudi, I., Tímár, J., 2007. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 56, 1459–1469.
- Lamkin, D.M., Ho, H.-Y., Ong, T.H., Kawanishi, C.K., Stoffers, V.L., Ahlawat, N., Ma, J.C.Y., Arevalo, J.M.G., Cole, S.W., Sloan, E.K., 2016. β -Adrenergic-stimulated macrophages: Comprehensive localization in the M1-M2 spectrum. *Brain. Behav. Immun.* 57, 338–346.
- Larivière, B., Freitas, C., Suchting, S., Brunet, I., Eichmann, A., 2009. Guidance of Vascular Development: Lessons From the Nervous System. *Circ. Res.* 104, 428–441.
- Lee, C.-H., Huang, C.-S., Chen, C.-S., Tu, S.-H., Wang, Y.-J., Chang, Y.-J., Tam, K.-W., Wei, P.-L., Cheng, T.-C., Chu, J.-S., Chen, L.-C., Wu, C.-H., Ho, Y.-S., 2010. Overexpression and activation of the $\alpha 9$ -nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1322–1335.
- Lee, W.H., Kim, S.H., Lee, Y., Lee, B.B., Kwon, B., Song, H., Kwon, B.S., Park, J.E., 2001. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 2004–2010.
- Lemeshow, S., Sorensen, H.T., Phillips, G., Yang, E.V., Antonsen, S., Riis, A.H., Lesinski, G.B., Jackson, R., Glaser, R., 2011. β -Blockers and Survival among Danish Patients with Malignant Melanoma: A Population-Based Cohort Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 20, 2273–2279.
- Leo, N.A., Bonneau, R.H., 2000. Mechanisms underlying chemical sympathectomy-induced suppression of herpes simplex virus-specific cytotoxic T lymphocyte activation and function. *J. Neuroimmunol.* 110, 45–56.
- Levine, J.D., Dardick, S.J., Roizen, M.F., Helms, C., Basbaum, A.I., 1986. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 6, 3423–3429.
- Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J.A., Berger, D.H., Albo, D., 2009. Perineural invasion in cancer. *Cancer* 115, 3379–3391.
- Lin, G., Sun, L., Wang, R., Guo, Y., Xie, C., 2014. Overexpression of Muscarinic Receptor 3 Promotes Metastasis and Predicts Poor Prognosis in Non–Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 9, 170–178.
- Lin, K.Y., Guarnieri, F.G., Staveley-O’Carroll, K.F., Levitsky, H.I., August, J.T., Pardoll, D.M., Wu, T.C., 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 56, 21–26.

Liu, T., Xie, C., Chen, X., Zhao, F., Liu, A.-M., Cho, D.-B., Chong, J., Yang, P.-C., 2010. Role of muscarinic receptor activation in regulating immune cell activity in nasal mucosa. *Allergy* 65, 969–977.

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

Lochner, M., Ohnmacht, C., Presley, L., Bruhns, P., Si-Tahar, M., Sawa, S., Eberl, G., 2011. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ t and LTi cells. *J. Exp. Med.* 208, 125–134.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., Harris, T.H., Kipnis, J., 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337–341.

Lukashev, M., LePage, D., Wilson, C., Bailly, V., Garber, E., Lukashin, A., Ngam-ek, A., Zeng, W., Allaire, N., Perrin, S., Xu, X., Szeliga, K., Wortham, K., Kelly, R., Bottiglio, C., Ding, J., Griffith, L., Heaney, G., Silverio, E., Yang, W., Jarpe, M., Fawell, S., Reff, M., Carmillo, A., Miatkowski, K., Amatucci, J., Crowell, T., Prentice, H., Meier, W., Violette, S.M., Mackay, F., Yang, D., Hoffman, R., Browning, J.L., 2006. Targeting the Lymphotoxin- β Receptor with Agonist Antibodies as a Potential Cancer Therapy. *Cancer Res.* 66, 9617–9624.

Luther, S.A., Ansel, K.M., Cyster, J.G., 2003. Overlapping Roles of CXCL13, Interleukin 7 Receptor α , and CCR7 Ligands in Lymph Node Development. *J. Exp. Med.* 197, 1191–1198.

Luther, S.A., Lopez, T., Bai, W., Hanahan, D., Cyster, J.G., 2000. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity* 12, 471–481.

Lutz, E.R., Wu, A.A., Bigelow, E., Sharma, R., Mo, G., Soares, K., Solt, S., Dorman, A., Wamwea, A., Yager, A., Laheru, D., Wolfgang, C.L., Wang, J., Hruban, R.H., Anders, R.A., Jaffee, E.M., Zheng, L., 2014. Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. *Cancer Immunol. Res.* 2, 616–631.

Ma, B., von Wasielowski, R., Lindenmaier, W., Dittmar, K.E.J., 2007. Immunohistochemical study of the blood and lymphatic vasculature and the innervation of mouse gut and gut-associated lymphoid tissue. *Anat. Histol. Embryol.* 36, 62–74.

ma, M., Liu, D., Duan, H., Qian, L., Wang, L., Niu, L., Zhang, H., Yong, Z., Gong, Z., Song, L., Yu, M., Hu, M., Xia, Q., Shen, B., Guo, N., 2011. The β 2-adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 125, 351–362.

Madeo, M., Colbert, P.L., Vermeer, D.W., Lucido, C.T., Cain, J.T., Vichaya, E.G., Grossberg, A.J., Muirhead, D., Rickel, A.P., Hong, Z., Zhao, J., Weimer, J.M., Spanos, W.C., Lee, J.H.,

- Dantzer, R., Vermeer, P.D., 2018. Cancer exosomes induce tumor innervation. *Nat. Commun.* 9.
- Maestroni, G.J.M., 2000. Dendritic Cell Migration Controlled by α 1b-Adrenergic Receptors. *J. Immunol.* 165, 6743–6747.
- Maestroni, G.J.M., Mazzola, P., 2003. Langerhans cells β 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. *J. Neuroimmunol.* 144, 91–99.
- Maglione, P.J., Xu, J., Chan, J., 2007. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7222–7234.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain J. Neurol.* 130, 1089–1104.
- Magnon, C., Hall, S.J., Lin, J., Xue, X., Gerber, L., Freedland, S.J., Frenette, P.S., 2013. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* 341, 1236361.
- Mantyh, W.G., Jimenez-Andrade, J.M., Stake, J.I., Bloom, A.P., Kaczmarek, M.J., Taylor, R.N., Freeman, K.T., Ghilardi, J.R., Kuskowski, M.A., Mantyh, P.W., 2010. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. *Neuroscience* 171, 588–598.
- Marchesi, F., Piemonti, L., Mantovani, A., Allavena, P., 2010. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev., Inflammation and Cancer* 21, 77–82.
- Marinkovic, T., Garin, A., Yokota, Y., Fu, Y.-X., Ruddle, N.H., Furtado, G.C., Lira, S.A., 2006. Interaction of mature CD3+CD4+ T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J. Clin. Invest.* 116, 2622–2632.
- Martelli, D., McKinley, M.J., McAllen, R.M., 2014a. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 182, 65–69.
- Martelli, D., Yao, S.T., McKinley, M.J., McAllen, R.M., 2014b. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. *J. Physiol.* 592, 1677–1686.
- Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J.-J., Rochaix, P., Girard, J.-P., 2011. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 71, 5678–5687.
- Martinet, L., Girard, J.-P., 2013. Regulation of tumor-associated high-endothelial venules by dendritic cells. *Oncoimmunology* 2.

Mathe, G., Bernard, J., Schwarzenberg, L., Larrieu, M.J., Lalanne, C.M., Dutreix, A., Denoix, P.F., Surmont, J., Schwarzmann, V., Ceoara, B., 1959. [Trial treatment of patients afflicted with acute leukemia in remission with total irradiation followed by homologous bone marrow transfusion]. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* 4, 675–704.

Mauffrey, P., Tchitchek, N., Barroca, V., Bemelmans, A., Firlej, V., Allory, Y., Roméo, P.-H., Magnon, C., 2019. Progenitors from the central nervous system drive neurogenesis in cancer. *Nature* 569, 672–678.

Mazzucchelli, L., Blaser, A., Kappeler, A., Schärli, P., Laissue, J.A., Baggiolini, M., Uguccioni, M., 1999. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J. Clin. Invest.* 104, R49-54.

McKay, J.D., Hung, R.J., Gaborieau, V., Boffetta, P., Chabrier, A., Byrnes, G., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., McLaughlin, J., Shepherd, F., Montpetit, A., Narod, S., Krokan, H.E., Skorpen, F., Elvestad, M.B., Vatten, L., Njølstad, I., Axelsson, T., Chen, C., Goodman, G., Barnett, M., Loomis, M.M., Lubinski, J., Matyjasik, J., Lener, M., Oszutowska, D., Field, J., Liloglou, T., Xinarianos, G., Cassidy, A., Zelenika, D., Boland, A., Delepine, M., Foglio, M., Lechner, D., Matsuda, F., Blanche, H., Gut, I., Heath, S., Lathrop, M., Brennan, P., Vineis, P., Clavel-Chapelon, F., Palli, D., Tumino, R., Krogh, V., Panico, S., González, C.A., Quirós, J.R., Martínez, C., Navarro, C., Ardanaz, E., Larrañaga, N., Kham, K.T., Key, T., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Trichopoulou, A., Linseisen, J., Boeing, H., Hallmans, G., Overvad, K., Tjønneland, A., Kumle, M., Riboli, E., 2008. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat. Genet.* 40, 1404–1406.

McMullen, T.P.W., Lai, R., Dabbagh, L., Wallace, T.M., Gara, C.J.D., 2010. Survival in rectal cancer is predicted by T cell infiltration of tumour-associated lymphoid nodules. *Clin. Exp. Immunol.* 161, 81–88.

Mebius, R.E., 2003. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 292–303.

Meier, D., Bornmann, C., Chappaz, S., Schmutz, S., Otten, L.A., Ceredig, R., Acha-Orbea, H., Finke, D., 2007. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* 26, 643–654.

Melhem-Bertrandt, A., Chavez-Macgregor, M., Lei, X., Brown, E.N., Lee, R.T., Meric-Bernstam, F., Sood, A.K., Conzen, S.D., Hortobagyi, G.N., Gonzalez-Angulo, A.-M., 2011. Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 2645–2652.

Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., Frenette, P.S., 2008. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452, 442–447.

Meshcheryakova, A., Tamandl, D., Bajna, E., Stift, J., Mittlboeck, M., Svoboda, M., Heiden, D., Stremitzer, S., Jensen-Jarolim, E., Grünberger, T., Bergmann, M., Mechtcheriakova, D.,

2014. B cells and ectopic follicular structures: novel players in anti-tumor programming with prognostic power for patients with metastatic colorectal cancer. *PloS One* 9, e99008.

Messina, J.L., Fenstermacher, D.A., Eschrich, S., Qu, X., Berglund, A.E., Lloyd, M.C., Schell, M.J., Sondak, V.K., Weber, J.S., Mulé, J.J., 2012. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci. Rep.* 2, 765.

Miknyoczki, S.J., Wan, W., Chang, H., Dobrzanski, P., Ruggeri, B.A., Dionne, C.A., Buchkovich, K., 2002. The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 1924–1931.

Minutello, M.A., Pileri, P., Unutmaz, D., Censini, S., Kuo, G., Houghton, M., Brunetto, M.R., Bonino, F., Abrignani, S., 1993. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4⁺ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J. Exp. Med.* 178, 17–25.

Morel, Y., Truneh, A., Sweet, R.W., Olive, D., Costello, R.T., 2001. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 2479–2486.

Mousa, S.A., Shaqura, M., Brendl, U., Al-Khrasani, M., Fürst, S., Schäfer, M., 2010. Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain. *Brain. Behav. Immun.* 24, 1310–1323.

Moussion, C., Girard, J.-P., 2011. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 479, 542–546.

Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D.L., Lund, F.E., Randall, T.D., 2004. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.* 10, 927–934.

Muller, P., Männel, D.N., Hehlhans, T., 2001. Functional characterization of the mouse lymphotoxin-beta receptor promoter. *Eur. Cytokine Netw.* 12, 325–330.

Murphy, M., Walter, B.N., Pike-Nobile, L., Fanger, N.A., Guyre, P.M., Browning, J.L., Ware, C.F., Epstein, L.B., 1998. Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *Cell Death Differ.* 5, 497–505.

Murtaza, A., Laken, H., Da Silva Correia, J., McNeeley, P., Altobelli, L., Zhang, J., Vancutsem, P., Wilcoxen, K., Jenkins, D., 2016. 311 - Discovery of TSR-022, a novel, potent anti-human TIM-3 therapeutic antibody. *Eur. J. Cancer*, 28 EORTC – NCI – AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics 69, S102.

Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T., Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Yamamoto, T., Inoue, J., 1999. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1

signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 4, 353–362.

Nance, D.M., Sanders, V.M., 2007. Autonomic Innervation and Regulation of the Immune System (1987-2007). *Brain. Behav. Immun.* 21, 736–745.

Ngo, V.N., Korner, H., Gunn, M.D., Schmidt, K.N., Riminton, D.S., Cooper, M.D., Browning, J.L., Sedgwick, J.D., Cyster, J.G., 1999. Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J. Exp. Med.* 189, 403–412.

Nijijima, A., 1996. The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 61, 287–291.

Nilsson, M.B., Armaiz-Pena, G., Takahashi, R., Lin, Y.G., Trevino, J., Li, Y., Jennings, N., Arevalo, J., Lutgendorf, S.K., Gallick, G.E., Sanguino, A.M., Lopez-Berestein, G., Cole, S.W., Sood, A.K., 2007. Stress Hormones Regulate Interleukin-6 Expression by Human Ovarian Carcinoma Cells through a Src-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 29919–29926.

Nissen, M.D., Sloan, E.K., Mattarollo, S.R., 2018. β -Adrenergic Signaling Impairs Antitumor CD8⁺ T-cell Responses to B-cell Lymphoma Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 6, 98–109.

Ohl, L., Henning, G., Krautwald, S., Lipp, M., Hardtke, S., Bernhardt, G., Pabst, O., Förster, R., 2003. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 197, 1199–1204.

Okusa, M.D., Rosin, D.L., Tracey, K.J., 2017. Targeting neural reflex circuits in immunity to treat kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 669–680.

Old, L.J., Clarke, D.A., Benacerraf, B., 1959. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 184(Suppl 5), 291–292.

Olivier, B.J., Cailotto, C., Vliet, J. van der, Knippenberg, M., Greuter, M.J., Hilbers, F.W., Konijn, T., Velde, A.A. te, Nolte, M.A., Boeckxstaens, G.E., Jonge, W.J. de, Mebius, R.E., 2016. Vagal innervation is required for the formation of tertiary lymphoid tissue in colitis. *Eur. J. Immunol.* 46, 2467–2480.

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 Res.* 71, 3505–3515.

Onder, L., Ludewig, B., 2018. A Fresh View on Lymph Node Organogenesis. *Trends Immunol.* 39, 775–787.

Oppitz, M., Möbus, V., Brock, S., Drews, U., 2002. Muscarinic receptors in cell lines from ovarian carcinoma: negative correlation with survival of patients. *Gynecol. Oncol.* 85, 159–164.

Ostrand-Rosenberg, S., 2008. Immune Surveillance: A Balance Between Pro- and Anti-tumor Immunity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 11–18.

Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M., 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500.

Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Galon, J., 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 2654–2666.

Pahl, A., Bauhofer, A., Petzold, U., Cnota, P.J., Maus, J., Brune, K., Szelenyi, S., 2006. Synergistic effects of the anti-cholinergic R,R-glycopyrrolate with anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1690–1696.

Pakala, S.V., Ilic, A., Chen, L., Sarvetnick, N., 2001. TNF-alpha receptor 1 (p55) on islets is necessary for the expression of LIGHT on diabetogenic T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 100, 198–207.

Palm, D., Lang, K., Niggemann, B., Drell, T.L., Masur, K., Zaenker, K.S., Entschladen, F., 2006. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int. J. Cancer* 118, 2744–2749.

Park, S.Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T., Saito, T., 1995. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3, 771–782.

Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Grell, M., Pfizenmaier, K., Bluethmann, H., Kollias, G., 1997. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6319–6323.

Pasquier, E., Street, J., Pouchy, C., Carre, M., Gifford, A.J., Murray, J., Norris, M.D., Trahair, T., Andre, N., Kavallaris, M., 2013. β -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br. J. Cancer* 108, 2485–2494.

Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2015. Neural circuitry and immunity. *Immunol. Res.* 63, 38–57.

Peske, J.D., Thompson, E.D., Gemta, L., Baylis, R.A., Fu, Y.-X., Engelhard, V.H., 2015. Effector lymphocyte-induced lymph node-like vasculature enables naive T-cell entry into tumours and enhanced anti-tumour immunity. *Nat. Commun.* 6, 7114.

Peters, A., Pitcher, L.A., Sullivan, J.M., Mitsdoerffer, M., Acton, S.E., Franz, B., Wucherpennig, K., Turley, S., Carroll, M.C., Sobel, R.A., Bettelli, E., Kuchroo, V.K., 2011. Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity* 35, 986–996.

Petitprez, F., de Reyniès, A., Keung, E.Z., Chen, T.W.-W., Sun, C.-M., Calderaro, J., Jeng, Y.-M., Hsiao, L.-P., Lacroix, L., Bougoüin, A., Moreira, M., Lacroix, G., Natario, I., Adam, J., Lucchesi, C., Laizet, Y.H., Toulmonde, M., Burgess, M.A., Bolejack, V., Reinke, D., Wani, K.M., Wang, W.-L., Lazar, A.J., Roland, C.L., Wargo, J.A., Italiano, A., Sautès-Fridman, C., Tawbi, H.A., Fridman, W.H., 2020. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*

Poncelet, A.J., Cornet, J., Coulon, C., Collard, P., Noirhomme, P., Weynand, B., groupe d'oncologie thoracique des Cliniques Saint-Luc, 2008. Intra-tumoral vascular or perineural invasion as prognostic factors for long-term survival in early stage non-small cell lung carcinoma. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* 33, 799–804.

Pour, P.M., Bell, R.H., Batra, S.K., 2003. Neural invasion in the staging of pancreatic cancer. *Pancreas* 26, 322–325.

Powe, D.G., Voss, M.J., Zänker, K.S., Habashy, H.O., Green, A.R., Ellis, I.O., Entschladen, F., 2010. Beta-Blocker Drug Therapy Reduces Secondary Cancer Formation in Breast Cancer and Improves Cancer Specific Survival. *Oncotarget* 1, 628–638.

Profita, M., Giorgi, R.D., Sala, A., Bonanno, A., Riccobono, L., Mirabella, F., Gjomarkaj, M., Bonsignore, G., Bousquet, J., Vignola, A.M., 2005. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy* 60, 1361–1369.

Pundavela, J., Roselli, S., Faulkner, S., Attia, J., Scott, R.J., Thorne, R.F., Forbes, J.F., Bradshaw, R.A., Walker, M.M., Jobling, P., Hondermarck, H., 2015. Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Mol. Oncol.* 9, 1626–1635.

Qin, J., Jin, F., Li, N., Guan, H., Lan, L., Ni, H., Wang, Y., 2015. Adrenergic receptor $\beta 2$ activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment. *BMB Rep.* 48, 295–300.

Qiu, Y.H., Peng, Y.P., Zhang, Q.Q., Wang, J.H., 1995. [Effect of acetylcholine on the proliferation of T lymphocyte of rat spleen]. *Sheng Li Xue Bao* 47, 275–280.

Randall, T.D., Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J., 2008. Development of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 627–650.

Randall, T.D., Kern, J.A., 2014. Tertiary Lymphoid Structures Target the Antitumor Immune Response to Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 767–769.

Rangel-Moreno, J., Carragher, D.M., Garcia-Hernandez, M. de la L., Hwang, J.Y., Kusser, K., Hartson, L., Kolls, J.K., Khader, S.A., Randall, T.D., 2011. The development of inducible

Bronchus Associated Lymphoid Tissue (iBALT) is dependent on IL-17. *Nat. Immunol.* 12, 639–646.

Rangel-Moreno, J., Moyron-Quiroz, J.E., Hartson, L., Kusser, K., Randall, T.D., 2007. Pulmonary expression of CXC chemokine ligand 13, CC chemokine ligand 19, and CC chemokine ligand 21 is essential for local immunity to influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10577–10582.

Rayford, W., Noble, M.J., Austenfeld, M.A., Weigel, J., Mebust, W.K., Shah, G.V., 1997. Muscarinic cholinergic receptors promote growth of human prostate cancer cells. *The Prostate* 30, 160–166.

Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A., Flejou, J.-F., Gibault, L., Verkarre, V., Regnard, J.-F., Pages, O.-N., Oudard, S., Mlecnik, B., Sautes-Fridman, C., Fridman, W.-H., Damotte, D., 2013. Characteristics and Clinical Impacts of the Immune Environments in Colorectal and Renal Cell Carcinoma Lung Metastases: Influence of Tumor Origin. *Clin. Cancer Res.* 19, 4079–4091.

Remark, R., Lupo, A., Alifano, M., Biton, J., Ouakrim, H., Stefani, A., Cremer, I., Goc, J., Régnard, J.-F., Dieu-Nosjean, M.-C., Damotte, D., 2016. Immune contexture and histological response after neoadjuvant chemotherapy predict clinical outcome of lung cancer patients. *Oncoimmunology* 5.

Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., Wang, V.X., Tang, C.Y., Olsen, O., Dulac, C., Osten, P., Tessier-Lavigne, M., 2016. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* 165, 1789–1802.

Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., Tessier-Lavigne, M., 2014. iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* 159, 896–910.

Ricci, A., Amenta, F., Bronzetti, E., Mannino, F., Mariotta, S., Tayebati, S.K., 2002. Expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptor subtypes in airway hyperresponsiveness. *J. Neuroimmunol.* 129, 178–185.

Rosas-Ballina, M., Olofsson, P.S., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S.I., Levine, Y.A., Reardon, C., Tusche, M.W., Pavlov, V.A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T.W., Tracey, K.J., 2011. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* 334, 98–101.

Roy, S., Bag, A.K., Singh, R.K., Talmadge, J.E., Batra, S.K., Datta, K., 2017. Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy. *Front. Immunol.* 8, 1228.

Sakimura, C., Tanaka, H., Okuno, T., Hiramatsu, S., Muguruma, K., Hirakawa, K., Wanibuchi, H., Ohira, M., 2017. B cells in tertiary lymphoid structures are associated with favorable prognosis in gastric cancer. *J. Surg. Res.* 215, 74–82.

Salomonsson, S., Jonsson, M.V., Skarstein, K., Brokstad, K.A., Hjelmström, P., Wahren-Herlenius, M., Jonsson, R., 2003. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 48, 3187–3201.

Sarkar, C., Chakroborty, D., Chowdhury, U.R., Dasgupta, P.S., Basu, S., 2008. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 2502–2510.

Sastry, K.S.R., Karpova, Y., Prokopovich, S., Smith, A.J., Essau, B., Gersappe, A., Carson, J.P., Weber, M.J., Register, T.C., Chen, Y.Q., Penn, R.B., Kulik, G., 2007. Epinephrine protects cancer cells from apoptosis via activation of cAMP-dependent protein kinase and BAD phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 14094–14100.

Sautès-Fridman, C., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Fisson, S., Fridman, W.H., Cremer, I., Dieu-Nosjean, M.-C., 2011. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 13–25.

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. *Front. Immunol.* 7, 407.

Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., Fridman, W.H., 2019. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 19, 307–325.

Sayar, A., Turna, A., Solak, O., Kılıçgün, A., Ürer, N., Gürses, A., 2004. Nonanatomic prognostic factors in resected nonsmall cell lung carcinoma: the importance of perineural invasion as a new prognostic marker. *Ann. Thorac. Surg.* 77, 421–425.

Scartozzi, M., Galizia, E., Verdecchia, L., Berardi, R., Graziano, F., Catalano, V., Giordani, P., Mari, D., Silva, R.R., Marmorale, C., Zingaretti, C., Cascinu, S., 2006. Lymphatic, blood vessel and perineural invasion identifies early-stage high-risk radically resected gastric cancer patients. *Br. J. Cancer* 95, 445–449.

Scheu, S., Alferink, J., Pötzel, T., Barchet, W., Kalinke, U., Pfeffer, K., 2002. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *J. Exp. Med.* 195, 1613–1624.

Schrama, D., thor Straten, P., Fischer, W.H., McLellan, A.D., Bröcker, E.-B., Reisfeld, R.A., Becker, J.C., 2001. Targeting of Lymphotoxin- α to the Tumor Elicits an Efficient Immune Response Associated with Induction of Peripheral Lymphoid-like Tissue. *Immunity* 14, 111–121.

Scheiermann, C., Kunisaki, Y., Lucas, D., Chow, A., Jang, J.-E., Zhang, D., Hashimoto, D., Merad, M., Frenette, P.S., 2012. ADRENERGIC NERVES GOVERN CIRCADIAN LEUKOCYTE RECRUITMENT TO TISSUES. *Immunity* 37, 290–301.

Schuller, H.M., 2009. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat. Rev. Cancer* 9, 195–205.

Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Aloisi, F., 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 14, 164–174.

Shah, N., Khurana, S., Cheng, K., Raufman, J.-P., 2009. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 296, C221–C232.

Shahzad, M.M.K., Arevalo, J.M., Armaiz-Pena, G.N., Lu, C., Stone, R.L., Moreno-Smith, M., Nishimura, M., Lee, J.-W., Jennings, N.B., Bottsford-Miller, J., Vivas-Mejia, P., Lutgendorf, S.K., Lopez-Berestein, G., Bar-Eli, M., Cole, S.W., Sood, A.K., 2010. Stress Effects on FosB- and Interleukin-8 (IL8)-driven Ovarian Cancer Growth and Metastasis. *J. Biol. Chem.* 285, 35462–35470.

Shalapour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., Willimsky, G., Ammirante, M., Strasner, A., Hansel, D.E., Jamieson, C., Kane, C.J., Klatte, T., Birner, P., Kenner, L., Karin, M., 2015. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature* 521, 94–98.

Shao, J., Wang, B., Yao, Y., Pan, Z., Shen, Q., Zhou, J., 2016. Autonomic nervous infiltration positively correlates with pathological risk grading and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Thorac. Cancer* 7, 588–598.

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

Shi, M., Liu, D., Duan, H., Qian, L., Wang, L., Niu, L., Zhang, H., Yong, Z., Gong, Z., Song, L., Yu, M., Hu, M., Xia, Q., Shen, B., Guo, N., 2011. The β 2-adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 125, 351–362.

Shikhagaie, M.M., Björklund, Å.K., Mjösberg, J., Erjefält, J.S., Cornelissen, A.S., Ros, X.R., Bal, S.M., Koning, J.J., Mebius, R.E., Mori, M., Bruchard, M., Blom, B., Spits, H., 2017. Neuropilin-1 Is Expressed on Lymphoid Tissue Residing LT α i-like Group 3 Innate Lymphoid Cells and Associated with Ectopic Lymphoid Aggregates. *Cell Rep.* 18, 1761–1773.

Shirai, K., Ebata, T., Oda, K., Nishio, H., Nagasaka, T., Nimura, Y., Nagino, M., 2008. Perineural invasion is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J. Surg.* 32, 2395–2402.

Shtivelman, E., Hensing, T., Simon, G.R., Dennis, P.A., Otterson, G.A., Bueno, R., Salgia, R., 2014. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. *Oncotarget* 5, 1392.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2018. Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 7–30.

Siegmund, D., Kums, J., Ehrenschrwender, M., Wajant, H., 2016. Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Death Dis.* 7, e2375.

Siliņa, K., Soltermann, A., Attar, F.M., Casanova, R., Uckeley, Z.M., Thut, H., Wandres, M., Isajevs, S., Cheng, P., Curioni-Fontecedro, A., Foukas, P., Levesque, M.P., Moch, H., Linē, A., Broek, M. van den, 2018. Germinal Centers Determine the Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Structures and Are Impaired by Corticosteroids in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 78, 1308–1320.

Sims, G.P., Shiono, H., Willcox, N., Stott, D.I., 2001. Somatic hypermutation and selection of B cells in thymic germinal centers responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 1935–1944.

Sloan, E.K., Priceman, S.J., Cox, B.F., Yu, S., Pimentel, M.A., Tangkanangnukul, V., Arevalo, J.M.G., Morizono, K., Karanikolas, B.D.W., Wu, L., Sood, A.K., Cole, S.W., 2010. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res.* 70, 7042–7052.

Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., Mano, H., 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566.

Song, P., Sekhon, H.S., Lu, A., Arredondo, J., Sauer, D., Gravett, C., Mark, G.P., Grando, S.A., Spindel, E.R., 2007. M3 muscarinic receptor antagonists inhibit small cell lung carcinoma growth and mitogen-activated protein kinase phosphorylation induced by acetylcholine secretion. *Cancer Res.* 67, 3936–3944.

Spindel, E.R., 2012. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists: Effects on Cancer. *Handb. Exp. Pharmacol.* 451–468.

Stowman, A.M., Hickman, A.W., Mauldin, I.S., Mahmutovic, A., Gru, A.A., Slingluff, C.L., 2018. Lymphoid aggregates in desmoplastic melanoma have features of tertiary lymphoid structures. *Melanoma Res.* 28, 237–245.

Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E., Littman, D.R., 2000. Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 288, 2369–2373.

Tamada, K., Shimozaki, K., Chapoval, A.I., Zhai, Y., Su, J., Chen, S.F., Hsieh, S.L., Nagata, S., Ni, J., Chen, L., 2000. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 4105–4110.

Tayebati, S.K., El-Assouad, D., Ricci, A., Amenta, F., 2002. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 132, 147–155.

Thaker, P.H., Han, L.Y., Kamat, A.A., Arevalo, J.M., Takahashi, R., Lu, C., Jennings, N.B., Armaiz-Pena, G., Bankson, J.A., Ravoori, M., Merritt, W.M., Lin, Y.G., Mangala, L.S., Kim, T.J., Coleman, R.L., Landen, C.N., Li, Y., Felix, E., Sanguino, A.M., Newman, R.A., Lloyd, M., Gershenson, D.M., Kundra, V., Lopez-Berestein, G., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W., Sood, A.K., 2006. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* 12, 939–944.

Thaunat, O., Patey, N., Caligiuri, G., Gautreau, C., Mamani-Matsuda, M., Mekki, Y., Dieu-Nosjean, M.-C., Eberl, G., Ecochard, R., Michel, J.-B., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., 2010. Chronic Rejection Triggers the Development of an Aggressive Intragraft Immune Response through Recapitulation of Lymphoid Organogenesis. *J. Immunol.* 185, 717–728.

ThyagaRajan, S., Priyanka, H.P., 2012. Bidirectional communication between the neuroendocrine system and the immune system: relevance to health and diseases. *Ann. Neurosci.* 19, 40–46.

Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–859.

Traversari, C., van der Bruggen, P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., Boon, T., 1992. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 176, 1453–1457.

Truxova, I., Kasikova, L., Hensler, M., Skapa, P., Laco, J., Pecen, L., Belicova, L., Praznovec, I., Halaska, M.J., Brtnicky, T., Salkova, E., Rob, L., Kodet, R., Goc, J., Sautes-Fridman, C., Fridman, W.H., Ryska, A., Galluzzi, L., Spisek, R., Fucikova, J., 2018. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *J. Immunother. Cancer* 6, 139.

Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., Fagarasan, S., 2008. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 29, 261–271.

van de Pavert, S.A., Mebius, R.E., 2010. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 664–674.

van de Pavert, S.A., Olivier, B.J., Goverse, G., Vondenhoff, M.F., Greuter, M., Beke, P., Kusser, K., Höpken, U.E., Lipp, M., Niederreither, K., Blomhoff, R., Sitnik, K., Agace, W.W., Randall, T.D., de Jonge, W.J., Mebius, R.E., 2009. Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. *Nat. Immunol.* 10, 1193–1199.

Väyrynen, J.P., Sajanti, S.A., Klintrup, K., Mäkelä, J., Herzig, K.-H., Karttunen, T.J., Tuomisto, A., Mäkinen, M.J., 2014. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int. J. Cancer* 134, 2126–2135.

Verbout, N.G., Jacoby, D.B., 2012. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on inflammation and immunity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 403–427.

von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., Murray, R., 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181, 1519–1526.

Wang, B., Xiao, Y., Ding, B.B., Zhang, N., Yuan, X. bin, Gui, L., Qian, K.X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., Geng, J.G., 2003. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4, 19–29.

Wang, H.M., Liao, Z.X., Komaki, R., Welsh, J.W., O'Reilly, M.S., Chang, J.Y., Zhuang, Y., Levy, L.B., Lu, C., Gomez, D.R., 2013. Improved survival outcomes with the incidental use of beta-blockers among patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Ann. Oncol.* 24, 1312–1319.

Wang, J.H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M., Georgopoulos, K., 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5, 537–549.

Ware, C.F., VanArsdale, T.L., Crowe, P.D., Browning, J.L., 1995. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 198, 175–218.

Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.P., Lira, S.A., Bravo, R., 1995. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 80, 331–340.

Weinstein, A.M., Chen, L., Brzana, E.A., Patil, P.R., Taylor, J.L., Fabian, K.L., Wallace, C.T., Jones, S.D., Watkins, S.C., Lu, B., Stroncek, D.F., Denning, T.L., Fu, Y.-X., Cohen, P.A., Storkus, W.J., 2017. Tbet and IL-36 γ cooperate in therapeutic DC-mediated promotion of ectopic lymphoid organogenesis in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 6, e1322238.

Wendland, M., Willenzon, S., Kocks, J., Davalos-Misslitz, A.C., Hammerschmidt, S.I., Schumann, K., Kremmer, E., Sixt, M., Hoffmeyer, A., Pabst, O., Förster, R., 2011. Lymph node T cell homeostasis relies on steady state homing of dendritic cells. *Immunity* 35, 945–957.

Wirsing, A.M., Rikardsen, O.G., Steigen, S.E., Uhlin-Hansen, L., Hadler-Olsen, E., 2014. Characterisation and prognostic value of tertiary lymphoid structures in oral squamous cell carcinoma. *BMC Clin. Pathol.* 14, 38.

Wirsing, A.M., Ervik, I.K., Seppola, M., Uhlin-Hansen, L., Steigen, S.E., Hadler-Olsen, E., 2018. Presence of high-endothelial venules correlates with a favorable immune microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 31, 910–922.

Xu, Q., Wang, Z., Chen, X., Duan, W., Lei, J., Zong, L., Li, X., Sheng, L., Ma, J., Han, L., Li, W., Zhang, L., Guo, K., Ma, Z., Wu, Z., Wu, E., Ma, Q., 2015. Stromal-derived factor-1 α /CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway promotes perineural invasion in pancreatic cancer. *Oncotarget* 6, 4717–4732.

Yang, E.V., Sood, A.K., Chen, M., Li, Y., Eubank, T.D., Marsh, C.B., Jewell, S., Flavahan, N.A., Morrison, C., Yeh, P.-E., Limeshow, S., Glaser, R., 2006. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.* 66, 10357–10364.

Yilmaz, A., Duyar, S.S., Cakir, E., Aydin, E., Demirag, F., Karakaya, J., Yazici, U., Erdogan, Y., 2011. Clinical impact of visceral pleural, lymphovascular and perineural invasion in completely resected non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 40, 664–670.

Yilmaz, Z.B., Weih, D.S., Sivakumar, V., Weih, F., 2003. RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J.* 22, 121–130.

Ying, X., Chan, K., Shenoy, P., Hill, M., Ruddle, N.H., 2005. Lymphotoxin plays a crucial role in the development and function of nasal-associated lymphoid tissue through regulation of chemokines and peripheral node addressin. *Am. J. Pathol.* 166, 135–146.

Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., Gruss, P., 1999. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397, 702–706.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Chin, R.K., Wang, J., Wang, Y., Schietinger, A., Philip, M., Schreiber, H., Fu, Y.-X., 2004. Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nat. Immunol.* 5, 141–149.

Zage, P.E., Graham, T.C., Zeng, L., Fang, W., Pien, C., Thress, K., Omer, C., Brown, J.L., Zweidler-McKay, P.A., 2011. The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. *Cancer* 117, 1321–1391.

Zareba, P., Flavin, R., Isikbay, M., Rider, J.R., Gerke, T.A., Finn, S., Pettersson, A., Giunchi, F., Unger, R.H., Tinianow, A.M., Andersson, S.-O., Andrén, O., Fall, K., Fiorentino, M., Mucci, L.A., 2017. Perineural Invasion and Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 26, 719–726.

Zhao, C.-M., Hayakawa, Y., Kodama, Y., Muthupalani, S., Westphalen, C.B., Andersen, G.T., Flatberg, A., Johannessen, H., Friedman, R.A., Renz, B.W., Sandvik, A.K., Beisvag, V., Tomita, H., Hara, A., Quante, M., Li, Z., Gershon, M.D., Kaneko, K., Fox, J.G., Wang, T.C., Chen, D., 2014. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Sci. Transl. Med.* 6, 250ra115.

Zhou, L., Zhang, Q., Stein, C., Schäfer, M., 1998. Contribution of Opioid Receptors on Primary Afferent Versus Sympathetic Neurons to Peripheral Opioid Analgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 1000–1006.

Zhou, Z.Z., Jones, S.B., 1993. Involvement of central vs. peripheral mechanisms in mediating sympathoadrenal activation in endotoxic rats. *Am. J. Physiol.* 265, R683-688.

Zhu, G., Nemoto, S., Mailloux, A.W., Perez-Villarroel, P., Nakagawa, R., Falahat, R., Berglund, A.E., Mulé, J.J., 2018. Induction of Tertiary Lymphoid Structures With Antitumor Function by a Lymph Node-Derived Stromal Cell Line. *Front. Immunol.* 9.