

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire (GICC)

EA 7501

THÈSE présentée par :

Diana Cadena Castaneda

Soutenue le : 07 décembre 2018

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

ETUDE DU NIVEAU D'EXPRESSION DU FCRN SUR LA REPONSE ANTI-TUMORALE : Impact sur les cellules Natural Killer (NK)

THÈSE dirigée par :

Mme GOUILLEUX-GRUART Valérie Maître de Conférences, HDR, Université de Tours

Mme HEUZÉ-VOURC'H Nathalie Chargée de Recherche, HDR, Inserm U1100, Tours

RAPPORTEURS :

Mme PELEGRIN Mireia Chargée de Recherche, HDR, CNRS, IGMM UMR 5535, Montpellier

M. WALZER Thierry Chargé de Recherche, HDR, Inserm U1111, Lyon

JURY :

Mme GOUILLEUX-GRUART Valérie Maître de Conférences, HDR, Université de Tours

Mme PELEGRIN Mireia Chargée de Recherche, HDR, CNRS, IGMM UMR 5535, Montpellier

M. SCOTET Emmanuel Directeur de Recherche, Inserm UMR892/CNRS UMR6299, Nantes

M. SI-TAHAR Mustapha Directeur de Recherche, Inserm U1100, Tours

M. THIBAUT Gilles Professeur, Université de Tours

M. WALZER Thierry Chargé de Recherche, HDR, Inserm U1111, Lyon

Membre invité:

Mme HEUZÉ-VOURC'H Nathalie Chargée de Recherche, HDR, Inserm, U1100, Tours

Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

Marie Curie (1867 – 1934)

Je dédie cette thèse à ma famille et amis

Remerciements

Avant tout je tiens à remercier le Dr Mireia Pelegrin et le Dr Thierry Walzer d'avoir accepté de participer à l'évaluation et au jugement de mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie également les autres membres du jury: le Pr Gilles Thibault, directeur du GICC EA 7501 (Tours), d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en qualité de président de jury. Au Dr Mustapha Si-Tahar, directeur du CEPR U1100 (Tours) et le Dr Emmanuel Scotet, directeur de l'équipe I2 UMR1232/ERL6001 (Nantes) en tant que membres examinateurs. Retrouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon respect.

Merci aux directeurs du GICC, Pr Paintaud et Pr Thibault et du CEPR Pr Si-Tahar, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires de recherche durant ces 4 années de thèse. Grâce à votre aide j'ai pu réaliser la totalité de mes expériences dans les meilleures conditions qui soient et j'ai pu ainsi mener à bien mon projet de thèse.

Je suis profondément reconnaissante vis-à-vis de mes directrices de thèse, le Dr Valérie Gouilleux-Gruart et le Dr Nathalie Heuzé-Vourch' qui m'ont donné l'opportunité de faire cette thèse au sein de leur équipe. Merci pour ces 4 ans de thèse autour d'un sujet complexe mais passionnant, merci de m'avoir apporté vos connaissances et votre expérience en biologie et immunologie. Merci Nathalie pour toute ton aide, ta rigueur, ta disponibilité, ton enthousiasme et ta patience tout au long de cette aventure. Merci Valérie pour tout ton soutien, ton humanité, ta confiance et ton côté un peu maternel. En particulier, un profond merci aussi, pour m'avoir accompagné lors des longues nuits d'expérimentation, ceci m'a donné la force et l'optimisme nécessaire pour aller jusqu'au bout de notre projet. Ainsi, veuillez recevoir toutes les deux ici la marque de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie sincèrement tous ceux qui ont soutenu financièrement ce travail: la Ligue contre le cancer, la région Centre et le Labex MAbImprove.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe 1 et 3 du CEPR; les membres de la plateforme de Zootechnie et les membres du Labex MAbImprove (personnes encore présentes comme déjà parties). Tout particulièrement, le Pr Hervé Watier pour son écoute et sa sympathie; Mélusine et Marc pour leur soutien et leur disponibilité; Jérôme, Chrystophe, Valérie S. et les autres membres pour leur aide inestimable avec les petites "bêtes"; Thomas, Alexandre et Fabien de l'équipe 1 du CEPR pour leur soutien technique et leur discussions

scientifiques; Thomas S., Emilie, Christelle et Delphine de l'équipe 3 du CEPR pour leur soutien technique et leur patience en particulier lors des longues expérimentations *in vivo*.

Merci aux différents stagiaires et étudiants qui ont fait partie du laboratoire, Emilie, Gaël, Aurélien, Marine, Antony, Benjamin pour leur bonne humeur. Merci également aux membres de l'ex 3^{ème} de Vialle, Steph, Laurianne et plus particulièrement Nora, Sally et Lucille pour leur grande amitié. Merci aux chimistes (Ludo, Camille ...) et aux membres du groupe hémotase (Jérôme, Caroline ...).

Un grand merci aux membres de l'ex 5^{ème} étage de Vialle grâce à qui ces années ont été vraiment agréables et grâce à qui je garderai des souvenirs mémorables. Merci pour leur grande humanité, leur gentillesse, leur soutien moral, leur bonne humeur et humour et tous les supers moments partagés. Plus particulièrement, Agnès, Anne et Sandrine pour leur disponibilité, leur aide administrative, leurs conseils, leur soutien, leur patience et écoute pour essayer de comprendre mon charabia de thèse aussi bien à l'écrit qu'à l'oral; Nicolas et Marc pour leur sympathie et soutien; William et Maxou pour leur goût pour le métal; Véro et Laetitia pour leur soutien technique et scientifique; Nadine pour son soutien, sa sincérité et ses conseils scientifiques; Michelle, pour sa gentillesse ; Calou, pour sa folie, ses conseils scientifiques et son soutien; Guillaume, pour sa gentillesse et son écoute; Cécile pour son soutien et pour les moments partagés au labo et en dehors du labo; Plaket, mon prédécesseur, pour sa gentillesse et ses conseils autour du plus grand mystère du monde, le FcRn et la question fatidique, existe-t-il vraiment? A Céline pour sa bonne humeur et sa gentillesse ; Mira, pour toutes les nuits blanches que nous avons passé ensemble à travailler et à nous soutenir; Quentin, pour son esprit critique, son soutien et pour toutes nos conversations existentielles à propos de la thèse; Sajida, pour sa gentillesse et son soutien; Amina, pour sa bonne humeur et pour nos moments partagés au labo et en dehors du labo en particulier les séances de jogging où je passais plus de temps à parler qu'à courir (histoire de te ralentir car je n'en pouvais plus!); Laurie, pour sa gentillesse, sa sincérité, son écoute, sa patience, ses conseils et son côté grande sœur même si de nous deux je suis la plus vieille; Christine, pour son amitié, sa gentillesse, sa sincérité, nos conversations un peu plus personnelles, sa confiance et surtout merci pour toute l'aide que tu m'a apportée pendant toutes ses années, mon binôme de manip sans fin. Enfin, un grand merci à Claire ma "Co-thésarde" adorée qui est devenue "ma sœur de laboratoire". Merci pour ta sincérité, ta gentillesse mais surtout merci pour ton soutien incomparable aussi bien pendant les bons moments que pendant les moments

les plus difficiles de la thèse. Merci de tout cœur à toi et à ta moitié, Ben pour tous les moments sympas, je vous adore les amis !

Finalement, un grand merci à ma chère famille qui m'a tant donné et à qui je dois tout ce que je suis. A mes beaux-frères et ma belle-sœur qui m'ont toujours encouragé et soutenu. A ma mère et mes sœurs qui sont ma force et mes piliers. A mes neveux et nièces que j'aime tant et qui sont ma source d'énergie. A mon père qui malgré la distance m'accompagne et me soutient sans cesse. A mon grand frère et ma grande sœur que je porterai toujours dans mon cœur et que quoique je fasse et où que j'aille me donnent le courage nécessaire pour relever les défis.

Merci à toi David, pour toute ton affection et ton soutien en particulier pour cette dernière étape de la thèse. Merci de m'avoir supporté et aidé à comprendre les émotions qui ont pu me submerger lors de l'écriture de la thèse. Tu avais raison sur le fait qu'il fallait plonger dedans et tout simplement vivre la thèse, pour tout cela je t'en suis reconnaissante.

Enfin un immense merci à tous mes amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé. En particulier, mes amies de Paris (Noémie, Cira, Hélène et Sophie) et de Bordeaux (Aurélié, Phiphi, Arturo, Maria et Arielle) qui me supportent depuis toutes ces années. Un énorme merci à mon binôme et amie d'escalade, Emeline, avec qui on a partagé plein de fous rires et de challenges en salle de sport.

Je dois avoir oublié des personnes alors veuillez me pardonner mais mon cerveau est à sec

Merci encore de tout cœur à tous pour m'avoir permis d'atteindre ce jour unique qu'est le jour de ma soutenance de thèse.

Résumé

Le FcRn ou récepteur néonatal pour la portion Fc des IgG est un récepteur " clé " qui prolonge la demi-vie sanguine des IgG et de l'albumine et assure leur distribution dans les tissus. Ainsi, ce récepteur est capable de prendre en charge et de moduler les propriétés de certains nouveaux biomédicaments, comme les anticorps thérapeutiques, dont la structure est basée sur celle des IgG. Plus récemment, son rôle s'est étendu à la réponse immunitaire humorale et anti-tumorale de par sa participation aux processus de phagocytose et de présentation antigénique des complexes immuns. Même si l'expression du FcRn est considérée comme ubiquitaire, certains travaux indiquent que le niveau d'expression du FcRn dans les différents tissus ou organes pourrait être à l'origine d'une modulation de ses fonctions. Dans ce contexte, nous avons premièrement montré que l'expression du FcRn était diminuée dans le tissu cancéreux pulmonaire par rapport au tissu sain, chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Cette diminution d'expression est inversement corrélée au pronostic des patients. Afin de comprendre les répercussions de la diminution de l'expression du FcRn sur le développement tumoral, nous avons mis en place un modèle murin syngénique de métastases pulmonaires, en implantant des cellules B16F10 chez les souris déficientes en FcRn (FcRn $-/-$). L'absence de FcRn influence la réponse anti-tumorale, en altérant le nombre de cellules dendritiques et de cellules TCD8 dans ce modèle, comme cela avait été préalablement démontré par Baker et al. Pour la première fois, nous avons montré que l'absence du FcRn influençait le développement/maturation et l'activité fonctionnelle (production d'IFN γ et capacité de dégranulation) des cellules NK, fragilisant ainsi encore plus l'immunosurveillance anti-tumorale. Ces nouveaux résultats sur les cellules NK mettent en avant un rôle jusqu'alors encore inconnu du FcRn dans le développement, la maturation et les fonctions des cellules NK. Les mécanismes à l'origine de cet effet restent encore à élucider, mais semblent impliquer un défaut de réponse à certaines cytokines intervenant dans la biologie des cellules NK.

Mots-clés: FcRn, cancer pulmonaire, modèle murin B16F10, cellules dendritiques, cellules TCD8, cellules NK, IFN γ et CD107a $^{+}$

Résumé en anglais

FcRn or neonatal receptor for the Fc portion of IgG is a "key" receptor since it extends the half-life of IgG and albumin and ensures their distribution in the tissues. Thus, this receptor is able to support and modulate the properties of some new biomolecules such as therapeutic antibodies, whose structure is based on that of IgGs. More recently, its role has been extended to the humoral and anti-tumor immune response by its participation in the phagocytosis and immune complex antigen presentation processes. Although the expression of FcRn is considered ubiquitous, some studies indicate that the expression level of FcRn in the different tissues or organs may modulate its functions. In this context, we first showed that the expression of FcRn was decreased in lung cancer tissue compared to healthy tissue, in patients with lung cancer. This decreased expression is inversely correlated with the prognosis of the patients. In order to understand the impact of the reduced FcRn expression on tumor development, we implemented a syngeneic murine model of lung metastases, implanting B16F10 cells in FcRn deficient mice (FcRn $-/-$). The absence of FcRn influences the anti-tumor response, by altering the number of dendritic cells and TCD8 cells as previously demonstrated by Baker et al. We showed for the first time that the lack of FcRn altered the development / maturation and the functional activity (production of IFN γ and degranulation capacity) of NK cells, thus weakening even more anti-tumor immunosurveillance. These new results on NK cells highlight a new role of FcRn in the development, maturation and functions of NK cells. The mechanisms underlying this effect need to be elucidated but seem to imply a lack of response to some cytokines involved in the biology of NK cells.

Keywords: FcRn, lung tumor, B16F10 mice model, dendritic cells, T CD8 cells, NK cells, IFN γ and CD107a $^{+}$.

Table des matières

Remerciements	4
Résumé	7
Résumé en anglais	8
Table des matières	9
Liste des tableaux	12
Liste des figures	13
Liste des annexes	15
Liste des abréviations	16
Liste des publications	18
Liste des communications dans les congrès	19
Introduction	20
1 Le FcRn ou récepteur néonatal pour la portion Fc des IgG	21
A. Structure du FcRn	21
1.A.1 Le FcRn, un hétérodimère composé d'une chaîne α et de la $\beta 2$ microglobuline	21
1.A.2 Le FcRn et la famille des Fc γ récepteurs	24
1.A.3 Homologie protéique du FcRn de l'Homme, du rat et de la souris	26
B. Les ligands du FcRn	28
1.B.1 Les IgG	28
1.B.2 L'albumine	33
C. Expression du FcRn	36
1.C.1 Expression et distribution protéique du FcRn	36
1.C.2 Le gène <i>FCGRT/fcgrt</i>	39
1.C.3 La variabilité génétique	39
1.C.4 Régulation de l'expression du <i>FCGRT</i>	42
2 Les fonctions du FcRn	44
A. Homéostasie des IgG et de l'albumine	44
2.A.1 Recyclage des IgG et de l'albumine	44
2.A.2 Transcytose des IgG et de l'albumine	46
2.A.3 Recyclage et transcytose des IgG : implications thérapeutiques	49
2.A.4 Recyclage et transcytose des anticorps monoclonaux thérapeutiques	51
B. Rôle du FcRn dans la réponse immunitaire	55

2.B.1	Rôle du FcRn dans la phagocytose	55
2.B.2	Rôle du FcRn dans la présentation des antigènes	56
2.B.3	Immunité des muqueuses et FcRn.....	58
2.B.4	Réponse immunitaire humorale	59
2.B.5	Réponse immunitaire anti-tumorale	60
Contexte et objectifs de la thèse		62
Résultats		65
Première partie : La diminution du niveau d'expression du FcRn dans les tumeurs de patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules est associée à un mauvais pronostic. (Travail collaboratif)		66
Introduction		67
Résultats principaux		69
Deuxième partie : L'absence d'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral influence le développement et les fonctions des cellules NK.		70
Introduction		71
A. Les cellules NK		72
a.	Le développement et la maturation des cellules NK.....	73
b.	Facteurs intrinsèques : les facteurs de transcription.....	75
c.	Facteurs extrinsèques : signaux du microenvironnement	77
d.	Homéostasie et circulation des NK	77
e.	Les éléments de la reconnaissance des cellules NK.....	79
f.	Les fonctions effectrices des cellules NK	81
g.	La cytotoxicité.....	82
h.	La production de cytokines et chimiokines.....	83
Résultats principaux		84
Résultats complémentaires non publiés concernant le rôle du FcRn dans le développement/maturation et les fonctions des cellules NK.....		86
A. Matériel et méthodes		86
a.	Animaux	86
b.	Préparation des suspensions cellulaires à partir des tissus de souris.....	86
c.	Isolement des cellules NK à partir de la rate des souris	87
d.	Cytométrie en flux : caractérisation des cellules NK	87
e.	Western-Blot	88
B. Résultats		89

a. L'absence du FcRn altère l'expression du CD122 par les cellules NK	89
b. L'absence du FcRn altère l'expression du CD69 et NKG2D par les cellules NK	91
c. L'absence du FcRn altère l'expression du récepteur S1P5 par les cellules NK.....	92
Discussion	94
1) Expression du FcRn dans les cancers.....	95
2) Influence de l'expression du FcRn dans la réponse immunitaire anti-tumorale	99
3) Influence de l'expression du FcRn dans le développement/ maturation et fonctions des cellules NK.....	102
4) Expression du FcRn et développement thérapeutique	105
Conclusion.....	107
Perspectives.....	110
1) Régulation de l'expression du FcRn dans les cellules et le microenvironnement tumoral	111
2) Influence de l'expression du FcRn dans les cellules cancéreuses.....	111
3) Impact du niveau d'expression du FcRn sur l'efficacité de la réponse anti-tumorale	112
4) Impact de l'absence de FcRn sur le développement/maturation et les fonctions des cellules NK.....	112
Bibliographie.....	114
Résumé.....	139
Résumé en anglais	139

Liste des tableaux

Tableau 1 : Variation de la séquence en acides aminés des IgG de l'Homme, la souris et du rat, impliquée dans l'interaction avec le FcRn, d'après (Victor Ghetie and Ward 2000; Ward, Velmurugan, and Ober 2014).....	32
Tableau 2 : Expression du FcRn par espèces et tissus.	38
Tableau 3 : Principaux travaux concernant l'impact du polymorphisme VNTR sur l'expression du <i>FCGRT</i> et les fonctions du FcRn, chez l'Homme	40
Tableau 4 : Liste des principaux SNPs identifiés chez l'Homme.....	41
Tableau 5 : Principaux travaux concernant la régulation de l'expression du <i>FCGRT/fcgrt</i> . ..	43
Tableau 6 : Principaux travaux sur la protection des muqueuses grâce au transport bidirectionnel des IgG	49
Tableau 7 : Principaux travaux portant sur l'impact de l'interaction IgG-FcRn sur la pharmacocinétique des Ac.	54
Tableau 8 : Principaux récepteurs NK chez l'Homme et la souris d'après de (Pegram et al. 2011).....	80
Tableau 9 : liste des anticorps utilisés pour caractériser les cellules NK de souris	88
Tableau 10 : liste des anticorps utilisés pour les expériences de western-blot	89

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique (A) et tridimensionnelle (B) du récepteur FcRn.	22
Figure 2 : Structures cristallographiques (A) et comparaison des sillons (B) du FcRn humain (hFcRn), rat (rFcRn), (PDB code 3FRU) et d'une molécule CMH I, HLA-A2 (PDB code 2CLR).	23
Figure 3 : Représentation schématique des Fcγ et du FcRn chez la souris.	24
Figure 4 : Représentation schématique des Fcγ et du FcRn chez l'Homme.	25
Figure 5 : Alignement des séquences protéiques de la chaîne lourde du FcRn humain, murin et de rat, obtenues sur Uniprot (http://www.uniprot.org/align/)	27
Figure 6 : Représentation schématique de la structure d'une IgG humaine.	29
Figure 7 : Représentation schématique du clivage enzymatique d'une IgG.	30
Figure 8 : Représentation schématique et cristallographique de l'interaction du FcRn avec une IgG humaine.	31
Figure 9 : Représentation tridimensionnelle suite à la co-cristallisation du FcRn humain avec l'albumine humaine, d'après Oganessian et al, 2014 et Sand et al. 2015.	34
Figure 10 : Sites impliqués dans la liaison du FcRn humain aux IgG et à l'albumine, d'après (Oganessian et al. 2014; Knudsen Sand et al. 2015).	36
Figure 11 : Représentation schématique des gènes <i>FCGRT</i> chez l'Homme et <i>fcgrt</i> chez la souris Source de l'information: http://www.ensembl.org	39
Figure 12 : Représentation schématique des mécanisme de recyclage et de transcytose des IgG et de l'albumine, d'après (Knudsen Sand et al. 2015).	46
Figure 13 : Transfert materno-fœtal/nouveau-né des IgG, d'après (Pyzik et al. 2015)	47
Figure 14 : FcRn et protection des muqueuses, cas de la lumière intestinale, d'après (Pyzik et al. 2015).	48
Figure 15 : Représentation schématique de différents formats d'Ac thérapeutiques sur le marché et en développement.	52
Figure 16 : Représentation schématique des éléments influençant la relation dose-réponse au cours d'un traitement par Ac thérapeutique, illustration tirée de (Goupille 2018).	53
Figure 17 : Modèle potentiel du rôle du FcRn dans la phagocytose, d'après (Stapleton et al. 2015).	56
Figure 18 : Représentation schématique de la présentation antigénique par les cellules dendritiques, d'après (Knudsen Sand et al. 2015).	58

Figure 19 : FcRn et immunité des muqueuses, cas de la muqueuse intestinale, d'après (Pyzik et al. 2015).....	59
Figure 20 : Représentation schématique de l'implication du FcRn dans la réponse anti-tumorale, d'après (Baker et al. 2013).	61
Figure 21: Représentation schématique du développement des cellules NK chez la souris ...	74
Figure 22: Principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement/maturation des NK chez la souris.	76
Figure 23: Facteurs extrinsèques impliqués dans le développement/maturation des cellules NK, d'après (Stabile et al. 2018).	77
Figure 24: Sortie des cellules NK de la MO vers la périphérie, d'après (Rouzaire et al. 2012).	78
Figure 25: Régulation de la réponse immunitaire par les cellules NK, d'après (Vivier et al. 2008).....	81
Figure 26: Représentation schématique de la fonction cytotoxique des cellules NK contre la cellule tumorale, adapté de (Morvan and Lanier 2015).	82
Figure 27 : Isolement des cellules NK de souris par tri magnétique négatif.....	87
Figure 28: Analyse par cytométrie en flux de l'expression du marqueur CD122 sur les cellules NK.....	90
Figure 29: Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs NKG2D et CD69 sur les cellules NK.....	91
Figure 30: Analyse par western-blot de l'expression du récepteur S1P5 dans des extraits protéiques de cellules de souris.....	93
Figure 31: Schéma récapitulatif de l'implication du FcRn dans la réponse anti-tumorale...	109

Liste des annexes

Annexe 1 : Article 3 : Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF- α Antibodies after a Single Injection in Mice	138
---	-----

Liste des abréviations

A

A.A.: Acides aminés

Ac: Anticorps

AcM: Anticorps monoclonal

ADC: «Antibody

ADCC: « Antibody Dependent Cell
Cytotoxicity »

Ag : Antigène

AP : Activator Protein

ARN : Acide ribonucléique

APC : Allophycocyanine

B

β2m: B2 microglobuline

C

CD : Cluster de Différenciation

CDR: « Complementarity Determining
Regions »

CI-IgG: Complexe Immun-IgG

CL: domaine constant

CMH: Complexe Majeur

d'Histocompatibilité

CNV: « Copy Number Variation »

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CSH : Cellule Souche hématopoïétique

F

Fab : Fragment antigen binding

Fc: Fragment cristallisable

FcγR : « Fragment constant γ Receptor »

FCGRT/fcgrt : gène du FcRn

humain/souris

FcRn: Récepteur néonatal au Fc

hFcRn: Récepteur néonatal au Fc humain

mFcRn: Récepteur néonatal au Fc murin

FITC: Fluorescein Isotocyanate

G

GM-CSF: Granulocyte-macrophage
colony-stimulating factor

H

HRP: horseradish peroxidase

I

IFN: Interferon

Ig: Immunoglobuline

IgG: Immunoglobuline G

IL : Interleukine

ILC : « Innate Lymphoid Cells »

iNK : NK immatures

Iono : Ionomycine

ITAM : « Immunoreceptor Tyrosine based
Activation »

ITIM : « Immunoreceptor Tyrosine based
Inhibition »

IVIG: Intravenous Immunoglobulin

K

KIR : « Killer like Immunoglobulin
Receptor »

L

LPS : Lipopolysaccharide

M

MΦ : Macrophages

M-CSF: Macrophage colony-stimulating
factor

N

NCR : « Natural Cytotoxicity Receptor »

NK : Natural Killer

NKP : précurseurs des NK

P

Pe : Phycoérythrine

PeCy : Phycoérythrine Cyanyne

PD: Pharmacodynamique

PK: Pharmacocinétique

PMA : Phorbol 12-Myristate-13-Acetate

Pré-NKP: pré-precurseurs des NK

R

RT-PCR: « Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction »

RT-QPCR: « Quantitative reverse transcription PCR »

S

SNP: «Single Nucleotide Polymorphism»

S1P: Sphingosine-1-phosphate

S1P5: Sphingosine-1-phosphate receptor 5

T

TAM: «Tumor Associated Macrophage»

TAN: «Tumor Associated Neutrophils»

TGF: «Transforming Growth Factor»

TH: lymphocyte T helper

TNF: «Tumor Necrosis Factor»

V

VIH: Virus Immunodéficience Humaine

VL: domaine variable

VNTR: « Variable Number Tandem Repeat »

W

WT : « Wild-Type », terme utilisé pour désigner les souris sauvages

Liste des publications

Lack of FcRn impairs natural killer cell development and functions in the tumor microenvironment.

Diana Cadena Castaneda, Christine Dhommée, Thomas Baranek, Emilie Dalloneau, Laurie Lajoie, Alexandre Valayer, Christophe Arnoult, Marie-Véronique Demattéi, Delphine Fouquenot, Christelle Parent, Nathalie Heuzé-Vourc'h and Valérie Gouilleux-Gruart. *Frontiers in Immunology*. 2018.

Generation of specific antisera directed against D-amino acids: focus on the neuroanatomical distribution of D-glutamate and other D-amino acids.

Rafael Coveñas Arturo Mangas, Manuel Lisardo Sánchez, **Diana Cadena**, Marianne Husson, Michel Geffard. *Folia Histochem Cytobiol*. 2017.

Crucial role for immune complexes but not FcRn in immunization against anti-TNF α antibodies after a single injection in Mice.

Christophe Arnoult, Guillaume Brachet, **Diana Cadena Castaneda**, Nicolas Azzopardi, Christophe Passot, Céline Desvignes, Gilles Paintaud, Nathalie Heuzé-Vourc'h, Hervé Watier and Valérie Gouilleux-Gruart. *Journal of Immunology*. 2017.

Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non-small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis.

Emilie Dalloneau, Nadine Baroukh, Konstantinos Mavridis, Agnès Maillet, Fabien Guegnon, Yves Courty, Agnès Petit, Thomas Kryza, Maguy Del Rio, Serge Guyétant, **Diana Carolina Cadena Castaneda**, Christine Dhommée, Christophe Arnoult, Andreas Scorilas, Valérie Gouilleux-Gruart and Nathalie Heuzé-Vourc'h. *Oncotarget*. 2016.

Assessing complement blockade in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab.

Régis Peffault de Latour, Véronique Fremeaux-Bacchi, Raphaël Porcher, Aliénor Xhaard, Jérémie Rosain, **Diana Cadena Castaneda**, Paula Vieira-Martins, Stéphane Roncelin, Paula Rodriguez-Otero, Aurélie Plessier, Flore Sicre de Fontbrune, Sarah Abbes, Marie Robin and Gérard Socié. *Blood*. 2015.

Liste des communications dans les congrès

▪ Communications orales

Pulmonary delivery of monoclonal antibodies in an animal model of lung tumors.
Diana Cadena Castaneda, Emilie Dalloneau, Valérie Gouilleux-Gruart and Nathalie Heuzé-Vourc'h.

Workshop, “New Advances in animal Models and preclinical Imaging for translational Research in Cancerology” Cancéropôle Grand Ouest (CGO); October 31st to November 3rd 2015, Nantes, France.

▪ Posters

Abnormal FcRn-dependent NK cell maturation in B16F10 experimental lung metastasis model.

Diana Cadena Castaneda, Christine Dhommée, Thomas Baranek, Emilie Dalloneau, Laurie Lajoie, Christophe Arnoult, Delphine Fouquenet, Christelle Parent, Nathalie Heuzé-Vourc'h and Valérie Gouilleux-Gruart.

- Annual Meeting of the French Society for Immunology (SFI) co-organized with the French Cytometry Association (AFC), 7-9 November 2017, Reims, France.
- Cell Symposia Cancer and Imflammation; 11-13 June 2017, San Diego CA, USA

Influence of FcRn expression during tumorigenesis in an animal model of lung tumors.

Diana Cadena Castaneda, Christine Dhommée, Emilie Dalloneau, Christophe Arnoult, Delphine Fouquenet, Christelle Parent, Laurie Lajoie, Thomas Baranek, Nathalie Heuzé-Vourc'h and Valérie Gouilleux-Gruart.

- Biotechnocentre ; 13-14 October 2016, Domaine de Seillac, France.

Introduction

1 Le FcRn ou récepteur néonatal pour la portion Fc des IgG

Au cours des années 1960, Francis William Rogers Brambell (1901-1970) a été le premier à proposer l'existence d'un récepteur pour la partie Fc (Fragment cristallisable) des anticorps (Ac), le récepteur Fc néonatal (FcRn) ou récepteur de Brambell (Brambell FW 1964; Brambell FW. 1966; Brambell 1969). Il émit une hypothèse pour expliquer l'homéostasie des immunoglobulines G (IgG) sériques. Cette hypothèse proposait l'existence de récepteurs de récupération dans des cellules de type inconnu qui liaient et recyclaient les IgGs présentes dans le sérum. Ce processus ne concernait que les IgG et permettait la transmission des IgG maternelles vers le fœtus ou le nouveau-né. Parallèlement, d'autres travaux concernant la demi-vie des immunoglobulines montraient une grande différence entre les demi-vies des IgG (environ 21 jours) et celles des IgA, IgM et des IgE (<7 jours). De plus, il était suggéré que ce processus de protection des IgGs était saturable (JL Fahey and Robinson AG 1963; Waldmann TA and Strober W 1969). Ainsi, l'hypothèse de Brambell a été avancée en l'absence de connaissance du ou des types de cellules impliquées. Ce n'est qu'à partir des années 1980 que cette hypothèse fut confirmée par différents groupes (V Ghetie et al. 1996; Simister NE and Ahouse JC 1996). Le FcRn a été alors identifié comme le récepteur responsable de la liaison des IgG à l'épithélium intestinal des rats nouveau-nés (Simister et al. 1985) et du transfert des IgG de la mère vers le nouveau-né.

A. Structure du FcRn

1.A.1 Le FcRn, un hétérodimère composé d'une chaîne α et de la $\beta 2$ microglobuline

Les travaux de Simister & Mostov en 1989 chez le rat ont révélé, par des analyses protéiques, que la chaîne lourde du FcRn partageait une homologie de 22%-29% avec celles des différentes molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I. En 1994, les études sur la structure du FcRn, d'abord chez le rat, puis chez l'Homme et la souris (Burmeister et al. 1994), ont permis de confirmer que le récepteur Fc néonatal (FcRn) était un hétérodimère glycoprotéique composé d'une chaîne lourde α glycosylée de 45 kDa pour l'Homme et 51 kDa pour les rongeurs, en association non covalente avec la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$) de 12 kDa (Figure 1). Les premiers indices qu'une association du FcRn avec la $\beta 2m$ était nécessaire et importante pour l'assemblage d'un récepteur fonctionnel proviennent des

souris knock-out $\beta 2m$ (Zijlstra et al. 1990), qui présentent des défauts de plusieurs fonctions associées au FcRn. Les nouveau-nés déficients en $\beta 2m$ présentent un taux sérique d'IgG plus bas à la naissance et accumulent moins d'IgG avant le sevrage que leur homologues "sauvages" (V Ghetie et al. 1996). De plus, les souris adultes dépourvues de $\beta 2m$ ont un taux de renouvellement des IgG plus élevé, ce qui entraîne des taux sériques d'IgG plus faibles (Israel et al. 1997; Junghans and Anderson 1996).

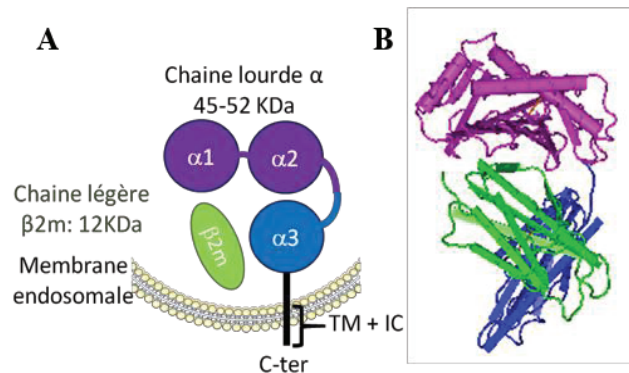


Figure 1 : Représentation schématique (A) et tridimensionnelle (B) du récepteur FcRn.

(A) Le FcRn est constitué d'une chaîne lourde α , présentant 3 domaines : $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (violet) qui forment un sillon étroit incapable de fixer des peptides et un domaine $\alpha 3$ (bleu); d'une région transmembranaire (TM) et d'une partie C-terminale (C-Ter). Cette chaîne est liée de façon non-covalente à la $\beta 2m$ microglobuline ($\beta 2m$). (B) Structure tridimensionnelle du FcRn obtenue à partir du Code " Protein Data Bank (PDB) " : 4N0U ; réalisée à l'aide du logiciel Cn3d) ; (Oganesyan et al. 2014).

Les études de l'expression du hFcRn (FcRn humain) seul ou en combinaison avec la $\beta 2m$ dans des cellules de mélanome humain (FO-1) ont démontré que la $\beta 2m$ était importante pour l'expression en surface cellulaire du FcRn et qu'en son absence le récepteur était retenu dans le réticulum endoplasmique (Praetor and Hunziker 2002). En l'absence de $\beta 2m$, la liaison IgG est diminuée par rapport à celle du FcRn natif. Ainsi, l'assemblage de la chaîne lourde du FcRn avec la $\beta 2m$ est important, à la fois pour le transport du FcRn du réticulum endoplasmique à la surface cellulaire et pour sa fonction (Xiaoping Zhu et al. 2002).

La chaîne lourde α présente trois domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), une région transmembranaire (TM) et un domaine intra-cytoplasmique (IC). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un sillon retrouvé également dans les molécules du CMH I. Cependant, à la différence des molécules de classe I, le FcRn ne peut pas accueillir de peptides en raison des réarrangements de ses hélices α . Le réarrangement de l'hélice $\alpha 2$ du FcRn est dû à une " rupture " de l'hélice, introduite par la présence d'une proline en position 162, entraînant la

fermeture du sillon (Bjorkman et al. 1987). En raison d'un repositionnement global de l'hélice $\alpha 1$ et de la flexion de la partie C-terminale de l'hélice $\alpha 2$, les hélices du FcRn sont considérablement plus proches les unes des autres. Les représentations de surface des sommets des domaines FcRn et des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de CMH de classe I montrent qu'il n'y a pas de sillon continu pour le FcRn (Figure 2).

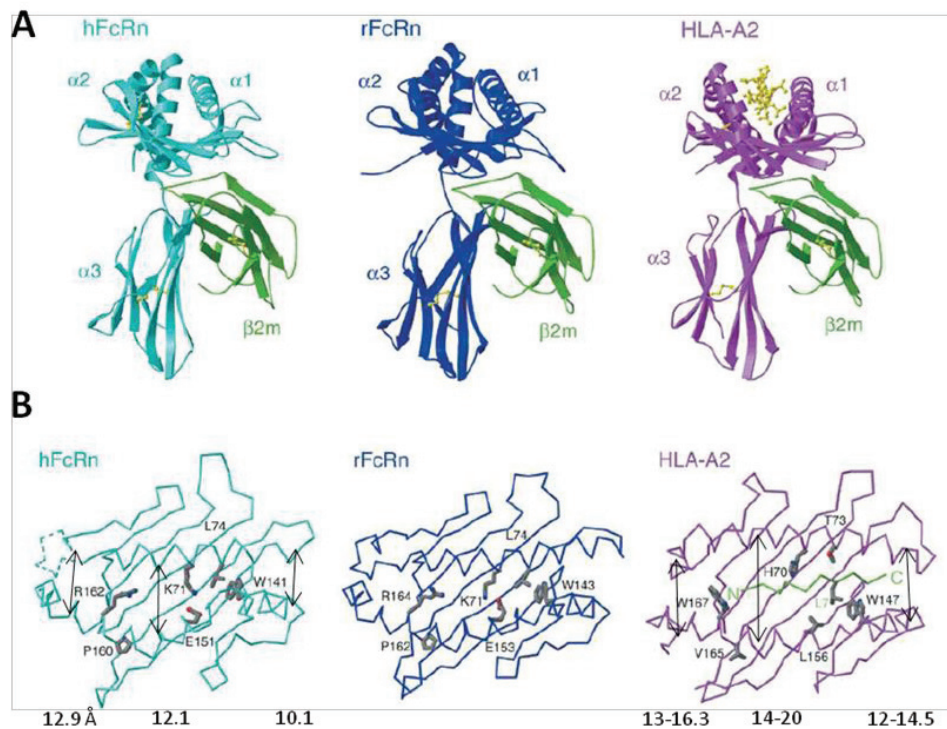


Figure 2 : Structures cristallographiques (A) et comparaison des sillons (B) du FcRn humain (hFcRn), rat (rFcRn), (PDB code 3FRU) et d'une molécule CMH I, HLA-A2 (PDB code 2CLR).

D'après (Zeng et al. 1997; West and Bjorkman 2000).

Ceci est en corrélation avec les résultats biochimiques montrant que le FcRn soluble ne contient pas de peptides endogènes (Burmeister et al. 1994). Les domaines $\alpha 3$ et $\beta 2m$ du FcRn se superposent étroitement aux domaines correspondants des CMH de classe I. De nombreux contacts entre la chaîne lourde / $\beta 2m$ sont conservés entre le FcRn et les molécules de classe I. Cependant, la chaîne lourde FcRn établit des contacts supplémentaires avec la $\beta 2m$. C'est le cas de la boucle entre les brins $\beta 1$ et 2 du domaine $\alpha 1$ qui descend pour entrer en contact avec la $\beta 2m$. En revanche, les domaines extracellulaires, les parties transmembranaires et les régions cytoplasmiques du FcRn et du CMH de classe I ne sont pas étroitement apparentées. Le fait que les domaines cytoplasmiques du FcRn partagent

beaucoup moins d'homologie avec les molécules du CMH de classe I est cohérent avec les différentes activités fonctionnelles des deux types de protéines.

1.A.2 Le FcRn et la famille des Fcγ récepteurs

De par sa capacité à lier la partie Fc des immunoglobulines G (IgG), le FcRn est considéré comme un membre de la famille des récepteurs Fcγ (Ravetch and Bolland 2001; Nimmerjahn and Ravetch 2008). L'IgG étant l'isotype le plus abondant dans la circulation sanguine, il est capable d'activer de nombreux récepteurs Fcγ (FcγRs) présents sur différents types de cellules effectrices (Nimmerjahn and Ravetch 2008; Nimmerjahn et al. 2005). La famille des récepteurs FcγRs peut être partagée en deux types de FcγR : les FcγRs de type I, qualifiés également de FcγR " classiques " et les FcγRs de type II, qualifiés de FcγR " non classiques ", auquel appartient le FcRn (Hogarth and Pietersz 2012; Pincetic et al. 2014; Bruhns and Jönsson 2015) (Figures 3 et 4).

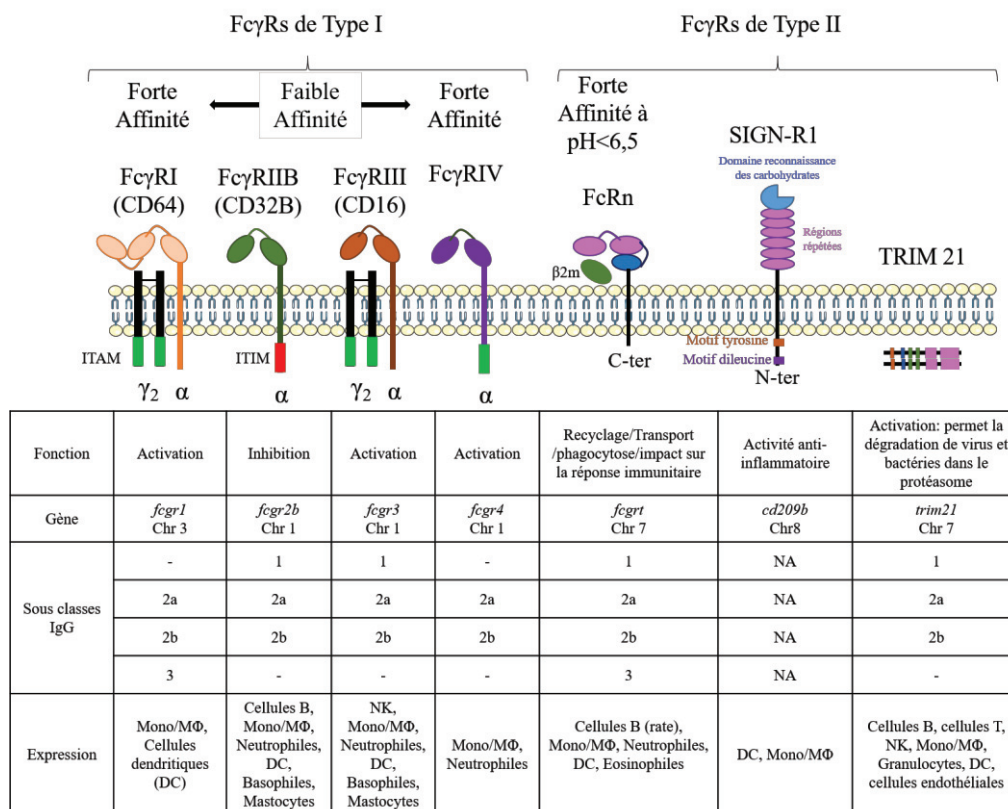


Figure 3 : Représentation schématique des Fcγ et du FcRn chez la souris.

Les fonctions, leur localisation génétique et leur expression au niveau des cellules sont indiquées dans le tableau. NA : non analysé. Illustration d'après Bruhns, Blood 2015.

Dans le cadre de cette thèse, nous n'aborderons que les grandes lignes à propos de la famille des FcγRs, le FcRn étant l'objet de cette thèse, il sera décrit plus en détail ultérieurement.

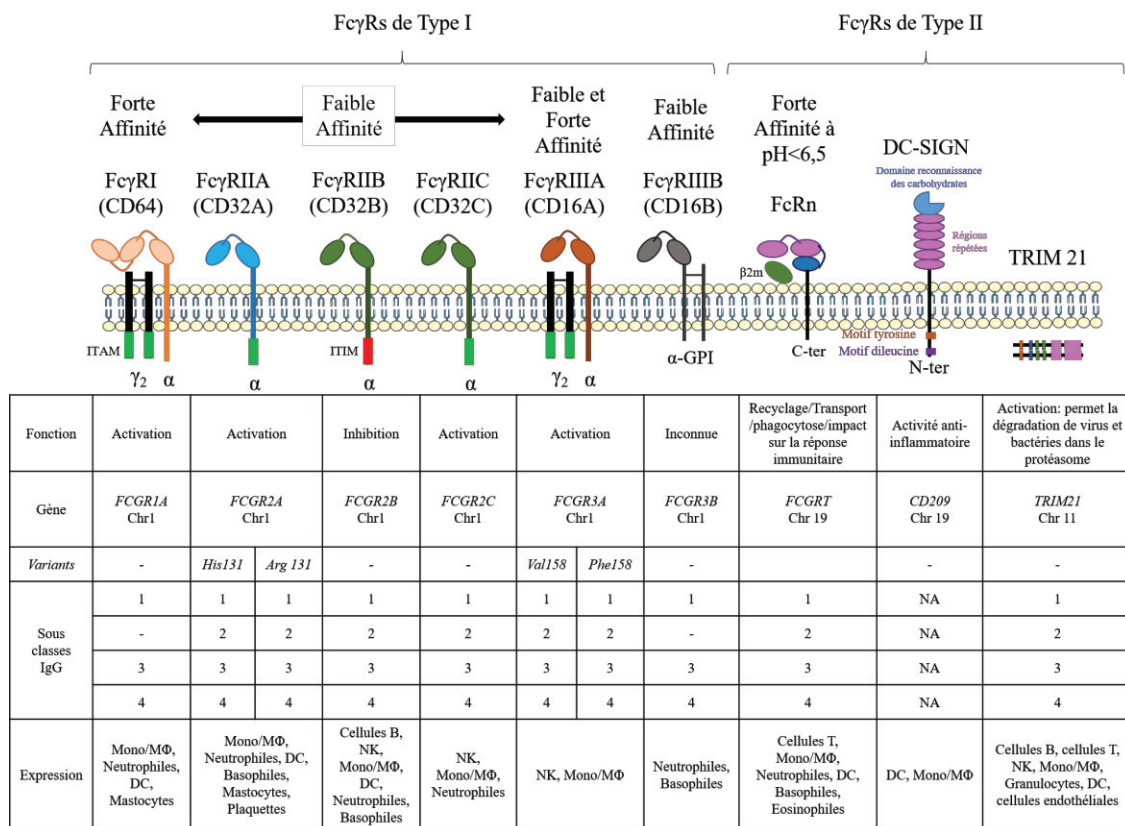


Figure 4 : Représentation schématique des Fcγ et du FcRn chez l'Homme.

Les fonctions, leur localisation génétique et leur expression au niveau des cellules sont indiquées dans le tableau. NA : non analysé. Illustration d'après Bruhns, Blood 2015.

Les FcγRs " classiques " appartiennent à la super famille des immunoglobulines (Ig). Ils sont constitués de 2-3 domaines extracellulaires de type immunoglobuline. Les motifs de signalisation intracellulaire sont soit à l'extrémité du récepteur lui-même (comme c'est le cas des FcγRIIA, FcγRIIB et FcγRIIC), ou sur une chaîne γ associée au FcR et ils sont de deux types (Hamerman and Lanier 2006; Abram and Lowell 2007).

- Motif activateur ITAM " Immunoreceptor Trosine-based Activation Motif "
- Motif inhibiteur ITIM " Immunoreceptor Trosine-based Inhibition Motif "

Le site de liaison des récepteurs aux IgG est situé sur le domaine CH2 et la partie inférieure de la région charnière du Fc de l'IgG. Chaque récepteur se lie au Fc près de sa région charnière avec un ratio stœchiométrique de 1/1 (récepteur/IgG). Leur interaction avec la partie Fc des IgG déclenche des fonctions effectrices diverses et complexes. Ces dernières pouvant être altérées par différents éléments, tels que :

- des variations génétiques : chez l'Homme par exemple, les polymorphismes mononucléotidiques ou SNP peuvent affecter leur affinité pour le Fc des IgG. Nous distinguons les variants His131 et Arg131 pour le FcγRIIa et les variants Val158 et Phe158 pour le FcγRIIIa (Bibeau et al. 2009; Concetti and Napolioni 2010).
- la glycosylation au niveau du Fc intervient dans la stabilité structurale des Ac et influence l'affinité des IgG pour les récepteurs FcγRs (Subedi and Barb 2015).

Parmi les fonctions effectrices induites par l'interaction IgG-FcγRs, nous distinguons : la sécrétion de molécules solubles telles que les cytokines, l'induction de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac (ADCC), la phagocytose, l'inflammation et dans le cas des récepteurs d'inhibition, l'inhibition de l'activation. Les signaux transmis par les motifs cytoplasmiques des FcγRs ou leurs chaînes associées modulent également la présentation de l'antigène, la sécrétion de cytokines et les récepteurs de cytokines ou l'expression de protéines co-stimulatrices (Nimmerjahn and Ravetch 2008).

Enfin, les FcγRs " non classiques ", sont représentés par les récepteurs de type C lectine (ex: DC-SIGN chez l'Homme et SIGN-R1 chez la souris) qui interagissent avec les oligosaccharides riches en acide sialique des IgG et déclenchent des fonctions anti-inflammatoires (X. Yu et al. 2013; Lanoue et al. 2004). La protéine TRIM21 est un récepteur intracellulaire qui interagit avec les complexes IgG-virus afin de neutraliser les virus avant leur réplication et initier leur dégradation dans le protéasome (Keeble et al. 2008). A côté de ces récepteurs s'ajoute le FcRn, qui lie le Fc des IgG et assure des fonctions complexes et multiples qui seront décrites tout au long de cette thèse. Ces récepteurs se fixent entre les domaines CH2-CH3 du Fc dans un rapport de 2/1 (Pincetic et al. 2014).

Le rôle de ces récepteurs à la surface ou à l'intérieur des cellules est de permettre la mise en place d'une réponse spécifique de l'antigène (via les Ac) avec un recrutement approprié des cellules du système immunitaire. Cette interaction résulte en différents processus en fonction de la classe de récepteur Fc, du type de cellule impliquée et même la nature et l'amplitude du signal du ligand (Van Der Poel et al. 2010; Lux et al. 2013).

1.A.3 Homologie protéique du FcRn de l'Homme, du rat et de la souris

Les travaux sur le séquençage des chaînes α du FcRn de différentes espèces, ainsi que les travaux sur sa fonction de prise en charge des IgG ont révélé non seulement une homologie, mais aussi sa conservation entre ces espèces. Les séquences du FcRn chez la souris et le rat étant fortement liées et la forme humaine plus divergente (Figure 5).

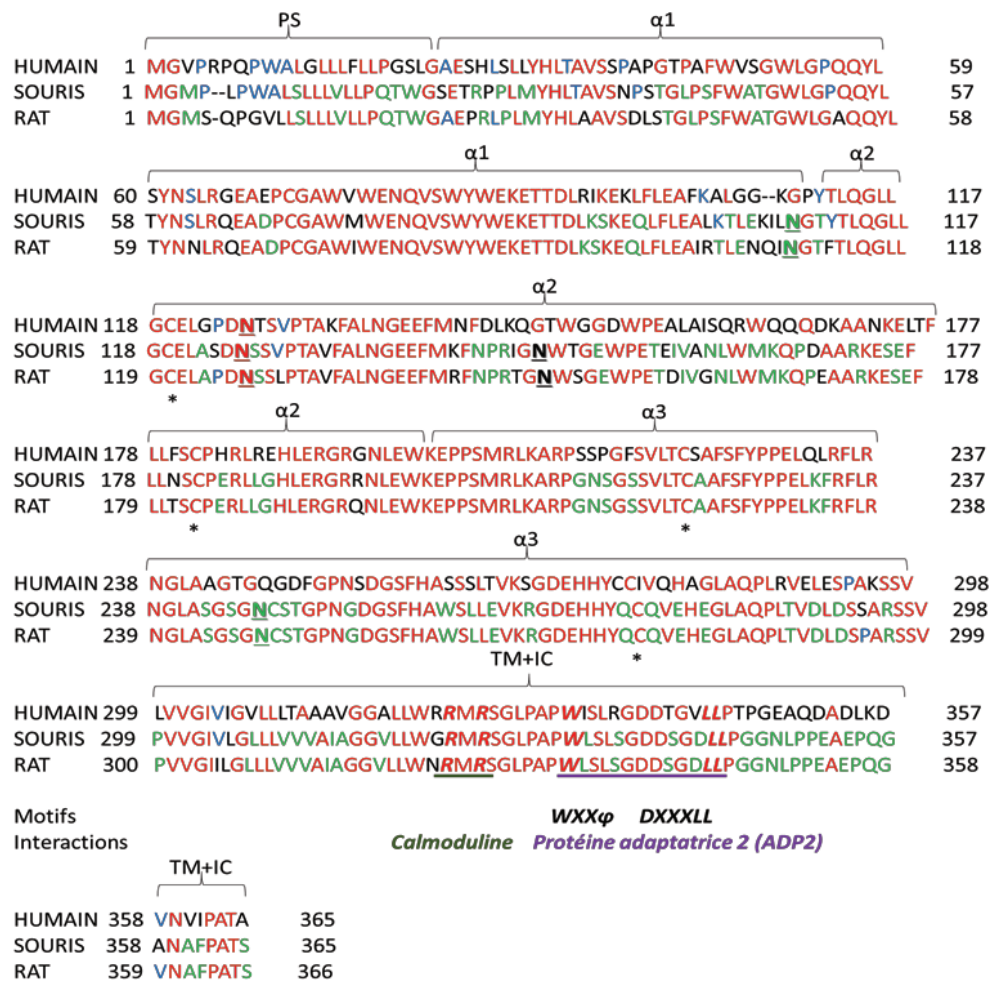


Figure 5 : Alignement des séquences protéiques de la chaîne lourde du FcRn humain, murin et de rat, obtenues sur Uniprot (<http://www.uniprot.org/align/>)

Code des acides aminés (a.a.) à 1 lettre. Rouge: a.a. communs aux 3 espèces; Bleu: a.a. communs à l'humain et à l'une des 2 espèces. Vert: a.a. communs à la souris et au rat. *: sites des ponts disulfures. **Gras**: sites de glycosylation. Au niveau de la région TM+IC, en *gras italique*, les motifs tryptophane ($WXX\phi$) et dileucine ($DXXXLL$) interagissent avec la protéine AP2 (Adaptor protein 2), en violet, connue pour son rôle de protéine adaptatrice dans l'endocytose. En vert, les acides aminés nécessaires à l'interaction avec la calmoduline, qui intervient dans la régulation du flux calcique agissant sur le "trafficking" du FcRn.

Les séquences aminées des chaînes lourdes de la souris et du rat partagent 91% d'identité (Ahouse et al. 1993) tandis que la chaîne lourde hFcRn partage 65% d'identité avec ses homologues de rat et souris (Story, Mikulska, and Simister 1994). Les études chez les primates non humains (les macaques), ont suggéré que les chaînes α du FcRn humain et celui des primates non humains possédaient des fonctions et une expression tissulaire similaires (Datta-mannan et al. 2012; Uno, Utoh, and Iwasaki 2014). Par ailleurs, l'alignement des

séquences a révélé une similitude de 92,60% avec la séquence du FcRn humain (<http://www.ensembl.org/>).

Il faut également remarquer que la chaîne lourde du FcRn diffère entre ces espèces par leur niveau de glycosylation. Chez l'Homme, il y a un site unique de N-glycosylation sur l'asparagine en position 105 (domaine $\alpha 1$). En revanche chez la souris et le rat il y a 3 sites de N-glycosylation supplémentaires sur les asparagines en position 87 (domaine $\alpha 1$), 128 (domaine $\alpha 2$) et 225 (domaine $\alpha 3$) (Kuo et al. 2009).

Enfin, l'analyse du domaine cytoplasmique du FcRn chez le rat montre la présence de signaux d'endocytose (Wu and Simister 2001). Le tryptophane en position 311 et le motif dileucine (positions 322 et 323), conjointement avec l'acide aspartique à la position 317 et/ou 318 sont des composants nécessaires aux signaux d'endocytose. Dans les modèles de cellules polarisées, le FcRn au niveau de la membrane plasmique est principalement présent du côté basolatéral. Cette distribution dépend des signaux qui chevauchent ceux qui gouvernent l'endocytose (Newton, Wu, and Simister 2005).

B. Les ligands du FcRn

Le FcRn possède deux ligands: les IgG et l'albumine, auxquelles il se lie de façon pH dépendante (liaison à pH 6-6,5 et dissociation à pH 7-7,4). Les IgG et l'albumine sont les deux types de protéines les plus abondantes dans la circulation sanguine et représentent 80-90% du pool de protéines totales. En outre, chez l'Homme, ces deux protéines partagent une longue demi-vie sérique qui s'élève à 19-21 jours ; en revanche, chez la souris la demi-vie sérique de l'albumine s'élève à 2-3 jours et à 4-8 jours pour les IgG (Dixon, Maurer, and Deichmiller 1953; Spiegelberg and Fishkin 1972; Vieira and Rajewsky 1988).

1.B.1 Les IgG

Les IgG (naturelles) ont une unité de base commune formée d'une structure comprenant quatre chaînes. Elles sont composées de deux chaînes légères (L: "Light") identiques (25 kDa) de 200 à 220 acides aminés (a.a.) et de deux chaînes lourdes (H: "Heavy") identiques (50 kDa) de 450 à 455 a.a. Les IgG se répartissent en 4 sous-classes, IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 et se distinguent, d'une part, par leur spécificité antigénique et d'autre part, par leurs taux sériques respectifs pouvant présenter des variations inter-individuelles. Les chaînes légères sont de deux types, κ et λ , et sont constituées d'un domaine variable (V_L) et d'un domaine constant (C_L). Cette structure à quatre chaînes est stabilisée par des liaisons disulfures inter-chaînes et intra-chaînes, ainsi que par des liaisons non-covalentes. Les parties amino

terminales des chaînes H et L sont caractérisés par une composition d'acides aminés très variables et sont désignées respectivement par V_H et V_L . La partie constante de la chaîne L est désignée CL , alors que la chaîne H est divisée en trois domaines ($CH1$, $CH2$ et $CH3$) avec une région charnière située entre le premier et le deuxième domaine constant (Figure 6.A) (Williams and Barclay 1988; Schroeder HW and Cavacini L 1999).

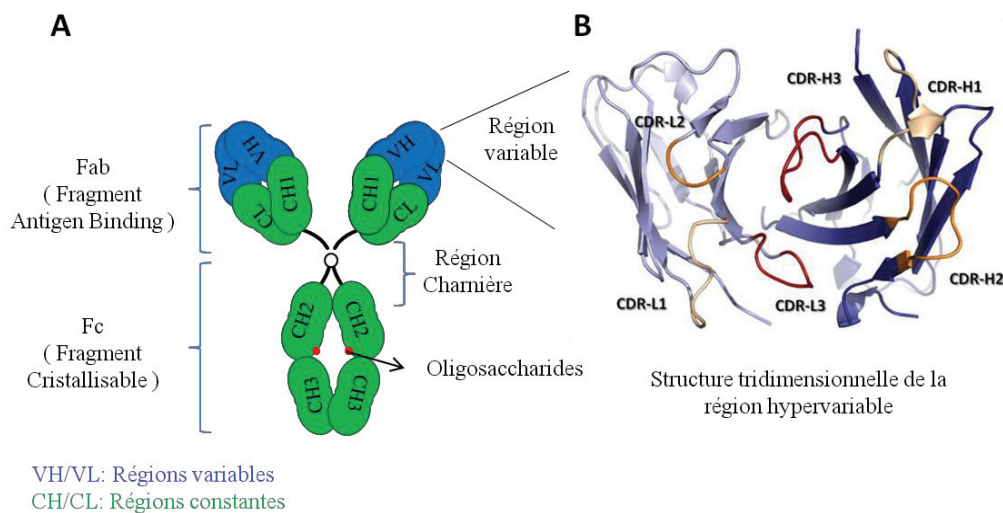


Figure 6 : Représentation schématique de la structure d'une IgG humaine

(A) Une IgG est composée d'une partie variable dont la fonction est la reconnaissance de l'antigène et d'une région constante aux fonctions effectrices et présentant des résidus glucidiques (Parekh et al. 1985). Fab : fragment de liaison à l'antigène (Ag), "fragment antigen-binding" ; Fc: Fragment cristallisable. (B) La structure 3D avec les CDR (couleurs claires) et FR (bleu foncé) a été réalisée avec Pymol (PDBID : 1IGT), d'après (Finlay and Almagro 2012).

La partie variable se compose de six régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Regions) de 5 à 15 acides aminés (a.a.) formant des boucles entre des régions charpentes ou FR (Framework), (Figure 6.B). Ces six boucles hypervariables, appartenant aux domaines V_H et V_L , peuvent se rapprocher dans l'espace grâce à des interactions non covalentes pour former une zone particulière appelée paratope, responsable de la liaison de l'Ac à un épitope spécifique au niveau de l'antigène (Ag). Les régions hypervariables sont propres à chaque Ac. Leurs séquences et leurs organisations spatiales sont responsables de la spécificité d'un Ac pour un épitope sur un Ag donné. Ainsi, un Ac possède deux sites de liaison à l'Ag, un au bout de chaque bras, et d'une partie constante aux fonctions effectrices complexes. Les IgG peuvent également être caractérisées par différents fragments obtenus après clivage enzymatique à la papaïne ou à la pepsine (Figure 7).

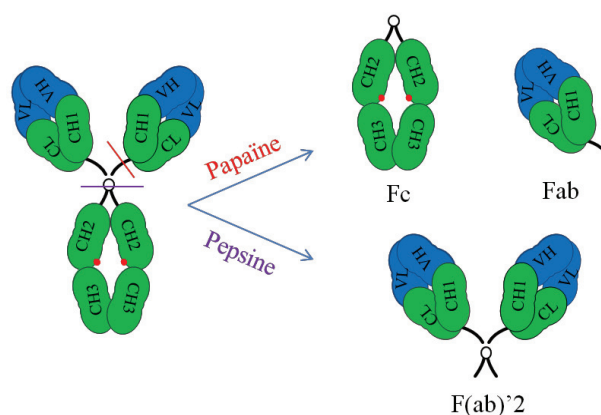


Figure 7 : Représentation schématique du clivage enzymatique d'une IgG

La papaïne permet d'obtenir 2 fragments différents : le Fab ("Fragment antigen-binding") et le fragment Fc, (Rousseaux, Rousseaux-Prévost, and Bazin 1983). La pepsine digère l'Ac au niveau des ponts disulfure de la région charnière, libérant ainsi le fragment F(ab)'2, (Lachmann 1971). La région charnière permet de relier le fragment F(ab)'2 au Fc et apporte également une grande flexibilité à l'Ac, qui peut ainsi interagir avec l'Ag dans différents plans de l'espace (Hanson, Schumaker, and Yguerabide 1981).

Un autre élément important de la structure et de la fonction des IgG est la présence de résidus glucidiques au niveau du fragment Fc. Les IgG présentent un site de N-Glycosylation au niveau de chaque domaine CH2 sur l'asparagine 297 (Asn297). Le motif oligosaccharidique de base comprend un heptamère bi-antennaire, composé de N-acétylglucosamine et de mannose. Ce motif conservé peut être modifié par l'ajout d'un nombre variable de résidus de fucose à sa base, de galactose ou d'acide sialique à ses extrémités (Parekh et al. 1985). Les glycosylations au niveau du Fc interviennent dans la stabilité structurale des Ac et influencent l'affinité des IgG pour les récepteurs FcγRs (Arnold et al. 2007). Par exemple, des IgG non glycosylées sont incapables de se fixer aux FcγRs pour médier leurs fonctions effectrices d'élimination des Ag (Tao and Morrison 1989). De plus, la composition du motif oligosaccharidique influence elle aussi l'activité des Ac. En effet, des taux anormaux d'IgG sans acide sialique ou galactose sont retrouvés chez des patients atteints de maladies auto-immunes, par exemple la polyarthrite rhumatoïde (Casburn-Budd et al. 1992). Il a également été montré que des IgG non fucosylées présentent des fonctions effectrices améliorées (Shields et al. 2002).

L'implication des motifs oligosaccharidiques des IgG dans l'interaction IgG-FcRn a été évaluée et s'est avérée nulle. Cependant, la même étude démontre que la glycosylation a un effet sur la distribution membranaire du FcRn (Kuo et al. 2009).

1.B.1.1 Interaction FcRn-IgG

Le FcRn lie les IgG de façon pH-dépendante avec une forte affinité, de l'ordre du nanomolaire, à pH 5-6 (pH des endosomes) et avec une liaison très faible dont l'affinité n'est pas mesurable à pH 7-7,4 (pH physiologique) (Rodewald 1976; Malini Raghavan, Gastinel, and Bjorkman 1993; Vaughn and Bjorkman 1998; Goebel et al. 2008). L'interaction FcRn-IgG se produit selon une stœchiométrie 1: 2, avec une IgG se liant à deux molécules FcRn via ses deux chaînes lourdes (Figure 8), (Huber et al. 1993; Sánchez, Penny, and Bjorkman 1999). Cependant, certains travaux utilisant la chromatographie et la résonance plasmonique de surface suggèrent que la stœchiométrie FcRn-IgG est de 1:1 (Popov et al. 1996). L'ensemble de ces données, certes contradictoires, peut malgré tout s'accorder avec l'hypothèse d'une stœchiométrie 1:2, avec les 2 sites qui coopéreraient négativement. Dans cette hypothèse, la fixation d'une IgG entraînerait une diminution de l'affinité de la seconde IgG pour le FcRn, ce qui expliquerait que dans certaines expériences les résultats donnent l'impression que la stœchiométrie est de 1: 1 (Huber et al. 1993).

Grâce aux études portant sur la structure cristallographique du complexe IgG-FcRn, nous savons que l'interaction IgG-FcRn implique la région CH2-CH3 de l'IgG et les trois domaines extracellulaires de la chaîne alpha (α 1, α 2, et α 3) ainsi, que la chaîne légère β 2m du FcRn (Burmeister, Huber, and Bjorkman 1994; Xiaoping Zhu et al. 2002).

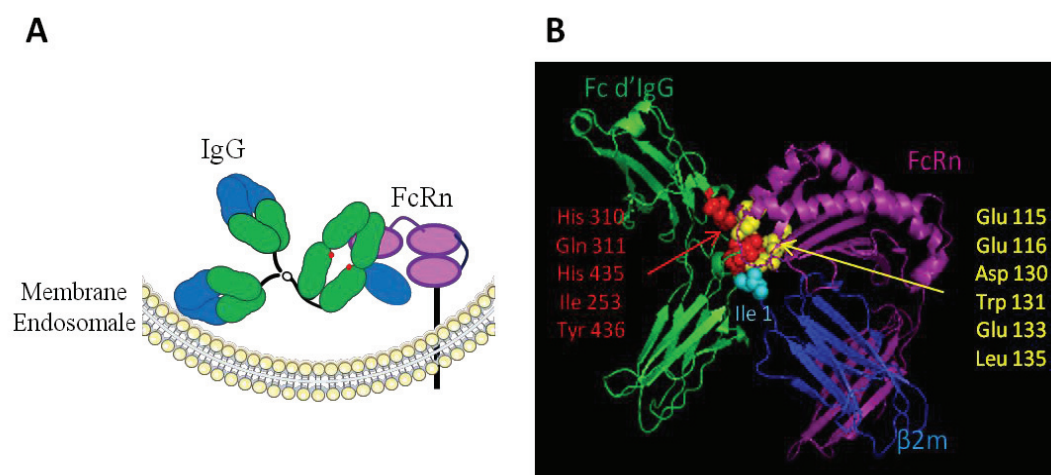


Figure 8 : Représentation schématique et cristallographique de l'interaction du FcRn avec une IgG humaine.

(A) Liaison FcRn-IgG humaine à l'intérieur d'une vésicule d'endocytose (pH < 6,5). (B) Structure tridimensionnelle de la liaison FcRn-IgG obtenue à partir du Code PDBID: 4N0U et réalisée à l'aide du logiciel Pymol. Les résidus intervenant dans l'interaction FcRn-IgG sont en rouge pour ceux sur l'IgG, en jaune pour ceux sur la chaîne α du FcRn et en bleu clair pour ceux sur la β 2m (Andersen and Sandlie 2009).

Ainsi, plusieurs acides aminés conservés et situés à l'interface du domaine CH2-CH3 de l'IgG ont été identifiés comme jouant un rôle central dans l'interaction avec le FcRn (Medesan et al. 1997; Ober et al. 2001):

- Chez le rat et la souris, les résidus His310, Gln311, His435, Ile253 et His436 de l'IgG interagissent avec les résidus Glu117, Glu118, Glu132, Trp133, Glu135 et Asp137 du FcRn ; le résidu Ile1 de la β 2m joue un rôle direct dans l'interaction.
- Chez l'Homme, les résidus His310, Gln311, His435, Ile253 et Tyr436 de l'IgG interagissent avec les résidus Glu115, Glu116, Asp130, Trp131, Glu133 et Leu135 du FcRn et le résidu Ile1 sur la β 2m.

La séquence -His-Asn-His-Tyr- (a.a. 433-436) du domaine CH3 est importante pour la liaison dépendante du pH et ces résidus sont hautement conservés d'une espèce à l'autre (Tableau 1) (Ward, Velmurugan, and Ober 2014). Dans une moindre mesure, les acides aminés en position 257, 307 et 309 participent également à l'interaction Fc-IgG (Medesan et al. 1997; M Raghavan et al. 1995). Les résidus histidines sont essentiels à la liaison FcRn-IgG car ce sont des acides aminés basiques chargés positivement à pH 6,5 et neutres à pH 7,4 (J. K. Kim et al. 1999) et par conséquent responsables de la dépendance au pH. Des études de liaison ont montré que le FcRn murin est capable de lier les IgG de différentes espèces alors que le FcRn humain se lie à l'IgG de l'Homme, du lapin et du cobaye, mais peu aux IgG de rat, de bovin et de souris (West and Bjorkman 2000; Ober et al. 2001; J. Zhou et al. 2003).

	Position	252	253	254	255	256	257	307	308	309	310	311	433	434	435	436
Humain	IgG1	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Val	Leu	His	Gln	His	Asn	His	Tyr
	IgG2	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Val	Val	His	Gln	His	Asn	His	Tyr
	IgG3	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Val	Leu	His	Gln	His	Asn	Arg	Phe
	IgG4	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Val	Leu	His	Gln	His	Asn	His	Tyr
Souris	IgG1	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Met	His	Gln	His	Asn	His	His
	IgG2a	Met	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Gln	His	Gln	His	Asn	His	His
	IgG2b	Met	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Lys	Asn	Tyr	Tyr
	IgG3	Met	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Gln	His	Gln	His	Asn	His	His
Rat	IgG1	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Leu	His	Gln	His	Asn	His	His
	IgG2a	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Val	His	Arg	His	Asn	His	His
	IgG2b	Leu	Ile	Ser	Gln	Asn	Ala	Pro	Ile	Gln	His	Gln	His	Asn	His	His
	IgG2c	Met	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	His	Ile	Gln	His	Gln	His	Asn	His	His

Tableau 1 : Variation de la séquence en acides aminés des IgG de l'Homme, la souris et du rat, impliquée dans l'interaction avec le FcRn, d'après (Victor Ghetie and Ward 2000; Ward, Velmurugan, and Ober 2014)

Enfin, nous savons que le fragment B de la protéine A du staphylocoque se lie au FcRn sur les acides aminés intervenant dans la liaison FcRn-IgG, entrant ainsi en compétition avec les IgG (M Raghavan et al. 1994).

1.B.2 L'albumine

L'albumine participe au maintien du pH et à l'équilibre osmotique du plasma nécessaire à la bonne distribution des fluides corporels entre les compartiments intra-vasculaires et les tissus. L'albumine a un rôle important dans le transport, la distribution et le métabolisme de nombreux ligands endogènes et exogènes (acides gras, acides aminés, stéroïdes, métaux et de nombreux produits pharmaceutiques) (Fasano et al. 2005; Curry 2009; Ishima et al. 2009; Bal et al. 2013). L'albumine est exclusivement synthétisée par les hépatocytes du foie et sécrétée dans la circulation sanguine à une concentration de 40 mg/ml chez la souris et l'Homme (Peters 1996). C'est une protéine globulaire de 66,5 KDa, hautement soluble et stable, non glycosylée. La séquence primaire et la structure cristallographique de l'albumine humaine montrent que la protéine est un polypeptide unique avec 585 résidus contenant 17 paires de ponts disulfure et une cystéine libre qui stabilisent l'ensemble de la structure. L'albumine est constituée de trois domaines homologues DI, DII et DIII, comprenant chacun deux sous-domaines (A et B) (Brown 1976; X. M. He and Carter 1992; Curry 2009) (Figure 9).

1.B.2.1 *Interaction FcRn-albumine*

Ce sont les travaux de Chaudhury et al. en 2003 qui ont révélé la prise en charge de l'albumine par le FcRn. Lors d'expériences de purification du complexe FcRn-IgG, ils ont montré que le FcRn liait une autre protéine, l'albumine, présente dans le milieu de culture. Cette liaison était comme pour le FcRn dépendante du pH ; le pH étant légèrement plus acide pour la liaison à l'albumine.

Le clonage et l'expression de chacun des domaines constituant l'albumine a permis de déterminer, par résonance plasmonique de surface à pH acide, que la fixation au FcRn s'effectue principalement au niveau du domaine DIII (Chaudhury et al. 2006; Andersen et al. 2012) (Figure 9).

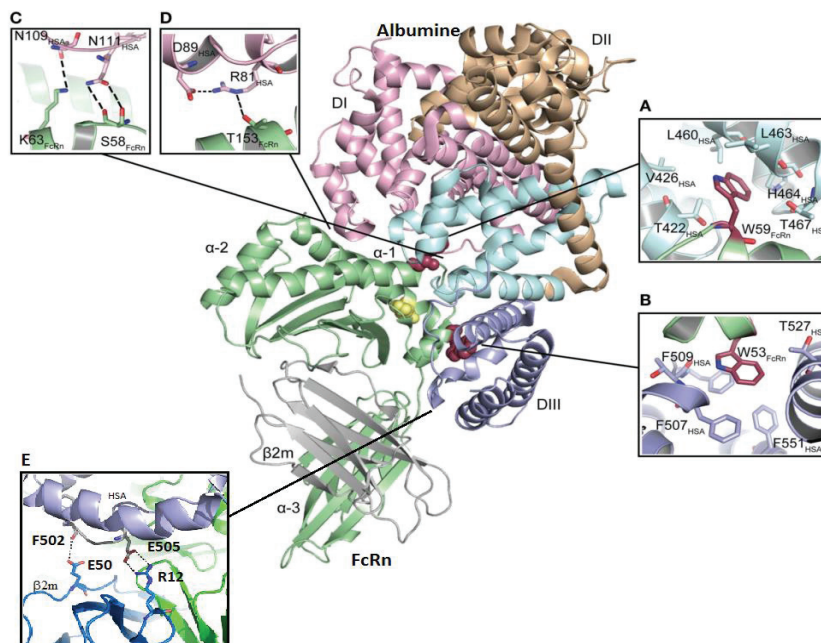


Figure 9 : Représentation tridimensionnelle suite à la co-cristallisation du FcRn humain avec l'albumine humaine, d'après Oganessian et al, 2014 et Sand et al. 2015.

Les trois domaines du FcRn ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) sont représentés en vert et la sous-unité $\beta 2m$ en gris, tandis que les trois domaines de l'albumine sont représentés en rose (DI), en orange (DII) et en bleu clair (DIII). En jaune, le résidu H166 du FcRn stabilise la structure de la boucle contenant les résidus W51, W53, W59 et W61. Les résidus W53 et W59 sont représentés par des sphères rouges. (A) Zone d'interaction du résidu W59 du FcRn avec une poche hydrophobe dans le domaine DIIIA. (B) Zone de contact hydrophobe du FcRn (W53) avec le domaine DIIIB. (C) Gros plan des zones structurales de DI qui interagissent avec le FcRn. (D) Gros plan de l'interface structurale montrant la liaison hydrogène intramoléculaire entre l'albumine et le FcRn. (E) Gros plan de l'interface structurale montrant l'interaction entre la $\beta 2m$ (bleu foncé) et l'albumine. E: Acide Glutamique; F: Phénylalanine; H: Histidine; K: Lysine; L: Leucine; N: Asparagine; R: Arginine; S: Sérine; T: Thréonine; V: Valine; W: Tryptophane.

Elle implique plus particulièrement trois résidus histidines conservés entre les espèces (H464, H510 et H535). D'autres résidus du domaine III influencent de façon plus modérée la fixation au FcRn : K500, K536, K538 et P537 (Oganessian et al. 2014; Schmidt et al. 2013). Sur le FcRn, le résidu histidine en position 166 a été identifié, par des expériences de mutagenèse dirigée, comme étant essentiel à la liaison à l'albumine. Ce résidu est situé au niveau du domaine $\alpha 2$ et stabilise une structure en boucle contenant deux résidus tryptophane importants : W53 et W59. Ces résidus entrent en contact avec des "poches hydrophobes" de l'albumine. Plus spécifiquement, le résidu W59 forme des interactions hydrophobes avec les résidus T422 (T: thréonine), V426 (V: Valine), L460 (L: Leucine), L463 et T467 dans le sous-domaine DIIIA. Tandis que le résidu W53 est inséré dans une poche hydrophobe entre

deux hélices α du sous-domaine DIIIB, qui comprend trois résidus phénylalanine F507, F509, et F551 ainsi que deux résidus thréonine T508 et T527. Cette interaction impliquant le résidu W53 nécessite une modification conformationnelle de l'albumine qui fait intervenir les résidus 500-510, qui font partie d'une longue boucle reliant DIIIA et DIIIB. Les deux résidus clés H510 et H535 sont situés dans cette boucle et participent à l'interaction FcRn-albumine en stabilisant la position de la boucle à pH acide. La troisième histidine, H464, fait partie de l'environnement hydrophobe qui accueille le résidu W59. Enfin, notons que de manière intéressante, les structures cristallographiques suggèrent également que l'albumine peut entrer en contact avec la sous-unité $\beta 2m$, impliquant des interactions entre ses résidus R12 et E50 avec le résidu E505 et F502 de la chaîne latérale de l'albumine. L'ensemble des données suggère que la stœchiométrie de la liaison FcRn-albumine est de 1 : 1.

De façon intéressante, les travaux de Schmidt et al 2013 (Schmidt et al. 2013) ont révélé que la liaison de l'albumine avec des acides gras entraînerait un changement de conformation pouvant affecter sa liaison avec le FcRn. Cet effet est dû au fait que dans le domaine DIII, il y a une région de haute affinité pour les acides gras. Ces connaissances ont permis de comprendre comment les ligands interagissaient avec l'albumine et comment cela impactait sa prise en charge par le FcRn, ce qui par conséquent affecterait son transport et son dépôt dans l'organisme. Plus récemment, les travaux de Pyzik M et al, 2017, chez la souris, ont montré qu'un blocage de l'interaction FcRn-albumine permettait de protéger les hépatocytes d'une intoxication par le paracétamol. Cet effet est dû à une redirection et dégradation de l'albumine-paracétamol dans le système biliaire.

Enfin, il a été rapporté que le fibrinogène pouvait entrer en compétition avec l'albumine et les IgG, cependant les mécanismes de cette nouvelle prise en charge restent à élucider (Alberio et al. 2018). Ces nouvelles connaissances sur l'albumine pourraient ouvrir des nouvelles perspectives thérapeutiques sur la façon de traiter les intoxications au paracétamol via le ciblage de l'interaction du FcRn avec l'albumine.

1.B.2.2 *Influence réciproque des interactions FcRn-IgG et FcRn-albumine*

Les travaux de Chaudhury et al. de 2003 et 2006 ont montré que le FcRn pouvait se lier à la fois à une IgG et à une molécule d'albumine, suggérant que les sites de liaison de ces 2 ligands étaient différents et suffisamment éloignés pour éviter un encombrement stérique entre eux. D'autre part, le modèle du complexe albumine/FcRn/IgG obtenu à partir des données de co-cristallisation du FcRn de rat et d'un Fc indique qu'il y a une distance d'au moins 24 Å entre l'albumine et le Fc. D'après cette modélisation, les Fab d'une IgG complète

ne pourraient *a priori* pas se trouver à moins de 10 Å de l'albumine, ce qui est compatible avec le fait que le FcRn lie ces deux molécules simultanément et sans incidence de la fixation de l'une sur l'affinité de l'autre (Schmidt et al. 2013). Des résultats similaires ont été retrouvés par Oganessian et ses collègues (2014) concernant le FcRn humain (Figure 10).

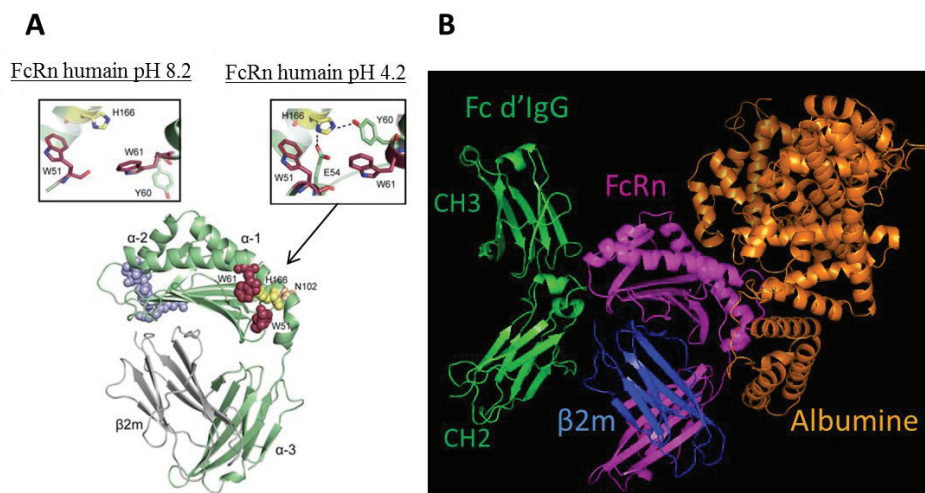


Figure 10 : Sites impliqués dans la liaison du FcRn humain aux IgG et à l'albumine, d'après (Oganessian et al. 2014; Knudsen Sand et al. 2015).

(A) Structure cristallographique du FcRn humain, présentant les principaux résidus d'acides aminés impliqués dans la liaison aux IgG, représentés par des sphères bleues (L112, E115, E116, W131, P132 et E133), tandis que les résidus centraux pour la liaison à l'albumine (W51, W53, W59 et W61) sont montrés par des sphères rouges. La boucle contenant les tryptophanes est régulée en fonction du pH par le résidu H166 dans le domaine α2 (sphères jaunes). Les gros plans montrent comment le résidu H166 stabilise la boucle des résidus d'acides aminés à pH acide. Ces interactions ne sont pas visibles dans la structure à un pH basique. (B) Structure tridimensionnelle du complexe Fc d'IgG/FcRn/Albumine (Code : 4N0U).

C. Expression du FcRn

1.C.1 Expression et distribution protéique du FcRn

Le FcRn est présent chez tous les mammifères, avec néanmoins quelques différences entre les espèces (Ward and Ober 2009) (Tableau 2). Son expression est ubiquitaire, c'est-à-dire que le FcRn est exprimé dans tous les organes (Latvala et al. 2017). Au niveau cellulaire, il a tout d'abord été décrit dans les cellules épithéliales polarisées puis endothéliales (Roberts, Guenther, and Rodewald 1990; Israel et al. 1997; Leach et al. 1996; Borvak et al. 1998) et il est également largement exprimé par les cellules du système hématopoïétique, telles que les monocytes, macrophages (MΦ), cellules dendritiques, neutrophiles, les cellules B et T (X Zhu et al. 2001; Gestur Vidarsson et al. 2006; Bruhns 2015). Néanmoins, certaines cellules sont

dépourvues de FcRn comme c'est le cas des adipocytes, de l'endothélium des capillaires rénaux, intestinaux et du tissu mammaire et des cellules Natural Killer (NK), des plaquettes, des érythrocytes. La localisation du FcRn est principalement intracellulaire au sein d'endosomes avec une distribution variable le long du réseau vésiculaire. Il est retrouvé à la surface cellulaire en faible quantité et de manière variable en fonction de la cellule et de l'espèce (Rath et al. 2013). La répartition intracellulaire est modifiée dans les cellules épithéliales polarisées en fonction du pôle apical et basal (Claypool et al. 2004).

Organe-Tissus	Type cellulaire	Humain	Primate non humain	Souris WT	Rat	Référence
Foie	Hépatocytes	+	+	+	+	(Latvala et al. 2017)
	Cellules de Kupffer	++	++	++	++	
	Cellules épithéliales sinusoidales	+	+	+	+	
	Extraits totaux	NA	NA	+	+	(V Ghetie et al. 1996*; Blumberg et al. 1995**)
Appareil digestif	Entérocytes apicaux	++	++	++	++	(Latvala et al. 2017)
	Entérocytes (Cryptes de Liberkühn)	++	++	-	++	
	Cellules de Globet	++	++	+	++	
	Extraits totaux et lignées cellulaires	+	NA	+	NA	(Israel et al. 1997*; Shah et al. 2003*; Dickinson et al. 1999*; Ben Suleiman et al. 2012**)
Cerveau	Neurones	-	-	-	-	(Latvala et al. 2017)
	Cellules des plexus choroïdes	NA	++	++	++	
	Cellules des microvaisseaux (épendymocytes)	NA	NA	NA	+	(Schlachetzki, Zhu, and Pardridge 2002)
Nerf sciatique	Tissus nerveux	-	-	-	-	(Latvala et al. 2017)
Cœur	Cardiomyocytes	-	-	-	-	
Muscles	Myocytes	-	-	-	-	
Thyroïde	Cellules épithéliales folliculaires	-	-	-	-	
Vaisseaux sanguins	Cellules endothéliales	NA	NA	+	NA	(V Ghetie et al. 1996; Borvak et al. 1998)
Œil	Choroïde, rétine	-	-	-* et **	-* et **	(H. Kim et al. 2008*; Powner et al. 2014**; Latvala et al. 2017)
	Epithélium ciliaire	-**	-	-**	-**	
	Cornée, iris, lentille	-**	-	-**	-**	
Rate	Pulpe rouge (MΦ)	++	++	++	++	(Latvala et al. 2017; Bruhns 2015*)
	Pulpe blanche (lymphocytes)	-*	-	-*	-	
Thymus	T lymphocytes	-*	-	-	-	

Organe-Tissus	Type cellulaire	Humain	Primate non humain	Souris WT	Rat	Référence
Ganglions	Lymphocytes	-*	-	-	-	(Latvala et al. 2017; Bruhns 2015*)
Appareil reproducteur	Cellules de Sertoli	-	-	-	-	(Z. Li et al. 2011*; Gupta et al. 2013**; Latvala et al. 2017)
	Cellules épithéliales (urètre et endocervix)	-* et **	-	-*	-	
Glande surrénale	Cellules de Chromaffin	-	-	-	-	(Latvala et al. 2017)
Rein	Podocytes	+***	NA	+*	NA	(Sarav et al. 2009*; S. Akilesh et al. 2008*; Haymann et al. 2000***)
	Epithélium du glomérule					
	Cellules du tube proximal					
Glande salivaire	Cellules sécrétrices (acini)	-	-	-	-	(Latvala et al. 2017)
Glande Mammaire	Cellules épithéliales des acini	+**	NA	+*	NA	(P Cianga et al. 1999*; Petru Cianga et al. 2003**)
Sac vitellin	Cellules de l'endoderme	NA	NA	+**	+*	(Roberts, Guenther, and Rodewald 1990*; V Ghetie et al. 1996**)
Placenta	Syncytiotrophoblaste, cellules endothéliales	+	NA	NA	NA	(Leach et al. 1996; Simister et al. 1996)
Moelle osseuse	Cellules hématopoïétiques: cellules dendritiques, monocytes, MΦ, polynucléaires	+** et ***	NA	+* et **	NA	(Gestur Vidarsson et al. 2006*; Bruhns 2015**; X Zhu et al. 2001***; Shreeram Akilesh et al. 2007*)
Poumon §	Cellules épithéliales alvéolaires	- (MΦ alvéolaires)	-	-	-	(Latvala et al. 2017)
	Cellules épithéliales bronchiques	-	-	-	-	
	Extraits totaux et Epithélium Bronchique/ alvéolaire	+** +**/-** sauf MΦ alvéolaires +		+** Epithélium bronchique +** Lignée poumon	+*	(Sakagami et al. 2006*; Spiekermann et al. 2002**; V Ghetie et al. 1996***)

Tableau 2 : Expression du FcRn par espèces et tissus.

+ à +++: expression faible à forte ; *-***: correspond aux différentes références qui rapportent l'expression du FcRn; -: absence d'expression sauf indication par une * et NA : non analysé. L'étude de l'expression du FcRn a été effectuée avec les différents outils de détection disponibles (Immunohistochimie, RT-PCR, RT-QPCR, microscopie à fluorescence et Western-blot) Abréviations: WT: "Wild type", pour souris de type sauvage. En fonction des travaux et donc des techniques utilisées par les auteurs, les résultats sur l'expression du FcRn dans un même tissu peuvent diverger. C'est par exemple le cas du poumon, dont les résultats plus récents de Latvala et al. 2017, diffèrent par rapport à ceux rapportés par Ghetie et al. 1996; Spiekermann et al. 2006 et Sakagami et al. 2006.

1.C.2 Le gène *FCGRT/fcgrt*

La chaîne lourde α du FcRn est codée par le chromosome 19 chez l'Homme (*FCGRT*) et le chromosome 7 chez la souris (*fcgrt*) (Ahouse et al. 1993; Kandil et al. 1996; J E Mikulska et al. 2000). Les orthologues du *FCGRT* ont été largement identifiés chez de nombreuses espèces de mammifères et de marsupiaux (Adamski, King, and Demmer 2000; Sayed-Ahmed et al. 2010). Les gènes *FCGRT* et *fcgrt* s'étendent sur 14kb et 10kb respectivement, et sont composés de 7 exons et 6 introns (Figure 11).

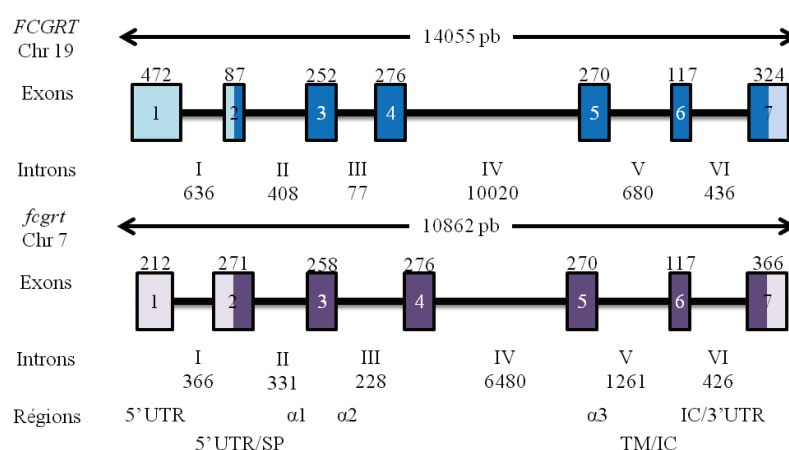


Figure 11 : Représentation schématique des gènes *FCGRT* chez l'Homme et *fcgrt* chez la souris
Source de l'information: <http://www.ensembl.org>

Les 7 exons sont représentés par des rectangles numérotés et les introns par une ligne continue avec une numérotation en chiffres romains. Les régions non codantes sont en bleu clair pour l'Homme et en violet clair pour la souris, les régions codantes en bleu foncé ou en violet foncé. La taille des exons en nucléotides est inscrite au-dessus et la taille des introns au-dessous des chiffres romains correspondants. UTR : extrémités 5' et 3' non traduites. SP : peptide signal; TM : domaine transmembranaire; IC : région intracellulaire.

Dans les 2 espèces, l'exon 1, une partie de l'exon 2 et une portion de l'exon 7 permettent l'obtention de séquences non codantes 5'UTR et 3' UTR. Les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sont codés par les exons 3, 4 et 5 respectivement. L'exon 6 code le domaine transmembranaire (TM) ainsi que les acides aminés de la portion cytoplasmique (IC). Notons que les introns 4 font entre 6-10kb et contiennent de multiples séquences répétées de type Alu.

1.C.3 La variabilité génétique

Étant donné l'importance du FcRn dans la pharmacocinétique (PK) des Ac et notamment des Ac thérapeutiques, des recherches ont été effectuées afin d'identifier les polymorphismes génétiques susceptibles d'influencer l'expression et les fonctions du FcRn. Il a été constaté que

la diversité allélique du gène *FCGRT* chez l'Homme est faible, avec peu de polymorphismes identifiés (Ahouse et al. 1993; Kandil et al. 1996; J E Mikulska et al. 2000). Parmi ceux-ci, nous comptons :

- Un polymorphisme de type "Variable Number Tandem Repeat" (VNTR). Ce polymorphisme, identifié par (Sachs et al. 2006), se situe dans la région 5' au niveau du promoteur. Il s'agit d'une séquence de 37 pb dans l'intron 1 qui se répète de 1 à 6 fois. Il existe donc cinq allèles différents de VNTR1 à VNTR5. Les allèles VNTR2 et VNTR3 sont les plus communs (7,5% et 92% chez les caucasiens, et 3,2% et 96,8% chez les japonais, respectivement) (Sachs et al. 2006; Ishii-Watabe et al. 2010). De nombreuses études se sont intéressées à l'impact de ce polymorphisme sur l'expression et les fonctions du FcRn (Tableau 3).

Type de tissu, Type de cellule	Résultats	Références
Lignée myélomonocytaire U937	Activité transcriptionnelle du <i>FCGRT</i> : hétérozygotes < VNTR3/VNTR3	(Sachs et al. 2006)
Monocytes (donneurs sains)	Transcrits <i>FCGRT</i> : hétérozygotes < homozygotes et fixation des IgG à pH acide : hétérozygotes < VNTR3/VNTR3	
Sang de donneurs sains et de patients atteints d'une néphropathie lupique (population chinoise)	Pas d'association entre le polymorphisme VNTR et la pathologie	(X.-J. Zhou et al. 2009)
Sang de femmes enceintes et sang de cordon correspondant	Pas d'impact du polymorphisme sur le passage materno-fœtal des IgG	(Freiberger, Ravcuková, et al. 2010)
Sang de patients atteints d'un déficit immunitaire commun variable)	Niveau d'ARNm du <i>FcRn</i> diminué chez les malades Pas d'association entre le polymorphisme VNTR et la pathologie	(Freiberger, Grodecká, et al. 2010)
	Meilleure efficacité du traitement de substitution par IgG par voie intraveineuse (IVIg) chez les homozygotes VNTR3/VNTR3	(Gouilleux-Gruart et al. 2013)
Sang de patients atteints d'un cancer colorectal et traités par cétuximab	Impact du VNTR sur la distribution des Ac thérapeutiques : hétérozygotes < VNTR3/VNTR3	(Passot et al. 2013)
Sang de patientes atteintes d'un cancer ovarien traitées par le Farletuzumab	Pas d'association entre le polymorphisme VNTR et la pathologie	(O'Shannessy et al. 2017)

Tableau 3 : Principaux travaux concernant l'impact du polymorphisme VNTR sur l'expression du *FCGRT* et les fonctions du FcRn, chez l'Homme

- Des variations nucléotidiques (SNP: "Single Nucleotide Polymorphism"). Elles sont essentiellement silencieuses et celles présentes dans la région codante ne semblent pas avoir d'impact sur les fonctions du FcRn (Tableau 4).

Nucléotides affectés	Type de mutation	Type de tissu	Références
T75C	Mutation silencieuse	Tissu intestinal (fœtus humain)	(Israel et al. 1997)
G251T, C707T	Mutation silencieuse	Placenta (humain)	(Gunraj, Fernandes, and Denomme 2002).
C3646T	Mutation silencieuse	Sang (donneurs sains)	(Sachs et al. 2006)
G629A (R210Q), T889A (S297T)	Substitutions non synonymes	Sang (donneurs sains)	(Ishii-Watabe et al. 2010)
T278C (I93T), T929C (L310P)	Substitutions non synonymes	Sang (cohorte de 476 patientes atteintes du cancer de l'ovaire, traitées par l'Ac thérapeutique : Farletuzumab)	(O'Shannessy et al. 2017).
C837T, A1041G	Mutation silencieuse		

Tableau 4 : Liste des principaux SNPs identifiés chez l'Homme

- Un polymorphisme de type "Copy Number Variation" (CNV) décrit comme la répétition ou la délétion d'une région génétique $\geq 1\text{kb}$ (Figure 12) (Sebat et al. 2004). Un CNV peut affecter le niveau de protéine et entraîner des conséquences fonctionnelles. Selon He et al. (2011), certains CNV sont utilisés comme marqueurs pharmacogénétiques. L'existence d'un CNV du *FCGRT* a été rapportée dans trois études, dont deux sont répertoriées dans la base de données " Database of Genomic Variants " (Wong et al. 2007; Perry et al. 2008).

Les deux premières études sont des études pangénomiques relativement peu résolutives et n'ont pas permis de conclure sur leur implication fonctionnelle. Dans la troisième étude menée au sein de notre laboratoire, la présence et la fréquence des CNV ont été évaluées chez 198 témoins sains et chez 94 patients traités par un Ac thérapeutique (Passot et al. 2013). Aucune délétion du gène n'était apparente et nous n'avons trouvé qu'un échantillon présentant des copies *FCGRT* supplémentaires dans chaque cohorte. Néanmoins, aucun profil particulier de PK n'a été observé pour les individus avec les copies supplémentaires de *FCGRT*. Enfin, de façon intéressante, une étude utilisant des souris transgéniques avec du *fcgrt* bovin a montré que des copies supplémentaires de *fcgrt* entraînaient une augmentation des taux d'ARNm et de protéine FcRn, ainsi, qu'un allongement de la demi-vie des IgG (Bender et al. 2007).

1.C.4 Régulation de l'expression du *FCGRT*

Il n'y a que très peu d'études sur la régulation de l'expression du gène *FCGRT*, aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques.

Les premiers indices rapportant une régulation de l'expression du FcRn ont été les études portant sur le transport des Ig de la mère vers le nouveau-né, chez les rongeurs. Ces études ont montré une diminution physiologique de l'expression du FcRn au niveau des entérocytes après le sevrage des animaux.

Les quelques données relatives à la régulation de l'expression du gène *FCGRT*, aussi bien chez l'Homme que dans certains modèles d'animaux, sont rapportées dans le tableau suivant (Tableau 5).

Type d'étude	Tissu, organe, type cellulaire	Facteurs de régulation	Région/séquence impliquée dans la régulation	Résultats	Références
Etude <i>in vitro</i> : Constructions plasmidiques composées de la séquence promotrice 5' du <i>FCGRT</i> avec un gène rapporteur	Lignée LU106 (fibroblaste humain), Lignée NIH3T3 (fibroblaste de souris)	Eléments régulateurs Sp1 (Specificity Protein 1) et AP-1	Séquence allant de -600 à +300	Induction de l'expression du FcRn dans les cellules transfectées	(J E Mikulska and Simister 2000)
Etude <i>in vitro</i> : Constructions plasmidiques avec un gène rapporteur et différentes portions de la région 5'; Effets de la stimulation par LPS ou PMA	Lignées humaines: THP-1 (monocyte), Caco-2 (lignée d'épithélium intestinal), Lu 106 et HUVEC, HSKMEC (lignées endothéliales)	Facteurs de transcription : Sp1, Sp2, Sp3, c-Fos/ c-Jun/YY1 et C / EBPbeta ou C / EBPdelta	Sites de liaison : Sp1 à -313, AP-1 à -276, c-Fos/c-Jun/ YY1 à -586 et C / EBPbeta situé à -497 et -233	Induction de l'expression du FcRn dans les cellules transfectées	(Joanna E. Mikulska 2015)
Etude <i>in vitro</i> : Effets de la stimulation par le TNF- α et l'IFN γ	Lignée primaires de kératinocytes humains	NA	NA	Aucun effet sur l'expression du FcRn	(Cauza et al. 2005)
Etude <i>in vitro</i> : Effets de la stimulation par le TNF- α , l'IL-1 β , le CpG ou le LPS	Lignées humaines: HT-29, Caco-2 (lignées d'épithélium intestinal) et THP-1	Facteurs de transcription : NF- κ B	Sites de liaison : position +1104 (intron 2) et positions +5561 et +9651 (intron 4)	Expression du FcRn ↗ Le LPS et le CpG impliquent les TLR4 et 9	(X. Liu et al. 2007)
Etude <i>in vitro</i> : Effets de la stimulation par IFN γ	Lignées humaines: T84 et HT-29, THP-1 et des cellules mononuclées de sang	Facteurs de transcription : STAT-1	2 sites potentiels de fixation à STAT-1 : -1445 et -891	Expression du FcRn ↘	(Xindong Liu et al. 2008).

Type d'étude	Tissu, organe, type cellulaire	Facteurs de régulation	Région/séquence impliquée dans la régulation	Résultats	Références
Etude <i>in vitro</i> : Effets de la stimulation par le TNF- α et l'IFN γ	Cellules primaires d'épithélium rétinien pigmentaire humain OZR1 et OZR5. Lignée d'épithélium pigmentaire rétinien humain ARPE-19	NA	NA	Expression du FcRn ↓ par le TNF- α Aucun effet de l'IFN γ	(van et al. 2011)
Etude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> : Effets de la stimulation par LPS	Cellules primaires d'endothélium bovin Souris Transgéniques exprimant le <i>FCGRT</i> bovin (bFCGRT)	Facteurs de transcription : NF- κ B	Séquence allant de -1787 à +92 (promoteur bFCGRT)	Expression du FcRn ↑	(Judit Cervenak et al. 2013)
Etude <i>in vitro</i> : Effets d'un agent infectieux, le coronavirus porcin de la gastro-entérite porcine (TGEV)	Lignée d'épithélium intestinal porcin IPEC-J2	Facteurs de transcription : NF- κ B	4 sites de liaison au niveau du promoteur : positions -1286, -1128, -642 et -563	Expression du FcRn porcin ↑ et élimination plus efficace de l'agent infectieux	(Guo et al. 2016)
Etude <i>in vitro</i> : Effets de la stimulation par des micro ARN	Lignées humaines : A549 (épithélium pulmonaire), HEK293 (cellules embryonnaires de rein) et HepG2 (cellules d'hépatoblastome)	Facteurs épigénétiques : hsa-miR-3181 et hsa-miR-3136-3p	Région 3 'non traduite du FcRn	Expression de l'ARNm et de la protéine FcRn ↓	(Ferguson and Blanco 2018)

Tableau 5 : Principaux travaux concernant la régulation de l'expression du *FCGRT/fcgrt*.

NA : Non Analysé

2 Les fonctions du FcRn

Chez l'Homme, le système immunitaire du nouveau-né n'étant pas encore compétent, le FcRn permet de transporter sélectivement les IgG à travers le placenta de la mère et assure ainsi la protection passive du nouveau-né (Firan et al. 2001). Chez l'adulte, le FcRn régule à la fois la demi-vie des IgG et de l'albumine (Borvak et al. 1998; Chaudhury et al. 2003; Roopenian and Akilesh 2007). Il assure également le transport de ces protéines entre différents compartiments, par transcytose à travers les cellules (Victor Ghetie and Ward 2002). Son expression dans certaines cellules hématopoïétiques lui permet de participer à la présentation des Ag, (Shreeram Akilesh et al. 2007; Baker et al. 2011). Le FcRn joue ainsi un rôle important dans la réponse immunitaire tout au long de la vie adulte.

A. Homéostasie des IgG et de l'albumine

L'homéostasie des IgG et de l'albumine consiste à maintenir une concentration constante de ces deux protéines dans l'organisme, en tenant compte de leur répartition dans les tissus. Elle est obtenue grâce à deux mécanismes différents que sont le recyclage et la transcytose cellulaire qui contrôlent le catabolisme de ces protéines (Figure 12).

2.A.1 Recyclage des IgG et de l'albumine

Les fonctions de recyclage des IgG par le FcRn ont été rapportées pour la première fois dans l'endothélium vasculaire (Waldmann TA and Strober W 1969). Plus tard, les travaux sur les souris « knockout » ou déficientes pour le FcRn (FcRn $-/-$) ont révélé que les cellules responsables du recyclage et de l'homéostasie des IgG étaient les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques (Qiao et al. 2008; Shreeram Akilesh et al. 2007; Montoyo et al. 2009). Cependant, nous ignorons encore si les cellules d'origine hématopoïétique et parenchymateuse participent de manière équivalente.

Contrairement à la plupart des autres composés protéiques internalisés par endocytose en phase fluide, les IgG et l'albumine sont sauvées de la dégradation enzymatique grâce au FcRn, (J. Kim 2006; Weissman et al. 2001). Brièvement, les IgG et l'albumine sont sujettes à une pinocytose non spécifique dans divers types cellulaires (Shreeram Akilesh et al. 2007; Montoyo et al. 2009; Junghans and Anderson 1996; Tesar and Björkman 2010). Ces protéines rencontrent et fixent le FcRn dans l'endosome à un pH acide de 5-6 (Rodewald 1976; Roopenian and Akilesh 2007). Les IgG et l'albumine liées au FcRn sont redirigées à la surface

cellulaire et sont libérées dans l'espace extracellulaire à un pH physiologique de 7,4, les protégeant ainsi de la dégradation lysosomale (Victor Ghetie and Ward 2000; Malini Raghavan and Bjorkman 1996) (Figure 13A). Le FcRn "retourne" dans la cellule après le relargage des protéines (V Ghetie et al. 1996; Ober et al. 2004). La liaison au FcRn étant saturable, les molécules qui ne sont pas liées au récepteur sont dégradées dans les lysosomes (Victor Ghetie and Ward 2000). Le mécanisme de liaison et de libération dépendant du pH est critique pour le recyclage des IgG et de l'albumine. Ce phénomène est responsable de la longue demi-vie des ligands et toute déviation des caractéristiques de liaison au FcRn peut fortement influencer leur demi-vie (Schlothauer et al. 2013; Vaccaro et al. 2005). Il y a peu de données sur le recyclage de l'albumine dépendante du FcRn, qui est en partie extrapolée à partir des connaissances dérivées des interactions IgG-FcRn. Sur cette base, une voie équivalente pour la récupération de l'albumine par le récepteur FcRn est supposée exister (Chaudhury et al. 2003). Cependant, l'efficacité de ces deux processus est très différente et il a été suggéré que pour six molécules d'albumine recyclées chez l'Homme, une seule molécule d'IgG est sauvée, alors que le rapport chez la souris est encore plus faible de 30 : 1 (Jonghan Kim et al. 2007). Néanmoins, ce niveau de recyclage est suffisant pour maintenir des concentrations plasmatiques élevées d'IgG avec une contribution relativement mineure apportée par la production d'IgG. En revanche, les taux élevés d'albumine sérique dépendent plus d'un taux élevé de synthèse hépatique que d'une récupération FcRn-dépendante (Jonghan Kim et al. 2007).

Plusieurs études ont permis d'identifier des molécules impliquées dans le trafic intracellulaire du FcRn (Figure 12). Notamment, les protéines Rab qui sont connues pour réguler le trafic des endosomes (Somsel Rodman and Wandinger-Ness 2000; Miaczynska and Zerial 2002). Les protéines Rab4(a), Rab5(a), Rab11(a) et Rab25 participent au trafic intracellulaire du FcRn (Ward et al. 2005). De façon intéressante, ce trafic est différent entre le recyclage et la transcytose (Tzaban et al. 2009). Ainsi, les protéines Rab4(a), Rab5(a) et Rab11(a) sont connues pour être impliquées dans le processus de recyclage (Daro et al. 1996; Green et al. 1997; Sönnichsen et al. 2000), tandis que le processus de transcytose, dans les cellules épithéliales polarisées, va plutôt impliquer les protéines Rab11(a) et Rab25, ainsi que la protéine MyoVb (protéine du cytosquelette) et la calmoduline (Tzaban et al. 2009; Dickinson et al. 2008).

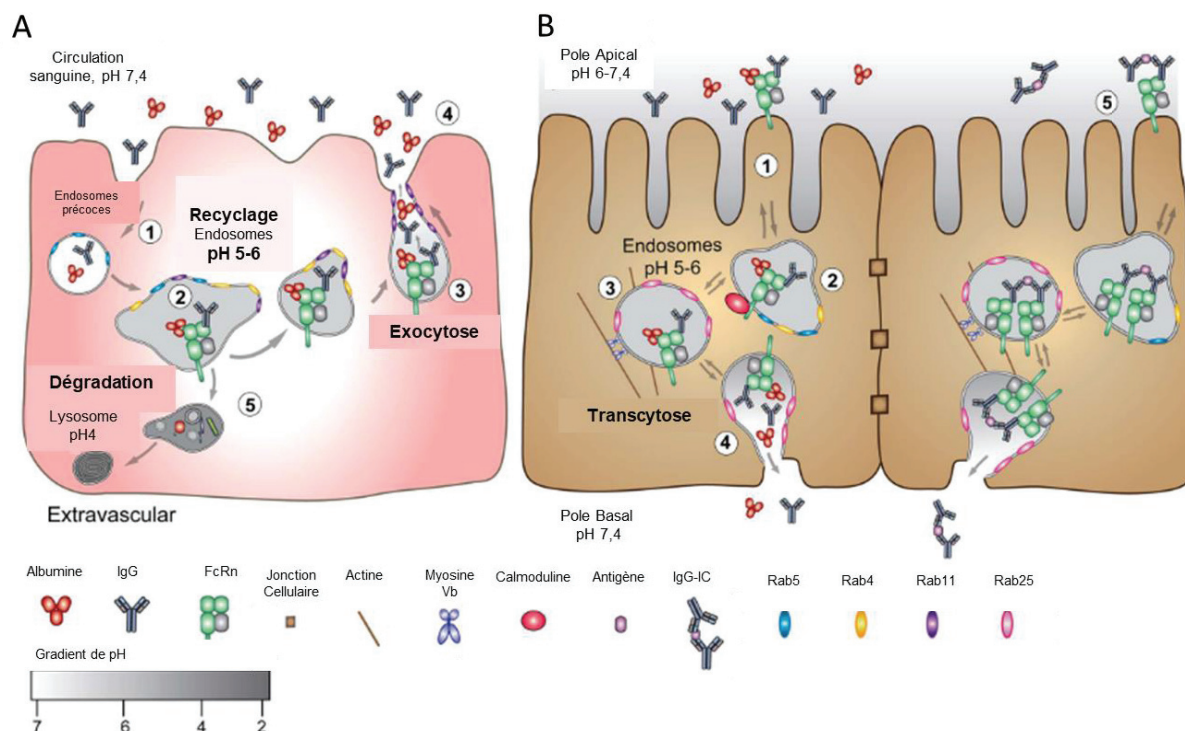


Figure 12 : Représentation schématique des mécanisme de recyclage et de transcytose des IgG et de l'albumine, d'après (Knudsen Sand et al. 2015)

(A) Processus de recyclage : pinocytose des IgG et de l'albumine, (1) incorporation des protéines dans les endosomes précoces (Rab5). (2) Puis, fusion avec les endosomes tardifs (protéines Rab4 et Rab11), pH acide. (3-4) Exocytose et relargage des protéines à pH neutre. (5) Les protéines non protégées par le FcRn subissent la dégradation lysosomale. (B) Processus de transcytose dans les cellules polarisées : (1) liaison du FcRn aux protéines de façon pH dépendante au pôle apical. (2-3) Puis, intégration des complexes IgG-FcRn-Albumine dans le trafic de transcytose, impliquant les protéines du cytosquelette MyoVb et Rab25. (4) Fusion des endosomes avec la membrane cellulaire au niveau basal et relargage des IgG et de l'albumine. (5) Le FcRn permet également la transcytose de complexes immuns-IgG (IgG-IC).

2.A.2 Transcytose des IgG et de l'albumine

Le transfert passif des Ac au travers du placenta chez l'Homme ou au travers de la barrière intestinale chez la souris est une étape importante avant le développement d'un système immunitaire fonctionnel chez le nouveau-né. Ce transfert des IgG dépend du FcRn et permet la protection des nouveaux-nés contre les infections de manière passive (Brambell 1958; Malek et al. 1996). Le FcRn a été initialement identifié au niveau de l'intestin grêle proximal des nouveau-nés de souris, puis au niveau du placenta humain (Simister et al. 1985; Leach et al. 1996).

Chez la souris, le FcRn s'exprime fortement au niveau de l'intestin durant les 15 premiers jours de vie afin d'assurer le passage des IgG maternelles contenues dans le lait ingéré ; après

le sevrage cette expression est réprimée. Dans l'intestin de nouveaux-nés de rongeurs, les jonctions serrées entre les cellules empêchent le passage des molécules d'une taille supérieure à 800 Da. Ainsi, afin de traverser cette barrière, les IgG maternelles se lient au FcRn à la surface apicale des cellules épithéliales (entérocytes) où le pH intra-luminal est acide, puis les IgG sont internalisées, protégées et relarguées au niveau du pôle basal en raison d'une augmentation du pH (Roopenian and Akilesh 2007) (Figure 12 B et 13 A). Par ailleurs, chez les souris knockout pour la β 2-microglobuline (β 2- / -) ou FcRn - / -, aucune IgG maternelle n'est transportée d'un pôle à l'autre des entérocytes des souriceaux (Israel et al. 1995).

Chez l'Homme, le FcRn permet la transcytose des IgG au travers du placenta de la mère vers le fœtus (Simister et al. 1996; Takizawa, Anderson, and Robinson 2005) (Figure 13 B).

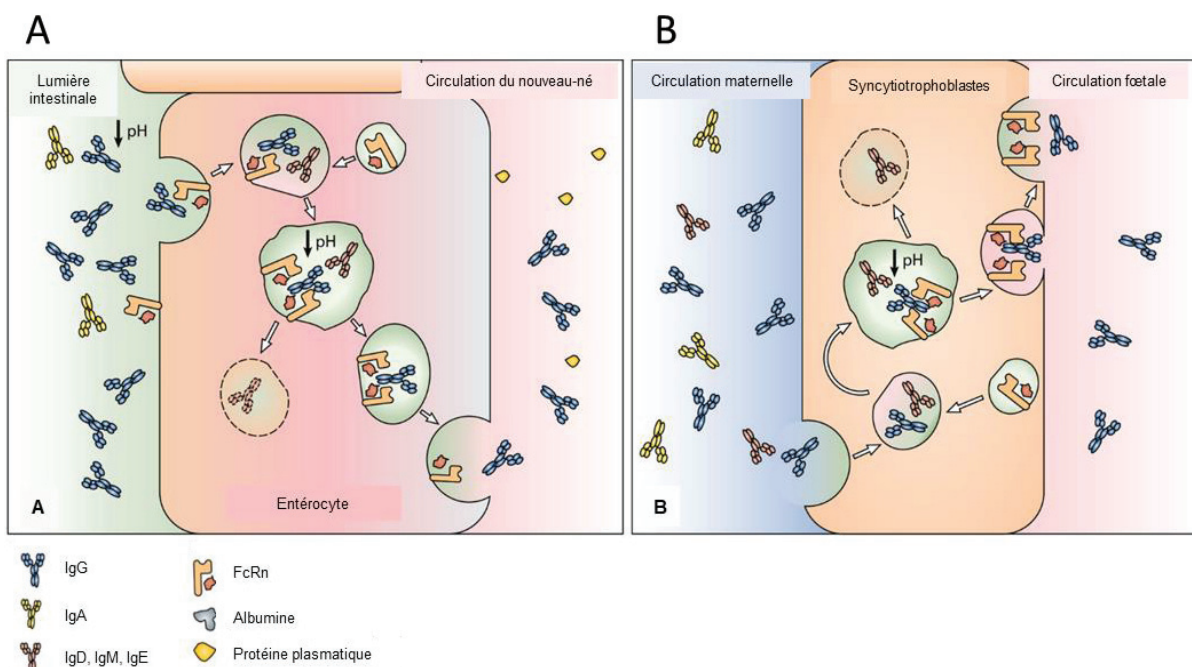


Figure 13 : Transfert materno-fœtal/nouveau-né des IgG, d'après (Pyzik et al. 2015)

(A) Chez la souris, absorption intestinale des IgG contenus dans le lait maternel ingéré par le nouveau-né. Les IgG se lient au FcRn au niveau du pôle apical des entérocytes, à pH acide, au niveau de la lumière intestinale, puis sont pinocytées, protégées de la dégradation lysosomale et relarguées au pôle basal de la cellule. (B) Chez l'Homme, transmission des IgG vers le fœtus, lors de la vie intra-utérine : Les IgG maternelles passent dans le sang fœtal au niveau des villus grâce au FcRn présent dans les syncytiotrophoblastes.

Le transport placentaire est un processus qui peut aller à l'encontre du gradient, de sorte qu'à terme la concentration totale en IgG de l'enfant surpasse habituellement celle de la mère de 20 à 30% (Saji et al. 1999). Le transport placentaire commence, dans une certaine mesure, vers 13 semaines de gestation, mais il n'atteint sa pleine capacité qu'au cours du dernier trimestre,

la majeure partie du transport ayant lieu au cours des 4 dernières semaines (Saji et al. 1999). Toutes les sous-classes d'IgG ne sont pas transportées de manière égale; le transport est plus efficace pour l'IgG1, suivi de près par l'IgG4, puis l'IgG3 et l'IgG2.

La transcytose des IgG peut être bidirectionnelle. Les travaux initiés par l'équipe de Blumberg indiquent que ce phénomène est à l'origine de la transmission des complexes IgG / Ag au travers de la barrière intestinale et que ce processus permet une protection des muqueuses contre l'Ag (Yoshida, Masuda, et al. 2006) (Figure 14). Des études ultérieures dans différents modèles animaux ont permis d'élargir cette notion de protection de la muqueuse intestinale via le FcRn à d'autres types de muqueuses (Tableau 6). L'ensemble des résultats montre qu'en fonction des capacités de neutralisation des Ac, du pH du site et du tissu, le FcRn peut être responsable du transfert d'IgG anti-agents infectieux qui facilitera ou empêchera l'infection. Ainsi, l'expression du FcRn au niveau des muqueuses telles que les poumons, l'intestin ou les voies génito-urinaires peut avoir des conséquences importantes sur la réponse immunitaire de l'hôte.

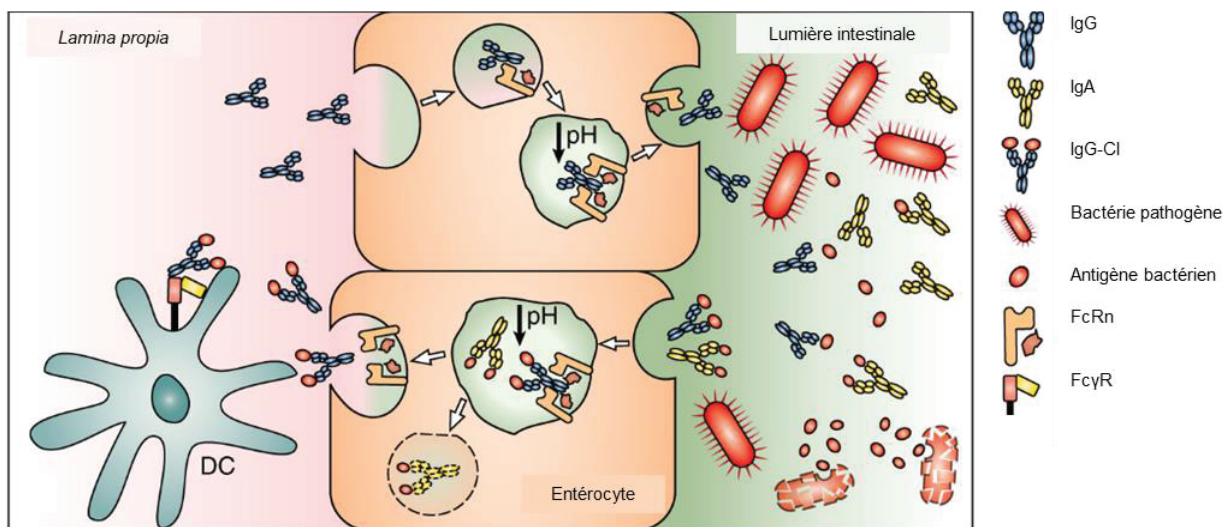


Figure 14 : FcRn et protection des muqueuses, cas de la lumière intestinale, d'après (Pyzik et al. 2015)

Au niveau de l'intestin des individus adultes, les entérocytes et les cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques, expriment le FcRn. De ce fait, les IgG traversent les entérocytes pour lier les Ag au niveau de la lumière intestinale. Il se forme alors des CI-IgG qui vont intégrer les cellules immunitaires afin de permettre par la suite une réponse immunitaire.

Etude	Modèle animal	Résultats-Conclusion	Références
Analyse de l'expression et de la fonction du FcRn dans la muqueuse pulmonaire en présence de complexes IgG-Ag	Modèle murin (adulte)	Le FcRn permet la transcytose bidirectionnelle des IgG et des complexes IgG-Ag entre la circulation sanguine et les muqueuses afin de mettre en place une protection contre les agents pathogènes au niveau des muqueuses aussi bien chez les nouveaux-nés que chez les adultes	(Spiekermann et al. 2002).
Infection des nouveau-nés avec des parasites (<i>Heligmosomoides polygyru</i>) ou des agents pathogènes (<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Citrobacter rodentium</i> ou <i>Chlamydia muridarum</i>) puis administration des IgG anti-agents pathogènes dans le lait maternel	Modèle murin (nouveau-né)		(Harris et al. 2006; Ben Suleiman et al. 2012; Armitage et al. 2014).
Ingestion de complexes IgG-Ag contenus dans le lait maternel	Modèle murin (nouveau-né)		(Verhasselt et al. 2008; Mosconi et al. 2010)
Infection par des agents viraux (Grippe, herpès simplex 2, Cytomégalo virus, VIH) au niveau des muqueuses telles que les poumons, ou les voies génito-urinaires	Modèle murin (adulte)		(Li et al. 2011; Ye et al. 2011; Bai et al. 2011; Maidji et al. 2006; Gupta et al. 2013, 2015; Burton et al. 2011; Ko et al. 2014)

Tableau 6 : Principaux travaux sur la protection des muqueuses grâce au transport bidirectionnel des IgG

Le processus de mise en place d'une réponse immunitaire via le FcRn afin de protéger les muqueuses sera abordé dans le chapitre 3.

Par ailleurs, des études plus récentes dans des modèles murins ont démontré que le FcRn faciliterait l'absorption intestinale des IgE maternelles sous la forme de complexes immuns (CI) IgG anti-IgE / IgE (Paveglia et al. 2012). Ces IgE liées aux IgG anti-IgE restent fonctionnelles et capables de se lier au FcεRI et d'induire la dégranulation cellulaire des basophiles chez l'animal. La même équipe rapporta plus tard que le FcRn humain était également capable de faciliter le transport transépithélial d'IgE sous la forme de CI IgG anti-IgE / IgE, expliquant la présence d'IgE dans le sang du cordon ombilical.

2.A.3 Recyclage et transcytose des IgG : implications thérapeutiques

A partir des études portant sur les maladies associées aux IgG et de leur relation avec le FcRn, il a été suggéré que le FcRn pouvait constituer une cible thérapeutique intéressante (Roopenian and Akilesh 2007). En effet, dans les maladies auto-immunes associées à des auto-Ac pathogènes de type IgG, l'administration d'IgG par voie intraveineuse (IVIg) peut induire une diminution de ces derniers suite à la saturation du FcRn et au catabolisme des IgG endogènes (Z. Yu and Lennon 1999; Getman and Balthasar 2005). La saturation du FcRn par

des Ig intraveineuses (IgIV) augmente significativement le catabolisme des IgG sériques chez la souris (Medesan et al. 1997).

Le même effet peut être obtenu par blocage de l'interaction FcRn-IgG en utilisant un Ac spécifique du FcRn. Ainsi, les effets thérapeutiques d'un AcM anti-FcRn de rat, 1G3, sur deux modèles de myasthénie ont entraîné une amélioration dose-dépendante des symptômes de la maladie après administration d'un Ac anti-récepteur acétylcholine (L. Liu et al. 2007; Christianson et al. 2012). De tels bloqueurs du FcRn (ou "Abdegs" pour les Ac améliorant la dégradation des IgG) peuvent être utiles pour réduire les taux d'IgG dans les maladies médiées par un Ac et pour induire la clairance rapide des complexes IgG-toxine ou IgG-médicament. Ces propriétés suggèrent que les Ac fabriqués avec des demi-vies sériques plus longues pourraient s'avérer être des traitements efficaces chez l'Homme (Vaccaro et al. 2005). L'entreprise Syntimmune créée en 2013 à partir des travaux du Dr Blumberg, s'intéresse à la recherche d'Ac thérapeutiques dans le traitement de maladies auto-immunes associées aux IgG ("Breakthrough Medicines | Syntimmune" n.d.). Ils ont développé, un AcM, le SYNT001 qui bloque le sauvetage des IgG par le FcRn et qui fait l'objet de deux essais cliniques en Phase I : un premier dans le cadre d'une pathologie hématologique, l'anémie hémolytique auto-immune chronique (WAIHA, N° essai clinique : NCT03075878) (L. Blumberg et al. 2017) ; et un autre essai dans le cadre d'une pathologie dermatologique, le pemphigus (N° essai clinique : NCT03075904).

Dans un autre contexte, tel que l'imagerie, il est désormais possible de créer des Ac avec des substitutions d'acides aminés uniques qui réduisent leur demi-vie (Medesan et al. 1997; J. K. Kim et al. 1999) et facilitent leur utilisation pour le diagnostic.

De plus, l'albumine étant également un ligand du FcRn, des médicaments couplés à l'albumine ont été générés (Larsen et al. 2016). Leur pharmacocinétique a été fortement améliorée (Müller et al. 2007; Sleep 2015).

Enfin, les travaux sur les primates non humains utilisant des protéines de fusion d'érythropoïétine-Fc administrées dans les voies respiratoires où le FcRn est exprimé par les cellules épithéliales ont permis de rapporter une voie de transport fonctionnelle. Cette voie est dépendante du FcRn dans les poumons et peut être utilisée pour délivrer des protéines thérapeutiques (Bitonti et al. 2004; Spiekermann et al. 2002). Ainsi, l'ensemble de ces données montrent que le FcRn peut être utilisé comme cible et permet aussi de délivrer de manière non invasive des protéines bioactives en quantités thérapeutiques.

2.A.4 Recyclage et transcytose des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Le FcRn étant impliqué dans le recyclage et la transcytose des IgG, il est par conséquent susceptible de prendre en charge les Ac thérapeutiques dont le format est basé sur la structure des IgG. Cette nouvelle classe de médicaments a révolutionné la prise en charge de nombreuses pathologies et est à l'origine de l'explosion des connaissances sur le FcRn.

2.A.4.1 *Les anticorps monoclonaux thérapeutiques*

Depuis 1986 et la mise sur le marché du premier AcM thérapeutique, le muromonab, un Ac murin anti-CD3 connu sous le nom d'OKT3 (Cosimi et al. 1981), le nombre d'AcM a considérablement augmenté, passant de 26 à plus de 50 dans diverses indications (Reichert 2010; Kaplon and Reichert 2018). Les AcM sont majoritairement des IgG entières et dominant le marché biopharmaceutique. Ils représentent plus de la moitié des ventes totales de tous les produits biopharmaceutiques, avec un chiffre d'affaire de 85,4 milliards de dollars en 2015, ("Molecular Weight Marker Market Size | Industry Report, 2018-2025" n.d.). En 2020, il est prévu d'avoir sur le marché environ 70 AcM et en combinant les ventes mondiales cela devrait atteindre un chiffre d'affaire de près de 125 milliards de dollars. Par ailleurs, l'expansion des AcM s'est également accompagnée de l'arrivée d'une grande diversité de format d'Ac (Figure 15) comme les Ac conjugués (ADC, pour "Antibody Drug Congugated") à des toxines, des radionucléides ou d'autres molécules d'intérêt (Beck et al. 2017) et les protéines de fusion IgG-Fc. Dans le cadre de la thèse, nous n'aborderons que les formats en relation avec le FcRn, c'est-à-dire les molécules présentant une portion Fc d'IgG (Jafari et al. 2017).

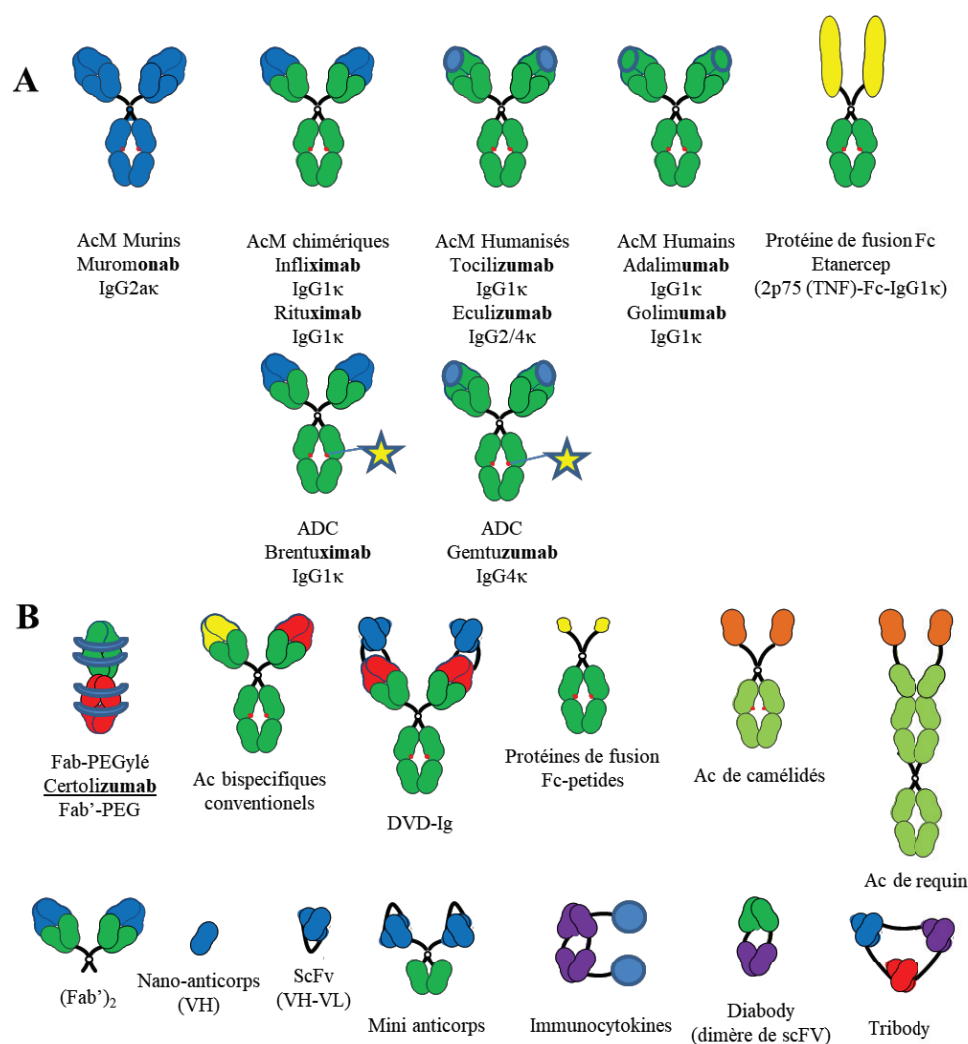


Figure 15 : Représentation schématique de différents formats d'Ac thérapeutiques sur le marché et en développement

(A) Exemples d'AcM et de protéines de fusion utilisés en clinique. (B) Le certolizumab est un exemple de Fab PEGylé utilisé en clinique, les autres formats sont en développement avec notamment des fragments d'Ac tri- ou tétra-valents, scFv ou diabodies, des Ac bispécifiques (conventionnels et DVD-Ig qui sont des bispécifiques tétravalents combinant les domaines variables de deux Ac monoclonaux liés par des "linkers" flexibles) et bien d'autres structures. A cela s'ajoutent les Ac naturels d'origine animale, de camélidés ou de certaines espèces de requins, constitués d'une simple chaîne lourde et d'un domaine unique (dAb, "single domain antibody"). (Dutertre and Teillaud 2006; Chames and Baty 2009; Dumet et al. 2018).

L'efficacité d'un Ac thérapeutique dépend de nombreux facteurs et en particulier des mécanismes par lesquels passent son action : i.e. la pharmacodynamique ("effets du médicament sur l'organisme") et des paramètres intervenant dans la pharmacocinétique ("effets de l'organisme sur le médicament"). Le FcRn prenant en charge les IgG et par conséquent les AcM, il représente un paramètre majeur de leur pharmacocinétique.

2.A.4.2 Pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques

La pharmacocinétique d'un médicament, notamment d'un Ac thérapeutique, consiste à caractériser le devenir de la molécule dans l'organisme. Elle permet de suivre l'évolution des concentrations d'Ac thérapeutiques en tenant compte des phénomènes d'absorption, de distribution et d'élimination, cette évolution peut être affectée par différents éléments tels que : le poids et le sexe du patient, l'immunogénicité et la glycosylation de l'AcM thérapeutique, la masse antigénique/l'inflammation, certains paramètres génétiques propres à chaque individu (polymorphismes des récepteurs Fc) et l'activité associée au FcRn (Figure 16) (Ternant and Paintaud 2005; Mould and Sweeney 2007).

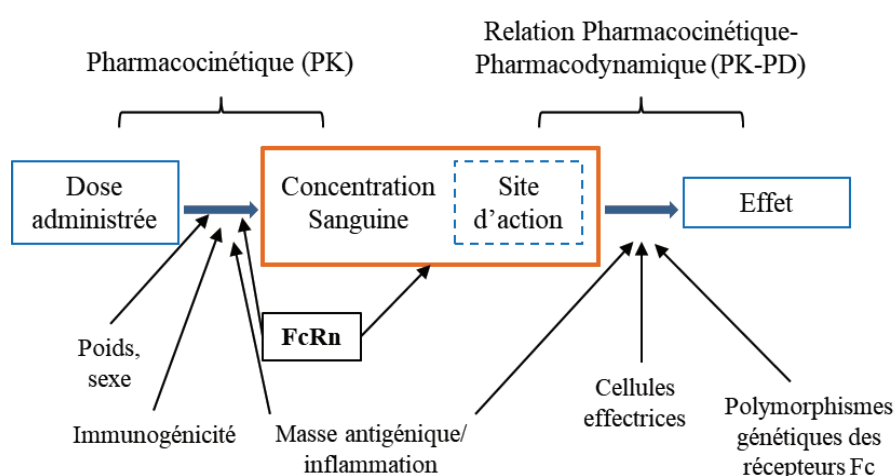


Figure 16 : Représentation schématique des éléments influençant la relation dose-réponse au cours d'un traitement par Ac thérapeutique, illustration tirée de (Goupille 2018).

La pharmacocinétique comprend généralement quatre phases : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination. Généralement, les AcM sont administrés par voie intraveineuse ou par voie intramusculaire. Ils présentent une pharmacocinétique non linéaire saturable avec la dose (Lobo, Hansen, and Balthasar 2004). Les mécanismes d'élimination des AcM sont très différents des médicaments "classiques", *i.e.* des molécules issues de la synthèse chimique. D'une part, ils subissent un catabolisme non spécifique, ce phénomène n'est pas saturable. D'autre part, les AcM sont éliminés après fixation sur leur cible. La quantité de cible étant par définition limitée, ce mode d'élimination des AcM est saturable. Le troisième mécanisme intervenant dans l'élimination des AcM est leur protection contre la dégradation grâce au FcRn. Aux concentrations thérapeutiques des AcM, ce phénomène n'est pas saturable. En termes de modélisation pharmacocinétique, l'élimination des AcM est donc habituellement

non linéaire et doit être décrite à la fois par des phénomènes non saturables et par des phénomènes saturables.

Sachant que le FcRn est responsable de la demi-vie des Ac thérapeutiques et de leurs dérivés, modifier leur pharmacocinétique représente un enjeu important dans le développement de nouvelles molécules. En effet, en altérant l'affinité des Ac pour le FcRn, leur biodisponibilité et donc leur efficacité peuvent être modifiées (Dall'Acqua, Kiener, and Wu 2006; Datta-Mannan et al. 2007). Les études portant sur les modifications susceptibles de jouer sur l'interaction Fc d'IgG-FcRn et qui impactent la pharmacocinétique des Ac sont rapportées dans le tableau suivant :

Type de modification des IgG altérant la PK	Modèle	Quels effets sur la PK des Ac?	Références
Mutations au niveau de la partie Fc (variants Fc) des IgG, les principaux variants sont : T250Q/M428L, V308P, M428L, M252Y/S254T/T256E, M428L/N434S, N434A, N434H	Modèles d'animaux : primates non humains et souris transgéniques	Affinité des IgG à pH6  et  ou absente à pH neutre  → amélioration de la demi-vie des Ac de 2 à 4 fois plus	(Hinton et al. 2004; Vaccaro et al. 2005; Hinton et al. 2006; Yeung et al. 2009; Deng et al. 2010; Datta-Mannan et al. 2007; Datta-mannan et al. 2012; Datta-Mannan et al. 2012)
Modification du motavizumab : obtention d'un AcM avec la modification 252Y/S254T/T256E	Sujets humains sains	 De la demi-vie de l'AcM et	(Robbie et al. 2013)
Oxydation ou mutations des résidus méthionine (M252, M358 et M428, résidus qui participent à l'interaction Fc-FcRn) dans des AcM thérapeutiques	Modèles <i>in vitro</i>	Altération de la liaison au FcRn 	(Bertolotti-Ciarlet et al. 2009; Pan et al. 2009)
	Modèle <i>in vivo</i> : souris transgéniques	 De la demi-vie de l'AcM	(Wang, Vlasak, et al. 2011)
Effets à distance : effet du Fab sur l'interaction du FcRn	Modèle <i>in vivo</i> : souris transgéniques	 De la demi-vie de l'AcM	(Wang, Lu, et al. 2011; Schoch et al. 2015)
Combinaison de modifications au niveau de la partie Fc (variants Fc) et de la glycosylation des IgG	Modèle <i>in vivo</i> : souris transgéniques	 De la demi-vie et de l'effet cytotoxique de l'AcM	(Monnet et al. 2014, 2015)
Effets des allotypes d'IgG	Modèle <i>in vivo</i> : patients traités par AcM thérapeutique	Affinité et demi-vie différentes en fonction de l'allotype d'IgG de l'AcM et du type d'allotype des IgG endogènes	(Ternant et al. 2016)

Tableau 7 : Principaux travaux portant sur l'impact de l'interaction IgG-FcRn sur la pharmacocinétique des Ac.

B. Rôle du FcRn dans la réponse immunitaire

De par son rôle dans le recyclage et la transcytose des IgG et de l'albumine, le FcRn a été considéré comme une protéine participant à l'immunité humorale et la protection des muqueuses de manière passive. Cependant, plus récemment, et grâce au développement des AcM thérapeutiques, de nouvelles études ont montré que ce récepteur joue un rôle actif insoupçonné dans la mise en place de la réponse immunitaire.

2.B.1 Rôle du FcRn dans la phagocytose

L'expression du FcRn par les phagocytes humains et murins (polynucléaires, monocytes, MΦ, cellules dendritiques) a été à l'origine des études sur la participation du FcRn dans le processus de phagocytose (X Zhu et al. 2001; Gestur Vidarsson et al. 2006). Ainsi, il a été observé que la phagocytose de pneumocoques opsonisés par des IgG était diminuée d'un facteur 4 dans des phagocytes issus de souris transgéniques (FcRn -/-) ou (β2M-/-). De façon similaire, l'utilisation d'IgG mutée (H435A) ne présentant pas d'affinité pour le FcRn, induit une diminution de la phagocytose des bactéries opsonisées. Il est important de noter que même si la phagocytose est diminuée, l'adhérence des bactéries à la surface des cellules n'est pas affectée, suggérant que seuls les Fcγ sont responsables de cette adhérence (Figure 17). D'un point de vue fonctionnel, il a été suggéré que les motifs tryptophane et dileucine présents dans la partie intracellulaire du FcRn pourraient interagir avec les protéines AP2 et participer à l'endocytose et au transport actif de corps étrangers à partir des endosomes précoces jusqu'aux endosomes de recyclage (Wernick, Haucke, and Simister 2005; Mahmoud et al. 2017). D'ailleurs, les complexes protéiques AP2 sont connus pour participer au recrutement de clathrines et de calmoduline afin de permettre la formation d'endosomes et ainsi, contribuer aux mécanismes de phagocytose (Rodemer and Haucke 2008; Traub 2009). Par ailleurs, ces résultats ont permis également d'expliquer pourquoi les agents pathogènes opsonisés par les IgA activant les phagocytes via les FcαRI, entraînaient un processus de phagocytose moins efficace que celui qui passe par les IgG (G Vidarsson et al. 2001; Stapleton et al. 2015).

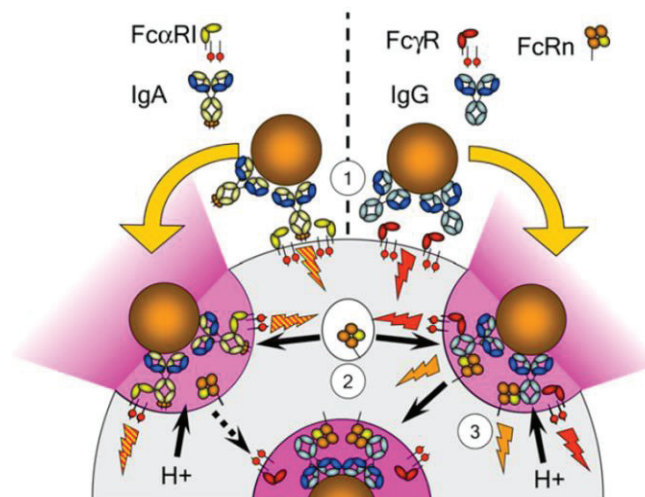


Figure 17 : Modèle potentiel du rôle du FcRn dans la phagocytose, d'après (Stapleton et al. 2015).

Les IgG (droite) et IgA (gauche) opsonisant les bactéries se fixent respectivement aux FcγR et FcαRI à la surface du polynucléaire neutrophile (1). Fusion des granules avec ceux des molécules de FcRn (2). Suite à la fusion, diminution du pH, les IgG perdent leur affinité pour les FcγR et se fixent au FcRn, ce qui facilite l'internalisation des bactéries opsonisées (3).

Le niveau d'expression du FcRn pourrait être impliqué dans le mécanisme de phagocytose. En effet, l'expression du FcRn par les monocytes humains est fortement régulée à la hausse lors de leur différenciation en cellules dendritiques immatures, puis régulée à la baisse quand ces cellules deviennent matures. Ceci serait directement en corrélation avec la capacité de ces cellules à endocyter et phagocyter les Ag (Stapleton et al. 2015).

L'ensemble de ces données indique que le FcRn est un acteur important dans le processus de phagocytose.

2.B.2 Rôle du FcRn dans la présentation des antigènes

La prise en charge des complexes immuns (IgG-Ag) par le FcRn exprimé par les cellules présentatrices d'Ag (CPA) telles que les cellules dendritiques, permet de mettre en place des mécanismes spécifiques de trafic des complexes d'IgG-Ag. Ainsi, les complexes immuns pourront intégrer les compartiments endo- et lysosomaux et à mesure que les vésicules " murissent " elles deviennent acides. Cette acidification va permettre aux complexes de se dissocier des FcγRs et favoriser la liaison au FcRn. Le FcRn ne permet pas la présentation de peptides, mais participe à l'intégration des Ag dans les compartiments intracellulaires des cellules dendritiques afin qu'ils puissent être traités et apprêtés par les molécules de l'histocompatibilité de classe I et II. Ainsi, il a été démontré *in vivo*, que le FcRn au sein des cellules dendritiques était primordial pour une présentation efficace des épitopes antigéniques

(OVA₃₂₃₋₃₃₉), complexés aux IgG, aux cellules T CD4 chez des souris transgéniques (OT-II) (Qiao et al. 2008). Ces résultats sont soutenus par les expériences utilisant des IgG "sauvages" ou des IgG portant une triple mutation IHH, qui suppriment la liaison au FcRn, mais préservent l'interaction des IgG avec les autres FcγR (Spiekermann et al. 2002). La présentation de l'Ag est supérieure avec les IgG "sauvages" qui permettent l'intervention du FcRn. Ces travaux ont également suggéré une amélioration de la présentation lorsque les complexes immuns sont multimériques et non pas monomériques. Il s'est avéré que l'adressage des complexes immuns est différent en fonction de la taille, où seuls les complexes multimériques semblent adressés au lysosome (Ward and Ober 2009). Il a été observé que la demi-vie des complexes immuns multimériques est inférieure à celle des complexes monomériques ou des IgG non complexées (Shreeram Akilesh et al. 2007).

En outre, le FcRn s'avère être également nécessaire pour la présentation croisée de peptides antigéniques. La présentation croisée étant le fait que des peptides antigéniques issus d'Ag exogènes habituellement présentés par les molécules de CMH II soient présentés par le CMH I (présentation de peptides endogènes) aux T CD8 pour les activer (Figure 18). Baker et al. ont décrit ce phénomène en 2011, en utilisant la présentation de faible concentration d'ovalbumine par les cellules dendritiques (CD8-/CD11b+) aux cellules T CD8 dans le modèle de souris transgéniques (OT-I) (Baker et al. 2011). Par ailleurs, l'utilisation de complexes immuns formés d'IgG portant la mutation N297A qui supprime la liaison aux FcγR mais préserve la liaison au FcRn, a permis de montrer que la présentation croisée dépendait aussi des FcγR en cohérence avec le rôle du FcRn dans la phagocytose (Gestur Vidarsson et al. 2006). Des résultats confortant ces données ont été publiés par la même équipe concernant la présentation croisée d'Ag tumoraux dans le cancer du côlon et du poumon à la fois chez la souris et l'Homme (Baker et al 2013).

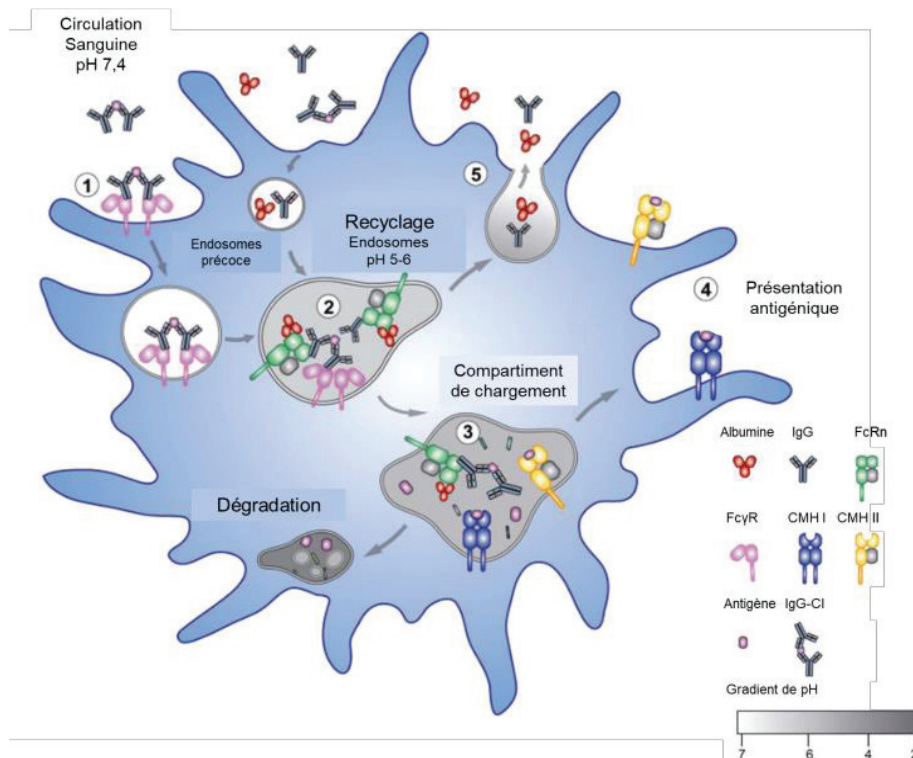


Figure 18 : Représentation schématique de la présentation antigénique par les cellules dendritiques, d'après (Knudsen Sand et al. 2015).

Les cellules dendritiques expriment à la fois le FcRn et les récepteurs FcγR classiques. (1) La liaison d'un complexe immunitaire (IgG-CI) aux FcγR exprimés en surface conduit à leur internalisation dans les endosomes précoces. (2) Après internalisation, il y a maturation et acidification des endosomes où les complexes immunitaires se fixent au FcRn. (3) Le FcRn dirige les complexes immunitaires vers les "compartiments de chargement" pour le traitement puis le chargement des peptides antigéniques sur le CMH I et le CMH II. (4) Par la suite, les molécules de CMH I et II chargées vont être dirigées vers la membrane plasmique pour la présentation des peptides aux cellules T. (5) Les ligands du FcRn sous forme de monomères peuvent être quant à eux recyclés par les cellules dendritiques.

2.B.3 Immunité des muqueuses et FcRn

Bien qu'il soit reconnu que les IgA sont les Ig majoritaires au niveau des muqueuses et qu'elles ont un rôle majeur dans l'immunité muqueuse, il n'en demeure pas moins que les IgG sont présentes dans ces tissus. Elles sont retrouvées à des concentrations de 300µg/ml dans les sécrétions nasales ou de 800µg/ml dans la lumière rectale (Kozlowski et al. 1997; Yoshida, Masuda, et al. 2006). L'acheminement des IgG depuis la circulation sanguine vers les muqueuses est permis grâce au FcRn. Le processus immunitaire mis en place repose sur la capacité du FcRn à permettre d'une part, la rencontre entre les IgG et les agents pathogènes au niveau des muqueuses et d'autre part, le transfert des complexes immunitaires au niveau de la *lamina propria*. Dans la muqueuse intestinale, les complexes peuvent se lier aux FcγRs à la

surface des cellules dendritiques et être internalisés. Ces CPA chargés en Ag vont migrer vers les ganglions lymphatiques drainants pour induire une réponse immunitaire. La liaison des complexes immuns au FcRn des cellules dendritiques induit la production de cytokines (ex : IL-12) par ces cellules. Les molécules de CMH chargées avec les Ag provenant des complexes immuns vont permettre l'activation de cellules T CD4 et/ou T CD8. L'IL-12 sécrétée peut agir d'une part sur les lymphocytes T CD4 activés pour induire une réponse TH1 et d'autre part sur les T CD8 afin de favoriser leur activation et cytotoxicité (Figure 19) (Yoshida, Kobayashi, et al. 2006; Rath et al. 2015). Ce processus d'immunité locale a été observé dans bien d'autres muqueuses, ce qui confère au FcRn un rôle important dans l'immunosurveillance des muqueuses (Bai et al. 2011; Li et al. 2011).

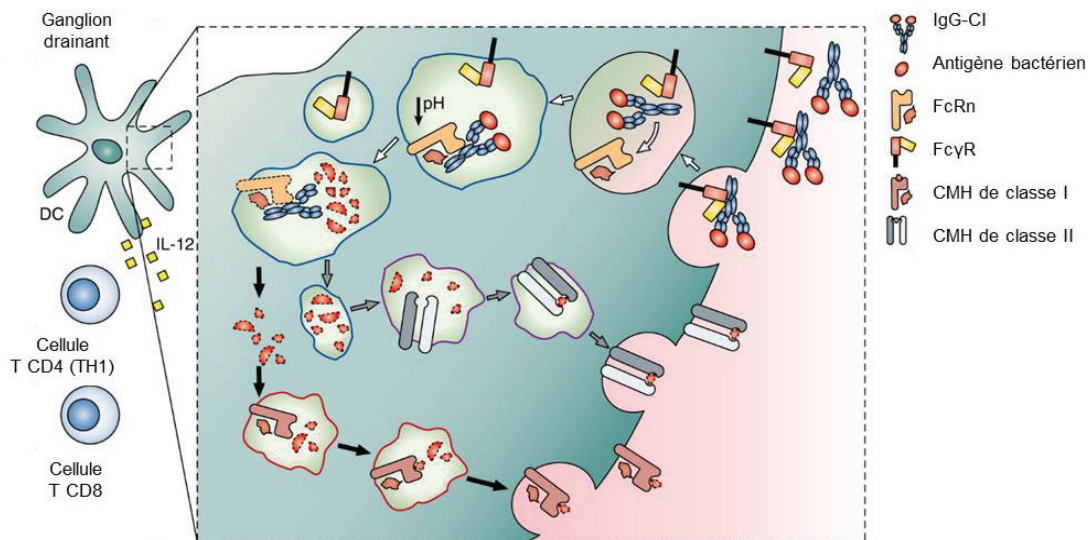


Figure 19 : FcRn et immunité des muqueuses, cas de la muqueuse intestinale, d'après (Pyzik et al. 2015).

Après la formation de complexes immuns constitués de bactéries et d'IgG anti-bactéries dans la lumière intestinale, le FcRn peut les retransférer dans la *lamina propria* où ils sont délivrés à des CPA, telles que les cellules dendritiques. Une fois les complexes immuns intégrés par les CPA, ces cellules vont migrer vers les ganglions lymphatiques drainants, afin de permettre la mise en place d'une réponse immunitaire.

2.B.4 Réponse immunitaire humorale

L'utilisation de modèles animaux transgéniques surexprimant le FcRn a révélé que ce récepteur était directement impliqué dans la réponse humorale. En effet, indépendamment de la demi-vie des IgG augmentée chez les animaux transgéniques, lors d'expériences d'immunisation, une augmentation significative des titres d'Ac et du nombre de cellules B spécifiques de l'Ag injecté ont été observés (Bender et al. 2007; Catunda Lemos et al. 2012;

Baranyi et al. 2013). De même, dans un modèle murin surexprimant du FcRn bovin, il a été constaté qu'une stimulation par des molécules faiblement antigéniques induisait une réponse humorale plus forte contre ces Ag que chez les souris sauvages (Végh et al. 2012). Une étude plus récente a permis de démontrer que cela était lié à une augmentation de la présentation des Ag par les CPA dans les organes lymphoïdes secondaires, entraînant une augmentation du nombre de cellules B spécifiques chez ces souris transgéniques (Schneider et al. 2015). Par ailleurs, cette étude démontre d'une part, que les cellules B spléniques expriment le FcRn, ce qui pourrait contribuer à une augmentation de l'activité de ces cellules et d'autre part, que la présentation des Ag par les cellules dendritiques impliquant le FcRn augmente significativement le nombre de cellules T helper, permettant ainsi une réponse hautement efficace contre une faible dose d'Ag.

2.B.5 Réponse immunitaire anti-tumorale

Plus récemment, les travaux de Baker et al. ont précisé le rôle du FcRn dans la réponse immunitaire lors du développement tumoral (Baker et al. 2013). Sachant que le FcRn est impliqué dans la présentation croisée des Ag et par conséquent dans l'activation des cellules T CD8, les auteurs se sont intéressés à l'implication du FcRn dans le développement tumoral dans différents modèles murins de cancer colorectal. Les résultats ont montré que les souris dépourvues de FcRn (FcRn $-/-$) étaient plus susceptibles de développer des cancers colorectaux que les souris sauvages (WT), que ce soit dans des modèles de cancer génétiquement (modèle de souris mutées pour le gène suppresseur de tumeurs APC, *Adenomatous Polyposis Coli*) ou chimiquement (exposition à l'azoxymethane associée ou non au dextran sulfate de sodium) induit. L'analyse du tissu digestif des souris révéla que le nombre de cellules T CD8 activées était plus important chez les souris sauvages que chez les souris déficientes en FcRn. Grâce aux expériences de transfert adoptif de cellules dendritiques (CD8 $-$ /CD11b $+$) de souris WT à des souris FcRn $-/-$ et inversement, ils ont décrit que le FcRn participait à la mise en place d'une réponse anti-tumorale via les cellules dendritiques qui activaient les T CD8. De plus, cette protection anti-tumorale FcRn-dépendante était également liée à la capacité des cellules dendritiques de souris sauvages à synthétiser l'IL-12, par comparaison aux cellules dendritiques de souris FcRn $-/-$, permettant l'amplification de la réponse cytotoxique des cellules T CD8. La sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques permet également l'activation des cellules T CD4 participant à l'induction d'une réponse humorale (Figure 20). Ces deux propriétés d'activation des T CD8 et de production d'IL-12 ont été confirmées sur des cellules dendritiques humaines obtenues à partir de monocytes.

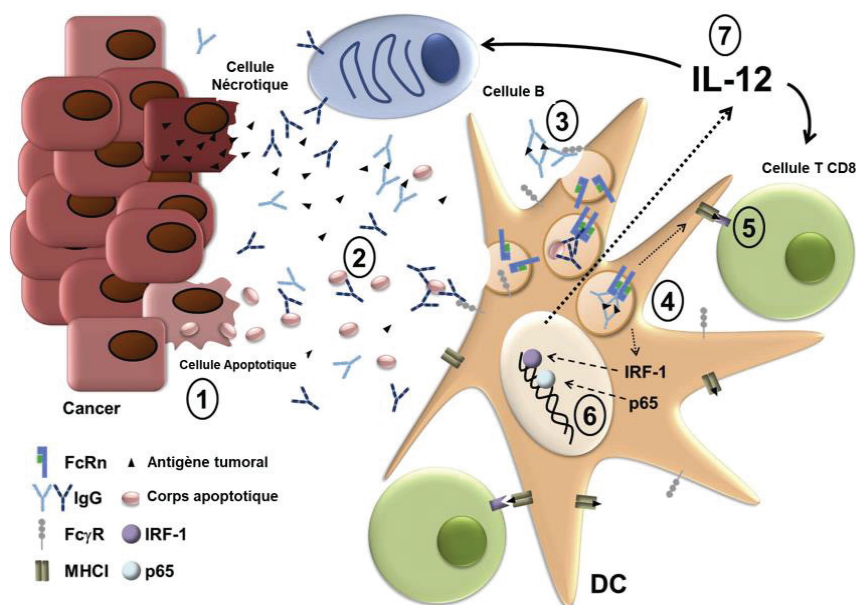


Figure 20 : Représentation schématique de l'implication du FcRn dans la réponse anti-tumorale, d'après (Baker et al. 2013).

(1) Les cellules cancéreuses peuvent libérer dans l'environnement tumoral des corps apoptotiques et des Ag tumoraux. (2) Ces derniers peuvent être reconnus par certaines IgG et former des complexes immuns. (3) Les cellules dendritiques présentes dans la *lamina propria* au niveau de la muqueuse intestinale expriment à la fois le FcRn et les récepteurs FcγR classiques. Ces cellules vont intégrer les Ag tumoraux. (4-6) La protection tumorale médiée par FcRn est provoquée par l'activation des lymphocytes T CD8 réactifs aux tumeurs endogènes, via les cellules dendritiques qui assurent la présentation croisée d'Ag complexés aux IgG, ainsi que par l'induction de la sécrétion de cytokines (IL-12). (7) Dans un contexte cytokinique favorable, la sécrétion d'IL-12 peut participer au recrutement de cellules T CD4, qui vont à leur tour permettre une réponse humorale contre la tumeur et amplifier l'activité des T CD8.

La participation du FcRn dans la tumorigenèse a été renforcée par les travaux de l'équipe de Sally Ward, rapportant une relation entre la perte de l'expression du FcRn et la hausse de la consommation d'albumine par la tumeur (Swiercz et al. 2016). L'albumine ne peut alors plus être recyclée par le FcRn, entraînant ainsi une augmentation de la croissance tumorale par son utilisation comme "carburant" par la cellule tumorale. L'inactivation de ce gène permet la digestion lysosomale de l'albumine, ce qui augmente les niveaux de glutamate intracellulaire et améliore la croissance des cellules tumorales. À l'inverse, les lignées de cellules tumorales transfectées avec le gène *FCGRT* réduisaient à la fois les taux d'absorption de l'albumine et de glutamate intracellulaire et, *in fine*, la croissance tumorale dans les modèles de xénogreffes de souris. Les auteurs sont allés jusqu'à identifier le FcRn comme un gène suppresseur de tumeur.

Contexte et objectifs de la thèse

Le FcRn ou récepteur néonatal pour la portion Fc des IgG, est un récepteur « clé » qui prolonge la demi-vie des IgG et des anticorps thérapeutiques et assure leur biodistribution dans les tissus. Plus récemment, son rôle s'est étendu à la réponse immunitaire humorale et cellulaire, soulevant de nouvelles questions concernant son implication dans la physiopathologie de certaines maladies comme le cancer.

Les principaux travaux ont révélé, d'une part, que le FcRn exprimé par les cellules présentatrices d'antigène intervient dans la phagocytose et la présentation croisée des complexes immuns aux lymphocytes T CD8 (Qiao et al. 2008; Baker et al. 2011; Xindong Liu et al. 2011; Baker et al. 2014a). De façon intéressante, le nombre de cellules dendritiques exprimant le FcRn est corrélé à la survie des patients atteints d'un cancer du côlon (Baker et al. 2013). D'autre part, la surexpression du FcRn chez des souris transgéniques améliore la réponse immunitaire humorale et l'expansion des lymphocytes B spécifiques de l'antigène. Enfin, la perte de l'expression du FcRn induit la croissance des cellules tumorales, via la consommation de l'albumine non recyclée par la tumeur (Swiercz et al. 2016). Ainsi, une altération du niveau de l'expression du FcRn par les cellules néoplasiques et/ou par les cellules du microenvironnement tumoral aurait des conséquences dans l'induction et le développement tumoral.

Mon projet de thèse a donc eu pour objectifs :

1) d'étudier l'expression du FcRn dans les tumeurs pulmonaires chez l'Homme.

Ce travail a été initié avant mon arrivée au laboratoire dans le cadre d'une collaboration entre l'Inserm UMR1100 et l'unité CNRS GICC/EA7501 de Tours et l'Université d'Athènes. Nous avons entrepris d'étudier l'expression du FcRn dans les tissus cancéreux issus d'une cohorte de patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (n° DC-2008-308 – cohorte des hôpitaux de Tours), car le poumon est un organe exprimant le FcRn et que ce cancer est l'un des plus fréquents. L'expression du FcRn a été évaluée au niveau de l'ARN messager par RT-PCR quantitative et au niveau protéique par western blot et immunohistochimie. Les données d'expression de cette étude et celles provenant de bases de données publiques (Oncomine) ont été analysées avec les données cliniques et ont montré que le FcRn pourrait être utilisé comme un marqueur pronostique du cancer du poumon. Ces résultats ont été publiés dans Oncotarget :

Emilie Dalloneau, Nadine Baroukh, Konstantinos Mavridis, Agnès Maillet, Fabien Gueugnon, Yves Courty, Agnès Petit, Thomas Kryza, Maguy Del Rio, Serge Guyetant, Diana Carolina Cadena Castaneda, Christine Dhommée, Christophe Arnoult, Andreas Scorilas,

Valérie Gouilleux-Gruart, and Nathalie Heuzé-Vourc'h. Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non-small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis. *Oncotarget*, 2016.

2) d'étudier l'impact de l'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral sur la tumorigénèse et la réponse immunitaire anti-tumorale.

Pour explorer l'impact du niveau d'expression du FcRn dans la tumorigénèse, nous avons utilisé le modèle murin syngénique de « métastases expérimentales pulmonaires » induites par l'injection par voie intraveineuse des mélanocytes malins B16F10 (qui expriment le FcRn). Les cellules ont été injectées chez des souris WT et des souris déficientes en FcRn (FcRn $-/-$) pour mimer une répression du FcRn par le microenvironnement tumoral. L'effet du niveau d'expression du FcRn sur la charge tumorale a été quantifié macroscopiquement ; celui sur la réponse immunitaire anti-tumorale par un immunophénotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux au niveau du site tumoral (poumon) et en périphérie (rate). En accord avec les résultats de Baker et al. (Baker et al. 2013) nous avons observé un impact de la répression du FcRn sur la croissance tumorale dans ce modèle et montré pour la première fois l'implication du FcRn dans le développement et la maturation des cellules NK. Ces résultats ont été publiés dans *Frontiers in Immunology* : **Diana Cadena Castaneda**, Christine Dhommée, Thomas Baranek, Emilie Dalloneau, Laurie Lajoie, Alexandre Valayer, Christophe Arnoult, Marie-Véronique Demattéi, Delphine Fouquet, Christelle Parent, Nathalie Heuzé-Vourc'h and Valérie Gouilleux-Gruart. Lack of FcRn impairs natural killer cell development and functions in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 2018.

Les résultats de ces deux publications vont être présentés successivement, puis commentés de manière globale dans la discussion générale.

Résultats

Première partie : La diminution du niveau d'expression du FcRn dans les tumeurs de patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules est associée à un mauvais pronostic. (Travail collaboratif)

Article n° 1

Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non- small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis.

Emilie Dalloneau, Nadine Baroukh, Konstantinos Mavridis, Agnès Maillet, Fabien Gueugnon, Yves Courty, Agnès Petit, Thomas Kryza, Maguy Del Rio, Serge Guyetant, **Diana Carolina Cadena Castaneda**, Christine Dhommée, Christophe Arnoult, Andreas Scorilas, Valérie Gouilleux-Gruart*, Nathalie Heuzé-Vourc'h*. *Oncotarget*. 2016

* Contribution identique à l'étude

Introduction

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde et peut être divisé en deux types, les cancers non à petites cellules et les cancers à petites cellules, représentant respectivement, 80% et 20% des cancers du poumon. En France, le cancer du poumon se place à la quatrième position derrière ceux de la prostate, du sein et du colon-rectum, en terme d'incidence ("Cancer Du Poumon | Ligue Contre Le Cancer" n.d.). En revanche, il constitue la première cause de décès chez l'Homme et la deuxième chez la femme. Les traitements des cancers, dont le cancer du poumon, sont en général lourds et présentent des variabilités interindividuelles quant à leur efficacité. C'est pourquoi il est nécessaire d'effectuer une surveillance régulière pour détecter les signes d'éventuelles rechutes et prendre en charge les potentiels effets secondaires. Notamment, dans la littérature, l'importance de la réponse immunitaire anti-tumorale dans le suivi du cancer pulmonaire est bien décrite (Domagala-Kulawik 2015). Ainsi, la détection de certaines cellules immunitaires infiltrant le tissu tumoral peut être associée à une évolution clinique favorable (cellules dendritiques, cellules TCD8, TCD4, lymphocytes B, NK/NKT) ou alors à une évolution défavorable (cellules Treg) dans la rémission du cancer (Jochems and Schlom 2011; Alifano et al. 2014; Germain et al. 2014). Par ailleurs, l'expression de certains marqueurs peuvent également apporter une information sur l'évolution clinique positive ou négative du cancer (Qi, Li, and Kang 2014; Fucikova et al. 2016). Le FcRn a la particularité d'être exprimé dans différents tissus et types cellulaires, comme les cellules hématopoïétiques. L'expression du FcRn au niveau pulmonaire a été rapportée dans différentes études avec néanmoins certaines divergences. Chez l'Homme, l'étude de Spiekerman et al. (Spiekermann et al. 2002) a décrit l'expression du FcRn par Western-Blot et immunohistochimie dans l'épithélium bronchique (anticorps anti- FcRn : Ab 176/190–1). Alors que l'étude plus récente de Latvala et al., utilisant exclusivement la technique d'immunohistochimie, montre uniquement un marquage du FcRn dans les MΦ alvéolaires et dans les cellules de l'endothélium vasculaire (Latvala et al. 2017). Les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques n'exprimeraient pas le FcRn (anticorps anti-FcRn : Novus NBP 1-89128). Ces différences pourraient relever de l'utilisation de différentes techniques et d'anticorps anti-FcRn n'ayant peut-être pas la même sensibilité. Malgré cette divergence, les deux études concordent sur l'expression du FcRn au niveau du tissu pulmonaire.

Ce récepteur est connu pour participer au recyclage et à la transcytose des IgG au niveau des muqueuses, permettant ainsi d'apporter une protection immunitaire contre certains agents pathogènes. (Yoshida, Masuda, et al. 2006; Yoshida, Kobayashi, et al. 2006; Bai et al. 2011) . Il est également impliqué dans certains processus importants de la réponse immunitaire (Stapleton et al. 2015) . De ce fait, il pourrait être considéré comme marqueur d'activité tumorale.

Des études plus récentes ont permis d'attribuer des fonctions supplémentaires au FcRn. Notamment, une implication dans la réponse anti-tumorale. D'après les travaux de Baker et al., dans le cancer colique, le nombre de cellules dendritiques exprimant FcRn est diminué dans le microenvironnement tumoral. Cette diminution affecte la présentation croisée des complexes immuns dépendante du FcRn, par les cellules dendritiques aux lymphocytes T CD8. Les auteurs ont démontré un lien entre le nombre de cellules dendritiques infiltrant le tissu tumoral et exprimant FcRn et la survie des patients dans le cancer colorectal (Baker et al. 2013).

Sur la base de ces données, nous avons réalisé une étude rétrospective sur une cohorte de cancer pulmonaire non à petites cellules afin d'évaluer la valeur pronostique de l'expression du FcRn dans ce type de cancer.

Nous avons (CEPR/Inserm U1100 et GICC/CNRS UMR7292) eu accès à des échantillons tumoraux et non tumoraux (adjacente à la tumeur) de 80 patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules (n° DC-2008-308, cohorte du CHU de Tours). L'expression du FcRn a été explorée au niveau de l'ARNm par RT-PCR quantitative et au niveau protéique par western-blot et immunohistochimie (Anti-FcRn Novus NBP 1-89128). L'analyse statistiques des données cliniques et de l'expression du FcRn a été réalisée en collaboration avec une équipe de recherche grecque de l'université d'Athènes (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Greece) afin d'évaluer la valeur pronostique et prédictive du FcRn dans le cancer pulmonaire. L'ensemble des analyses a été effectué conformément aux normes d'éthique selon la déclaration d'Helsinki et des autorités françaises de la bioéthique.

Résultats principaux

Notre étude a montré pour la première fois que l'expression du FcRn était dérégulée dans la zone tumorale par comparaison à la zone « saine » entourant la tumeur d'un même patient dans le cas du cancer pulmonaire non à petites cellules (Figure 1). Ces résultats sont en lien avec les données de Baker et al., qui ont montré une diminution de l'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral dans le cas du cancer colorectal chez l'Homme (Baker et al. 2013).

Au sein des échantillons de cancer du poumon non à petites cellules, l'expression du FcRn a été principalement détectée dans certaines cellules immunitaires (MΦ alvéolaires et cellules dendritiques, Figure 2). Dans le tissu pulmonaire, on note une faible expression au niveau des cellules épithéliales, qui n'est pas retrouvée dans les cellules cancéreuses pulmonaires. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Lavtala et al., (Latvala et al. 2017) qui ont par ailleurs utilisé le même anticorps que dans notre étude et par ceux de l'équipe de S. Ward qui a montré une diminution d'expression du FcRn dans des cellules tumorales (Swiercz et al. 2016).

Enfin, les études statistiques ont permis d'établir que l'expression du transcrit FcRn (ARNm du *FCGRT*) pouvait être utilisé comme marqueur pronostique favorable pour ce type de cancer, indépendamment des autres paramètres cliniques (Figure 3, Tableau 1). Cette observation est valable à la fois pour l'analyse des tissus cancéreux et non cancéreux. Ces résultats ont été validés sur des données issues des bases de données publiques, ainsi que par les méta-analyses pour d'autres cohortes du même type de cancer (Figure 4, Tableau 2). L'évaluation de la valeur pronostique de l'expression du transcrit FcRn en fonction du classement des patients a également été effectuée. Deux sous-groupes de patients dits à « faible risque » ont été concernés par cette analyse, ceux classés au stade précoce (I/II) de la pathologie et ceux caractérisés pour ne pas présenter de métastases (Données supplémentaires Tableau S2). Les résultats dans les différents sous-groupes ont révélé que la valeur pronostique du FcRn continuait à être valable, alors que les patients sont à des stades différents de l'évolution de la pathologie.

L'ensemble de ces résultats a permis de révéler l'intérêt de l'utilisation de l'expression du FcRn comme marqueur pronostique dans le suivi des patients.

Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non-small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis

Emilie Dalloneau^{1,2}, Nadine Baroukh³, Konstantinos Mavridis⁴, Agnès Maillet^{1,2}, Fabien Gueugnon^{1,2}, Yves Courty^{1,2}, Agnès Petit^{1,2}, Thomas Kryza⁵, Maguy Del Rio⁶, Serge Guyetant^{1,2}, Diana Carolina Cadena Castaneda³, Christine Dhommée³, Christophe Arnoult³, Andreas Scorilas⁴, Valérie Gouilleux-Gruart^{3,7,*}, Nathalie Heuzé-Vourc'h^{1,2,*}

¹Université François Rabelais, UMR 1100, Tours, France

²INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, UMR 1100, Tours, France

³Université François Rabelais de Tours, CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece

⁵Institute of Health and Biomedical Innovation, Translational Research Institute, Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland, Australia

⁶Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), INSERM U1194, Montpellier, France

⁷CHRU de TOURS, Laboratoire d'Immunologie, Tours, France

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Nathalie Heuzé-Vourc'h, **email:** nathalie.vourch@med.univ-tours.fr

Keywords: FcRn, non-small cell lung cancer, prognosis, marker, antitumor immunity

Received: October 28, 2015

Accepted: May 14, 2016

Published: June 15, 2016

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide. Although the recommended tumor, node and metastasis (TNM) classification and stage determination are important to select therapeutic options for patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC), additional molecular markers are required to indicate the prognosis, in particular within a specific stage, and help with the management of patients.

Because neonatal Fc receptor (FcRn) has recently been involved in colon cancer immunosurveillance, we measured its expression in non-cancerous and NSCLC lung tissues and evaluated its prognostic value in overall survival for patient with NSCLC. FcRn expression was determined at both mRNA and protein levels on cancerous and adjacent non-cancerous tissues from 80 NSCLC patients. In NSCLC, FcRn was mainly found in resident and tumor infiltrating immune cells. The corresponding mRNA and protein were significantly less abundant in lung tumor than non-cancerous tissue. Moreover, analysis of our cohort and datasets from the public data bases show that *FCGRT* mRNA down-regulation is a robust and independent, unfavorable predictive factor of NSCLC patient survival. We conclude that *FCGRT* mRNA expression may be a useful additional marker for immunoscore, reflecting tumor immune system, and help in the decision-making process for NSCLC patients.

INTRODUCTION

Lung carcinogenesis is complex, involving both neoplastic cells and the tumor microenvironment. Today, the complex interplay between the immune system and lung tumor is well documented [1]. The quality of antitumor immune responses relies on lymphocytes, macrophages and granulocytes. Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (CTL),

CD4⁺ T lymphocytes, B-lymphocytes and natural killer (NK)/natural killer T (NKT) cells, are known to play a major role in the cytotoxic attack against tumor cells. The success of this attack depends partly on an effective antigen presentation by tumor cells and antigen presenting cells (APC), including macrophages and dendritic cells (DC). As documented in various solid tumors, the nature, the density and the location of immune cells correlate with

cancer patient prognosis. In non-small cell lung cancer (NSCLC), mature DC and follicular B-cell density, and infiltration of CD8⁺ T cells correlate with a better clinical outcome [2, 3]. Interestingly, molecular changes, related to antitumor immune response, may also constitute prognosis biomarkers. For example, high expression of calreticulin, which participates to the immunogenic cell death and antigenicity of tumor cells, constitutes a favorable molecular prognosis biomarker in NSCLC [4].

FcRn belongs to the family of receptors for the Fc portion of IgG and is encoded by *FCGRT*. FcRn is expressed in many cells and tissues throughout life. It is found in endothelial and epithelial cells from various organs (including placenta, lung, intestine and brain) where it participates in the recycling and transcytosis of IgG [5, 6]. This contributes to the long half-life of IgGs in biological fluids and their distribution in the human body [5, 7–9]. Aside from these well-known biological functions, FcRn is also involved in the humoral immune response: present in the epithelia of mucosa, FcRn is important for the host immune response against both bacteria and viruses [10–13]. FcRn allows virus-specific IgG to bind with pathogens in epithelial cell endosomes where it neutralizes virus [13]. FcRn in immune cells, in particular dendritic cells, macrophages, monocytes [14] and neutrophils [15], is involved in antigen presentation and cross-presentation by dendritic cells [16, 17]. Recently, FcRn has been shown to play a pivotal role in anti-tumor immunity. Indeed, FcRn mediated tumor protection through DC activation of endogenous tumor-reactive CD8⁺-T cells via the cross-presentation of IgG complexed antigens, in a colorectal cancer model, using *fcgrt* knock-out mice [18]. Moreover, the density of FcRn-expressing DC correlated with CD8⁺ T cell numbers and predicted improved prognosis in human colorectal carcinoma.

Based on these results, we conducted a retrospective study in several NSCLC cohorts, to evaluate the prognosis value of FcRn expression in lung cancer: the lung is one of the major organs expressing FcRn and lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality [19]. Herein, we showed for the first time that *FCGRT* mRNA is down-regulated in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients and that *FCGRT* mRNA levels in both NSCLC and adjacent non-cancerous tissues are independently positively correlated with prognosis. We found that FcRn was mainly expressed by resident and tumor-infiltrating immune cells, in the lung, indicating that *FCGRT* mRNA level might reflect lung antitumor immune response.

RESULTS

FCGRT mRNA is down-regulated in NSCLC tissue

FCGRT mRNA was assayed by qRT-PCR in cancerous and non-cancerous samples from patients with

NSCLC (Figure 1A). Mean *FCGRT* mRNA levels were significantly lower in the cancerous (mean $\pm$ SE = 0.727 $\pm$ 0.080) than non-cancerous (mean $\pm$ SE = 2.95 $\pm$ 0.12) tissue. *FCGRT* mRNA levels were lower in 95% (76/80) of the NSCLC than paired non-cancerous tissues ($P < 0.001$). The median *FCGRT* mRNA values were 6-fold lower in the cancerous than non-cancerous samples (median tumor = 0.482, median adjacent normal tissue = 2.89; $P < 0.001$) (Figure 1B). Similarly, western blotting of pooled protein extracts from different patients, chosen randomly, showed that the amount of FcRn (normalized to α -tubulin) was much lower in cancerous than non-cancerous tissue (Figure 1C). Using a cut-off value of 1.66 expression units, the relative *FCGRT* mRNA levels in cancerous and non-cancerous tissues showed a sensitivity of 93.7% and a specificity of 92.5%, (Figure 1D). ROC analysis of *FCGRT* mRNA levels (Figure 1D) produced a notable AUC of 0.934 (SE = 0.024, 95% CI = 0.884 – 0.967, $P < 0.001$). At fixed sensitivities of 90.0% and 95.0%, specificity values were 92.50% and 87.50%, respectively. At fixed specificities of 80.0% and 90.0%, sensitivity values were 97.50% and 93.75%, respectively. Findings for stage I specimens were similar: the difference in expression was 5-fold ($P < 0.001$), and the corresponding ROC curve analysis generated an AUC of 0.947 (95% CI = 0.905 – 0.989, $P < 0.001$) (Figure 1E). Similarly, the discriminatory capacity of FcRn was also robust for stage>I patients (AUC = 0.923, 95% CI = 0.862 – 0.983, $P < 0.001$). Using a cut-off value at 1.66 expression units, we can distinguish cancerous tissues from non-cancerous with a strong efficiency; this holds true even for early stage (stage I) patients for whom *FCGRT* mRNA expression analysis offers important differential diagnostic information indicating that it could enhance the accuracy of trans-bronchial needle aspirations or small biopsies. No significant association was found between *FCGRT* mRNA levels in cancerous tissues and clinic-pathological features (Supplementary Table S1).

Expression of FcRn in NSCLC patients is mainly attributed to immune cells

The distribution of FcRn protein has been studied in the normal lungs of various species and is restricted to bronchial epithelial cells and alveolar macrophages in humans [20]. NSCLC originate mainly from epithelial bronchial cells (and in some cases from epithelial alveolar cells), so we tested for FcRn expression by immunohistochemistry (see supplemental results for IHC validation) in a small set of cancerous and non-cancerous lung tissues. We detected FcRn in alveolar macrophages and at very low levels in the bronchial epithelium of the non-cancerous tissue (Figure 2). In tumor samples, it was very low in neoplastic cells while mainly detected in large cells, located in immune islets, in the stromal and peri-vascular compartment (Figure 2). Staining for CD8 (CD8⁺ T cells),

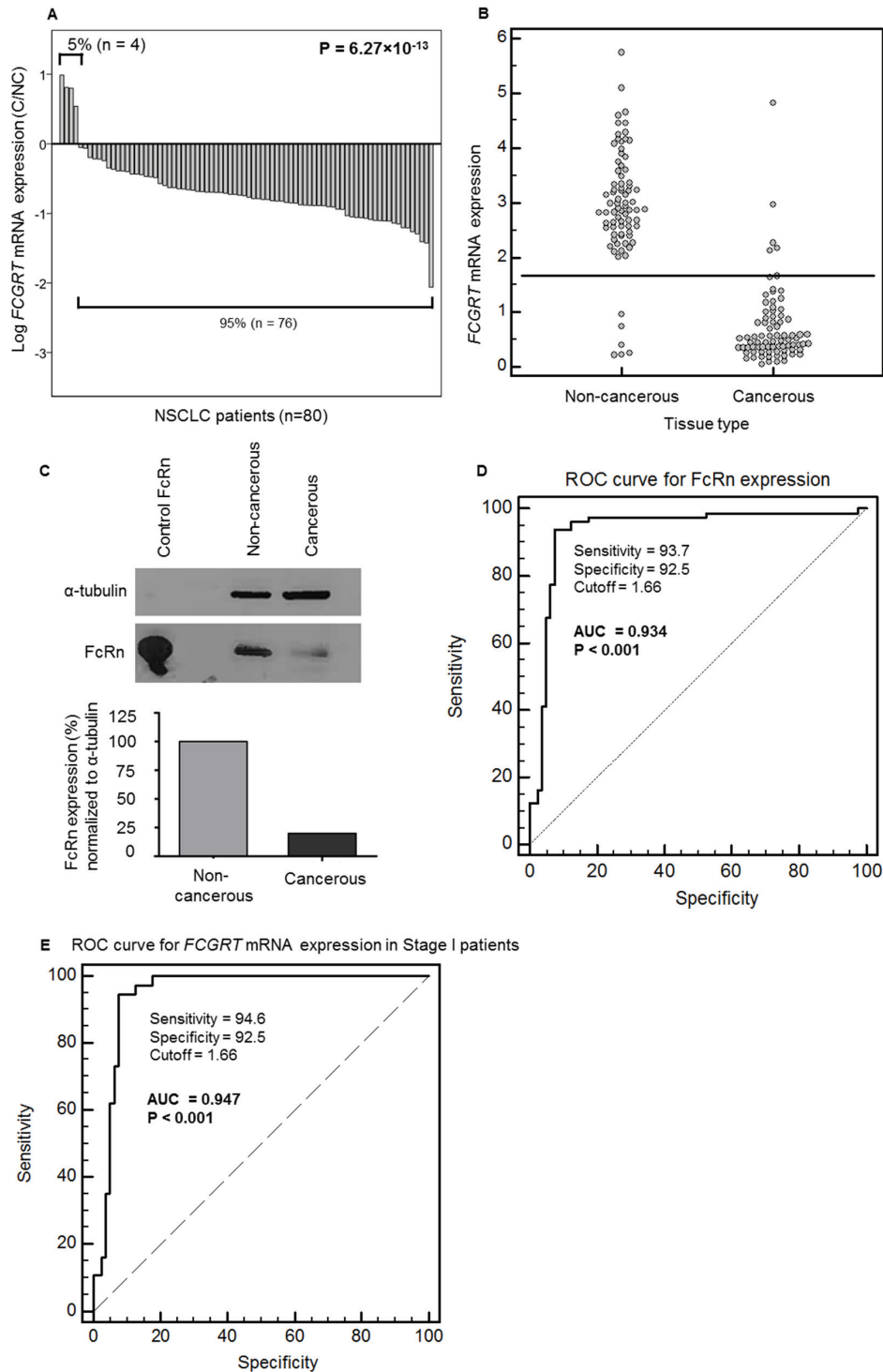


Figure 1: A. Ratios of *FCGRT* mRNA in cancerous (C) / non-cancerous (NC) in paired tissues from the NSCLC patients (n=80; $P = 6.27 \times 10^{-13}$, Wilcoxon Signed Ranks test). B. Distribution of *FCGRT* mRNA levels in non-cancerous and cancerous tissues (n=80; $P = 2.54 \times 10^{-21}$, Mann-Whitney test). C. Representative image of FcRn protein revealed by western blotting in a pool of 10 patients with matched cancerous and adjacent non-cancerous tissue. Recombinant human FcRn protein was loaded as a positive control. Signals were quantified with ImageJ and normalized to that for α-tubulin. D. ROC curve analysis for *FCGRT* mRNA level in cancerous and non-cancerous lung tissue samples. n= 80, AUC = 0.934, SE = 0.024, 95% CI = 0.884 – 0.967, $P < 0.0001$, calculations according to DeLong *et al.*, 1988. Youden index J = 0.863 (95% CI = 0.775 – 0.925, BCa bootstrap interval, 1000 iterations). E. ROC curve analysis for *FCGRT* mRNA levels in stage I cancerous and in non-cancerous tissues (n=37; AUC = 0.947, 95% CI = 0.905 – 0.989, $P < 0.001$, calculations according to DeLong *et al.*, 1988. Youden index J = 0.871 (95% CI = 0.771 – 0.938, BCa bootstrap interval, 1000 iterations).

CD163 (macrophages) or PS100 (dendritic cells) on serial sections revealed that they were macrophages and dendritic cells (Figure 2), as previously described by Baker *et al.* in human colorectal carcinomas [18].

Prognostic value of *FCGRT* mRNA in NSCLC patients

FCGRT mRNA in cancerous tissues is associated with a favorable prognosis

Baker *et al.* showed that the frequency of specific FcRn-positive cells correlated with survival in colorectal

carcinoma [18], so we evaluated the predictive value of testing for FcRn in cancerous and non-cancerous lung tissues. The predictive value of FcRn for NSCLC patient survival was evaluated by analyzing *FCGRT* mRNA expression (high or low) in cancer tissues. The survival of NSCLC patients classified as *FCGRT*-high (62.0 months (SE = 6.9)) was better than that of *FCGRT*-low patients (37.3 months (SE = 3.3); $P = 0.046$ Kaplan-Meier analysis) (Figure 3A); this was also shown by univariate Cox regression analysis (HR = 0.362, 95% CI = 0.127 – 1.03, $P = 0.057$) (Table 1). Multivariate Cox regression analysis, adjusted for significant clinicopathological variables, identified *FCGRT* mRNA expression in the cancerous

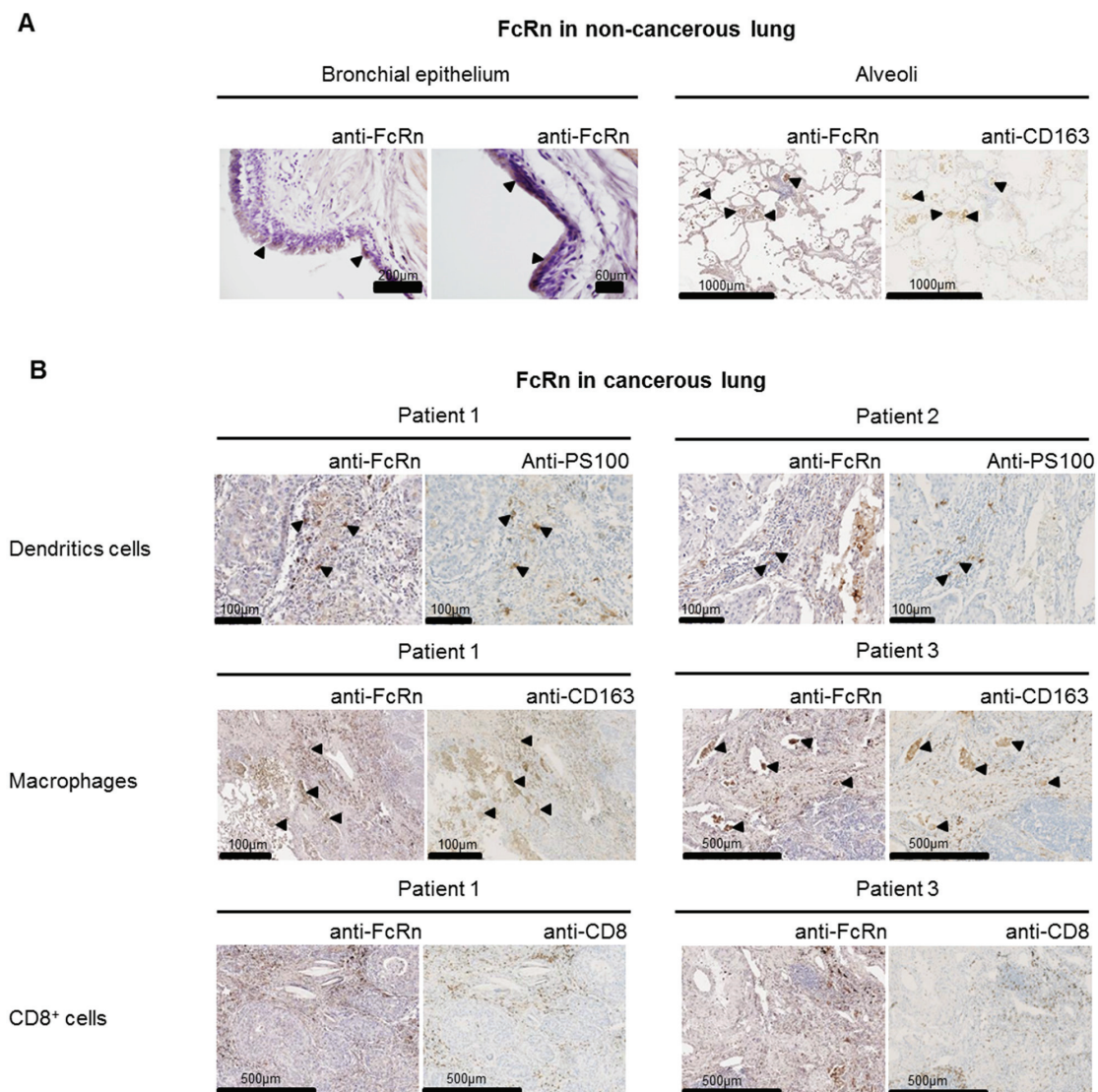


Figure 2: Expression of FcRn in non-cancerous A. and cancerous B. serial lung sections from a small set of patients (n=8). (A) FcRn expression was very weak in bronchial epithelial cells (left panel) and marked in alveolar macrophages (right panel) in the non-cancerous lung. (B) In cancerous tissue, the staining revealed that FcRn is expressed in interstitial stromal cells including DCs (PS100), macrophages (CD163) (arrowheads indicate areas of colocalization) but no CD8⁺ T cells (CD8). A very weak staining was also observed in carcinomatous cells. Pictures from 3 patients were selected as they are representative of the different staining.

tissues as an independent indicator of favorable prognosis for NSCLC patients (HR = 0.332, 95% CI = 0.112 – 0.983, P = 0.047) (Table 1).

***FCGRT* mRNA in non-cancerous tissues is also an independent predictor of survival for NSCLC patients**

Taking into consideration the recently described role of FcRn in the anti-tumor immune response [18],

and the prognostic gene expression signatures that can be derived from tumor-adjacent tissue parts as previously reported for several human malignancies [21, 22], we sought to evaluate the predictive value of *FCGRT* mRNA expression in non-cancerous tissues obtained from NSCLC patients. High *FCGRT* mRNA levels in the non-cancerous specimens were associated (P = 0.005) with favorable prognosis (Figure 3B), whereas

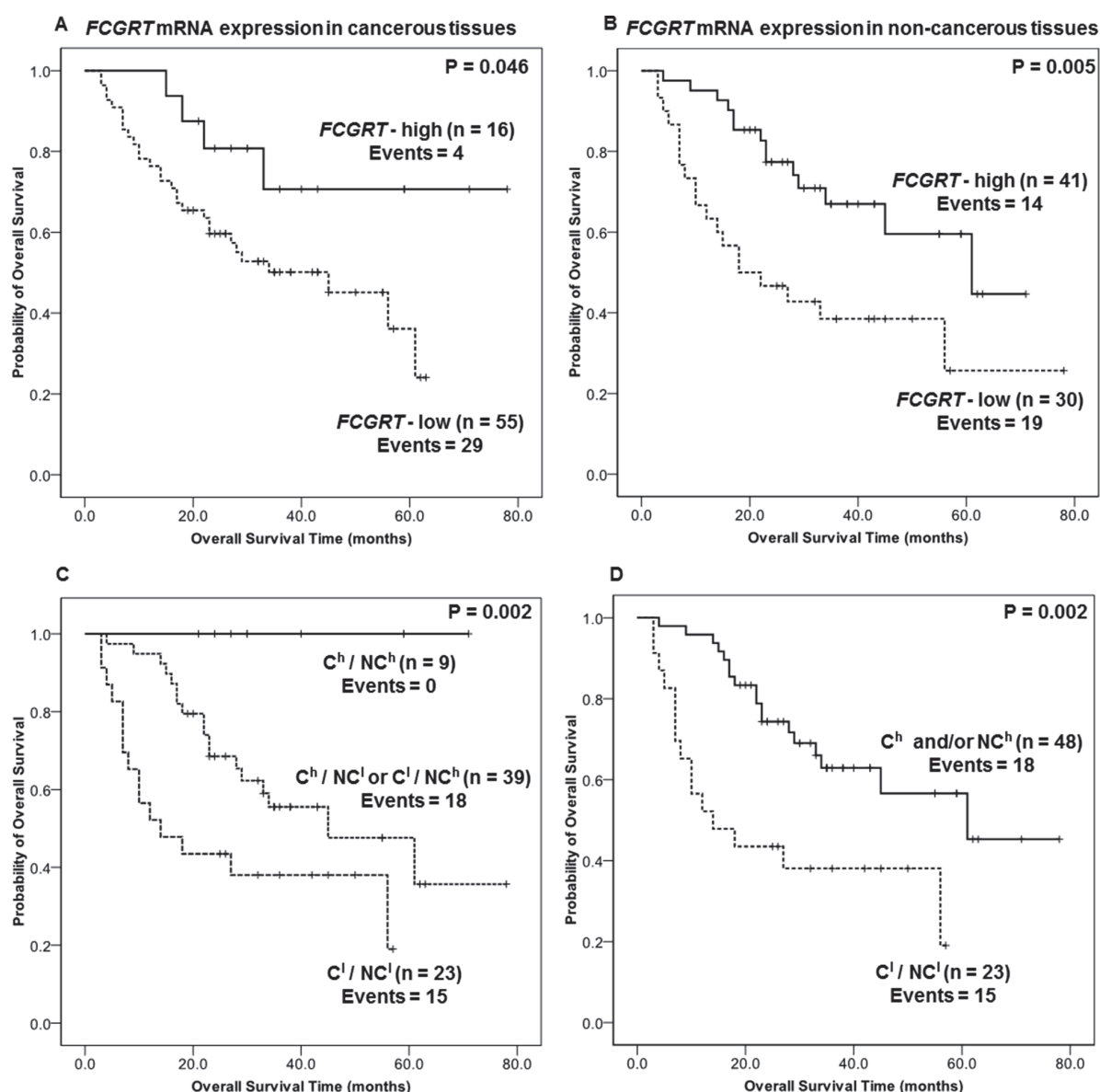


Figure 3: A. Kaplan-Meier overall survival analyses for *FCGRT* mRNA level in cancerous tissue from NSCLC patients (n=71). Cut-off value = 0.888 (74th percentile of *FCGRT* mRNA abundance in cancerous samples). B. Kaplan-Meier overall survival analysis for *FCGRT* mRNA level in non-cancerous tissue from NSCLC patients (n=71). Cut-off value = 2.82 (43th percentile of *FCGRT* expression in normal tissues). C-D. Kaplan-Meier overall survival analysis for NSCLC patients stratified according to *FCGRT* mRNA level in cancerous and non-cancerous (n=71). (C) C^h / NC^h : Patients with high *FCGRT* mRNA levels in both tissue parts. C^h / NC^l or C^l / NC^h : Patients with high *FCGRT* mRNA expression only in the cancerous or the non-cancerous tissue, respectively. C^l / NC^l : Patients with low *FCGRT* mRNA levels in both tissue parts (n=71). (D) C^h and/or NC^h : Patients with high *FCGRT* mRNA levels in at least one tissue part (cancer and/or non-cancerous tissues n=71). C^l / NC^l : Patients with low *FCGRT* mRNA levels in both tissue parts. Cut-off values as described above.

Table 1: Cox regression overall survival analyses at the univariate and multivariate levels (n=71)

Univariate Analysis					Multivariate Analysis				
Variable	HR	95% CI	P value	Bootstrap P value	Variable	HR	95% CI	P value	Bootstrap P value
<i>FCGRT</i> mRNA level in cancerous tissue					<i>FCGRT</i> mRNA level in cancerous				
Low (l) (n=55)	1.00				Low	1.00			
High (h) (n=16)	0.362	0.127 – 1.03	0.057	0.041	High	0.332 ^a	0.112 – 0.983	0.047	0.042
						0.267 ^b	0.089 – 0.806	0.019	0.013
<i>FCGRT</i> mRNA level in non-cancerous tissue					<i>FCGRT</i> mRNA level in non-cancerous tissue				
Low (n=30)	1.00				Low	1.00			
High (n=41)	0.384	0.192 – 0.769	0.007	0.003	High	0.323 ^a	0.154 – 0.678	0.003	0.002
						0.339 ^b	0.162 – 0.709	0.004	0.008
<i>FCGRT</i> mRNA levels in both tissue types					<i>FCGRT</i> mRNA levels in both tissue types				
C ^l /NC ^l (n=23)	1.00				C ^l /NC ^l	1.00			
C ^h and/or NC ^h (n=48)	0.355	0.177 – 0.714	0.004	0.003	C ^h and/or NC ^h	0.273 ^a	0.129 – 0.577	0.001	0.001
						0.263 ^b	0.124 – 0.556	<0.001	0.002
Stage (n=71)	1.22	1.04 – 1.44	0.015	0.009					
Histotype									
SCC (n=29)	1.00								
ADC (n=42)	1.23	0.605 – 2.50	0.566	0.570					
Age (n=71)	0.992	0.961 – 1.02	0.596	0.565					
Metastasis									
No (n=57)	1.00								
Yes (n=12)	2.37	1.09 – 5.17	0.030	0.012					

^a Multivariate model adjusted for stage, histotype, age (model a).

^b Multivariate model adjusted for metastasis status, histotype, age (model b).

patients with low *FCGRT* mRNA expression were 2.6 times more likely to die of the disease, as indicated by univariate analysis (P=0.007; Table 1). Furthermore, *FCGRT* mRNA expression in non-cancerous tissues was found to constitute a strong independent predictor of favorable overall survival outcome in NSCLC patients (HR = 0.323, 95% CI = 0.154 – 0.678, P = 0.003 Table 1). Altogether those results showed that *FCGRT* mRNA higher levels in cancerous and, intriguingly non-cancerous tissue are associated with a favorable outcome and provide prognosis information independently of other clinic-pathological parameters.

Assessment of *FCGRT* mRNA in both the tumor and non-cancerous tissues can stratify NSCLC patients according to overall survival

We further stratified NSCLC patients, according to *FCGRT* mRNA levels in both cancerous (C) and non-cancerous (NC) tissue. Overall survival periods were longer for high (h) than low (l) *FCGRT* mRNA levels in both cancerous and non-cancerous tissues (P = 0.002) (Figure 3C–3D). Strikingly, none of the “double high” (C^h/NC^h) patients died during the follow-up period, whereas the survival probabilities progressively worsened over time for patients with one or both tissue types scored as

FCGRT-low (Figure 3C). The findings were similar when the patients were grouped into those with high FcRn expression in at least one tissue type (C^h and/or NC^h) and those with low *FCGRT* expression in both tissue types (C^l / NC^l): the latter group showed significantly worse outcomes ($P = 0.002$) (Figure 3D).

Thus, analysis of *FCGRT* mRNA expression in both tissues types can provide significant and robust prognostic information about NSCLC patients as shown by univariate Cox regression ($HR = 0.355$, 95% CI = $0.177 - 0.714$, $P = 0.004$) (Table 1), which is independent of the currently used conventional indicators and important clinico-pathological variables as proven by multivariate survival analysis ($HR = 0.273$, 95% CI = $0.129 - 0.577$, $P = 0.001$) (Table 1).

Prognostic value of *FCGRT* mRNA in early stage and in metastasis-free NSCLC patients

We analyzed the prognostic performance of *FCGRT* mRNA levels in subgroups of NSCLC patients conventionally classified as “lower-risk”. Kaplan-Meier survival analysis within the early stage (I/II) patient subgroup indicated that high *FCGRT* mRNA levels retained their association with favorable outcome; this was statistically significant for non-cancerous tissue ($P = 0.035$). Early stage patients with high levels of *FCGRT* mRNA in at least one tissue (C^h and/or NC^h) survived longer than patients with low levels of *FCGRT* mRNA in both tissues (C^l / NC^l) ($P = 0.055$). Similar observations were made for the non-metastatic patients, as *FCGRT* mRNA expression again endowed NSCLC patients with enhanced overall survival intervals; this held true for the determination of *FCGRT* mRNA expression in non-cancerous tissue parts ($P = 0.007$) and the comparisons between NSCLC patients with at least one tissue part with a high expression *versus* patients with both tissue having a low expression of *FCGRT* mRNA ($P = 0.008$) (see Supplementary Table S2).

Multivariate analysis confirmed the independent prognostic information from *FCGRT* mRNA expression levels in normal and cancerous tissues, further demonstrating the similar yet discrete clinical significance of these assessments (data not shown).

Prognostic value of *FCGRT* mRNA expression is validated in others cohorts with NSCLC

In order to reinforce our findings regarding the prognostic significance of *FCGRT* mRNA expression in lung cancer, we performed *in silico* analysis of FcRn expression. Firstly, we analyzed microarrays studies extracted from the Oncomine database [23]. The results showed that *FCGRT* mRNA down regulation was also associated with poor survival of NSCLC patients in several datasets, supporting the results of our qRT-PCR study (Tables 2 and 3). Secondly, we used Affymetrix microarray expression data from lung cancer patients and analyzed *FCGRT* mRNA expression as determined

by probe set 218831_s_at, based on the online “Kaplan Meier Plotter” tool [24]. The significant association of *FCGRT* mRNA expression with favorable overall survival of lung cancer patients that we observed, was validated using this independent dataset of 1,926 lung cancer samples (Figure 4A, see Supplementary Table S3) at the univariate ($HR = 0.69$, 95% CI = $0.6 - 0.79$, $P = 8 \times 10^{-8}$), and multivariate levels after adjustment for stage and tumor histotype ($HR = 0.69$, 95% CI = $0.55 - 0.86$, $P = 0.0009$) (see Supplementary Table S3). Finally to validate these results, we performed a meta-analysis on data from publicly available expression analysis platforms: Kaplan Meier Plotter [24], Prognoscan [25], PROGeneV2 [26] and SurvExpress [27]. *FCGRT* mRNA expression was strongly associated with favorable overall survival of lung cancer patients as indicated by the pooled HR from $n=31$ studies/databases $HR = 0.70$ (95% CI = $0.65-0.74$), $P < 0.0001$. In 28/31 studies the HRs were <1 (indicating association with favorable prognosis) and 12/31 were individually statistically significant, including large cohorts from the Kaplan Meier plotter database ($N=1926$), the SurvExpress platform ($N=1044$) and the CAARRAY, NCI ($N=468$) (Figure 4B, see Supplementary Table S4). Moreover, no statistical heterogeneity was observed (Cochran $Q = 33.08$, $df = 30$, $P = 0.3191$, $I^2 = 9.3\%$, 95% CI = $0-42\%$), neither statistically significant bias (Begg-Mazumdar: Kendall’s tau = 0.0409 $P = 0.7616$, Egger: bias = -0.04965 , 95% CI = $-0.790-0.691$, $P = 0.8918$) (Figure 4C, see Supplementary Table S4). The absence of statistically significant heterogeneity and bias are indicators of the sufficient quality of the meta-analyses and the validity of the deriving conclusions.

DISCUSSION

The lungs are one of the major organs expressing FcRn and a common site of carcinogenesis. In this study, we showed a significant decrease of FcRn expression, at both the mRNA and protein levels, in the lung cancerous compared to the lung non-cancerous tissues from NSCLC patients. This discriminative value of *FCGRT* mRNA expression between cancer lesions from non-cancerous tissue parts is high, even for early stage patients (AUC = 0.947). This result is in line with the recent evidences demonstrating a central role of FcRn in anti-tumor immune-surveillance [18]. It also raises questions on the role of FcRn in non-cancer lung diseases, since lower levels of *FCGRT* mRNA were also described in bronchiectasis and lung fibrosis, correlating with the extent of lung abnormalities [28].

Herein, we also found that *FCGRT* mRNA levels were associated with a favorable outcome and provided prognostic information independently from important clinic-pathological parameters, when it was assessed in the cancer or, intriguingly, in the non-cancerous tissue part. In fact, *FCGRT* mRNA expression, especially

Table 2: Association between survival status and down-regulation of *FCGRT* mRNA expression in some human lung cancer datasets extracted from Oncomine

Clinical parameters significantly associated to reduced <i>FCGRT</i> mRNA levels in human Lung cancer datasets	n	p-value	Dataset Reference
Lung Adenocarcinoma, Dead at 1 Year	76	0.03	Beer Lung, Nat Med, 2002
	21	0.014	Garber Lung, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001
Large Cell Lung Carcinoma, Dead at 3 Years	10	0.016	Zhu Lung, J Clin Oncol, 2010
Large Cell Lung Carcinoma, Dead at 5 Years	12	0.012	Hou Lung, PLoS One, 2010
	10	0.016	Zhu Lung, J Clin Oncol, 2010
Squamous Cell Lung Carcinoma, Dead at 5 Years	10	0.038	Hou Lung, PLoS One, 2010

Table 3: Associations between *FCGRT* mRNA expression and survival status of NSCLC patients at 1 year after surgery (Tours' hospital cohort)

<i>FCGRT</i> expression	Number of patients (%)		P*
	<i>1-year survival</i>		
Cancerous tissue	Dead	Alive	
Low (l)	13 (100.0)	42 (72.4)	0.032
High (h)	0 (0.0)	16 (27.6)	
Non-cancerous tissue	Dead	Alive	
Low	11 (84.6)	19 (32.8)	0.001
High	2 (15.4)	39 (67.2)	
Combined	Dead	Alive	
C ^l / NC ^l	11 (84.6)	12 (20.7)	<0.001
C ^h and/or NC ^h	2 (15.4)	46 (79.3)	

* Fisher's exact test

when assessed in the non-cancerous tissue part has prognostic relevance even for the “lower-risk” early stage ($P = 0.035$) and metastasis-free NSCLC patients ($P = 0.007$). Interestingly, multivariate analysis also corroborated the similar yet discrete clinical significance of these assessments (data not shown). Overall our findings are consistent with the accumulating evidences showing molecular alterations of the normal-appearing tissue adjacent to tumor lesions and their impact in the stepwise progression to lung cancer [29]. Considering the role of FcRn in immunosurveillance and tumorigenesis, the decrease in *FCGRT* mRNA expression might be an important biomarker of the molecular changes promoting lung carcinogenesis and tumor progression. It may help with decision-making for NSCLC management and yield important advances for the development of novel chemoprevention strategies.

When analyzing the combined non-cancerous and cancerous expression of *FCGRT* mRNA, we noticed a progressive deterioration of overall survival periods with the decrease presence of *FCGRT* mRNA in non-cancerous and cancerous tissue parts. None of the patients classified as *FCGRT* mRNA -high for both tissue parts died within the study's follow-up period, whereas the survival probabilities worsened when moving to patients with one tissue part and both tissue parts showing low expression. This observation extends the tumor-protective role of FcRn in the lungs. The combined analysis of *FCGRT* mRNA expression can provide significant and robust prognostic information regarding the overall survival of NSCLC patients. The robustness of our findings is clearly reinforced by the fact that same results were found in other independent and international cohorts. It was found to be independent

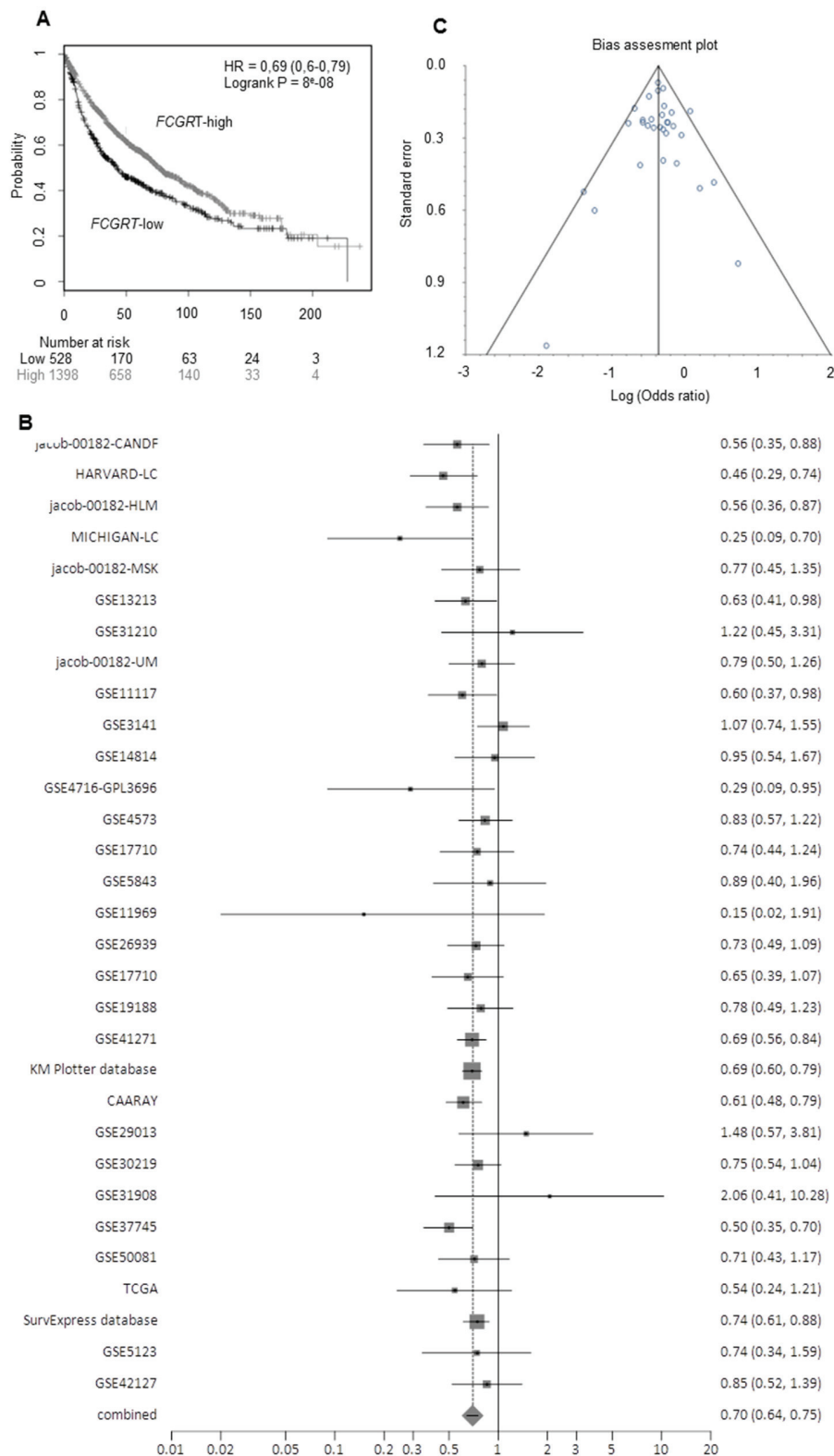


Figure 4: A. Kaplan-Meier overall survival curves based on *FCGRT* expression (high vs low), as assessed by the KM plotter expression analysis data. B. Forest plot (random effects method) of the hazard ratio for *FCGRT* expression and overall survival in lung cancer based on data obtained by the Prognoscan, PROGgeneV2, Kaplan Meier Plotter and SurvExpress platforms. C. Bias assessment plot for trials considered in the meta-analysis.

of the currently used conventional indicators and important clinic-pathological parameters. Moreover, these results were confirmed by the meta-analysis realized on data from publicly available microarray databases. In fact, the absence of statistically significant heterogeneity and bias in the meta-analysis are indicators of the sufficient quality of the meta-analyses and the validity of the deriving conclusions.

Description of FcRn expression in a small set of patients, by IHC, revealed a marked expression by alveolar macrophages and a faint signal from epithelial bronchial cells in the normal lungs, as previously described [20]. In NSCLC, FcRn expression was mainly found in infiltrating immune cells, in particular macrophages and DCs. Further studies will be required to assess if *FCGRT* mRNA reduction is attributed to a lower density of FcRn⁺ cells or/and to molecular mechanisms underlying mRNA down-regulation in these cells. In colorectal carcinoma, Baker *et al.* [18] found that FcRn-positive dendritic cells (DCs) were strongly correlated with the presence of CD8⁺ T cells in the non-cancerous tissue and promote the anti-tumor role of FcRn. In NSCLC, the global expression of *FCGRT* mRNA might be a reflection of the density of antigen presenting cells and antitumor immune response in NSCLC. In that context, it will be interesting to evaluate the predictive value of FcRn in response to immunomodulatory monoclonal antibodies, targeting immune checkpoints (anti-PD-1 or anti-CTLA-4) that have raised great promises in the treatment of NSCLC [30, 31].

Although the recommended tumor, node and metastasis (TNM) classification and stage determination are important to select therapeutic options for patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC), additional molecular markers are required to indicate better the prognosis, in particular within a specific stage, and determine the potential benefits of adapted therapy in NSCLC [32]. We report the first demonstration of the prognostic and predictive values of testing for *FCGRT* mRNA in NSCLC patients. The prognostic value of testing for FcRn in specific cell populations by double IHC staining has already been described in colorectal carcinoma [18]. Although our study suffers from the common limitations of investigations with surgical tumor samples, being mainly descriptive, as well as a retrospective nature and a certain degree of heterogeneity of the samples, our results identified *FCGRT* mRNA level as a robust and independent marker of NSCLC patient outcome and add to the existing evidences on the central role of the tumor's niche on carcinogenesis and disease progression [33]. Future external validations, in one or more independent, ideally multicentric, prospective studies would be required to support our findings and help transfer our results to a clinical application for NSCLC.

Testing for *FCGRT* mRNA is straightforward, and can readily be applied in the clinic. This novel

marker could be combined with the recently described Immunoscore® [34], a method measuring the beneficial impact of the immune infiltrate on tumor outcome, which has emerged in colorectal cancer and may be relevant in other malignancies, such as lung cancer [35]. Taking together, they may help with decision-making for NSCLC management, contributing to the timely and appropriate administration of adjuvant treatment.

MATERIALS AND METHODS

Lung tissue specimens

Specimens (2-3 cm²) of cancerous and non-cancerous tissues (80 patients) were collected from patients prior to any therapy, as described by Gueugnon *et al.* [36] at the Trousseau Hospital, Tours, France, between 2006 and 2011 (n° DC-2008-308 – also named in the manuscript Tours' hospital cohort). The nonmalignant tissue samples were taken from sites at least 3 cm away from the edge of the tumor. Patient data were recorded in a database for statistical analysis (See Tables 4 and 5). This study was conducted in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration and French bioethical authorities. Frozen lung tissues were embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe) and 8µm sections were cut on a cryotome (Thermo SCIENTIFIC). Sections (up to 50 mg) were immediately placed in lysis buffer (RLT Plus, Qiagen) containing 143 µM β-mercaptoethanol and vortexed thoroughly for 2 minutes. The lysates were then centrifuged in a microfuge for 1 min at full speed. Aliquots of each supernatant were collected and stored at -80°C. RNA was purified on a QIAasympphony SP workstation using the RNA CT 400 protocol (QIAasympphony RNA kit, Qiagen), including digestion of genomic DNA with DNase I. Total RNA was eluted RNase-free water and quantified using a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC). RNA integrity was assessed using an Agilent 2100 bioanalyzer. Only samples with an RNA integrity number (RIN) > 6 were considered for RT-qPCR analysis (80 patients matched for tumoral and non tumoral adjacent tissue).

Single-strand cDNA was synthesized from 2µg total RNA from each sample with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time PCR

Following RNA extraction from NSCL and non-cancerous adjacent tissues, and cDNA synthesis, quantitative-PCR was carried out on the LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH) as described by Gueugnon *et al.* [36]. The concentration of *FCGRT* mRNA was normalized to the geometric mean of mRNAs of two reference genes: TATA-binding protein

Table 4: Patient characteristics (n=80)

Characteristics	N (%)
Gender	
Male	64 (80)
Female	16 (20)
Smoking history	
Never	9 (11.25)
Former/Current	68 (85)
Unknown	3 (3.75)
Histologic type	
Squamous cell carcinoma (SCC)	35 (43.75)
Adenocarcinoma (ADC)	45 (56.25)
T- primary tumor size	
≤ 3cm	27 (33.75)
> 3cm	48 (60)
Unknown	5 (6.25)
N- lymph node status	
Yes	47 (58.75)
No	31 (38.75)
Unknown	2 (2.5)
M- distant metastasis	
Yes	13 (16.25)
No	65 (81.25)
Unknown	2 (2.5)
pTNM Stage	
IA	11 (13.75)
IB	26 (32.5)
IIA	5 (6.25)
IIB	8 (10)
IIIA	13 (16.25)
IIIB	3 (3.75)
IV	13 (16.25)
Unknown	1 (1.25)

(*TBP*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*). This gives more reliable results than using a single reference gene [37]. Gene-specific primer pairs were designed according published mRNA sequences so that the amplicons generated spanned two exons. The sequences of the primers used in this study are:

FCGRT F 5'-CCCTGGCTTTTCCGTGCTT-3'; R 5'-TGACGATTCCCACCACGAG-3'; *HPRT1* F 5'-CAT TATGCTGAGGATTGGAAGG-3'; R 5'-CTTGAGCAC ACAGAGGGCTACA-3'; *TBP* F 5'-TGTATCCACAG TGAATCTTGGT TG-3'; R 5'-GGTTCGTGGCTCTCT TATCCTC-3'. PCR reactions were carried out using 20ng cDNA as template, 0.2μM each of forward and reverse primer and 1x SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc). Each reaction was performed in triplicate. The thermal protocol consisted of an initial denaturation step at 95°C for 30 sec followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 5 sec and primer annealing and extension at 60°C for 20 sec. Melting curves were generated for each amplified cDNA to check the specificity of the reactions. In the standard protocol, fluorescence was read at 60°C during the annealing and extension step. However, we included an additional step (heating at 82°C for 15sec) to record the fluorescence. This increased the specificity of *FCGRT* measurement by eliminating all non-specific signals. Each PCR run included a no-template control and a calibrator AV090211 (a pool of cDNA from many lung tumors) to evaluate inter-assay variability.

Serial dilutions of the AV090211 calibrator (a pool of 10 cDNA from tumoral and non tumoral samples) (80ng cDNA to 0.625ng cDNA) were used to create a standard curve for each gene. These curves were constructed by plotting the crossing point (Cp) values against the initial quantity of the AV090211 calibrator. The Cp of a sample, defined as the point where the fluorescence curve of the sample was above the background fluorescence, was calculated according to the second derivative maximum method by the LightCycler 480 software. The efficiencies of PCR for *FCGRT* and reference genes were calculated from the formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$; they were close to 100% (i.e. efficiency $E = 2$): *FCGRT*: $E = 1.986$; *TBP*: $E = 2.041$; *HPRT1*: $E = 1.979$. Thus, the software converted Cp data from the samples into a concentration for each gene using the PCR efficiency and the initial amount of AV090211 calibrator. Finally, the results for each sample were normalized by dividing the *FCGRT* value by the geometric mean of *HPRT1* and *TBP* reference genes.

Western blot

Protein extracts (40μg) of a pool of 10 cancerous tissues and 10 matched non-cancerous tissues from NSCLC patients, chosen blindly and human recombinant FcRn protein were separated on a NUPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Life Technologies) and then transferred onto PVDF (polyvinylidenedifluoride) membranes by electroblotting. Membranes were blocked and then incubated with anti-FcRn (1/500) (Novus Biologicals cat. number NBP1-89128) or anti-alpha tubulin (1/20000) as a loading control antibody (Abcam cat. number ab7291) under the conditions recommended by the manufacturers. After incubation with the appropriate conjugated-HRP

Table 5: Descriptive statistics of the continuous variables (n=80)

	N	Mean	S.E.	Min	Max	Percentiles				
						10	25	50 (median)	75	90
Age	80	65.2	1.2	36.0	83.0	50.2	59.0	66.5	73.0	78.0
Tumor size (cm)	75	3.75	0.18	1.20	10.0	2.00	2.50	3.50	4.50	6.00
Packs per year	66	42.8	2.4	5.0	100	20.0	30.0	40.0	50.0	75.0
Smoking cessation (years)	57	7.32	1.50	0.0	60.0	0.0	0.0	0.0	11.5	22.4
OS (months)	71	30.0	2.14	3.0	78.0	7.0	17.0	27.0	42.0	58.6

secondary antibody, membranes were developed using an enhanced chemiluminescence western blotting detection reagent (Amersham Biosciences). Densitometry of the FcRn spots was quantified using ImageJ and normalized with α -tubulin. The experiments were done three times with two different pools of proteins from 10 patients. The FcRn human recombinant protein used as a positive control is homologous over its entire region to the amino acid sequence PAKS, from there it is deleted on the entire Ct final region and the original sequence was replaced by a synthetic sequence which corresponds to the sequence factor X, followed by the V5 epitope and a polyhistidine. The construction has been obtained by a 2-step cloning 1) a deletion from PAKS (since the beginning of exon 6) then 2) an insertion of the synthetic sequence at BamHI-NotI site.

Immunohistochemical analysis

Staining of FcRn⁺ cells, dendritic cells, macrophages and CD8⁺-T cells was assessed on both cancerous (C) and non-cancerous (NC) 3 μ m-thick serial lung tissue sections from a small set of patients (n=8), using anti-FcRn (Abcam cat. number ab4360), anti-PS100 (Dako, cat. number Z0311), anti-CD163 (LEICA, cat. number NCL-CD163) and anti-CD8 (Dako, cat. number M7103) antibodies, respectively. Briefly, tissues were deparaffinized, rehydrated and subjected to heat antigen retrieval in a citrate buffer (pH 6.0). FcRn staining was done as followed: samples were washed twice in TBS-Tween 0.1% before being blocked for endogenous peroxidase activity in 3% hydrogen peroxide-methanol. After 2 washes, the VECTASTAIN Elite ABC Kit (Goat IgG, VECTOR Laboratories) was used for immunostaining following the manufacturer's instructions. Tissues sections were blocked 1h in blocking buffer (PBS-triton 0.4% + 3 drops of goat sera (from the VECTASTAIN Elite ABC kit) + 5% BSA + 3% normal human sera buffer). Tissue sections were incubated with anti-FcRn (diluted 1/500) polyclonal antibody (Novus Biologicals cat. number NBP1-89128) overnight at 4°C in blocking buffer. A standard avidin-biotin immunoperoxidase method and diaminobenzidine as chromogen (DakoCytomation) were used for visualization. Tissues slides were colored

using Harris' hematoxylin. Rabbit IgG (1/28,000), whole molecule (Jackson ImmunoResearch), was used as both isotype and negative control. Positive and negative controls were realized on human placenta section with FcRn antibody. PS100, CD163 and CD8 staining were done using a benchmark XT automated stainer (Roche) following the manufacturer's instructions; tissues sections were colored with Gill's hematoxylin.

Statistical analyses

Differences between *FCGRT* expression values between groups of cancerous samples were assessed using the non-parametric Mann-Whitney U and Jonckheere-Terpstra tests. *FCGRT* mRNA levels in paired NSCLC samples were compared with the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. The DeLong *et al.* [38] method was used for ROC curve analyses. The optimal cut-off that derived from the ROC curve analysis corresponded to the highest accuracy as calculated by the Youden index J.

Kaplan-Meier survival curves were analyzed for the overall survival of the 71 NSCLC patients with available follow-up data; the log-rank test was used for evaluation of statistical significance. Cox regression models were used to evaluate the prognostic potential of *FCGRT* mRNA levels for overall survival (OS) of NSCLC patients through the calculation of hazard ratios (HR) at the univariate and multivariate levels. Multivariate models were adjusted for tumor stage, tumor histotype and patient age (model a) or metastasis status, tumor histotype and patient age (model b). For survival analyses, optimal cut-off points were established using the X-tile algorithm and the minimal p-value approach for cutoff optimization. All regression models were validated by the bootstrap resampling (n=1,000 bootstrap samples) using the bias corrected and accelerated approach. The selected cut-off for FcRn expression in the cancerous tissue parts was additionally validated (P=0.0197) in the Kaplan-Meier Plotter (KM Plotter) database, indicating that it can be applied in an independent dataset. SPSS Statistics (version 17.0), MedCalc software (version 12.5) and GraphPad Prism (version 5.00) were used.

Publicly available databases, online survival analysis tools and meta-analysis

The Oncomine database and gene microarray analysis tool, a repository for published cDNA microarray data (www.oncomine.org) [23] was used (January 2015) to analyze the *FCGRT* mRNA expression in public Lung cancer datasets [39–42]. Oncomine algorithms were used for the statistical analysis of the differences in *FCGRT* mRNA expression and association with patient survival status (Student's t-test).

The Kaplan Meier-Plotter (KM Plotter) online survival analysis tool was used in order to confirm the prognostic potential of FcRn in a large cohort of lung cancer patients. Briefly, gene expression data and overall survival information are downloaded from GEO, EGA and TCGA and a database is created. To analyze the prognostic value of a particular gene, in our case *FCGRT*, the patient samples are split into two groups according to various quantile expressions and are compared by a Kaplan-Meier survival plot. KM plotter was used both at the univariate and multivariate level [24].

Meta-analysis on FcRn prognostic significance was performed by gathering all available Hazard Ratios and 95% Confidence Intervals for FcRn in lung cancer from different individual microarray-based studies using the publicly available biomarker analysis and validation tools: Prognoscan [25], ProgGene V2 [26], SurvExpress [27] and KM Plotter [24]. Subsequently we analyzed this information with the StatsDirect v3.0 [StatsDirect Ltd. StatsDirect statistical software. <http://www.statsdirect.com>. England: StatsDirect Ltd. 2013]. Statistical software in order to calculate the pooled Hazard Ratio, Cochran Q and I^2 values, as well as and to produce Forest plots and Bias-assessment plots.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof Pascal Dumont (Tours Hospital) and Valérie Gissot (CIC INSERM 1415) for their help in collecting tissues and clinical data. English was edited by Alex Edelman & Associates.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

GRANT SUPPORT

N.HV and V.GG received financial supports from the French Higher Education and Research Ministry under the program “Investissements d’avenir”, Grant agreement, and from the European Union (Grant Agreement: Presage 4940-37478; OutExFon). Europe is engaged in Région Centre with the FEDER. N.B fellowship was obtained from LabEX MAbImprove ANR-10-LABX-53-01, the

one for E.D from Région Centre (BIOSONS project), the one for D.C.C from both LabEX MAbImprove ANR-10-LABX-53-01 and Région Centre.

REFERENCES

1. Domagala-Kulawik J. The role of the immune system in non-small cell lung carcinoma and potential for therapeutic intervention. *Transl Lung Cancer Res*. 2015; 4: 177–90. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.11.
2. Alifano M, Mansuet-Lupo A, Lococo F, Roche N, Bobbio A, Canny E, Schussler O, Dermine H, Régnard J-F, Burroni B, Goc J, Biton J, Ouakrim H, et al. Systemic inflammation, nutritional status and tumor immune microenvironment determine outcome of resected non-small cell lung cancer. *PloS One*. 2014; 9: e106914. doi: 10.1371/journal.pone.0106914.
3. 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, 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; 189: 832–44. doi: 10.1164/rccm.201309-1611OC.
4. Fucikova J, Becht E, Iribarren K, Goc J, Remark R, Damotte D, Alifano M, Devi P, Biton J, Germain C, Lupo A, Fridman WH, Dieu-Nosjean M-C, et al. Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer Res*. 2016; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1142.
5. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 715–25. doi: 10.1038/nri2155.
6. Ward ES, Ober RJ. Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Adv Immunol*. 2009; 103: 77–115. doi: 10.1016/S0065-2776(09)03004-1.
7. Claypool SM, Dickinson BL, Wagner JS, Johansen F-E, Venu N, Borawski JA, Lencer WI, Blumberg RS. Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fcγ-receptor. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 1746–59. doi: 10.1091/mbc.E03-11-0832.
8. Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 5512–6.
9. Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N, Petkova S, Avanesian L, Choi EY, Shaffer DJ, Eden PA, Anderson CL. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003; 170: 3528–33.

10. Ben Suleiman Y, Yoshida M, Nishiumi S, Tanaka H, Mimura T, Nobutani K, Yamamoto K, Takenaka M, Aoganghua A, Miki I, Ota H, Takahashi S, Matsui H, et al. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium regulates bacterial infection in mice. *Mucosal Immunol*. 2012; 5: 87–98. doi: 10.1038/mi.2011.53.
11. Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, Bry L, Glickman JN, Claypool SM, Kaser A, Nagaishi T, Higgins DE, Mizoguchi E, Wakatsuki Y, Roopenian DC, Mizoguchi A, et al. Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J Clin Invest*. 2006; 116: 2142–51. doi: 10.1172/JCI27821.
12. Bai Y, Ye L, Tesar DB, Song H, Zhao D, Björkman PJ, Roopenian DC, Zhu X. Intracellular neutralization of viral infection in polarized epithelial cells by neonatal Fc receptor (FcRn)-mediated IgG transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 18406–11. doi: 10.1073/pnas.1115348108.
13. Ko S-Y, Pegu A, Rudicell RS, Yang Z, Joyce MG, Chen X, Wang K, Bao S, Kraemer TD, Rath T, Zeng M, Schmidt SD, Todd J-P, et al. Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. *Nature*. 2014; 514: 642–5. doi: 10.1038/nature13612.
14. Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, Wang Y, Robert C, Wu B, Smith PD, Lencer WI, Blumberg RS. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2001; 166: 3266–76.
15. Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers FE, de Haas M, van de Winkel JG. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood*. 2006; 108: 3573–9. doi: 10.1182/blood-2006-05-024539.
16. Qiao S-W, Kobayashi K, Johansen F-E, Sollid LM, Andersen JT, Milford E, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 9337–42. doi: 10.1073/pnas.0801717105.
17. Baker K, Qiao S-W, Kuo TT, Aveson VG, Platzer B, Andersen J-T, Sandlie I, Chen Z, de Haar C, Lencer WI, Fiebigier E, Blumberg RS. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 9927–32. doi: 10.1073/pnas.1019037108.
18. Baker K, Rath T, Flak MB, Arthur JC, Chen Z, Glickman JN, Zlobec I, Karamitopoulou E, Stachler MD, Odze RD, Lencer WI, Jobin C, Blumberg RS. Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity*. 2013; 39: 1095–107. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.003.
19. Sörenson S, Glimelius B, Nygren P, SBU-group. Swedish Council of Technology Assessment in Health Care. A systematic overview of chemotherapy effects in non-small cell lung cancer. *Acta Oncol Stockh Swed*. 2001; 40: 327–39.
20. Spiekermann GM, Finn PW, Ward ES, Dumont J, Dickinson BL, Blumberg RS, Lencer WI. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J Exp Med*. 2002; 196: 303–10.
21. Román-Pérez E, Casbas-Hernández P, Pirone JR, Rein J, Carey LA, Lubet RA, Mani SA, Amos KD, Troester MA. Gene expression in extratumoral microenvironment predicts clinical outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2012; 14: R51. doi: 10.1186/bcr3152.
22. Lamb JR, Zhang C, Xie T, Wang K, Zhang B, Hao K, Chudin E, Fraser HB, Millstein J, Ferguson M, Suver C, Ivanovska I, Scott M, et al. Predictive genes in adjacent normal tissue are preferentially altered by sCNV during tumorigenesis in liver cancer and may rate limiting. *PloS One*. 2011; 6: e20090. doi: 10.1371/journal.pone.0020090.
23. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 2004; 6: 1–6.
24. Györfy B, Surowiak P, Budczies J, Lánczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PloS One*. 2013; 8: e82241. doi: 10.1371/journal.pone.0082241.
25. Mizuno H, Kitada K, Nakai K, Sarai A. PrognoScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Med Genomics*. 2009; 2: 18. doi: 10.1186/1755-8794-2-18.
26. Goswami CP, Nakshatri H. PROGgeneV2: enhancements on the existing database. *BMC Cancer*. 2014; 14: 970. doi: 10.1186/1471-2407-14-970.
27. Aguirre-Gamboa R, Gomez-Rueda H, Martínez-Ledesma E, Martínez-Torteya A, Chacolla-Huaringa R, Rodriguez-Barrientos A, Tamez-Peña JG, Treviño V. SurvExpress: an online biomarker validation tool and database for cancer gene expression data using survival analysis. *PloS One*. 2013; 8: e74250. doi: 10.1371/journal.pone.0074250.
28. Freiburger T, Grodecká L, Ravcuková B, Kurecová B, Postránecká V, Vlcek J, Jarkovský J, Thon V, Litzman J. Association of FcRn expression with lung abnormalities and IVIG catabolism in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2010; 136: 419–25. doi: 10.1016/j.clim.2010.05.006.
29. Gomperts BN, Spira A, Massion PP, Walser TC, Wistuba II, Minna JD, Dubinett SM. Evolving concepts in lung carcinogenesis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011; 32: 32–43. doi: 10.1055/s-0031-1272867.
30. Santarpia M, Giovannetti E, Rolfo C, Karachaliou N, González-Cao M, Altavilla G, Rosell R. Recent developments in the use of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med*. 2016; doi: 10.1080/17476348.2016.1182866.

31. Soria J-C, Marabelle A, Brahmer JR, Gettinger S. Immune checkpoint modulation for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2015; 21: 2256–62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2959.
32. Wang J, Wu N, Zheng Q, Feng Y, Yan S, Lv C, Li S, Wang Y, Yang Y. Evaluation of the 7th edition of the TNM classification for lung cancer at a single institution. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014; 140: 1189–95. doi: 10.1007/s00432-014-1636-0.
33. Heinrich EL, Walser TC, Krysan K, Licican EL, Grant JL, Rodriguez NL, Dubinett SM. The inflammatory tumor microenvironment, epithelial mesenchymal transition and lung carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* 2012; 5: 5–18. doi: 10.1007/s12307-011-0089-0.
34. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014; 232: 199–209. doi: 10.1002/path.4287.
35. Anitei M-G, Zeitoun G, Mlecnik B, Marliot F, Haicheur N, Todosi A-M, Kirilovsky A, Lagorce C, Bindea G, Ferariu D, Danciu M, Bruneval P, Scripcariu V, et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 1891–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2830.
36. Gueugnon F, Barascu A, Mavridis K, Petit-Courty A, Marchand-Adam S, Gissot V, Scorilas A, Guyetant S, Courty Y. Kallikrein-related peptidase 13: an independent indicator of favorable prognosis for patients with nonsmall cell lung cancer. *Tumour Biol J.* 2015; doi: 10.1007/s13277-015-3148-1.
37. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3: RESEARCH0034.
38. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988; 44: 837–45.
39. Beer DG, Kardias SLR, Huang C-C, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, Lin L, Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Lizyness ML, Kuick R, Hayasaka S, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2002; 8: 816–24. doi: 10.1038/nm733.
40. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, van de Rijn M, Rosen GD, Perou CM, Whyte RL, Altman RB, Brown PO, Botstein D, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 13784–9. doi: 10.1073/pnas.241500798.
41. Zhu C-Q, Ding K, Strumpf D, Weir BA, Meyerson M, Pennell N, Thomas RK, Naoki K, Ladd-Acosta C, Liu N, Pintilie M, Der S, Seymour L, et al. Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 4417–24. doi: 10.1200/JCO.2009.26.4325.
42. Hou J, Aerts J, den Hamer B, van Ijcken W, den Bakker M, Riegman P, van der Leest C, van der Spek P, Foekens JA, Hoogsteden HC, Grosveld F, Philipsen S. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PloS One.* 2010; 5: e10312. doi: 10.1371/journal.pone.0010312.

Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non-small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Total RNA isolation and cDNA synthesis

NSCLC and non tumoral adjacent tissues

Frozen lung tissues were embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe) and 8µm sections were cut on a cryotome (Thermo SCIENTIFIC). Sections (up to 50 mg) were immediately placed in lysis buffer (RLT Plus, Qiagen) containing 143 µM β-mercaptoethanol and vortexed thoroughly for 2 minutes. The lysates were then centrifuged in a microfuge for 1 min at full speed. Aliquots of each supernatant were collected and stored at -80°C. RNA was purified on a QIAasympyphony SP workstation using the RNA CT 400 protocol (QIAasympyphony RNA kit, Qiagen), including digestion of genomic DNA with DNase I. Total RNA was eluted RNase-free water and quantified using a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC). RNA integrity was assessed using an Agilent 2100 bioanalyzer. Only samples with an RNA integrity number (RIN) > 6 were considered for RT-qPCR analysis (80 patients matched for tumoral and non tumoral adjacent tissue).

Single-strand cDNA was synthesized from 2µg total RNA from each sample with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

CRC and non tumoral adjacent tissues

All tissue samples were maintained at 180°C (liquid nitrogen) until RNA extraction and were weighed before

homogenization. Tissue samples were then disrupted directly into a lysis buffer using Mixer Mill MM 300 (Qiagen). Total RNA was isolated from tissue lysates using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and additional DNase digestion was performed on all samples during the extraction process (RNase-Free DNase Set Protocol for DNase treatment on RNeasy Mini Spin Columns; Qiagen). After each extraction, a small fraction of the total RNA preparation was taken to determine the quality of the sample and the yield of total RNA. Controls analyses were performed by UV spectroscopy and analysis of total RNA profile using the Agilent RNA 6000 Nano LabChip Kit with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) to determine RNA purity, quantity, and integrity.

Quantitative real-time PCR

The *FCGRT* mRNA expression in lung samples was determined by quantitative real-time PCR in a LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH). The concentration of *FCGRT* mRNA was normalized to the geometric mean of mRNAs of two reference genes. TATA-binding protein (*TBP*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*). This gives more reliable results than using a single reference gene (Vandesompele et al. 2002). Gene-specific primer pairs were designed according published mRNA sequences so that the amplicons generated spanned two exons. The sequences of the primers used in this study are:

Gene	Forward	Reverse
FCGRT	5'-CCCTGGCTTTTCCGTGCTT-3'	5'-TGACGATTCCCACCACGAG-3'
HPRT1	5'-CATTATGCTGAGGATTGGA AGG-3'	5'-CTTGAGCACACAGAGGGGCT ACA-3'
TBP	5'-TGTATCCACAGTGAATCTTGG TTG-3'	5'-GGTTCGTGGCTCTCTTATC CTC-3'

PCR reactions were carried out using 20ng cDNA as template, 0.2µM each of forward and reverse primer and 1x SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc). Each reaction was performed in triplicate. The thermal protocol consisted of an initial denaturation step at 95°C for 30 sec followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 5 sec and primer annealing and extension at 60°C for 20 sec. Melting curves were generated for each amplified cDNA to check the specificity of the reactions. In the standard protocol, fluorescence was read at 60°C during the annealing and extension step. However, we included an additional step (heating at 82°C for 15sec) to record

the fluorescence. This increased the specificity of *FCGRT* measurement by eliminating all non-specific signals. Each PCR run included a no-template control and a calibrator AV090211 (a pool of cDNA from many lung tumors) to evaluate inter-assay variability.

Serial dilutions of the AV090211 calibrator (a pool of 10 cDNA from tumoral and non tumoral samples) (80ng cDNA to 0.625ng cDNA) were used to create a standard curve for each gene. These curves were constructed by plotting the crossing point (Cp) values against the initial quantity of the AV090211 calibrator. The Cp of a sample, defined as the point where the fluorescence curve of the

sample was above the background fluorescence, was calculated according to the second derivative maximum method by the LightCycler 480 software. The efficiencies of PCR for the target and reference genes were calculated from the formula $E = 10^{-1/\text{slope}}$; they were close to 100% (i.e. efficiency $E = 2$): *FCGRT*: $E = 1.986$; *TBP*: $E = 2.041$; *HPRT1*: $E = 1.979$. Thus, the software converted Cp data from the samples into a concentration for each gene using the PCR efficiency and the initial amount of AV090211 calibrator. Finally, the results for each sample were normalized by dividing the *FCGRT* value by the geometric mean of *HPRT1* and *TBP* reference genes.

Western blot

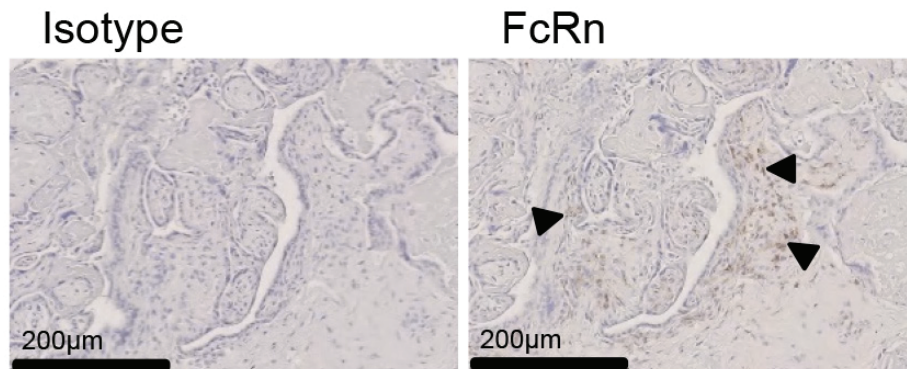
Protein extracts (40µg) of a pool of 10 cancerous tissues and 10 matched non-cancerous tissues from NSCLC patients, chosen blindly and human recombinant FcRn protein were separated on a NUPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Life Technologies) and then transferred onto PVDF (polyvinylidenedifluoride) membranes by electroblotting. Membranes were blocked and then incubated with anti-FcRn (Novus Biologicals) or anti-alpha tubulin as a loading control antibody (Abcam) under the conditions recommended by the manufacturers. After incubation with the appropriate conjugated-HRP secondary antibody, membranes were developed using an enhanced chemiluminescence western blotting

detection reagent (Amersham Biosciences). The FcRn human recombinant protein used as a positive control is homologous over its entire region to the amino acid sequence PAKS, from there it is deleted on the entire Ct final region and the original sequence was replaced by a synthetic sequence which corresponds to the sequence factor X, followed by the V5 epitope and a polyhistidine (10). The construction has been obtained by a 2-step cloning 1) a deletion from PAKS (since the beginning of exon 6) then 2) an insertion of the synthetic sequence at BamHI-NotI site.

Immunohistochemical analysis

10µm-thick tissue sections from both NSCLC and non-cancerous tissues were deparaffinized, rehydrated and subjected to heat antigen retrieval in a citrate buffer (pH 6.0). Samples were blocked for endogenous peroxidase activity in 3% hydrogen peroxide-methanol. The VECTASTAIN Elite ABC Kit (Goat IgG, VECTOR Laboratories) was used for immunostaining following the manufacturer's instructions. Tissue sections were incubated with anti-FcRn polyclonal antibody (Novus Biologicals) overnight at 4°C. A standard avidin-biotin immunoperoxidase method and diaminobenzine as chromogen (DakoCytomation) were used for visualization. Rabbit IgG, whole molecule (Jackson ImmunoResearch), was used as a negative control.

SUPPLEMENTARY FIGURE AND TABLES



Supplementary Figure S1: Negative (Isotype: Rabbit IgG whole molecule) and positive controls of FcRn immunostaining were realized on commercial human placenta slides. No staining was observed with isotype whereas arrowheads indicate FcRn staining (in brown).

Supplementary Table S1: Associations between *FGRT* mRNA levels and clinicopathological characteristics of NSCLC patients

	N	Median FCRN expression in NSCLC	P value
Gender			
Male	64	0.449	0.085 ^a
Female	16	0.698	
Histotype			
Squamous cell carcinoma	35	0.380	0.091 ^a
Adenocarcinoma	45	0.556	
Differentiation status			
Moderately or well	34	0.387	0.501 ^a
Poorly	15	0.470	
Unknown	31		
Tumor size			
≤3 cm	27	0.487	0.843 ^a
>3 cm	48	0.496	
Unknown	5		
Lymph node status			
Negative	47	0.532	0.755 ^a
Positive	31	0.451	
Unknown	2		

(Continued)

	N	Median FCRN expression in NSCLC	P value
Metastasis			
No	65	0.522	0.507 ^a
Yes	13	0.382	
Unknown	2		
Stage			
I, II	50	0.496	0.692 ^a
III, IV	29	0.477	
Unknown	1		
Chronic Obstructive Pulmonary Disease			
No	44	0.558	0.246 ^a
Yes	36	0.409	
Smoking status			
Never	9	0.810	0.234 ^a
Currently or former	68	0.455	
Unknown	3		
Pack-years			
<21	9	0.579	0.179 ^b
21-49	34	0.464	
>49	23	0.407	
Unknown	14		
Stage (ordinal)			
Ia	11	0.823 ^c	0.144 ^b
Ib	26	0.432 ^c	
IIa	5	0.314 ^d	
IIb	8	0.382 ^d	
IIIa	13	0.487 ^e	
IIIb	3	0.810 ^e	
IV	13	0.382 ^e	
Unknown	1		

^a P value calculated by Mann-Whitney test

^b P value calculated by Jonckheere-Terpstra test

^cP = 0.043 (for Stage Ia vs Stage Ib, Mann-Whitney test)

^dP = 0.380 for (for Stage IIa vs Stage IIb, Mann-Whitney test)

^eP = 0.726 for (for Stage III vs Stage IV, Mann-Whitney test)

Supplementary Table S2: The prognostic value of *FCGRT* mRNA levels for early stage and metastasis-free NSCLC patients (Kaplan-Meier analysis)

Variable	Mean overall survival time in months (95% CI)	P*
Early stage (I/II) patients (n=45)		
FCGRT mRNA level in cancerous tissue parts		
Low (l) (n=34)	41.3 (32.7 – 49.8)	0.339
High (h) (n=11)	61.1 (44.8 – 77.4)	
FCGRT mRNA level in non-cancerous tissue parts		
Low (n=20)	41.1 (26.4 – 55.8)	0.035
High (n=25)	50.5 (42.3 – 58.8)	
Combined FCGRT mRNA levels		
C ^l / NC ^l (n=15)	31.1 (18.8 – 43.5)	0.055
C ^h and/or NC ^h (n=30)	55.8 (44.8 – 66.7)	
Non-metastatic patients (n=57)		
FCGRT mRNA level in cancerous tissue parts		
Low (n=44)	40.0 (32.7 – 47.3)	0.108
High (n=13)	63.8 (49.7 – 77.9)	
FCGRT mRNA level in non-cancerous tissue parts		
Low (n=23)	36.8 (23.6 -50.0)	0.007
High (n=34)	54.1(45.6 – 62.6)	
Combined FCGRT mRNA levels		
C ^l / NC ^l (n=18)	29.9 (18.9 – 41.0)	0.008
C ^h and/or NC ^h (n=39)	56.1 (46.6 – 65.6)	
Late stage (III/IV) patients (n=26)		
FCGRT mRNA level in cancerous tissue parts		
Low (l) (n=21)	31.0 (22.0 – 40.0)	0.080
High (h) (n=5)	58.3 (38.1 – 78.6)	
FCGRT mRNA level in non-cancerous tissue parts		
Low (n=10)	25.8 (11.7 – 39.9)	0.076
High (n=16)	45.1 (31.8–58.4)	
Combined FCGRT mRNA levels		
C ^l / NC ^l (n=8)	21.1 (5.8–36.5)	0.024
C ^h and/or NC ^h (n=18)	44.7 (32.3 – 57.1)	
Metastatic patients (n=12)		
FCGRT mRNA level in cancerous tissue parts		
Low (l) (n=9)	20.4 (10.5 – 30.4)	0.110
High (h) (n=3)	34.5 (32.4 – 36.6)	

(Continued)

Variable	Mean overall survival time in months (95% CI)	P*
<i>FCGRT</i> mRNA level in non-cancerous tissue parts		
Low (n=6)	18.2 (8.2 – 28.1)	0.272
High (n=6)	31.5 (18.8 – 44.2)	
Combined <i>FCGRT</i> mRNA levels		
C ^l / NC ^l (n=4)	10.0 (3.7– 16.4)	0.003
C ^h and/or NC ^h (n=8)	32.4 (22.5 – 42.3)	

*P value calculated by the log-rank test (Kaplan-Meier survival analysis).

Supplementary Table S3: Multivariate analysis for the association of *FCGRT* mRNA expression and overall survival (adjusted for Stage and Histology), based on the KM-plotter platform (n=890 available patients).

	P value	Hazard Ratio
Histology	0.0002	1.38 (1.17 - 1.64)
Stage	0	1.49 (1.3 - 1.7)
<i>FCGRT</i>	0.0009	0.69 (0.55 - 0.86)

Supplementary Table S4: Data used for the meta-analysis and construction of Forest Plot for NSCLC (Figure 4 B-C)

Study	HR	Low	High	P value	SE	Weights (fixed)	Weights (random)
<i>jacob-00182-CANDF</i>	0.56	0.35	0.88	0.0129397	0.235	2.083	2.499
<i>HARVARD-LC</i>	0.46	0.29	0.74	0.00120089	0.239	2.018	2.425
<i>jacob-00182-HLM</i>	0.56	0.36	0.87	0.0105452	0.225	2.274	2.711
<i>MICHIGAN-LC</i>	0.25	0.09	0.7	0.00826201	0.523	0.421	0.533
<i>jacob-00182-MSK</i>	0.77	0.45	1.35	0.364188	0.280	1.467	1.795
<i>GSE13213</i>	0.63	0.41	0.98	0.0394138	0.222	2.332	2.775
<i>GSE31210</i>	1.22	0.45	3.31	0.702288	0.509	0.445	0.563
<i>jacob-00182-UM</i>	0.79	0.5	1.26	0.325736	0.236	2.073	2.487
<i>GSE11117</i>	0.6	0.37	0.98	0.0405953	0.248	1.866	2.254
<i>GSE3141</i>	1.07	0.74	1.55	0.71182	0.189	3.239	3.747
<i>GSE14814</i>	0.95	0.54	1.67	0.868149	0.288	1.389	1.704
<i>GSE4716-GPL3696</i>	0.29	0.09	0.95	0.0408259	0.601	0.319	0.405
<i>GSE4573</i>	0.83	0.57	1.22	0.353167	0.194	3.058	3.557
<i>GSE17710</i>	0.74	0.44	1.24	0.252865	0.264	1.650	2.006

(Continued)

Study	HR	Low	High	P value	SE	Weights (fixed)	Weights (random)
<i>GSE5843</i>	0.89	0.4	1.96	0.7728	0.405	0.701	0.880
<i>GSE11969</i>	0.15	0.02	1.91	0.1456	1.163	0.085	0.109
<i>GSE26939</i>	0.73	0.49	1.09	0.1285	0.204	2.770	3.251
<i>GSE17710</i>	0.65	0.39	1.07	0.0919	0.257	1.738	2.108
<i>GSE19188</i>	0.78	0.49	1.23	0.2813	0.235	2.091	2.507
<i>GSE41271</i>	0.69	0.56	0.84	0.0003	0.103	10.771	10.114
<i>KM Plotter database</i>	0.69	0.6	0.79	0.00000008	0.070	23.399	16.700
<i>CAARRAY</i>	0.61	0.48	0.79	0.0001	0.127	7.133	7.368
<i>GSE29013</i>	1.48	0.57	3.81	0.419	0.485	0.491	0.620
<i>GSE30219</i>	0.75	0.54	1.04	0.084	0.167	4.122	4.642
<i>GSE31908</i>	2.06	0.41	10.28	0.3672	0.822	0.171	0.218
<i>GSE37745</i>	0.5	0.35	0.7	0.00004	0.177	3.686	4.206
<i>GSE50081</i>	0.71	0.43	1.17	0.17	0.255	1.767	2.141
<i>TCGA</i>	0.54	0.24	1.21	0.13	0.413	0.677	0.850
<i>SurvExpress database</i>	0.74	0.61	0.88	0.001096	0.093	13.186	11.677
<i>GSE5123</i>	0.74	0.34	1.59	0.4374	0.394	0.744	0.932
<i>GSE42127</i>	0.85	0.52	1.39	0.5014	0.251	1.832	2.215

Deuxième partie : L'absence d'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral influence le développement et les fonctions des cellules NK.

Article n° 2

Lack of FcRn impairs natural killer cell development and functions in the tumor microenvironment.

Diana Cadena Castaneda, Christine Dhommée*, Thomas Baranek*, Emilie Dalloneau, Laurie Lajoie, Alexandre Valayer, Christophe Arnoult, Marie-Véronique Demattéi, Delphine Fouquenet, Christelle Parent, Nathalie Heuzé-Vourc'h** and Valérie Gouilleux-Gruart**. *Frontiers in Immunology*. 2018

* Contribution identique à l'étude

** Contribution égale à l'encadrement du projet

Introduction

Depuis la description initiale des fonctions du FcRn dans la demi-vie et la biodistribution des immunoglobulines, les connaissances concernant les fonctions du FcRn n'ont pas cessé de s'étendre. Ceci est illustré par son implication récente et jusqu'alors insoupçonnée dans la réponse anti-tumorale, révélée dans trois articles originaux dont le nôtre décrit précédemment (Baker et al. 2013; Dalloneau et al. 2016; Swiercz et al. 2016). Ils apportent certains indices sur le fonctionnement de ce récepteur dans la réponse anti-tumorale, en particulier la première étude de Baker et al. en 2013. Cette étude a révélé que le FcRn était impliqué dans la présentation croisée des complexes immuns spécifiques de tumeur, au sein des cellules dendritiques permettant l'activation des cellules T CD8 cytotoxiques (Baker et al. 2013). Puis, au sein de notre laboratoire nous avons démontré que l'expression du FcRn était dérégulée dans les tissus cancéreux de patients atteints de cancer pulmonaire (voir article N°1). Enfin, plus récemment, l'équipe de Sally Ward a suggéré que la diminution d'expression du FcRn par les cellules tumorales elles-mêmes constituait un avantage dans la promotion du développement tumoral. Ceci serait conséquent à l'augmentation de la consommation de l'albumine qui n'est plus recyclée par le FcRn, mais utilisée comme source d'énergie par les cellules tumorales (Swiercz et al. 2016).

Ainsi, le niveau d'expression du FcRn influence la tumorigenèse, mais les effets sur les différents acteurs de la réponse anti-tumorale, en dehors des cellules dendritiques et des cellules T CD8, restent encore peu clairs. Ces dernières sont importantes dans la réponse anti-tumorale, néanmoins ce ne sont pas les seuls acteurs de l'immunosurveillance tumorale. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris de décortiquer comment l'absence du FcRn influence la tumorigenèse et la réponse anti-tumorale. Pour cela, nous nous sommes tournés vers un modèle murin syngénique de « métastases » pulmonaires, le modèle B16F10 (Overwijk and Restifo 2001). Ce modèle est très largement utilisé dans l'exploration de la réponse anti-tumorale, notamment dans celle de l'implication du récepteur FcγRI, des lymphocytes T CD8 cytotoxiques et des cellules NK. Ainsi, l'importance du récepteur FcγRI dans l'efficacité du traitement par anticorps a été décrite avec l'anticorps TA99, dirigé contre l'antigène tyrosinase TYRP-1/gp75 exprimé par les B16F10 (Bevaart et al. 2006). D'autre part, les acteurs (cellules T CD4 et TCD8) impliqués dans la réponse immunitaire spécifique d'antigènes ont été également évalués (Ramirez-Montagut et al. 2003). Enfin, ce modèle a été utilisé dans de nombreuses études concernant le rôle des cellules NK, en particulier leur

importance dans la résistance au développement des métastases pulmonaires, puisque leur élimination induisait une augmentation encore plus importante du nombre de métastases pulmonaires (Grundy, Zhang, and Sentman 2007).

Dans notre étude, nous avons réalisé des injections de cellules B16F10 à des souris WT et des souris FcRn $-/-$, aboutissant à la formation de nodules tumoraux bien distincts au niveau des poumons. Une analyse macroscopique des poumons a permis de confirmer que l'absence de FcRn dans le microenvironnement tumoral facilitait le développement des « métastases ». Afin d'explorer le rôle du FcRn sur les acteurs cellulaires du système immunitaire autres que les cellules dendritiques et les cellules T CD8, nous avons réalisé un immunophénotypage des cellules infiltrant les poumons tumoraux et un organe lymphoïde secondaire (la rate). Nous avons démontré pour la première fois que l'absence du FcRn influençait la réponse anti-tumorale via les cellules NK.

Ce travail a révélé l'implication des cellules NK comme relais important de l'activité du FcRn dans la réponse anti-tumorale. Je vais donc introduire ici les éléments concernant la biologie des cellules NK se rapportant à notre sujet.

A. Les cellules NK

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes innées (ILC) qui, contrairement aux lymphocytes de l'immunité adaptative, n'expriment pas de récepteurs spécifiques de l'antigène (Crinier et al. 2017). Les ILC dérivent d'un précurseur commun et se répartissent en trois classes de cellules matures : les ILC1 cytotoxiques, les ILC auxiliaires ILC2 et ILC3. Les cellules NK appartiennent aux ILC de type 1 qui se caractérisent par l'expression des facteurs de transcription T-bet et EOMES, par la sécrétion de cytokines en particulier l' $IFN\gamma$ et une variété de chimiokines, ainsi que par ses fonction cytotoxiques (cytotoxicité " naturelle " et l'ADCC). Les cellules NK possèdent un large éventail de récepteurs inhibiteurs et activateurs qui ont pour fonction de différencier le " soi " du " non soi " (ou soi altéré, ex. cellules cancéreuses) et de reconnaître différents signaux de danger. Ces attributs fonctionnels font des cellules NK la première ligne de défense de l'organisme contre les cellules tumorales ou infectées par des agents pathogènes, tout en sécrétant des cytokines/chimiokines qui peuvent participer à la stimulation et orientation de la réponse immunitaire adaptative (Gasteiger et al. 2013; Ferlazzo and Morandi 2014). Ces cellules ont également d'autres rôles importants en transplantation d'organes et greffes de cellules souches

hématopoïétiques, ain qu'en reproduction (Villard 2011; Tsirigotis, Resnick, and Shapira 2012; Moffett and Colucci 2014).

Les cellules NK sont retrouvées dans différents compartiments de l'organisme en proportion variable (poumons, endomètre ...etc). Elles sont localisées dans le sang périphérique ainsi que dans divers organes spécialisés qui assurent soit leur développement (organes lymphoïdes primaires, comme la moelle osseuse et le thymus), soit leur maintien et leur rencontre avec les agents pathogènes (organes lymphoïdes secondaires). Les cellules NK se développent en plusieurs étapes dans la moelle osseuse et sont identifiées par l'expression de récepteurs de surface, de facteurs de transcription et de certaines combinaisons de cytokines. Cette population cellulaire est très hétérogène (Freud and Caligiuri 2006; Di Santo and Vosshenrich 2006).

Bien qu'il existe des différences claires entre l'Homme et la souris, notamment au niveau des récepteurs, diverses études ont révélé une certaine conservation des mécanismes de régulation du développement, des mécanismes d'activation et des fonctions des NK chez ces deux espèces (Colucci, Di Santo, and Leibson 2002; N. D. Huntington et al. 2007; Vivier et al. 2008). Nous décrirons en priorité les connaissances relatives aux cellules NK murines.

a. Le développement et la maturation des cellules NK

Les différentes études effectuées dans les modèles murins et dans les modèles *in vitro* ont beaucoup contribué à la compréhension du processus de développement et maturation des NK (J. Yu, Freud, and Caligiuri 2013). Les premières étapes du développement se produisent dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur hématopoïétique commun. Plus particulièrement, à partir de la famille des cellules Lymphoïdes Innées, qui en présence d'une combinaison de cytokines et chimiokines différentes, ainsi qu'en présence d'autres facteurs produits localement (ex : les interleukines 15 et 2 ou IL-15, IL-2, facteurs de croissance comme c-Kit ligand, FLt-3 ...etc.) par les cellules stromales de la moelle osseuse, sont nécessaires pour orchestrer le développement des cellules NK (Mrózek, Anderson, and Caligiuri 1996; H. Yu et al. 1998; Iizuka et al. 1999). Ces études ont permis de proposer un modèle de développement des cellules NK chez la souris au niveau de la moelle osseuse, qui se ferait à travers la perte et l'acquisition séquentielle de marqueurs proposés (Figure 21) (Nicholas D Huntington, Vosshenrich, and Di Santo 2007; J. Yu, Freud, and Caligiuri 2013).

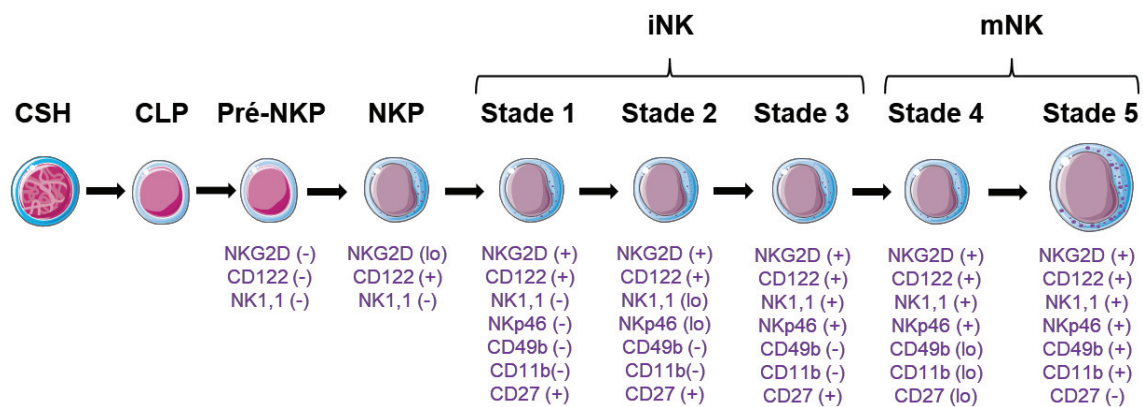


Figure 21: Représentation schématique du développement des cellules NK chez la souris

Ici sont représentés en particulier les marqueurs ayant fait l'objet de notre étude. En résumé, le développement des cellules NK chez la souris démarre dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ensuite, ces cellules souches se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) pour successivement perdre/acquérir des marqueurs nécessaires jusqu'à l'obtention de cellules NK matures prêtes à sortir de la moelle osseuse CD11b⁺/CD49b⁺ (ou DX5). Pour chaque stade de développement, l'acquisition de l'expression de chaque antigène de surface permet de distinguer les populations d'intermédiaires du développement des NK. "+" (expression), "-" (aucune expression) ou "lo" (expression faible).

Chez la souris, l'acquisition de l'expression du CD122 (chaîne α du récepteur commun à l'IL-2 et l'IL-15) est un évènement important pour que les précurseurs s'engagent dans le développement des NK (Freud and Caligiuri 2006; J. Yu, Freud, and Caligiuri 2013; Mrózek, Anderson, and Caligiuri 1996). Remarquons que cela est également vrai pour l'Homme (J. Yu, Freud, and Caligiuri 2013). Ainsi, les précurseurs de cellules NK qui expriment le CD122 répondent à l'effet de l'IL-15, montrant ainsi un rôle central de cette cytokine chez les deux espèces (Lodolce et al. 1998; Kennedy et al. 2000). Le passage des précurseurs de NK (NKP) qui se différencient en NK immatures (iNK) est un point de non-retour dans la lignée NK (Freud et al. 2006). Ces cellules se caractérisent par de nombreux marqueurs (voir figure 1), mais n'expriment pas encore les protéines effectrices (IFN- γ , perforine, granzyme) caractéristiques des NK matures. Néanmoins, certaines études ont révélé qu'une sous-population de iNK pouvait exercer une activité lytique par l'intermédiaire de TRAIL (Takeda et al. 2005). Cette population iNK se trouve être également présente dans les organes lymphoïdes secondaires et peuvent constituer une population progénitrice des NK en dehors de la moelle osseuse (Freud et al. 2006; Goh and Huntington 2017). Enfin, une fois que les cellules NK ont acquis les récepteurs nécessaires et qu'elles sont aptes à faire la différence entre le « soi » et « non soi » elles vont pouvoir sortir de la moelle osseuse (Orr and Lanier

2010). La population des iNK qui servent de progéniteurs en dehors de la moelle osseuse peuvent également être « rééduqués » (Y. He and Tian 2017).

En dehors de cette hétérogénéité, il a été démontré que les NK sorties de la moelle osseuse peuvent continuer leur « maturation » en périphérie. D'après les travaux de Chiossone et al. cette maturation se caractérise par une variation de l'expression des marqueurs CD11b et CD27 selon 4 étapes successives : Double négatives (DN : CD11b⁻/CD27⁻) → (CD11b⁻/CD27⁺) → Double positives (DP : CD11b⁺/CD27⁺) → (CD11b⁺/CD27⁻) étant la sous population de NK qui va pouvoir acquérir des fonctions effectrices (cytotoxiques et productrices de cytokines) (Chiossone et al. 2009). Les proportions de chaque sous-population vont être différentes et caractéristiques de chaque tissu (Holmes et al. 2014).

Ainsi, l'ensemble de ces données montre que les étapes de développement/maturation et d'acquisition des fonctions effectrices des NK constituent un processus complexe aboutissant à une population hétérogène de cellules NK. Cela s'avère être vrai non seulement pour la souris, mais aussi pour l'Homme (Shi et al. 2011; Peng et al. 2013; Daussy et al. 2014).

Enfin, l'existence des cellules NK mémoire à longue durée de vie avec une réponse secondaire spécifique amplifiée a été suggérée, bien que les cellules NK appartiennent à l'immunité innée (Marcus and Raulet 2013; Peng and Tian 2017). Cette population de NK mémoires constituerait un stade avancé dans le développement/maturation des cellules NK avec des critères fonctionnels particuliers.

Ainsi, plusieurs facteurs interviennent dans le développement/maturation des cellules NK. Nous distinguons les facteurs intrinsèques qui englobent principalement les facteurs de transcription et les facteurs extrinsèques qui correspondent majoritairement à des cytokines/chimiokines.

b. Facteurs intrinsèques : les facteurs de transcription

Plusieurs facteurs de transcription sont essentiels à la génération des cellules NK, leur intervention est complexe et séquentielle dans la moelle osseuse et en dehors de la moelle osseuse (Figure 22) (Hesslein and Lanier 2011; Sun 2015; Geiger and Sun 2016; Goh and Huntington 2017).

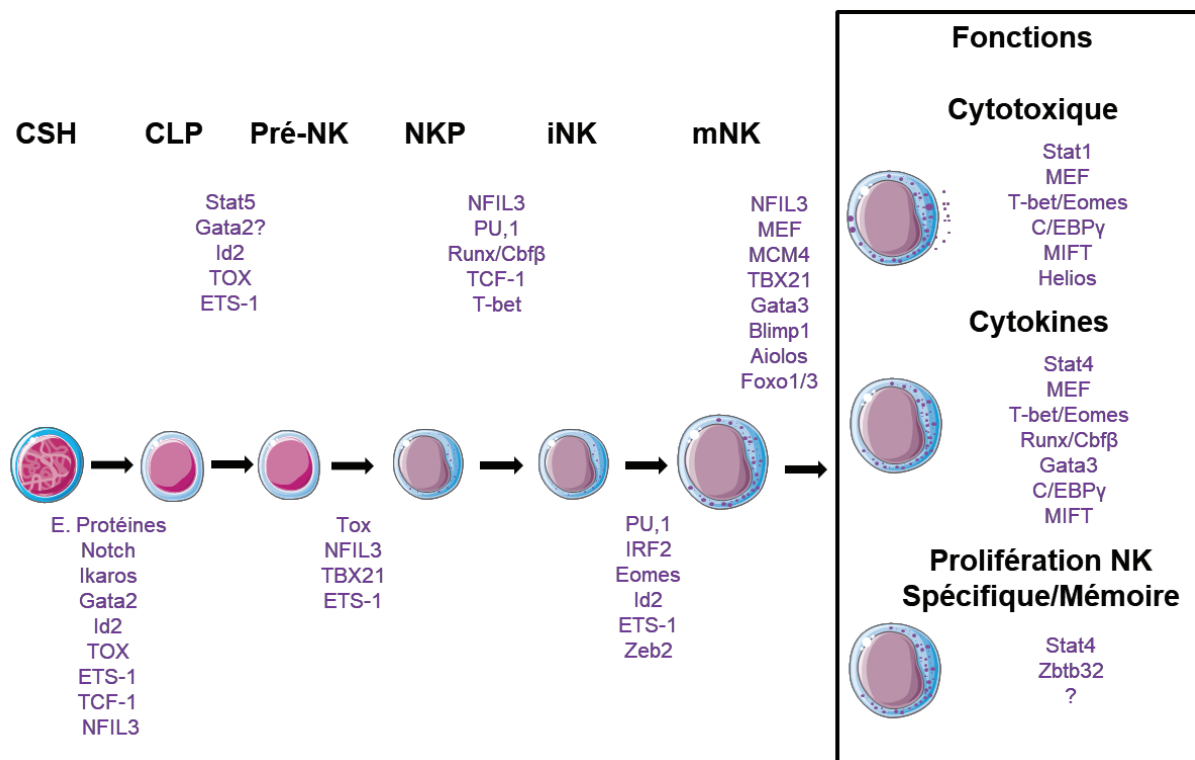


Figure 22: Principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement/maturation des NK chez la souris.

La coordination et régulation spatio-temporelle de l'expression des facteurs de transcription assure le choix du lignage et la régulation des fonctions effectrices des cellules NK, (Luevano, Madrigal, and Saudemont 2012; Bernardini et al. 2014). Leur intervention au cours du développement des cellules NK est schématisée dans la figure ci-dessus, celle-ci est commune à l'Homme et la souris. Certains facteurs de transcription tels que Id2, TOX ou NFIL3 (ou E4BP4) interviennent dans la progression des cellules souches hématopoïétiques vers les différents stades, dont les progéniteurs communs lymphoïdes. D'autres facteurs comme T-bet et Eomes agissent ensemble pour promouvoir la maturation et fonctions des NK à partir du stade NKP (Gordon et al. 2012) en agissant par exemple sur l'expression de gènes qui codent pour la perforine, les granzymes, l'IFN- γ et le TNF- α (Freud and Caligiuri 2006; Gill et al. 2012). Enfin des facteurs tels que ETS-1 (Ramirez et al. 2012), Aiolos (Holmes et al. 2014), ou encore GATA3 (Freud et al. 2006; Ali et al. 2016) interviennent dans le contrôle de la différenciation, des fonctions effectrices ou encore de l'homéostasie des NK.

c. Facteurs extrinsèques : signaux du microenvironnement

Des signaux avec des rôles complémentaires et chevauchants sont requis dans le processus de développement/maturation des cellules NK (Figure 23). Notamment, l'IL-12, IL-15 et l'IL-18 sont des facteurs jouant un rôle à la fois dans l'engagement des CSH vers la lignée NK, dans leur maturation et l'activation de leurs fonctions effectrices. Les effets et voies de signalisation de ces cytokines sont par ailleurs bien conservés entre l'Homme et la souris (Marçais et al. 2013; Stabile et al. 2018).

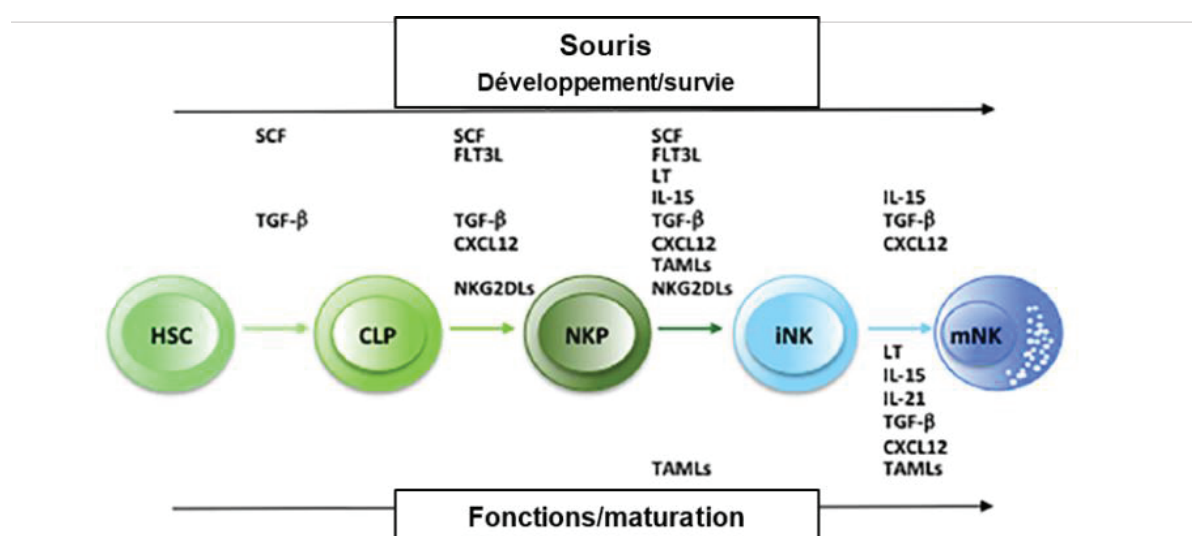


Figure 23: Facteurs extrinsèques impliqués dans le développement/maturation des cellules NK, d'après (Stabile et al. 2018).

Les cytokines (IL-15, IL-21, TGF-β), les chimiokines (CXCL12) et divers systèmes de récepteurs-ligand (TAML, Notch1, NKG2DL ...etc.) guident le développement des CSH vers les cellules mNK. SCF : " stem cell factor " ; LT : lymphotoxines (appartiennent à la famille des ligands TNF).

d. Homéostasie et circulation des NK

Une fois les cellules NK matures et aptes à pouvoir assurer leur rôle en périphérie, elles vont sortir de la moelle osseuse. Ce processus fait intervenir différents récepteurs et protéines circulantes, notamment la Sphingosine-1 phosphate receptor 5 (S1P5) et le récepteur CXCR4, qui sont par ailleurs communes à l'Homme et la souris (Walzer et al. 2007; Mayol et al. 2011; Rouzaire et al. 2012). Les ligands de ces récepteurs sont respectivement S1P (lipoprotéine transportée par l'albumine) et CXCL12 (chimiokine sécrétée par les cellules stromales). Ils se répartissent selon un gradient de concentration entre la moelle osseuse et la périphérie, (Mayol et al. 2011). En parallèle à ce gradient, l'expression des récepteurs varie, i.e. que

l'expression de S1P5 augmente tandis que l'expression de CXCR4 diminue pour permettre le processus de sortie des cellules NK entre la moelle osseuse et la périphérie (Figure 24).

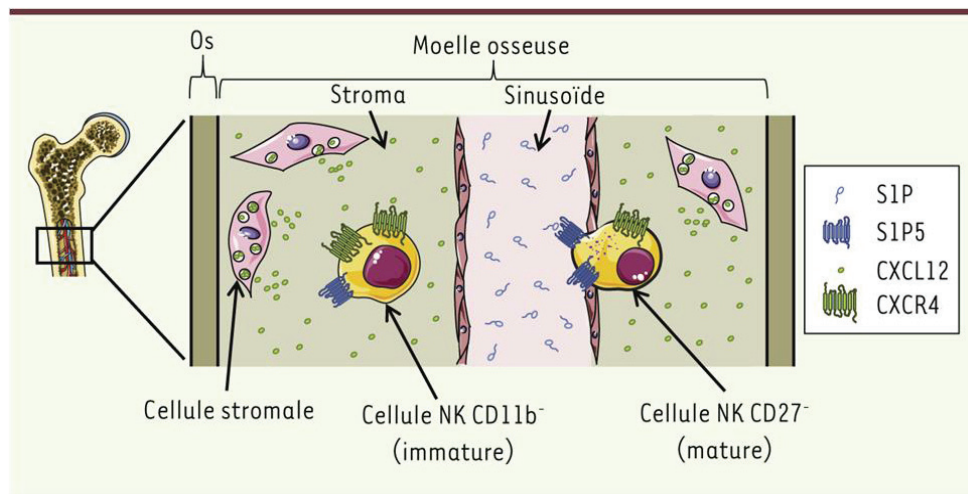


Figure 24: Sortie des cellules NK de la MO vers la périphérie, d'après (Rouzaire et al. 2012).

Dans le stroma de la moelle osseuse, les cellules NK CD11b⁻ immatures sont dans un environnement riche en CXCL12, et expriment faiblement S1P5 et fortement CXCR4 à leur surface. Lors de la maturation des précurseurs en NK CD27⁻ matures, l'expression de S1P5 augmente alors que celle de CXCR4 diminue, permettant à ces NK matures de suivre le gradient de S1P et de sortir de la moelle osseuse *via* les sinusoides.

En périphérie, les cellules NK matures immunocompétentes ont une demi-vie estimée à 17 jours environ chez la souris, rappelons qu'elle est de 7-10 jours chez l'Homme (Rouzaire et al. 2012). La maintenance des cellules NK en périphérie après leur sortie de la moelle osseuse nécessite des interactions cellulaires entre les cellules NK et les cellules environnantes ainsi que des signaux provenant de facteurs solubles (Sun and Lanier 2011; Marçais et al. 2013). Les cellules NK peuvent interagir avec les cellules dendritiques et les monocytes (Walzer et al. 2005; Michel, Hentges, and Zimmer 2012). Ces interactions sont nécessaires à l'homéostasie des cellules NK aux derniers stades de leur développement, notamment par apport d'IL-15 (Guimond et al. 2010; Soderquest et al. 2011). Ce dialogue entre les cellules se fait dans les deux sens, ainsi les NK et cellules dendritiques ou monocytes peuvent s'activer réciproquement à travers la sécrétion de plusieurs facteurs solubles (Vivier et al. 2008). A cela s'ajoutent les études récentes qui ont montré la nécessité d'une interaction avec les neutrophiles au cours du développement afin d'obtenir des NK fonctionnelles (Costantini and Cassatella 2011; Jaeger et al. 2012). Enfin, en fonction des conditions physiologiques ou pathologiques, les NK vont être capables d'être mobilisées dans les différents organes grâce aux différents signaux environnementaux (Sun and Lanier 2011).

e. Les éléments de la reconnaissance des cellules NK

Afin d'assurer la protection de l'hôte, les cellules NK doivent être immunocompétentes. Pour cela elles doivent auparavant acquérir le "permis de tuer" et la capacité de réagir aux stimuli ultérieurs sans attaquer "le soi" (B. Jaeger. E. Vivier 2012). Cette éducation repose principalement sur les interactions entre les cellules NK, via les récepteurs d'activation, les récepteurs inhibiteurs et les cellules éducatrices via des molécules du CMH-I, des molécules non classiques du CMH-I et des molécules non-CMH-I (Tu, Mahmoud, and Makrigiannis 2016; Y. He and Tian 2017). Les cellules NK sont capables d'éliminer rapidement les cellules anormales (ex: tumorales) tout en respectant les cellules saines. Cette capacité résulte d'un équilibre dynamique entre signaux activateurs et inhibiteurs transmis par des récepteurs membranaires. Ces signaux reposent sur des molécules qui peuvent être différentes entre l'Homme et la souris. La majorité des récepteurs inhibiteurs et activateurs appartiennent à deux types : Les glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines (les KIR chez l'Homme et les LIR/ILT communs aux deux espèces) et des glycoprotéines de type lectine (CD94/NKG2 communs aux deux espèces) (Inngjerdingen et al. 2011; Pegram et al. 2011). Les principaux récepteurs sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

Récepteurs	Espèce	Ligands	Activation (Act)/ Inhibition (Inhib)
Famille Ly49	Souris (S)	Molécules du CMH-I	Act/Inhib
Ly49A		H-2D ^{d,k,p}	Inhib
Ly49C		H-2K ^{b,d} , H-2D ^{b,d,k}	Inhib
Ly49D		H-2D ^d	Act
Ly49H		M157	Act
Ly49I		H-2K/D ^{b,d,s,q, v}	Inhib
Ly49P		H-2D ^d	Inhib
KIR	Homme (H)	Molécules HLA-A/-B/-C	Act/Inhib
KIR2DL1		HLA-C2	Inhib
KIR2DL2/3		HLA-C1	Inhib
KIR2DL4		HLA-G	Act
KIR2DL5		?	Inhib
KIR3DL1		HLA-Bw4	Inhib
KIR3DL2		HLA-A3, -A11	Inhib
KIR2DS1		HLA-C2	Act
KIR2DS2		HLA-C1	Act
KIR2DS3		?	Act
KIR2DS4		?	Act
KIR2DS5		?	Act
KIR3DS1		HLA-Bw4	Act
CD94-NKG2	H/S	H : HLA-E/ S :Qa1b	Act/Inhib
NKG2A			Inhib
NKG2C			Act
NKG2E			Act
NKG2D	H/S	H : MIC-A/-B, ULBP1-4 S : RAE-1, MULT-1, H60	Act
NCRs	H/S	Hémagglutinine viral	Act/Inhib
NKp30		BAT-3, HSPG, B7-H6	Act
NKp44		Viral HA	Act
NKp46		Viral HA, HSPG	Act
NKp80		AICL	Act
LILR	H/S	CMH-I, UL18	Inhib
2B4	H/S	CD48	Act/Inhib
KLRG1	H/S	Cadherines	Inhib
NKR-P1	S	M Ocl/Clr-b	Act/Inhib
DNAM-1	H/S	PVR, CD122	Act
PILR M CD99 ACT	S	CD99	Act

Tableau 8 : Principaux récepteurs NK chez l'Homme et la souris d'après de (Pegram et al. 2011).

Abréviations: HA: hémagglutinine; HLA: "human leukocyte antigen"; HSPG: "heparan sulfate proteoglycan"; Inhib: inhibition; KIR: "killer immunoglobuline receptor"; KLRG1: "killer cell lectin-like receptor G1"; LILR: "Leukocyte immunoglobulin-like receptor"; CMH: complexe majeur d'histocompatibilité; MULT-1: "mouse UL16-binding-like transcript-1"; NCR: "natural cytotoxicity receptor"; PVR: "polio virus receptor"; RAE-1: "retinoic acid early transcript-1".

f. Les fonctions effectrices des cellules NK

Les cellules NK sont des cellules "sentinelles" capables d'éliminer rapidement les cellules anormales (tumorales ou infectées). Mais en plus, en faisant partie du système immunitaire inné, les cellules NK participent à la mise en place d'une réponse adaptative efficace à travers la sécrétion de différents médiateurs solubles et le dialogue bidirectionnel avec d'autres cellules immunitaires (Figure 25).

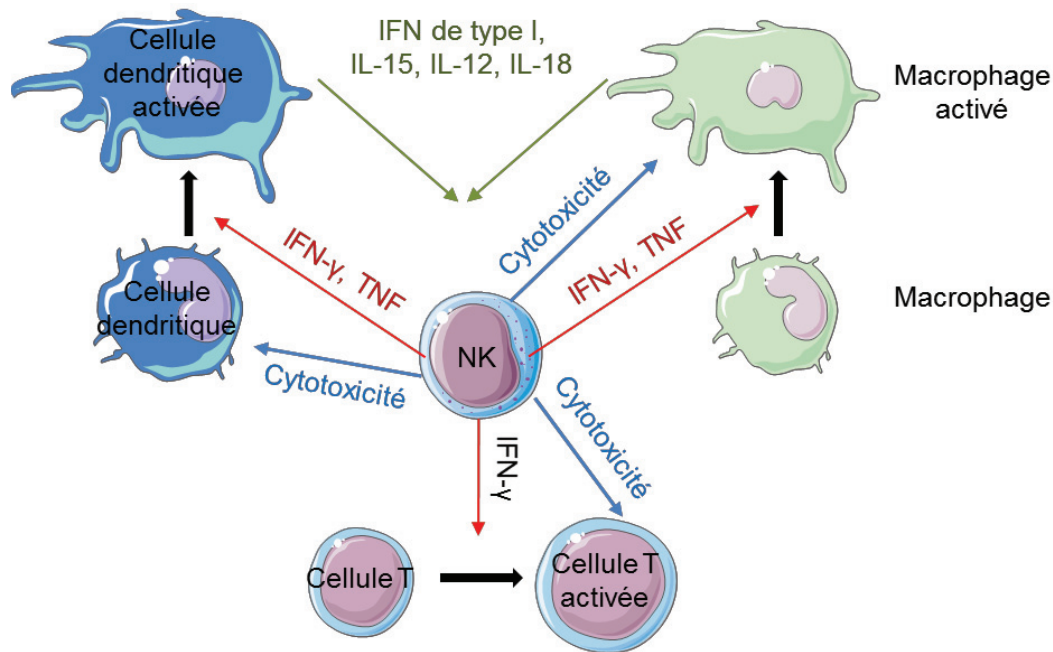


Figure 25: Régulation de la réponse immunitaire par les cellules NK, d'après (Vivier et al. 2008).

L'activation des cellules NK par divers facteurs solubles (ex : l'IFN) stimule (flèches rouges) la maturation et l'activation des cellules dendritiques, MΦ et cellules T. Les cellules NK peuvent également induire la mort cellulaire (flèches bleues) des cellules dendritiques immatures, des cellules T CD4 activées et des MΦ hyperfonctionnels. Ces fonctions régulatrices de la part des cellules NK sont sous le contrôle de la reconnaissance de molécules du soi exprimées de manière constitutive (ex : CMH de classe I) au moyen de récepteurs inhibiteurs (ex : molécules Ly49 chez la souris).

Les cellules NK ont un rôle complémentaire à celui des lymphocytes T CD8 lorsque les cellules tumorales n'expriment plus de molécules du CMH de classe I. Ainsi, les cellules NK ont deux principales fonctions : la fonction cytotoxique contre les cellules infectées ou transformées, et la sécrétion de facteurs solubles, cytokines et chimiokines après stimulation. Le déclenchement et le contrôle de ces fonctions passe à travers les récepteurs que ces cellules expriment (Vivier et al. 2008).

g. La cytotoxicité

Suite à la reconnaissance de la cellule cible par l'engagement de la bonne combinaison de récepteurs, il va y avoir formation d'une synapse immunologique, au niveau de laquelle les cellules NK vont exercer leur fonction cytotoxique (Figure 26).

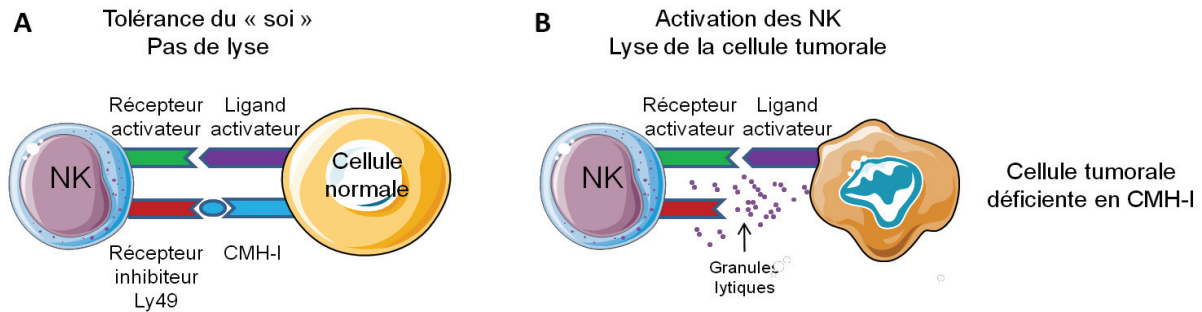


Figure 26: Représentation schématique de la fonction cytotoxique des cellules NK contre la cellule tumorale, adapté de (Morvan and Lanier 2015).

A) Un équilibre des signaux délivrés par les récepteurs activateurs et inhibiteurs régule la reconnaissance des cellules normales ou « saines » par les cellules NK. B) Les cellules tumorales qui régulent en général négativement les molécules CMH de classe I sont détectées en tant que du « soi manquant » et sont lysées par les cellules NK.

Deux mécanismes principaux sont impliqués : la libération de granules cytotoxiques perforine/granzyme et l'implication de « récepteurs de mort » (Fas-L sur NK, Fas sur la cible ; Trail-Trail récepteur. TNF- α -TNF-R). Actuellement, le rôle et l'importance relative de chacun de ces systèmes dans la lyse médiée par les cellules NK n'est pas clairement établi, néanmoins la voie perforine / granzyme semble être prédominante. Ceci est commun aux NK chez l'Homme et la souris. Enfin, parmi les différences entre l'Homme et la souris, il est important de noter leur différence par rapport au récepteur Fc γ RIII/CD16 et sa relation avec la fonction ADCC. Chez l'Homme, la fonction d'ADCC peut être induite par le seul engagement du CD16A (récepteur Fc γ activateur) avec à la fois la production de cytokines et le déclenchement de la cytotoxicité (Vivier et al. 2008; Vivier and Ugolini 2010). En revanche, chez la souris, le CD16 n'est pas équivalent au CD16A humain (Bruhns 2015). La fonction d'ADCC chez la souris est assurée par les cellules myéloïdes (M Φ) et non par les cellules NK (Nimmerjahn and Ravetch 2010).

h. La production de cytokines et chimiokines

Les cellules NK produisent en particulier de l'IFN- γ , mais aussi du TNF- α , de l'IL-10, du GM-CSF et les chimiokines, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) et CCL5 (RANTES). Ce large panel de cytokines produites par les cellules NK peut participer à la régulation de la réponse inflammatoire, par exemple par le recrutement de M Φ et de cellules dendritiques, au contrôle direct de la réplication virale par la production d'IFN- γ ou au contrôle du type de la réponse adaptative (orientation TH1/TH2/Treg). Il est important de noter qu'il y a des différences entre l'Homme et la souris quant à l'induction de la synthèse des cytokines/chimiokines. Notamment chez la souris, la production d'IL-10 requiert STAT4 en aval de l'interaction entre l'IL-12 et son récepteur (Grant et al. 2008). Dans les deux espèces, c'est la synthèse d'IFN- γ qui caractérise le mieux les cellules NK. L'IFN- γ a un rôle pléiotropique puisque plusieurs types cellulaires expriment son récepteur (Scharton and Scott 1993; Dunn, Koebel, and Schreiber 2006; Lion et al. 2009; Aquino-López et al. 2017).

La présentation synthétique des connaissances concernant le développement, la maturation et l'activation des cellules NK va permettre d'appréhender nos résultats concernant l'impact de l'absence du FcRn. Dans notre modèle animal de souris WT ou FcRn KO, l'injection par voie intraveineuse des cellules B16F10 conduit à la formation de métastases pulmonaires, processus décrit dans l'article suivant.

Résultats principaux

Dans ce travail, nous avons évalué l'influence de l'absence d'expression du FcRn (dans le microenvironnement tumoral) sur le développement tumoral et la réponse anti-tumorale. Pour cela nous avons utilisé le modèle syngénique de métastases pulmonaires issues de cellules de mélanome B16F10, bien décrit dans la littérature. Les cellules B16F10 sont positives pour l'expression du FcRn (western- blot; données non présentées). Ainsi, nous avons observé que le nombre de nodules tumoraux était significativement plus important chez les souris déficientes pour le FcRn, par comparaison aux souris sauvages (Figure 1).

L'analyse de nos résultats concernant l'intervention des cellules du système immunitaire dans le rôle du FcRn sur la réponse anti-tumorale, concorde avec l'implication des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD8 décrite par Baker et al (Baker et al. 2013) (Figure 2 A et G). De façon tout à fait inattendue, nous avons identifié la participation des cellules NK dans ce phénomène. Ainsi, dans ce modèle tumoral, nous avons observé :

- un défaut du pourcentage des cellules NK chez les souris FcRn ^{-/-} par comparaison aux souris sauvages (Figure 2 H), associé à un pourcentage élevé de neutrophiles chez les souris FcRn ^{-/-} (Figure 2 C,K)
- un défaut de la maturation des cellules NK dans les poumons et la rate des souris FcRn ^{-/-} (Figure 4), mis en évidence par l'utilisation des marqueurs de maturation CD11b et CD27 décrits par Chiossone et al (Chiossone et al. 2009)
- une réduction de la capacité des cellules NK de souris FcRn ^{-/-} à produire de l'IFN- γ et à exprimer le CD107a par rapport à celle des souris WT

Ces résultats obtenus dans un contexte de développement tumoral, révélant un défaut de maturation et d'activation fonctionnelle des cellules NK en absence d'expression de FcRn, nous ont amené à évaluer l'état de maturation et développement des cellules NK chez des souris FcRn ^{-/-} naïves (Figure 5 et 6). Nous avons mis en évidence que le défaut de développement et de maturation des cellules NK préexistait chez les souris FcRn ^{-/-} naïves et cela précocement, depuis la moelle osseuse jusqu'en périphérie (poumons et rate). De plus, les fonctions (production d'IFN γ et dégranulation (CD107a⁺) des cellules NK de rate issues de souris FcRn ^{-/-} étaient également altérées. Ceci que ce soit après une stimulation par PMA/ionomycine ou après une stimulation plus physiologique par des cytokines comme l'IL-12, IL-15 et IL-18 (Figure 7 A-D).

Nous avons également montré que l'absence de FcRn n'affectait pas les capacités de lyse spécifique à l'état basal (Figure 7 E). En revanche, l'étude de la prolifération et de la mort cellulaire en présence d'IL-2 a mis en évidence une sensibilité à la mort cellulaire *in vitro* (Figure 7 F et G). Les résultats fonctionnels impliquant l'activation par des cytokines semblent être en faveur d'un défaut cellulaire impliquant l'activation via les cytokines.

Ainsi, l'ensemble des résultats décrit dans l'article n°2 démontre que l'absence d'expression du FcRn affecte la réponse anti-tumorale. Cette absence pourrait altérer la signalisation (via des cytokines) entre les cellules immunitaires, affectant alors l'efficacité de la réponse anti-tumorale. De plus, les résultats chez les souris FcRn $-/-$ naïves rapportent pour la première fois l'implication du FcRn dans le développement/maturation des cellules NK. L'ensemble de ces résultats est repris dans la discussion générale englobant les deux articles.



Lack of FcRn Impairs Natural Killer Cell Development and Functions in the Tumor Microenvironment

Diana Cadena Castaneda^{1,2}, Christine Dhommée^{1,2†}, Thomas Baranek^{1,3†}, Emilie Dalloneau^{1,3}, Laurie Lajoie^{1,2}, Alexandre Valayer^{1,3}, Christophe Arnoult^{1,2}, Marie-Véronique Demattéi^{1,2}, Delphine Fouquet^{1,3}, Christelle Parent^{1,3}, Nathalie Heuzé-Vourc'h^{1,3‡} and Valérie Gouilleux-Gruart^{1,2*‡}

¹ Université François Rabelais de Tours, Tours, France, ² CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France, ³ INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, U1100, Tours, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabrizio Mattei,
Istituto Superiore di Sanità (ISS), Italy

Reviewed by:

Anahid Jewett,
University of California, Los Angeles,
United States
Dr. Kawaljit Kaur,
University of California, Los Angeles,
United States

*Correspondence:

Valérie Gouilleux-Gruart
valerie.gouilleux@univ-tours.fr

† These authors have contributed
equally to this work

‡ These authors have contributed
equally in the design of this project

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 08 March 2018

Accepted: 11 September 2018

Published: 28 September 2018

Citation:

Castaneda DC, Dhommée C, Baranek T, Dalloneau E, Lajoie L, Valayer A, Arnoult C, Demattéi M-V, Fouquet D, Parent C, Heuzé-Vourc'h N and Gouilleux-Gruart V (2018) Lack of FcRn Impairs Natural Killer Cell Development and Functions in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 9:2259. doi: 10.3389/fimmu.2018.02259

The neonatal Fc receptor (FcRn) is responsible for the recycling and transcytosis of IgG and albumin. FcRn level was found altered in cancer tissues and implicated in tumor immunosurveillance and neoplastic cell growth. However, the consequences of FcRn down-regulation in the anti-tumor immune response are not fully elucidated. By using the B16F10 experimental lung metastasis model in an FcRn-deficient microenvironment (FcRn^{-/-} mice), we found lung metastasis associated with an abnormal natural killer (NK) cell phenotype. In FcRn^{-/-} mice, NK cells were immature, as shown by their surface marker profile and their decreased ability to degranulate and synthesize interferon γ after chemical and IL-2 or IL-12, IL-15 and IL-18 activation. These new findings support the critical role of FcRn downregulation in the tumor microenvironment in anti-tumor immunity, via NK cell maturation and activation.

Keywords: FcRn, anti-tumor immunity, NK cells, IFN- γ , CD107a, *fcgrt* knock-out

INTRODUCTION

The neonatal Fc receptor (FcRn) is a member of the IgG-Fc receptor family comprising type I (e.g., “classical” Fc γ Rs) and type II (e.g., non-classical FcR: FcRn, TRIM21) receptors (1–3). The structure, expression and functions of this IgG-Fc receptors have been extensively reviewed regarding their major role in the regulation of immune responses (4). FcRn is an MHC class I-related molecule consisting of a heavy chain associated with β 2-microglobulin molecule, well-known for its role in regulating IgG and albumin homeostasis (5). Indeed, FcRn-dependent IgG and albumin recycling leads to an extended half-life of these two molecules (6, 7). FcRn is also a main actor in the biodistribution of IgG and albumin throughout the body, via transcytosis (3, 8). Accordingly, FcRn expression is ubiquitous within organs and tissues, with high expression in endothelial and epithelial cells (9). It is also expressed by hematopoietic cells, in particular macrophages/monocytes and dendritic cells (DCs) (10). The expression of FcRn in antigen-presenting cells is connected to its implication in the humoral immune response, via an immune complex presentation (11).

Besides these functions, FcRn was recently found an important player in anti-tumor immunity. First, FcRn in immune cells was shown to be critical for the activation of tumor-reactive CD8⁺ T cells in colorectal cancer (12). The density of FcRn-expressed DCs was correlated with CD8⁺ T-cell number and predicted improved prognosis in human colorectal carcinoma. Second, we reported FcRn mRNA and protein levels in both lung cancerous tissue and non-cancerous tissue

associated with favorable prognosis in non-small cell lung cancer (13). Third, studies involving neoplastic cells expressing different levels of FcRn showed that FcRn-mediated recycling of albumin reduced tumor cell growth and proliferation (14).

Because FcRn may shape additional anti-tumor properties, here we further investigated the consequences of its downregulation. We used the B16F10 experimental lung metastasis model (15, 16) in an FcRn-depleted environment (FcRn^{-/-} mice) and compared the different cellular components of the anti-tumor immune response in wild-type (WT) and FcRn^{-/-} mice. We explored natural killer (NK) cells as relaying FcRn-dependent anti-tumor immunity. These cells are important in the host and therapy-induced immune response against cancer (17, 18) and their efficacy *in vivo* is compromised by suppressive signals delivered by tumor or tumor-associated cells (19, 20).

MATERIALS AND METHODS

Cell Line

The murine melanoma cell line B16F10 Luc⁺ was a kind gift from Dr Laurent Gros (Institute of Cancer Research of Montpellier, Montpellier, France). The murine lymphoma cell line YAC-1 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). B16F10 Luc⁺ and YAC-1 cells were maintained in RPMI 1640 culture medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Lonza), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) referred as complete medium.

B16F10 Experimental Lung Metastasis Model

WT C57BL/6J mice were obtained from Charles River Laboratories. FcRn^{-/-} C57BL/6J mice, deficient in *fcgrt* gene (B6.129X1-Fcgrt tm1 Dcr/DcrJ [*fcgrt*^{-/-}]), were originally purchased from The Jackson Laboratory. A targeting vector was designed to replace 1,588 nucleotide fragments (encoding the promoter sequence 5' end of the transcriptional start site, exon 1, intron 2, and most of exon 2) with a PGK-NeoR cassette. The vector was electroporated into 129X1/SvJ-derived ES/J-1182 embryonic stem (ES) cells. Correctly targeted ES cells were injected into recipient C57BL/6J blastocysts. The resulting chimeric animals were crossed to C57BL/6J mice. The mice were then backcrossed to C57BL/6J for 11 generations. All mice were maintained in a dedicated pathogen-free environment in our animal facility and were used at age 7–12 weeks. All animal studies were performed according to French national regulations (EC directive 86/609/CEE, French decree no. 87-848) after approval was received from the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Val-de-Loire, CEEA VdL (referral no. 2015070117414040).

Syngeneic experimental lung metastases were induced by intravenously injecting 10⁵ B16F10 Luc⁺ melanoma cells in 100 µl RPMI 1640 medium in the tail vein of WT and FcRn^{-/-} mice. The cells colonized lungs and formed well-defined black melanocytic nodules in the lung (15, 21). After 18 days, mice were euthanized. Lungs and spleens were harvested for further analysis. Lungs were scored for number of tumor nodules.

Cell Preparation for Flow Cytometry

Lungs were dissociated into single-cell suspensions by combining mechanical dissociation (gentleMACS Dissociators, Miltenyi) with enzymatic degradation of the extracellular matrix. The enzymatic degradation involved use of a digestion buffer: RPMI 1640 containing 5% FBS, 125 µg/ml Liberase LT (Roche Diagnostics) and 100 µg/ml DNase corresponding to 200 Kuntz units/ml DNase (Roche Diagnostics). Spleens were flushed with a 25G needle and syringe containing the digestion buffer, then incubated for 30 min at 37°C. Bone-marrow cells were isolated from the femur and tibia by flushing with a 25G needle and syringe containing 1X PBS. Red blood cells in the resulting cell suspensions were lysed by using an ammonium chloride buffer, then filtered (70 µm, MACS SmartStrainers) and resuspended at 10⁷ cells/ml in 1X PBS containing 5% FBS and 2 mM EDTA.

Murine NK-Cell Isolation And *ex vivo* Expansion and Stimulation

NK cells were isolated from pooled spleens of WT or FcRn^{-/-} mice by negative selection with magnetic Microbeads (NK cell isolation kit II, Miltenyi). NK-cell purity was >90%. NK cells were expanded in RPMI 1640 complete medium supplemented with 5,000 U/ml rhIL2 (PreproTech) for 4 days. For the cell growth and mortality analyses, cells were counted daily using a cell counting chamber (Malassez). Cell surface-mobilized CD107a and intracellular IFN-γ levels were measured as described (22) after 4-h stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100 ng/mL) and 500 ng/mL ionomycin calcium (Sigma-Aldrich) at 37°C in 5% CO₂. Next, 10⁵ freshly isolated NK cells were added per well with 5 µl (0.5 mg/ml) anti-CD107a (clone 1D4B, FITC, Becton Dickinson [BD]) and 1 µg/10⁶ cells of brefeldin A (GolgiPlug, BD). At the end of incubation, cells were washed with 1X PBS containing 5% FBS and 2 mM EDTA. Then, NK cells were treated with an Fc block (anti-CD32/CD16 in the form of 2.4G2 hybridoma culture supernatant) to inhibit non-specific antibody binding for 20 min and stained for surface NK-cell markers: NK1.1 (clone PK136, APC, BD), NKp46 (clone 29A1.4, Pe, BD), CD27 (clone LG.3A10, PeCy7, BD) and CD11b (clone M1/70, PerCPCys5.5, BD) for 30 min. Samples were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (BD) and stained for intracellular IFN-γ (clone XMG1.2, APC-H7, BD) for an additional 30 min. After washing, cells were analyzed by flow cytometry. For cytokine induced cell surface-mobilized CD107a and intracellular IFN-γ production, 2 × 10⁶–5 × 10⁶ freshly isolated splenocytes were seeded in RPMI 1640 complete medium supplemented or not with 5,000 U/ml rhIL2 or 5 ng/ml rhIL12 (MBL), 50 ng/ml rhIL15 (Miltenyi) and 10 ng/ml rhIL18 (MBL) for 4-h in the presence of brefeldin A and anti-CD107a. After incubation, the cells were additionally stained for CD3, NKp46, NK1.1 and IFN-γ flow cytometry analysis.

Murine NK-Cell Cytotoxicity Assay

For *in vitro* cytotoxicity assays, isolated NK cells were maintained overnight in RPMI 1640 complete medium supplemented with 50 U/ml rhIL2 and mixed at indicated effector: target ratios

(10:1, 5:1 and 1:1) with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, TonboBio) labeled target YAC-1 cells as previously described (23, 24). After 4-h of incubation at 37°C, the specific target cell lysis was assessed by flow cytometry (23).

Flow Cytometry

Single-cell suspension prepared from mouse lungs and spleens were analyzed by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10, Miltenyi). After adding Fc blocking 2.4G2 hybridoma supernatant, cells were stained with mixtures of monoclonal antibodies at the optimal concentration determined in our laboratory and designed to distinguish leukocytes. Mix 1, for dendritic cells, neutrophils and macrophage/monocytes: CD45 (clone 30-F11, APC-H7, BD), CD11c (clone N418 APC, BD), CD11b (PErCPCys5.5, BD), Ly6G (clone 1A8, FITC, eBioscience [eBio]), Ly6C (clone HK1.4, PeCy7, eBio), and F4/80 (clone BM8, V450, BD). Mix 2, for B and T lymphocytes: CD45, CD19 and B220 (clone RA3-6B2, APC, BD), CD3 and TCR (clone H57-597, V450, BD), CD8 (clone 53-6.7, PerCPCys5.5, BD) and CD4 (clone GK1.5, PeCy7, eBio). Mix 3, for NK cells: CD45, exclusion of T and B cells (lineage CD3/TCR/CD19/B220, V450), NKp46 (PE, eBio); and for NK maturation, CD27 (APC, BD) and CD11b (PErCPCys5.5, BD). For bone-marrow single-cell suspensions, an exclusive additional mix was used for NK development: CD45, exclusion of T and B cells (lineage CD3/TER119/C19/B220, FITC), CD122 (clone TM-beta 1, Pe, eBio), NK1.1 (PerCPCys5.5, BD), NKp46 (V450, BD), CD11b (PeCy7, BD), and CD49b (clone DX5, APC, BD). LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) was added for excluding nonviable cells in all analyses. Data analysis involved use of Kaluza 1.3 flow cytometry analysis software (Beckman Coulter).

Statistical Analysis

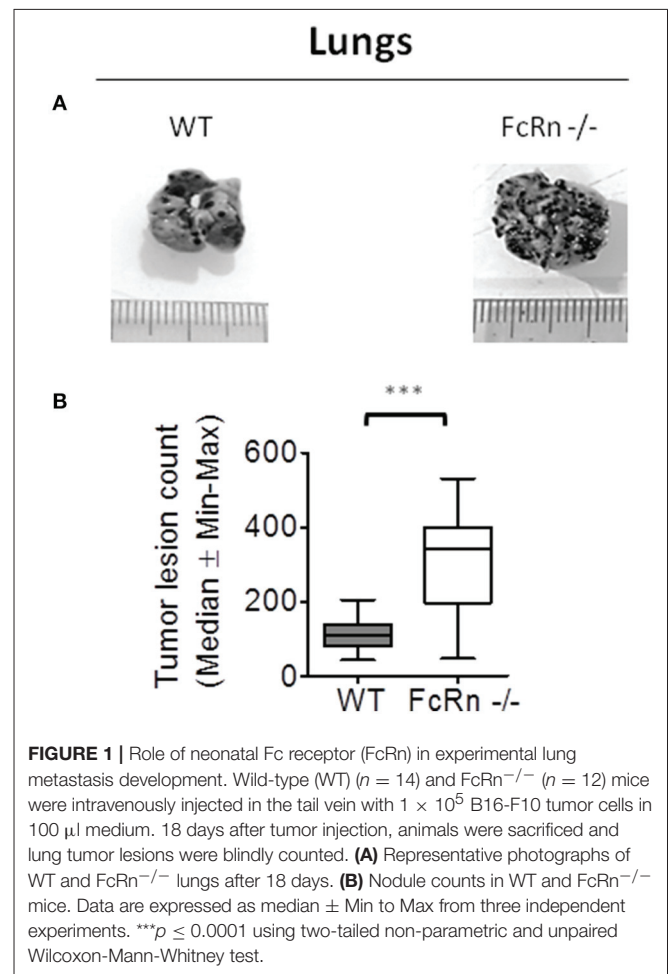
All results are expressed as median $\pm$ Min to Max, unless specified. Statistical significance was analyzed by two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis involved use of Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA), where, ns = not significant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ and *** $p \leq 0.0001$.

RESULTS

Abnormal Immune Cell Profile Associated With Development of Experimental Lung Metastasis in Mice Lacking FcRn

To dissect the role of FcRn in anti-tumor immunity, we used the well-characterized syngeneic B16F10 experimental lung metastasis mouse model (15, 16). B16F10 cells were intravenously injected in WT and FcRn^{-/-} C57BL/6 mice. Macroscopy of lungs revealed a greater number of pulmonary nodules in FcRn^{-/-} than WT mice at 18 days post-implantation (Figure 1). No nodule was detected in other organs under the experimental conditions.

To investigate the immune cell populations in lungs of WT and FcRn^{-/-} mice, we used flow cytometry of cell



suspensions from fully dissociated lungs to distinguish leukocyte populations (Supplementary Figure S1). The proportion of macrophages/monocytes (CD11b⁺/F4/80⁺), B lymphocytes (CD19⁺/B220⁺), T lymphocytes (CD3⁺/TCR⁺) and CD4⁺ T lymphocytes (CD3⁺/TCR⁺/CD4⁺) did not differ between FcRn^{-/-} and WT mice (Figures 2B–F), but that of conventional dendritic cells (cDCs: CD11c⁺/CD11b⁺) and CD8⁺ T lymphocytes (CD3⁺/TCR⁺/CD8⁺) was significantly lower in FcRn^{-/-} than WT mice (Figures 2A,G). As well, the percentage of neutrophils (CD11b⁺/Ly6G⁺) was significantly higher in FcRn^{-/-} than WT mice (Figure 2C). The proportion of NK cells (CD3⁺/B220⁺/NKp46⁺), which do not express FcRn (Supplementary Figure S2), was significantly decreased in FcRn^{-/-} mice (Figure 2H). As well, the number of NK cells was altered but not significantly ($p = 0.059$) in FcRn^{-/-} mice (Figure 2P). The amount of other cell types was not affected (Figures 2I,J,L–O), except for neutrophils, which were increased in FcRn^{-/-} mice (Figure 2K).

Because the lungs are the main primary site of B16F10 nodules after intravenous injection, we explored whether the cell modifications were also detected in other peripheral

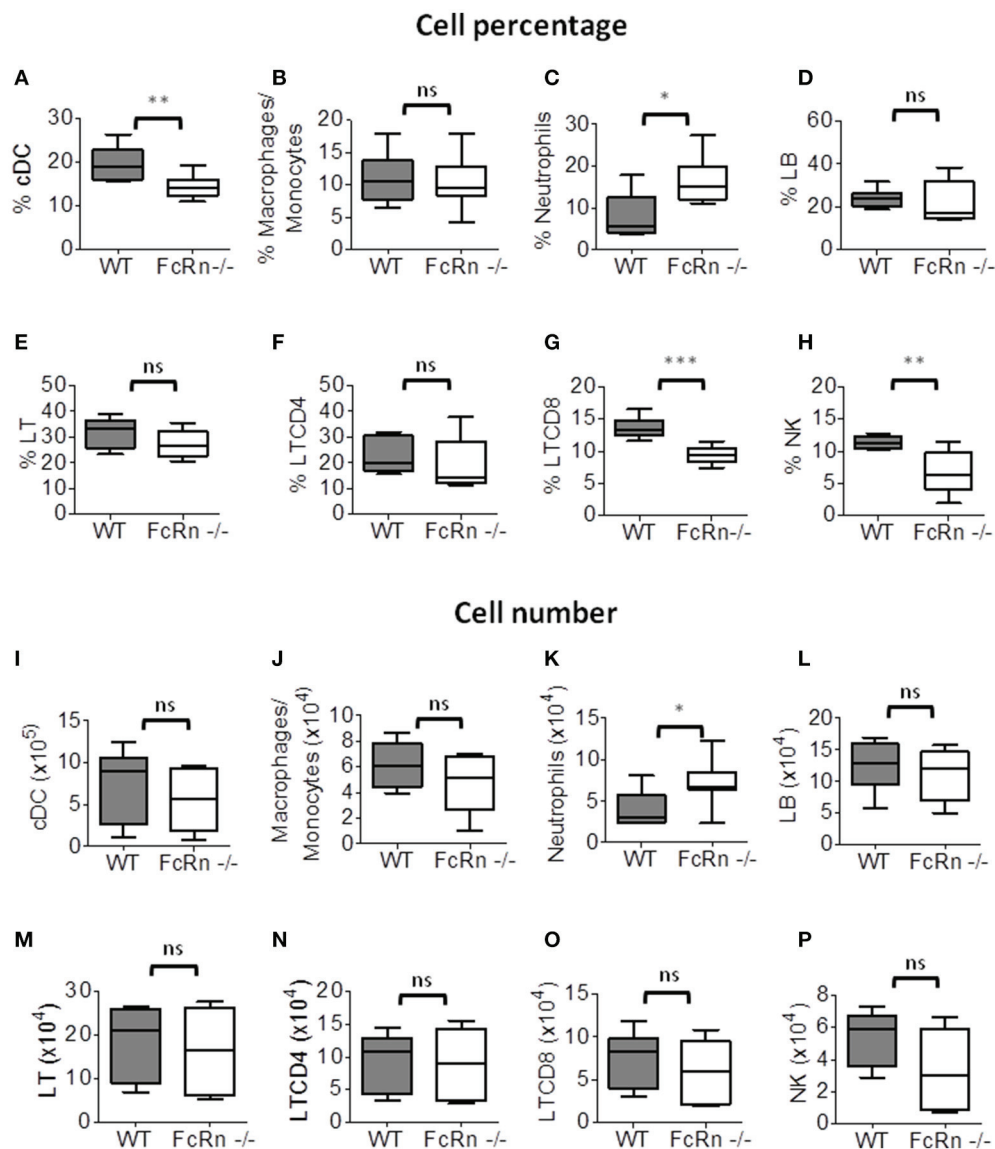


FIGURE 2 | Flow cytometry of leukocytes in lungs of WT ($n = 8$) and FcRn^{-/-} ($n = 8$) mice injected, in the tail vein, with 1×10^5 B16-F10 tumor cells in 100 μ l medium. Lungs were excised and dissociated by combining mechanical dissociation with enzymatic degradation of the extracellular matrix to obtain a single-cell suspension and cells were resuspended at 10^7 cells/ml in 1X PBS containing 5% FBS and 2 mM EDTA for flow cytometry staining. Results correspond to the proportion (top panel: **A–H**) and number (bottom panel: **I–P**) of (**A,I**) conventional dendritic cells, (**B,J**) macrophages/monocytes, (**C,K**) neutrophils, (**D,L**) B lymphocytes, (**E,M**) T lymphocytes, (**F,N**) CD4 T lymphocytes, (**G,O**) CD8 T lymphocytes, and (**H,P**) natural killer (NK) cells (See **Figure S1** for gating strategy). Data are expressed as median $\pm$ Min to Max from one out of three independent experiments with similar results. ns = not significant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, and *** $p \leq 0.0001$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

organs, such as the spleen, where no nodule was detected under our experimental conditions. In the spleen, the percentage and number of macrophages/monocytes (**Figures 3B,J**) and neutrophils (**Figures 3C,K**) were significantly greater in FcRn^{-/-} than WT mice. There was no difference in percentage and number of B lymphocytes (**Figures 3D,L**), T lymphocytes (**Figures 3E,M**) and CD4⁺ T lymphocytes (**Figures 3F,N**). The numbers of cDCs, CD8⁺ T lymphocytes and NK cells were decreased in FcRn^{-/-} mice (**Figures 3I,O,P**), with no variation

in proportion of these cells (**Figures 3A,G,H**). Altogether, data obtained in this experimental lung metastasis model are consistent with the implication of cDCs, CD8⁺ T lymphocytes and NK cells in tumor development in FcRn^{-/-} mice.

Lack of FcRn Affects NK Cell Maturation in Experimental Lung Metastasis Model

To gain insight into defective NK cells in an FcRn-depleted microenvironment, we explored NK cell maturation by flow

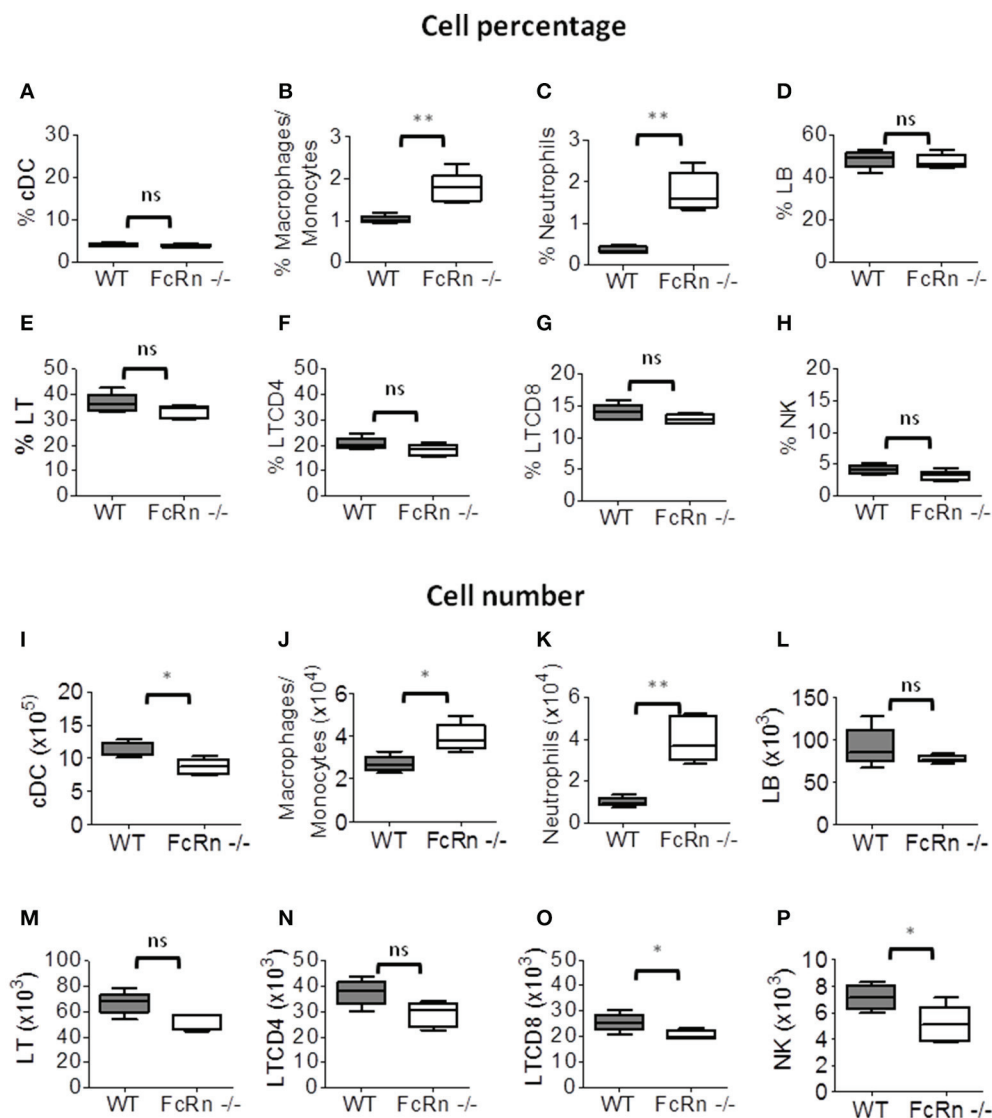


FIGURE 3 | Flow cytometry of leukocytes in the spleen of WT ($n = 5$) and FcRn^{-/-} ($n = 5$) mice injected, in the tail vein, with 1×10^5 B16F10 tumor cells in 100 μ l medium. Spleens were recovered and dissociated by combining mechanical dissociation with enzymatic degradation of the extracellular matrix to obtain a single-cell suspension. Then, cells were resuspended at 10^7 cells/ml in 1X PBS containing 5% FBS and 2 mM EDTA for flow cytometry staining. Results correspond to the proportion (top panel: **A–H**) and number (bottom panel: **I–P**) of (**A,I**) conventional dendritic cells, (**B,J**) macrophages/monocytes, (**C,K**) neutrophils, (**D,L**) B lymphocytes, (**E,M**) T lymphocytes, (**F,N**) CD4 T lymphocytes, (**G,O**) CD8 T lymphocytes, and (**H,P**) NK cells. Data are expressed as median $\pm$ Min to Max from one of two independent experiments with similar results. ns = not significant, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.005$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

cytometry on cell suspensions from lungs and spleen of mice implanted with B16 cells. We distinguished the different stages of NK-cell maturation as previously described under physiological conditions (25, 26). In peripheral organs, mouse NK-cell maturation proceeds through four stages based on CD11b/CD27 expression: CD11b⁻/CD27⁻ (double negative: DN), CD11b⁻/CD27⁺ (CD11b⁻), CD11b⁺/CD27⁺ (double positive: DP), and CD11b⁺/CD27⁻ (CD27⁻). We analyzed these different NK subtypes in lungs and spleen of mice (Supplementary Figure S3). In lungs, the proportion of DN,

CD11b⁻ and DP NK cells was significantly greater in FcRn^{-/-} than WT mice, whereas that of CD27⁻ NK cells, the more mature NK stage, was significantly decreased (Figure 4A). The sum of DN, CD11b⁻, and DP NK cells, corresponding to the less mature cells, was 31.2 and 21.1% in FcRn^{-/-} and WT mice, respectively. Similarly, in spleen, the proportion of less mature cells DN NK cells but not CD11b⁻ and DP NK cells was greater in FcRn^{-/-} than WT mice. The proportion of CD27⁻ NK cells was lower in FcRn^{-/-} than WT mice (Figure 4B). These results reveal less mature NK cells in FcRn-deficient than WT mice in the B16F10

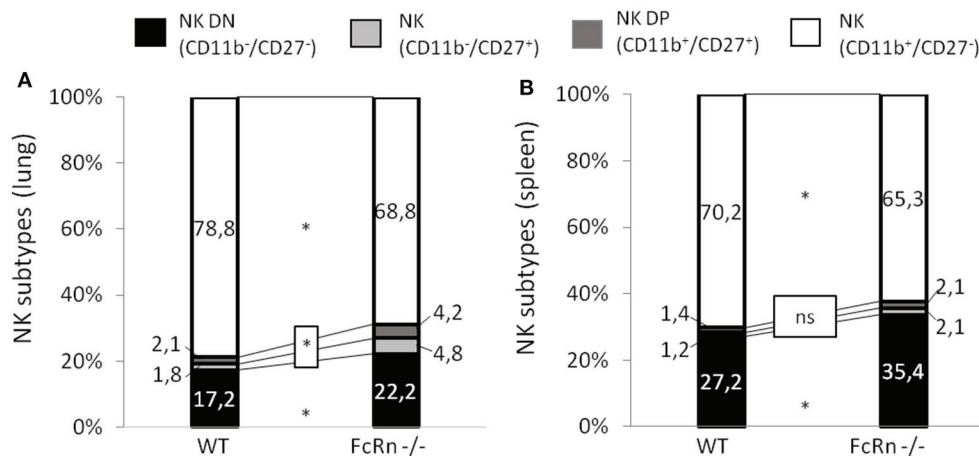


FIGURE 4 | Flow cytometry of NK subtypes based on CD11b and CD27 markers in (A) lungs and (B) spleen from WT ($n = 10$) and FcRn^{-/-} ($n = 10$) mice injected, in the tail vein, with 1×10^5 B16F10 cells in 100 μ l medium. Lungs and spleen were collected from euthanized animals and dissociated by combining mechanical dissociation with enzymatic degradation of the extracellular matrix to obtain a single-cell suspension. Then, cells were resuspended at 10^7 cells/ml in 1X PBS containing 5% FBS and 2 mM EDTA for flow cytometry staining. Histograms represent the sum of the percentage of CD11b⁻/CD27⁻, CD11b⁻/CD27⁺ (CD11b⁻), CD11b⁺/CD27⁺, and CD11b⁺/CD27⁻ NK cell subtypes in WT and FcRn^{-/-} mice. Data are means from two independent experiments. ns = not significant, * $p \leq 0.05$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

lung metastasis model, with a more pronounced effect in the lungs.

NK Cell Development/Maturation Is Impaired in FcRn^{-/-} Naive Mice

To establish whether the defective NK cell maturation was consecutive to B16F10 cell injection or pre-existed in FcRn^{-/-} mice, we phenotyped leukocytes by flow cytometry in naive mice (Supplementary Figures S4, S5) and focused on NK-cell sub-populations. First, the proportion of NK cells in lungs was significantly lower in FcRn^{-/-} than WT mice (Figure 5A), with no difference in spleen (Figure 5B). Second, phenotype analysis of NK cells revealed an organ-specific NK subtype distribution previously described (27, 28) corresponding to an increased NK DP population in lungs vs. spleen in both WT and FcRn^{-/-} mice (Figures 5C,D). Third, the proportion of DN and CD11b⁻ NK cells, corresponding to more immature cells, was greater in lungs and spleen of FcRn^{-/-} than WT mice (31.8 vs. 18.8% in lungs and 51.7 vs. 39.9% spleen). Altogether, these results suggest that defective NK cell development/maturation was already present in naive FcRn^{-/-} mice.

To further investigate the origin of the impaired NK cell maturation in an FcRn-depleted environment, we compared NK-cell development in bone marrow of FcRn^{-/-} and WT mice. To distinguish the different stages of NK cell development in bone marrow, we used specific markers as previously described (29). The global level of NK cell precursors in bone marrow did not differ between FcRn^{-/-} and WT mice, as characterized by CD122 expression, also known as interleukin-2R β (Figure 6A). In contrast, the following stages of NK-cell development were altered. The proportion of NK cells in stage 1 (CD122⁺/NK1.1⁻/NKp46⁻) was increased in FcRn^{-/-} mice and that of NK cells in stages 3, 4, and 5 was decreased as

compared with WT mice (Figures 6B,C). Our results clearly indicate significantly impaired NK cell development in FcRn^{-/-} mice.

Defective Functions of NK Cells From FcRn^{-/-} Mice

We analyzed the ability of splenic NK cells from FcRn^{-/-} and WT naive mice to produce IFN- γ and degranulate, which are major functions of NK cells. For this, we measured *de novo* IFN- γ production by intracellular staining of NK cells and NK cell degranulation by surface mobilization of CD107a, after exogenous stimulation with PMA/ionomycin and cytokines (IL-2 or IL-12, IL-15 and IL-18). Overall, NK cells from FcRn^{-/-} mice produced less IFN- γ (Figures 7A,C) and expressed less CD107a on their surface (Figures 7B,D) than those from WT mice in all conditions. To gain insight into NK function in FcRn^{-/-} mice, we assessed NK cell cytotoxicity against YAC-1 cells in basal condition as described by Mizutani et al. (23). Although NK cells from FcRn^{-/-} animals had a significant lower expression of CD107a compared to WT mice (Figure 7D), there was no significant difference in NK cytotoxicity against YAC-1 cells (Figure 7E). This result suggests that NK cells from an FcRn^{-/-} deprived microenvironment displayed similar “basal” cytotoxic properties when they are unstimulated. Additionally, we found that NK cells from FcRn^{-/-} and WT naive animals proliferated identically (Figure 7F), but died more in the presence of IL-2 5,000 U/mL (Figure 7G). Altogether, our results indicate that NK activation by cytokines is impaired in FcRn^{-/-} naive mice.

DISCUSSION

Herein, we confirmed the crucial role of FcRn in the anti-tumor immune response in the B16F10 model of experimental

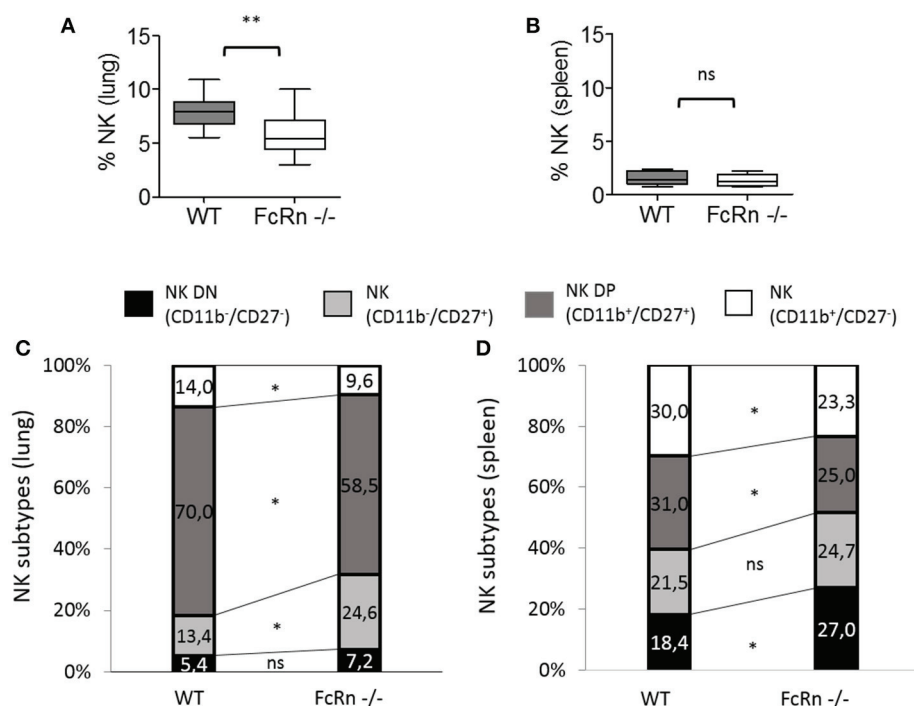


FIGURE 5 | Flow cytometry of NK cell proportion in **(A)** lungs and **(B)** spleen from WT ($n = 13$) and FcRn^{-/-} ($n = 12$) naive mice. Data are expressed as median $\pm$ Min to Max from two independent experiments. Flow cytometry of NK subtypes based on CD11b and CD27 markers in **(C)** lungs and **(D)** spleen from WT ($n = 5$) and FcRn^{-/-} ($n = 5$) naive mice. After euthanasia of naive animals, lungs and spleen were collected and dissociated by combining mechanical dissociation with enzymatic degradation of the extracellular matrix to obtain a single-cell suspension. Then, cells were resuspended at 10^7 cells/ml in 1X PBS containing 5% FBS and 2 mM EDTA for flow cytometry staining. Histograms represent the sum of the percentage of CD11b⁻/CD27⁻, CD11b⁻/CD27⁺ (CD11b⁻), CD11b⁺/CD27⁺, and CD11b⁺/CD27⁻ NK cell subtypes in WT and FcRn^{-/-} mice. Data are means from one experiment. ns = not significant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

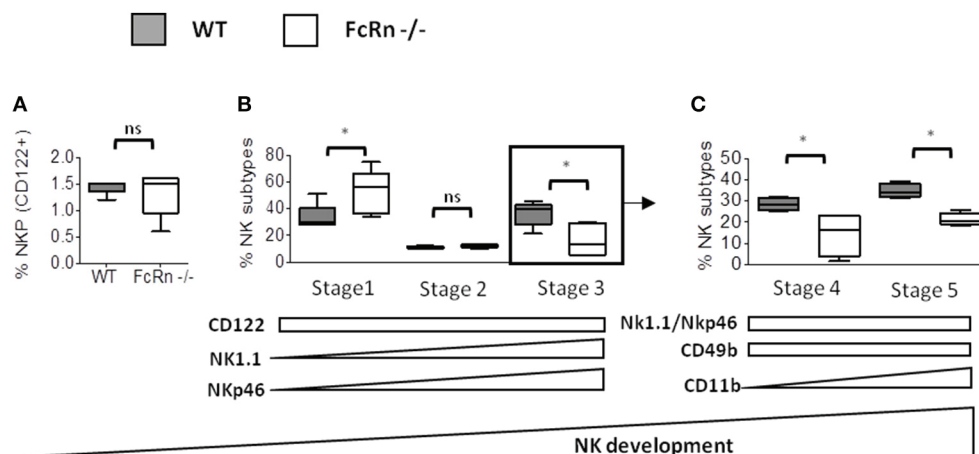


FIGURE 6 | Flow cytometry of NK cell development in bone marrow of WT ($n = 5$) and FcRn^{-/-} ($n = 5$) naive mice. After euthanasia of naive animals, bone-marrow cells were isolated from the femur and tibia and cells separated by mechanical dissociation. Then, cells were resuspended at 10^7 cells/ml in 1X PBS containing 5% FBS and 2 mM EDTA for flow cytometry staining. The development of NK cells is initiated with the expression of **(A)** CD122, then three early immature steps [NK precursor (NKP), stage 1 and stage 2] are identified with the expression of **(B)** CD122, NK1.1 and Nkp46. **(C)** From stage 2, stage 5 and 6 subtypes are characterized by CD49b and CD11b expression. Acquisition of marker during NK cell development is represented schematically by arrows under the graphics. Data are expressed as median $\pm$ Min to Max from one out of two independent experiments with similar results. ns = not significant and * $p \leq 0.05$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

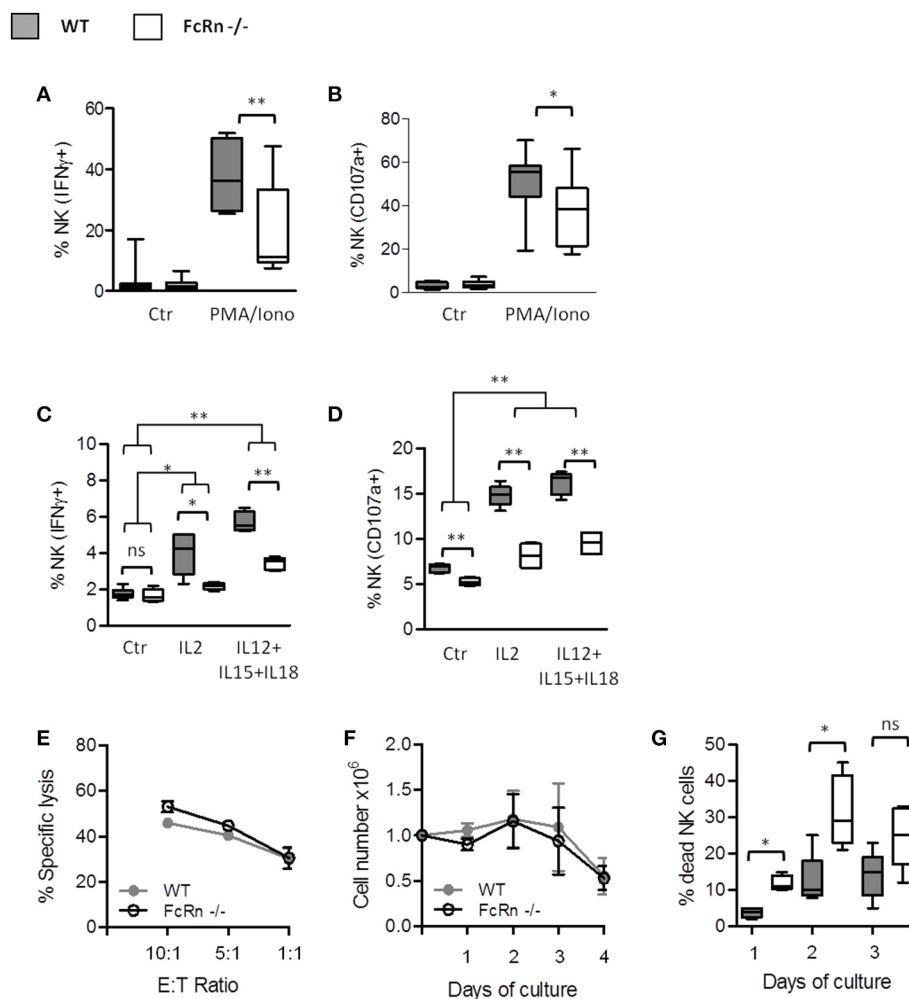


FIGURE 7 | Influence of FcRn on NK cell functions and *in vitro* expansion. Purified splenic NK cells were analyzed by flow cytometry for (A) the intracellular measurement of IFN- γ and (B) the surface expression of the late endosomal marker CD107a, after 4-h incubation at 37°C without (Ctr) or with PMA (100 ng/mL)/ionomycin (500 ng/mL). Data are median $\pm$ Min to Max analyzed from eight independent experiments using pooled NK cells from 2 mice. Freshly isolated splenocytes were seeded in RPMI 1640 complete medium supplemented with 5,000 U/ml rIL2 or with 5 ng/ml rIL12, 50 ng/ml rIL15, and 10 ng/ml rIL18 for 4-h (C,D). Within splenocytes, CD3⁺/NK1.1⁺/Nkp46⁺ cells were analyzed for (C) the intracellular expression of IFN- γ and (D) the surface expression of CD107a by flow cytometry. Data are median $\pm$ Min to Max from two independent experiments using pooled spleens from 2 mice. (E) Cytotoxicity assay was performed against CFSE-labeled YAC-1 target cells with different ratios of purified NK cells previously maintained overnight in RPMI 1640 complete medium supplemented with 50 U/ml of rIL2 ($n = 3$). The results were expressed as means $\pm$ SEM. (F,G) Purified splenic NK cells were plated in complete medium supplemented with 5,000 U/ml rIL2. (F) The living cell numbers and (G) the percentage of dead cells were determined daily by manual cell counting using trypan blue in Malassez chamber ($n = 3$). The results were expressed as mean $\pm$ SEM (F) and median $\pm$ Min to Max (G). ns = not significant * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.005$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

lung metastasis in which we clearly show an increase in lung metastasis in an FcRn-depleted environment in mice. Analysis of the immune cells infiltrating the lungs after intravenous injection of B16F10 cells revealed a decreased proportion of cDCs and CD8⁺ T lymphocytes with lack of FcRn. These results agree with the already assessed function of FcRn-mediated tumor protection driven by DC and CD8⁺ T-cell activities described by Baker et al. (12). However, we identified NK cells as a new and additional cellular component of the FcRn-dependent anti-tumor response.

NK cells are effector lymphoid cells belonging to the innate immune system that can recognize and kill microbial-infected

cells and play an important role in the immune surveillance against tumors (30). In this study, mice lacking FcRn showed reduced intratumoral NK-cell infiltration, which may participate in amplified development of B16F10 lung lesions, because NK cells are required for B16F10 tumor rejection (16, 23). In FcRn^{-/-} mice, NK cells had an immature phenotype on the whole, as characterized by surface markers (26). The particular cells affected were DP and CD27⁺ NK subtypes, which are able to proliferate under inflammation and exhibit effector functions.

The distribution of the four maturation stages depends on the tissue (31). In our B16F10 experimental lung metastasis

model, the distribution of the NK cell subtypes was modified in lungs of FcRn^{-/-} mice and in the spleen to a lesser extent. These results suggest that the phenotypic alteration of NK cells is more pronounced in tumor-associated tissues. The alteration may be due to impaired *in situ* maturation in the tumor lung microenvironment caused by tumor-related soluble factors (32, 33). To understand the origin of the NK cell immature phenotype, we evaluated the distribution of NK cell subtypes in FcRn^{-/-} naive mice and found that they also displayed an immature phenotype in lungs as well as spleens. Although NK sub-populations are distributed differently in the spleen and lungs of mice (28) because of distinct homing properties and tissue-specific maturation, their distribution in the different peripheral organs of FcRn^{-/-} mice is unusual. Because NK cells develop from lineage-restricted progenitors in bone marrow, we analyzed NK subpopulations in this compartment. The proportion of NK precursors was higher in FcRn^{-/-} than WT mice, which suggests partial blockade of NK-cell development at early steps. This phenomenon confirmed the previously described hindrance effect of tumor growth on NK-cell maturation in bone marrow (17, 34) that we also observed in our lung experimental metastasis model in WT mice.

Because altered NK-cell maturation would affect the cellular properties of NK cells, we analyzed the ability of NK cells to synthesize IFN- γ and mobilize CD107a, which reflects NK-cell degranulation/cytotoxic activity. NK cells help eliminate B16F10 tumor cells in the experimental model of lung metastasis (16) and effector molecules, such as perforin and IFN- γ play important roles in NK-mediated inhibition of metastasis and tumor growth (17, 35). Although, non-activated NK cells from FcRn^{-/-} animals had a significant lower expression of CD107a compared to WT mice, it was not correlated with a reduced cytotoxicity efficacy. Interestingly, NK cells from FcRn^{-/-} mice were less prone to degranulate and synthesize IFN- γ after chemical stimulation and (IL-2 or IL-12, IL-15 and IL-18) cytokine activation than NK cells from WT mice. These cytokines are involved in proliferation, differentiation/maturation of NK cells and enhance their effector functions (36, 37). Pre-activation of NK cells with IL-2 or IL-12, IL-15 and IL-18 results in the generation of NK cells efficient to target and kill tumor cells (24, 38). The lower expression of CD107a and IFN- γ synthesis (after IL-2 or IL-12, IL-15, and IL-18 activation) as well as the increased cell death (in the presence of IL-2) in FcRn^{-/-} NK cells, support an impaired response of NK cells to cytokines in an FcRn^{-/-} deprived microenvironment. This might be critical to limit the spreading of lung tumor lesions in the B16F10 lung metastasis model. Accordingly, a lower CD107a expression was found in splenic NK cells from FcRn^{-/-} animals (compared to WT mice) in the B16F10 model and which persisted after cytokine activation (**Supplemental Figure S6**).

Once activated, NK cells produce cytokines and chemokines that regulate both the innate and adaptive immune system (39, 40). Because NK cells express no FcRn, the immature phenotype of NK cells might arise via indirect mechanisms due to the absence of FcRn in other cells of the immune system, such as DCs (10). Previous studies described interactions between NK cells and DCs and found a bidirectional crosstalk leading to NK-cell

priming by DCs, which in turn induces DC maturation (41, 42). Knowing that FcRn-positive DCs are important for shaping the CD8⁺ effector T-cell anti-tumor response (12), FcRn might also affect the bidirectional cross-talk between NK cells and DCs. In light of our results showing impaired secretion of IFN- γ by NK cells in FcRn^{-/-} mice and the important role of IFN- γ in DC maturation by NK cells (43), IFN- γ might play a role in an FcRn-dependent cross-talk between NK cells and DC. Following this idea, the defective interleukin-12 level described in FcRn^{-/-} DCs (12) may also participate in the impaired NK-cell activation in our model because of its involvement in IFN- γ production by NK cells (41). Other FcRn-expressing cells, such as neutrophils and monocytes/macrophages (10, 44) may also be involved in NK-cell interactions (40, 45). Of note, we found a marked increase in the proportion of neutrophils in FcRn^{-/-} mice as compared with WT mice. Similarly, the proportion of neutrophils was enhanced in the model of anti-TNF antibody immunization in FcRn-deficient mice (46) and in other models (47). Previous studies also reported a high number of intratumoral neutrophils associated with the induction and maintenance of tumor angiogenesis (48, 49). Moreover, in breast cancer (50) and diverse murine cancer models (51, 52), macrophage/monocyte cells (53, 54) and/or neutrophils (52, 55) have been implicated in tumor promotion. From this evidence and our results, we cannot rule out a link between neutrophils expressing FcRn (44) and NK-cell maturation/activation. Whether this potential interaction occurred via soluble factors, such as cytokines or direct cell contact needs to be investigated. Finally, several cell types present in the hematopoietic niche or secondary lymphoid organs express FcRn. This is the case with stromal cells, endothelial and epithelial cells (44), which may also intervene in NK-cell maturation (36, 40, 56, 57). Further studies are needed to decipher the impact of FcRn-positive cells in the maturation of NK precursors.

For the first time, we described that NK-cell mediated tumor elimination/surveillance is impaired in an FcRn-deficient microenvironment. This could be linked to an abnormal cytokine response which needs further investigations to provide understanding in the involvement of FcRn. In light of our previous results (13) and those from Baker et al. (12), showing FcRn dysregulation in lung and colorectal cancers and associated with an unfavorable outcome, our current findings further support the central role of FcRn in anti-tumor immunity and highlight the interest of targeting FcRn for therapeutic purposes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DC performed the research, analyzed, discussed, interpreted data and literature and wrote the manuscript; CD, ED, LL, AV, CA, M-VD, DF, and CP contributed to the research and analyzed data; TB, NH-V, and VG-G supervised, discussed and verified data analysis and contributed to manuscript preparation.

FUNDING

This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency as part of the

Investissements d'Avenir program (no. ANR-10-LABX-53-01); the Ligue contre le cancer, Indre et Loire and Finistère committee; the FLUKILLER program from the Région Centre and the PlasTICO program from the Cancéropôle Grand-Ouest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nikita Pallaoro, Cécile Bergua, Thomas Sécher for technical help and Valérie Schnubel, Jérôme Montharu, George Roseau, Chrystophe Aubert, Benjamin Plante, Elodie

Theyssandier and Michèle De Monte for assistance with the animal facility in our laboratory. We also thank the cell-sorting flow facility of the technical platform of François Rabelais University, Tours. English was edited by L.L. Smales (BioMedEditing).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02259/full#supplementary-material>

REFERENCES

1. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev.* (2015) 268:25–51. doi: 10.1111/imr.12350
2. Caaveiro JMM, Kiyoshi M, Tsumoto K. Structural analysis of Fc/FcR complexes: a blueprint for antibody design. *Immunol Rev.* (2015) 268:201–21. doi: 10.1111/imr.12365
3. Stapleton NM, Einarsdóttir HK, Stemerding AM, Vidarsson G. The multiple facets of FcRn in immunity. *Immunol Rev.* (2015) 268:253–68. doi: 10.1111/imr.12331
4. Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* (2014) 15:707–16. doi: 10.1038/ni.2939
5. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* (2007) 7:715–25. doi: 10.1038/nri2155
6. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med.* (2003) 197:315–22. doi: 10.1084/jem.20021829
7. Ghetie V, Ward ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol.* (2000) 18:739–66. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.739
8. Ramalingam TS, Detmer SA, Martin WL, Bjorkman PJ. IgG transcytosis and recycling by FcRn expressed in MDCK cells reveals ligand-induced redistribution. *EMBO J.* (2002) 21:590–601. doi: 10.1093/emboj/21.4.590
9. Latvala S, Jacobsen B, Otteneder MB, Herrmann A, Kronenberg S. Distribution of FcRn across species and tissues. *J Histochem Cytochem.* (2017) 65:321–33. doi: 10.1369/0022155417705095
10. Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, et al. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol.* (2001) 166:3266–76. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3266
11. Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. The role of FcRn in antigen presentation. *Front Immunol.* (2014) 5:408. doi: 10.3389/fimmu.2014.00408
12. Baker K, Rath T, Flak MB, Arthur JC, Chen Z, Glickman JN, et al. Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity* (2013) 39:1095–107. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.003
13. Dalloneau E, Baroukh N, Mavridis K, Maillet A, Gueugnon F, Courty Y, et al. Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non-small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis. *Oncotarget* (2016) 7:54415–29. doi: 10.18632/oncotarget.10074
14. Swiercz R, Mo M, Khare P, Schneider Z, Ober RJ, Ward ES. Loss of expression of the recycling receptor, FcRn, promotes tumor cell growth by increasing albumin consumption. *Oncotarget* (2016) 8:3528–41. doi: 10.18632/oncotarget.13869
15. Fidler IJ, Fidler J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer Res.* (1975) 35:218–24.
16. Grundy MA, Zhang T, Sentman CL. NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner *in vivo*. *Cancer Immunol Immunother.* (2007) 56:1153–61. doi: 10.1007/s00262-006-0264-1
17. Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne PJN. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biol Targets Ther.* (2012) 6:73–82. doi: 10.2147/BTT.S23976
18. Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy. *Front Immunol.* (2015) 6:601. doi: 10.3389/fimmu.2015.00601
19. Jewett A, Tseng HC. Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells. *J Cancer* (2011) 2:443–57. doi: 10.7150/jca.2.443
20. Sabry M, Lowdell MW. Tumor-primed NK cells: waiting for the green light. *Front Immunol.* (2013) 4:408. doi: 10.3389/fimmu.2013.00408
21. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol.* (2001) Chapter 20:Unit 20.1. doi: 10.1002/0471142735.im2001s39.B16
22. Lajoie L, Congy-Jolivet N, Bolzec A, Gouilleux-Gruart V, Sicard E, Sung HC, et al. ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIA on human NK cells: identification of the cleavage site and relationship with activation. *J Immunol.* (2014) 192:741–51. doi: 10.4049/jimmunol.1301024
23. Mizutani T, Neugebauer N, Putz EM, Moritz N, Simma O, Zebadin-Brandl E, et al. Conditional IFNAR1 ablation reveals distinct requirements of Type I IFN signaling for NK cell maturation and tumor surveillance. *Oncimmunology* (2012) 1:1027–37. doi: 10.4161/onci.21284
24. Witalisz-Siepracka A, Gotthardt D, Prchal-Murphy M, Didara Z, Menzl I, Prinz D, et al. NK cell-specific CDK8 deletion enhances antitumor responses. *Cancer Immunol Res.* (2018) 6:458–66. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0183
25. Huntington ND, Voshchenrich CAJ, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol.* (2007) 7:703–14. doi: 10.1038/nri2154
26. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* (2009) 113:5488–96. doi: 10.1016/j.clim.2010.03.147
27. Bozzano F, Marras F, De Maria A. Natural killer cell development and maturation revisited: possible implications of a novel distinct Lin-CD34⁺DNAM-1brightCXCR4⁺ cell progenitor. *Front Immunol.* (2017) 8:268. doi: 10.3389/fimmu.2017.00268
28. Shi F-D, Ljunggren H-G, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11:658–71. doi: 10.1038/nri3065
29. Baranek T, Morello E, Valayer A, Aimar R-F, Bréa D, Henry C, et al. FHL2 regulates natural killer cell development and activation during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Front Immunol.* (2017) 8:123. doi: 10.3389/fimmu.2017.00123
30. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* (2015) 16:7–19. doi: 10.1038/nrc.2015.5
31. Michel T, Poli A, Domingues O, Mauffray M, Thérésine M, Brons NHC, et al. Mouse lung and spleen natural killer cells have phenotypic and functional differences, in part influenced by macrophages. *PLoS ONE* (2012) 7:e51230. doi: 10.1371/journal.pone.0051230
32. Hochweller K, Striegler J, Hämmerling GJ, Garbi N. A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement

- for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur J Immunol.* (2008) 38:2776–83. doi: 10.1002/eji.200838659
33. Stabile H, Fionda C, Gismondi A, Santoni A. Role of distinct natural killer cell subsets in anticancer response. *Front Immunol.* (2017) 8:293. doi: 10.3389/fimmu.2017.00293
 34. Richards JO, Chang X, Blaser BW, Caligiuri MA, Zheng P, Liu Y. Tumor growth impedes natural-killer – cell maturation in the bone marrow. *Growth (Lakeland)* (2006) 108:246–252. doi: 10.1182/blood-2005-11-4535
 35. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2002) 13:95–109. doi: 10.1016/S1359-6101(01)00038-7
 36. Marçais A, Viel S, Grau M, Henry T, Marvel J, Walzer T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol.* (2013) 4:450. doi: 10.3389/fimmu.2013.00450
 37. Lusty E, Poznanski SM, Kwofie K, Mandur TS, Lee DA, Richards CD, et al. IL-18/IL-15/IL-12 synergy induces elevated and prolonged IFN- γ production by *ex vivo* expanded NK cells which is not due to enhanced STAT4 activation. *Mol Immunol.* (2017) 88:138–147. doi: 10.1016/j.molimm.2017.06.025
 38. Boieri M, Ulvmoen A, Sudworth A, Lendrem C, Collin M, Dickinson AM, et al. IL-12, IL-15, and IL-18 pre-activated NK cells target resistant T cell acute lymphoblastic leukemia and delay leukemia development *in vivo*. *Oncotarget* (2017) 6:1–12. doi: 10.1080/2162402X.2016.1274478
 39. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* (2008) 9:503–10. doi: 10.1038/ni1582
 40. Vivier E, Raulet D, Moretta A, Caligiuri M. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* (2011) 331:44–49. doi: 10.1126/science.1198687
 41. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev.* (2006) 214:219–28. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00450.x
 42. Ferlazzo G, Morandi B. Cross-talks between natural killer cells and distinct subsets of dendritic cells. *Front Immunol.* (2014) 5:159. doi: 10.3389/fimmu.2014.00159
 43. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Aricò M, Moretta L, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* (2005) 106:566–71. doi: 10.1182/blood-2004-10-4035
 44. Vidarsson G, Stermerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers FE, et al. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* (2006) 108:3573–9. doi: 10.1182/blood-2006-05-024539
 45. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11:519–31. doi: 10.1038/nri3024
 46. Arnoult C, Brachet G, Cadena Castaneda D, Azzopardi N, Passot C, Desvignes C, et al. Crucial role for immune complexes but not FcRn in immunization against anti-TNF- α antibodies after a single injection in mice. *J Immunol.* (2017) 199:418–24. doi: 10.4049/jimmunol.1601246
 47. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* (2006) 6:836–48. doi: 10.1038/nri1961
 48. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN- β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest.* (2010) 120:1151–64. doi: 10.1172/JCI37223
 49. Andzinski L, Wu CF, Lienenklaus S, Kröger A, Weiss S, Jablonska J. Delayed apoptosis of tumor associated neutrophils in the absence of endogenous IFN- γ . *Int J Cancer* (2015) 136:572–83. doi: 10.1002/ijc.28957
 50. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer* (2016) 2:15025. doi: 10.1038/npjbcancer.2015.25
 51. Lasnik A, Eaton JW, Mitchell RA, Lamont GJ, Faughn JD, Satoskar A, et al. Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol.* (2013) 190:2984–93. doi: 10.4049/jimmunol.1201650
 52. Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G $^{+}$ Ly6C $^{+}$ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2010) 107:21248–55. doi: 10.1073/pnas.1015855107
 53. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* (2014) 6:1670–90. doi: 10.3390/cancers6031670
 54. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* (2015) 41:49–61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010
 55. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer* (2016) 16:431–46. doi: 10.1038/nrc.2016.52
 56. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8 $^{+}$ T cells. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11:645–57. doi: 10.1038/nri3044
 57. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* (2013) 34:573–82. doi: 10.1016/j.it.2013.07.005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Castaneda, Dhommée, Baranek, Dalloneau, Lajoie, Valayer, Arnoult, Demattéi, Fouquet, Parent, Heuzé-Vourc'h and Gouilleux-Gruart. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

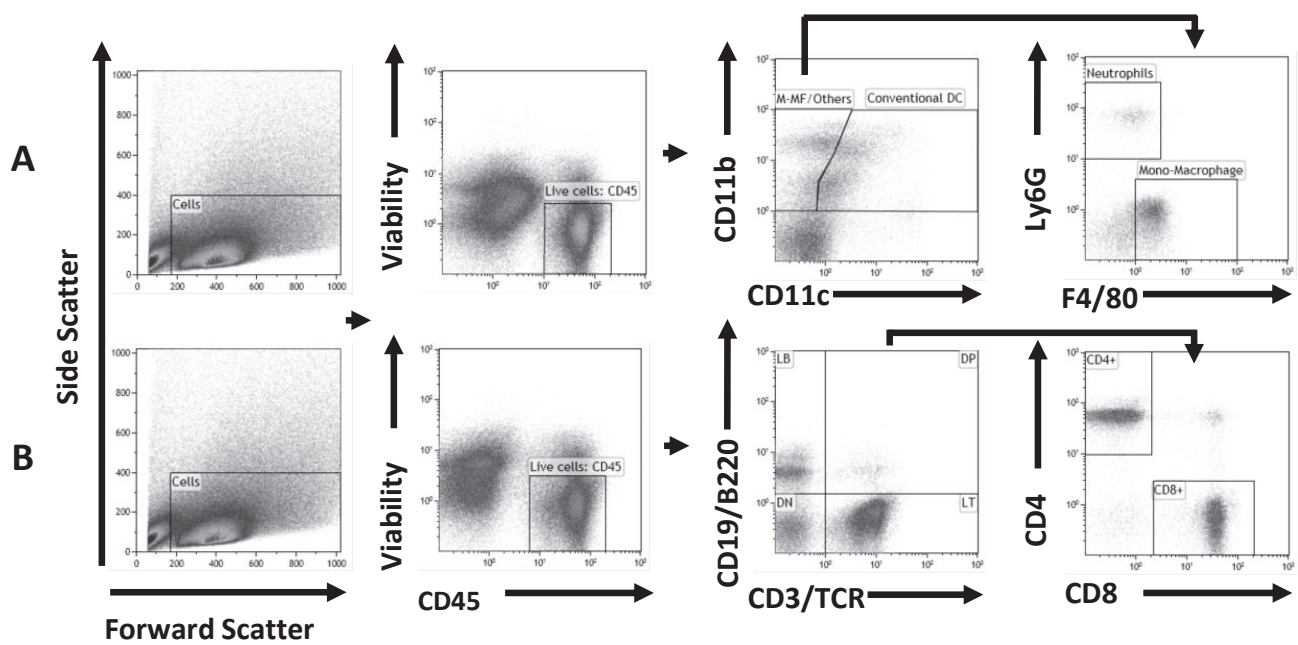


Figure S1. Gating strategy example for flow cytometry analysis. Single-cell suspensions were prepared from tissues (lungs or spleens) from wild-type (WT) C57B/L6 and neonatal Fc receptor-deficient (FcRn^{-/-}) mice challenged with melanoma cells. After adding Fc blocking 2.4G2 hybridoma supernatant, cells were stained with specific monoclonal antibodies designed to distinguish **(A)** conventional dendritic cells (CD45⁺/CD11c^{hi}/CD11b^{hi}), neutrophils (CD45⁺/CD11c^{low}/CD11b^{hi}/Ly6G⁺) and monocytes/macrophages (CD45⁺/CD11c^{low}/CD11b^{hi}/F4/80⁺); **(B)** B lymphocytes (CD45⁺/CD19⁺/B220⁺), T lymphocytes (CD45⁺/CD3⁺/TCR⁺), CD8 T lymphocytes (CD45⁺/CD19⁻/B220⁻/CD3⁺/TCR⁺/CD8⁺), and CD4 T lymphocytes (CD45⁺/CD19⁻/B220⁻/CD3⁺/TCR⁺/CD4⁺).

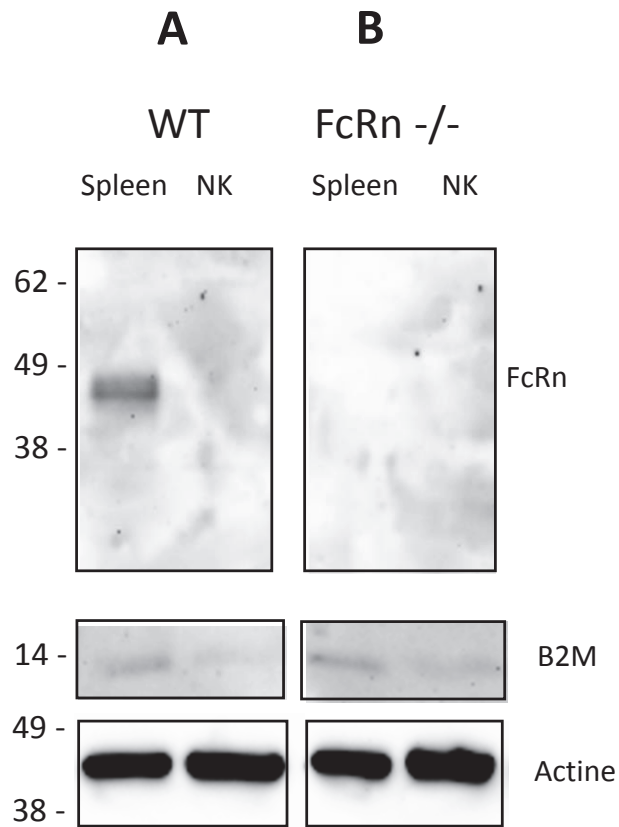


Figure S2: FcRn expression in splenocytes and purified natural killer (NK) cells from **(A)** naive wild-type (WT) and **(B)** FcRn^{-/-} mice. Immunoblotting of splenocytes and purified NK-cell lysates revealed with anti-FcRn α -chain (R&D, Ref: AF6775), anti- β 2m (Dako, Ref: A0072) and anti β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Ref: sc-47778) antibodies. Cropped images are shown with molecular weight (kDa) on the left. Data are representative of two independent experiments.

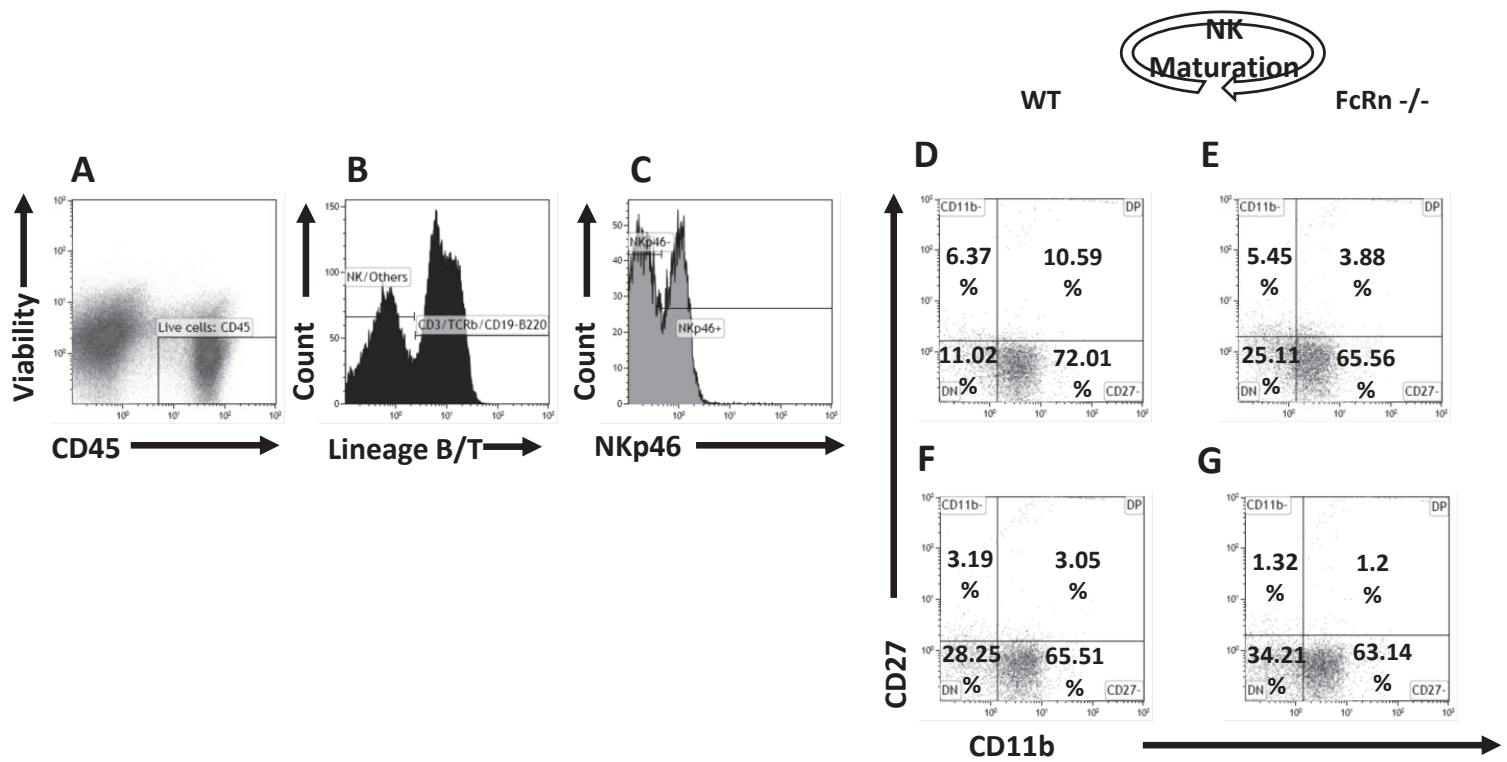
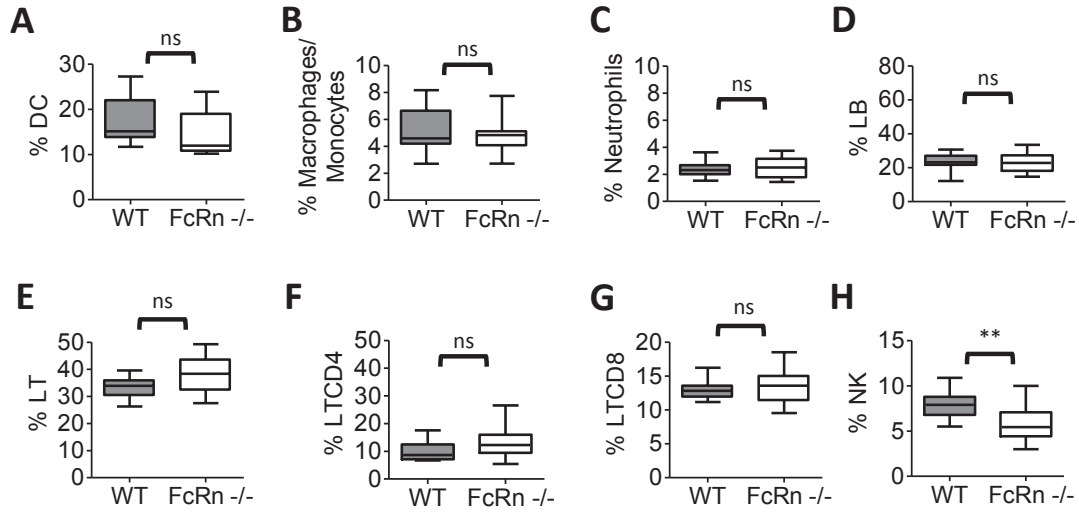
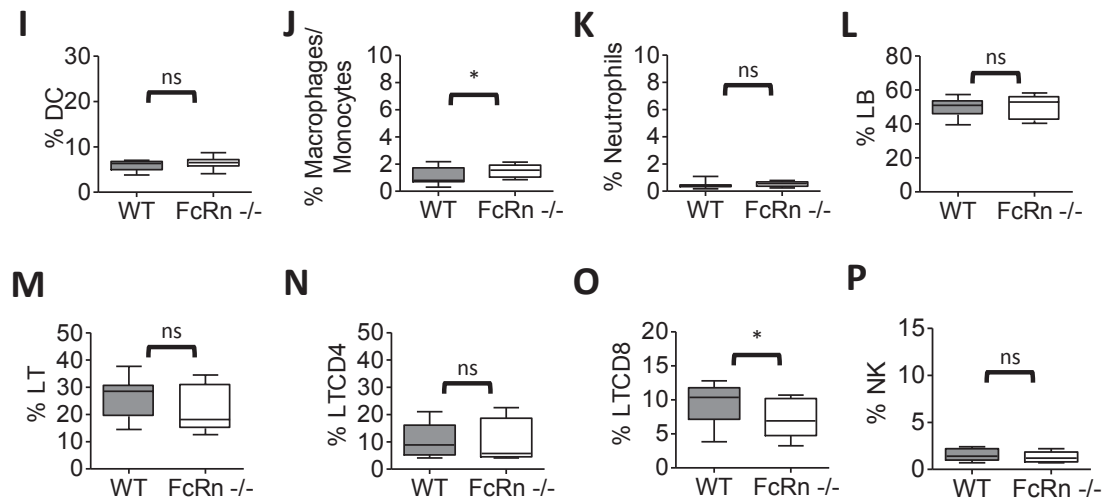


Figure S3: Gating strategy for flow cytometry analysis of NK-cell maturation. Single-cell suspensions were prepared from **(D, E)** lungs and **(E,G)** spleens of mice challenged with melanoma cells. After adding Fc blocking 2.4G2 hybridoma supernatant, cells were stained with specific monoclonal antibodies designed to distinguish the four NK sub-populations. The NK population was obtained by gating on **(A)** CD45 cells, followed by an exclusion of **(B)** B and T cells with CD19/B220/CD3/TCR markers and **(C)** a final gating on NKp46 cells. For the last gating, we determined the maturation status by analysis of CD11b and CD27 expression. NK-cell maturation is a 4-stage process that starts with CD11b⁻/CD27⁻ (double negative (DN)), and then CD11b⁻/CD27⁺ (CD11b⁻) → CD11b⁺/CD27⁺ (double positive (DP)) → CD11b⁺/CD27⁻ (CD27⁻)

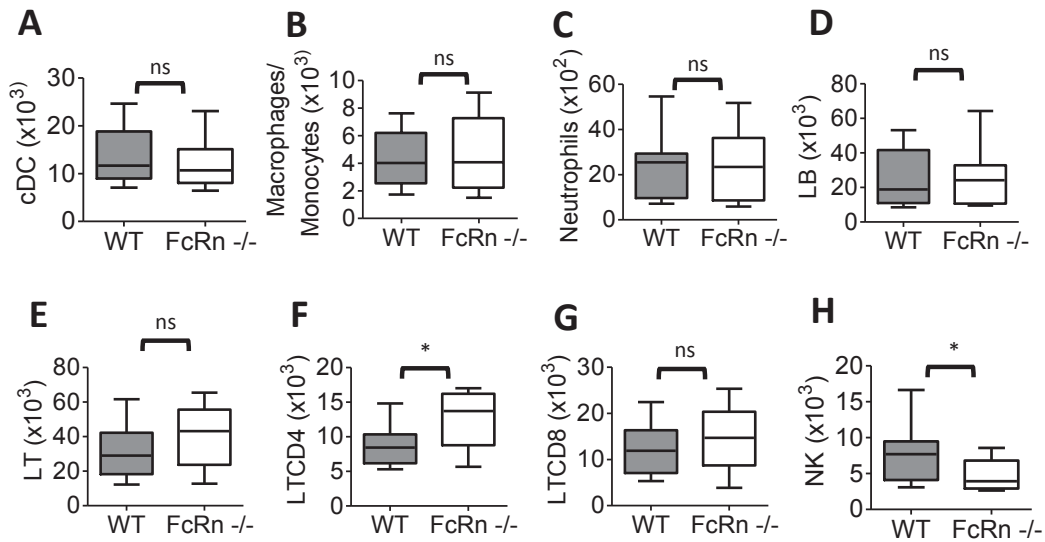


Percentage of leukocytes in the lungs from naive mice

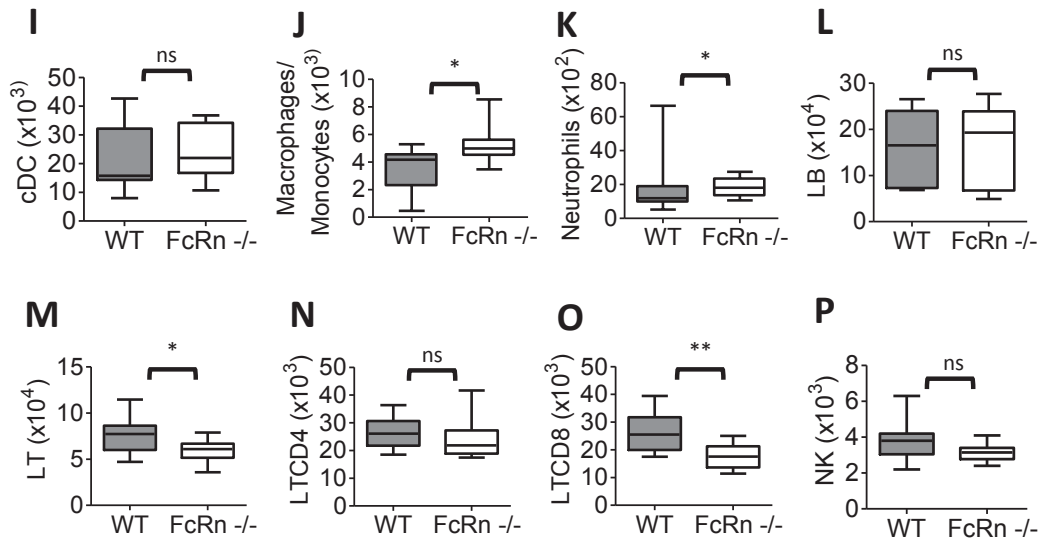


Percentage of leukocytes in the spleen from naive mice

Figure S4: Flow cytometry of leukocytes in lungs and spleens from WT (n=13) and FcRn^{-/-} (n=12) naive mice. Percentage of (A, I) conventional dendritic cells, (B, J) macrophages/monocytes, (C, K) neutrophils, (D, L) B lymphocytes, (E, M) T lymphocytes, (F, N) CD4 T lymphocytes, (G, O) CD8 T lymphocytes and (H, P) NK cells. Data represent median $\pm$ Min to Max, from two independent experiments. ns = not significant, * = $p \leq 0.05$ and ** = $p \leq 0.005$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.



Number of leukocytes in the lungs from naive mice



Number of leukocytes in the spleen from naive mice

Figure S5: Flow cytometry of leukocytes in lungs and spleens from WT (n=13) and FcRn^{-/-} (n=12) naive mice. Number of (A, I) conventional dendritic cells, (B, J) macrophages/monocytes, (C, K) neutrophils, (D, L) B lymphocytes, (E, M) T lymphocytes, (F, N) CD4 T lymphocytes, (G, O) CD8 T lymphocytes and (H, P) NK cells. Data represent median $\pm$ Min to Max, from two independent experiments. ns = not significant, * = $p \leq 0.05$ and ** = $p \leq 0.005$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Figure S6

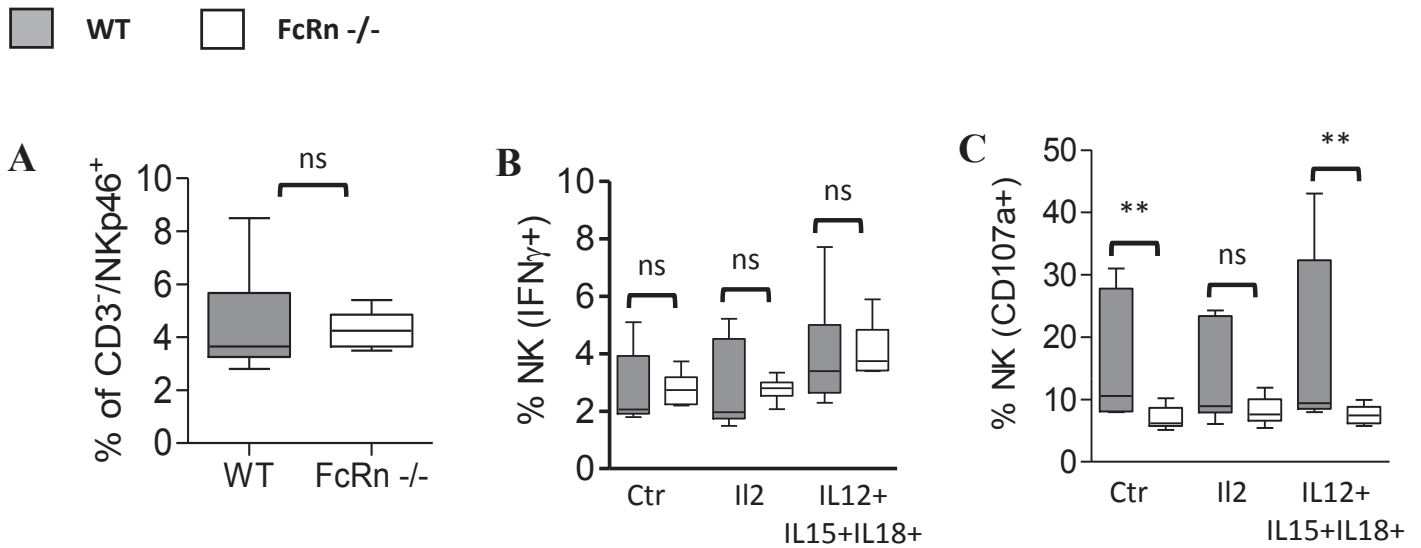


Figure S6. Functional analysis of splenic infiltrating NK cells.

On day 0, $1 \cdot 10^5$ B16F10 Luc⁺ cells were injected i.v. into mice. 18 days after tumor injection, animals were sacrificed to analyze *ex vivo* cytokine-induced stimulation of NK cells. $2 \cdot 10^6$ to $5 \cdot 10^6$ of (A, B, C) freshly isolated splenocytes were incubated in RPMI 1640 complete medium (Ctr) or complete medium supplemented with 5000 U/ml rhIL2 or with 5 ng/ml rhIL12, 50 ng/ml rhIL15 and 10 ng/ml rhIL18 for 4-h in the presence of brefeldine A and anti-CD107a. (A, B) The IFN γ production of CD3⁺/NK1.1/NKp46 cells as well as (A, C) CD107a expression were analyzed by flow cytometry. Results are presented as median $\pm$ Min to Max from two independent experiments. ns = not significant and ** = $p \leq 0.005$ using two-tailed non-parametric and unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Résultats complémentaires non publiés concernant le rôle du FcRn dans le développement/maturation et les fonctions des cellules NK

Afin de répondre à certaines hypothèses soulevées par nos résultats concernant les mécanismes d'action du FcRn sur la maturation des cellules NK, nous avons réalisé quelques expériences informatives que nous présentons sous formes de résultats complémentaires. Elles concernent l'analyse de récepteurs de cytokines ou de molécules d'activation importante pour le développement des cellules NK.

A. Matériel et méthodes

a. Animaux

L'ensemble des expériences menées sur les souris a été approuvé par le Comité d'éthique en expérimentation Val de Loire (CEEV VdL) (saisine 2015070117414040). Les souris sauvages C57BL/6J (WT) ont été obtenues auprès de Charles River et les souris C57BL/6J FcRn $-/-$ (B6.129X1-Fcgrt $tm1$ Dcr/DcrJ (fcgrt $-/-$)) ont été achetées auprès du laboratoire Jackson, puis maintenues dans un élevage en interne (Bar Harbor, Maine, Etats-Unis). L'ensemble des souris a été hébergé au sein de l'animalerie de la faculté de Médecine de Tours en conditions EOPS (« Exempt d'organismes pathogènes spécifiques ») en portoir ventilé. Les expériences ont été réalisées sur les souris femelles âgées de 7 à 12 semaines. Les prélèvements de moelle osseuse et de rate ont été effectués après euthanasie des animaux naïfs par dislocation cervicale.

b. Préparation des suspensions cellulaires à partir des tissus de souris

Les cellules de moelle osseuse ont été isolées à partir du fémur et du tibia des animaux. Les os longs ont été cassés aux deux extrémités, puis un rinçage à l'aide d'une aiguille de 25G et d'une seringue contenant du PBS 1X a été effectué afin de récupérer la moelle osseuse.

Les cellules de rate de souris ont été isolées après dissociation et digestion enzymatique de la matrice extracellulaire de la rate. Un premier rinçage des rates a été réalisé à l'aide d'une aiguille de 25G et d'une seringue contenant un tampon de digestion : milieu RPMI 1640 (Sigma), 5% de SVF (Lonza), 125 μ g/ml de Libérase LT (Roche Diagnostics) et 100 μ g/ml de DNase (Roche Diagnostics). Ensuite, la dissociation et la digestion des tissus durs de la rate a

été obtenu par une incubation des rates dans 2 ml de tampon de digestion pendant 30 min à 37°C dans une plaque à 6 puits. En fin d'incubation, chaque suspension cellulaire a été filtrée (70 µm, MACS SmartStrainers), centrifugée puis lavée 3 fois avec du PBS 1X. Finalement, le culot cellulaire a été repris avec 2 ml d'une solution de chlorure d'ammonium 1X et incubé 1 minute dans la glace afin de lyser les globules rouges. Les suspensions cellulaires ont ensuite été lavées, centrifugées 3 fois avec du PBS 1X et filtrées une dernière fois avant la remise en suspension à 10^7 cellules/ml dans du PBS 1X contenant 5% de SVF et 2 mM d'EDTA.

c. Isolement des cellules NK à partir de la rate des souris

Les suspensions cellulaires issues de 4 à 5 rates de souris WT ou FcRn^{-/-} ont été soumises à un tri négatif des cellules NK par l'utilisation de colonnes à billes magnétiques selon les recommandations du fabricant (NK cell isolation kit II, Miltenyi). Les différentes étapes sont représentées dans la figure 27. Le taux de pureté des cellules NK récupérées selon cette technique était supérieur à 90%.

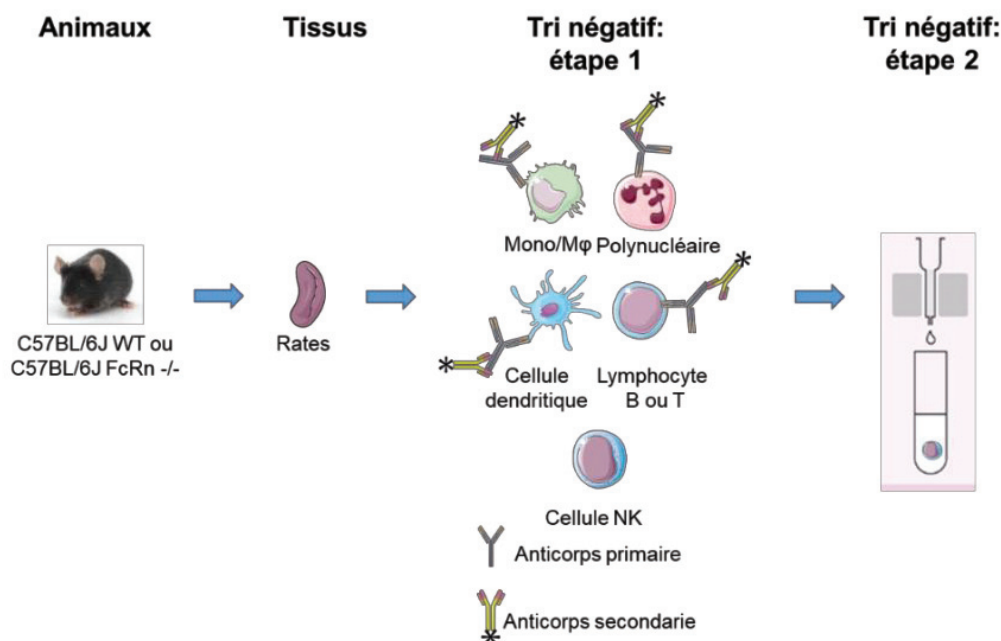


Figure 27 : Isolement des cellules NK de souris par tri magnétique négatif

d. Cytométrie en flux : caractérisation des cellules NK

Les cellules issues de la rate et des poumons de chaque souris naïve ont été marquées en plaque 96 puits (100000 à 1.10^6 cellules/ puits) afin de caractériser l'expression des marqueurs CD122, NKG2D et CD69 à la surface des cellules NK par cytométrie en flux (MACSQuant Analyzer10, Miltenyi). Pour cela, un blocage des FcR pour éviter les marquages non

spécifiques, a été réalisé par l'utilisation de 100µl d'une solution de PBS 1X avec 5% de surnageant cellulaire contenant l'anticorps monoclonal anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2) pendant 20 min à 4°C. Après un lavage des cellules avec 200µl final/puits en tampon de marquage (PBS 1X / 5% de FBS / 2 mM d'EDTA), le marquage des cellules a été effectué pendant 30 min à 4°C, avec un mélange d'anticorps (Tableau 9) dont les concentrations ont été optimisées au sein de notre laboratoire.

Marquage des cellules NK	Fluorochromes (fabricant)	Excitation/Emission (nm)
Marquage de viabilité « LIVE/DEAD »	Aqua (Invitrogen)	367/528
Marquage de toutes les cellules immunitaires : anti-CD45 (clone 30-F11)	APC-H7 (BD)	633/ 780
Exclusion des cellules T et B : anti-CD3/ anti-B220 (clone 145-2C11 et RA3-6B2)	APC (eBioscience)	633-647/660
Marquage des cellules NK totales Anti-NKp46 (clone 29A1.4)	V450 (BD)	445/405
Marquage de CD122 (clone TM-beta)	Pe (eBioscience)	488-561/578
Marquage de NKG2D (clone CX5)	PE-Cy7 (BD)	488-561/775
Marquage de CD69 (clone H12F3)	FITC (BD)	488/520

Tableau 9 : liste des anticorps utilisés pour caractériser les cellules NK de souris

A la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées, centrifugées et reprises avec 200µl/puits de tampon de marquage avant d'être passées au cytomètre en flux (Miltenyi). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

e. Western-Blot

L'extraction protéique a été effectuée avec du tampon RIPA sur 5.10^6 cellules issues de chaque type de tissu (moelle osseuse, rate et cellules NK isolées) pour les groupes de souris sauvages et les souris FcRn-/-). Après extraction protéique, les échantillons ont été analysés sur gels polyacrylamide de 10-12% (NuPAGE Bis-Tris 10-12%, Invitrogen) en tampon tris-

glycine-SDS (NuPAGE MES SDS (20X), Invitrogen) et en conditions dénaturantes. Les protéines ont ensuite été transférées en tampon tris-glycine sur des membranes de nitrocellulose (Nitrocellulose Pre-Cut Blotting Membranes, 0.45 µm, Invitrogen). La qualité du transfert a été évaluée par coloration au rouge ponceau. Les membranes ont été lavées 2 fois au PBS 1X puis saturées à l'aide d'un tampon PBS 1X, Tween 0.2% et 5% lait pendant 1h à température ambiante. Directement après, les membranes ont été mises en présence des anticorps primaires (Tableau 2) dilués dans le même tampon, pendant une 1h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. Par la suite, les membranes ont été lavées 3 fois pendant 15 min avec du PBS 1X, puis mises en présence des anticorps secondaires HRP (Tableau 10) dans le même tampon, pendant 1h à température ambiante. Après trois lavages, les membranes ont été révélées par chimioluminescence à l'aide du réactif Femto (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoFischer) et analysées avec le Fusion FX (Vilber).

Anticorps	Cible	Fournisseur	Dilution
Anti-récepteur S1P Réf: SC-48356 Anticorps monoclonaux de souris	Humain Souris	Non marqué (Santa-Cruz)	1/500
Anti-actine Réf: SC-47778 Anticorps monoclonaux de souris	Humain Souris	Horse Radish Peroxidase (Santa-Cruz)	1/5000
Anti-IgG de souris Réf: sc-2005 Anticorps polyclonaux de chèvre HRP	Souris	Horse Radish Peroxidase (Santa-Cruz)	1/10000

Tableau 10 : liste des anticorps utilisés pour les expériences de western-blot

B. Résultats

a. L'absence du FcRn altère l'expression du CD122 par les cellules NK

Plusieurs cytokines sont importantes dans la biologie des cellules NK chez la souris, notamment l'IL-15, impliquée dans le développement/maturation et la survie des cellules NK et, l'IL-2 jouant un rôle dans leur activation (Saxena, Saxena, and Adler 1984; C. C. Liu, Perussia, and Young 2000; Marçais et al. 2013). L'IL-15 peut être produite par différentes cellules exprimant le FcRn, notamment les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse et les cellules dendritiques (Shreeram Akilesh et al. 2007). L'IL-2 quant à elle est

sécritée par les lymphocytes T CD4⁺ activées. Les récepteurs pour ces cytokines ont en commun la chaîne β (CD122) et la chaîne γ_c . Les chaînes CD122 et γ_c s'associent respectivement avec la chaîne γ (CD132) pour constituer le récepteur pour l'IL-15 ou avec la chaîne α (CD25) pour former le récepteur de l'IL-2 (Marçais et al. 2013). La stimulation par ces cytokines pourrait induire l'expression de certains récepteurs activateurs sur les cellules NK, comme par exemple l'expression de NKG2D et CD69, nécessaires aux cellules NK pour assurer leurs fonctions effectrices (Nausch and Cerwenka 2008; Esplugues et al. 2005; Fogel et al. 2013; Boieri et al. 2017).

Nous avons posé comme première hypothèse un défaut de réponse des cellules NK à l'IL-15 et IL-2, suite à une altération d'expression du CD122 chez les souris FcRn -/-.

Nous avons donc évalué l'expression du CD122 par cytométrie en flux à la surface des cellules NK provenant de la rate et des poumons de souris sauvages et FcRn -/- naïves. Nous avons constaté que le pourcentage de cellules NK (CD45+/Livedead-/lineage CD3-B220-/NKp46+) exprimant le CD122 était significativement supérieur dans les poumons et la rate des souris FcRn -/- par comparaison aux souris WT (Figure 28).

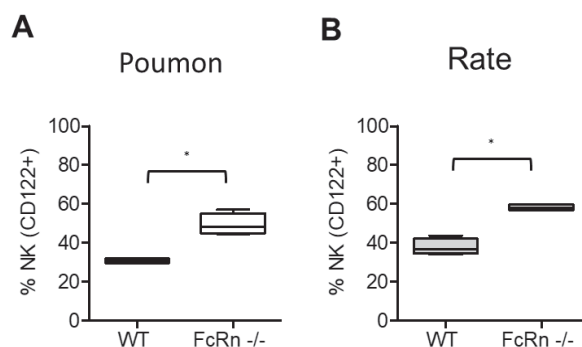


Figure 28: Analyse par cytométrie en flux de l'expression du marqueur CD122 sur les cellules NK

Le marquage a été effectué sur les cellules fraîches des poumons (A) et des rates (B) des souris sauvages (n=4) et FcRn -/- (n=4) naïves. Les données sont représentatives d'une seule expérience et sont représentées sous forme de boîte à moustache avec la Médiane $\pm$ Max-Min. Les analyses de statistiques ont été obtenues en faisant un test non-paramétrique et non apparié de Wilcoxon-Mann-Whitney à l'aide du programme Prism 5 (Graphpad). * = $p \leq 0.05$.

Ces résultats montrent une altération (augmentation) de l'expression du CD122 par les cellules NK en périphérie (rate et poumons) chez les souris déficientes pour le FcRn. Celle-ci pourrait être liée à une sorte d'épuisement ou « exhaustion » des cellules NK, comme documenté pour les cellules T CD8 qui ne pourraient plus répondre efficacement à une stimulation par les cytokines (Beltra et al. 2016).

b. L'absence du FcRn altère l'expression du CD69 et NKG2D par les cellules NK

Ce défaut de signalisation par les cytokines pourrait également avoir un impact sur les marqueurs d'activation des cellules NK, notamment NKG2D et CD69, qui pourrait expliquer en partie le défaut de production d'IFN- γ et de CD107a.

L'analyse de l'expression des deux récepteurs a été effectuée par cytométrie en flux sur des cellules issues des poumons et des rates des souris. Les résultats indiquent que le pourcentage de cellules NK exprimant le NKG2D (Figure 29 A, B) est significativement diminué chez les souris FcRn $-/-$ par comparaison aux souris WT dans les 2 organes. A l'inverse, une augmentation significative du pourcentage de cellules NK exprimant le CD69 est observée dans les poumons de souris FcRn $-/-$ par comparaison aux souris WT (Figure 29 C). Aucune différence significative n'a été observée pour le CD69 dans les rates (Figure 29 D).

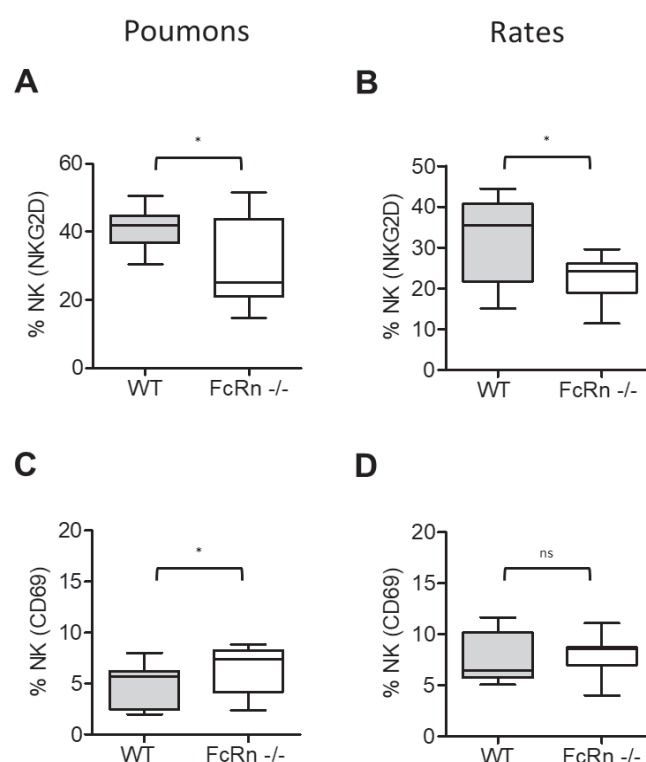


Figure 29: Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs NKG2D et CD69 sur les cellules NK

Le marquage a été effectué sur des cellules fraîches des poumons (A, C) et des rates (B, D) des souris WT (n=13) et FcRn $-/-$ (n=13) naïves. Les données sont représentatives d'une seule expérience et sont représentées sous forme de boîte à moustache avec la Médiane $\pm$ Max-Min. Les analyses statistiques ont été obtenues en faisant un test non-paramétrique et non apparié de Wilcoxon-Mann-Whitney à l'aide du programme Prism 5 (Graphpad). * = $p \leq 0.05$.

Ainsi, ces résultats révèlent que l'absence de FcRn pourrait également influencer l'expression des marqueurs d'activité des NK tels que NKG2D et CD69. D'après la littérature, une diminution du NKG2D est susceptible d'altérer les fonctions des NK mais aussi des cellules T CD8 (Wiemann et al. 2005). A l'inverse, d'autres travaux ont montré qu'une surexpression du CD69 était associée au développement tumoral. Ceci est en accord avec les travaux chez les souris déficientes pour le CD69 (CD69^{-/-}). En effet, l'absence d'expression de CD69 dans un contexte tumorale a révélé une réponse anti-tumorale plus efficace (Esplugues et al. 2003, 2005; Paul et al. 2016). Ainsi, les variations d'expression de NKG2D et CD69 pourraient faire partie du faisceau d'arguments expliquant le défaut de fonctionnalité des cellules NK observé chez les souris FcRn^{-/-}.

c. L'absence du FcRn altère l'expression du récepteur S1P5 par les cellules NK

Enfin, un autre élément intéressant est l'implication de l'albumine dans le processus de sortie des cellules NK de la moelle vers la périphérie (Rouzaiare et al. 2012). Les souris déficientes en FcRn sont connues pour présenter une hypoalbuminémie ("003982 - B6.129X1-Fcgrt/DcrJ" n.d.). L'hypoalbuminémie pourrait induire un défaut de sortie des cellules NK de la moelle osseuse, puisque celle-ci est gouvernée en partie par deux protéines solubles, la chimiokine CXCL12 et plus particulièrement la lipoprotéine S1P transportée par l'albumine. (Knudsen Sand et al. 2015). Ces protéines, CXCL12 et S1P, se fixent spécifiquement à leurs récepteurs à la surface des cellules NK : S1P5 qui augmente avec la maturation des cellules NK et CXCR4 qui diminue avec la maturation et sortie des NK (Mayol et al. 2011; Rouzaiare et al. 2012).

Dans notre hypothèse, l'absence de FcRn induirait via l'hypoalbuminémie un défaut de l'expression du récepteur S1P5 et en conséquence un défaut du « trafficking » des cellules NK, expliquant en partie pourquoi les cellules NK issues de souris FcRn^{-/-} restent bloquer dans un stade « immature ».

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'expression du S1P5 à la surface des cellules NK par western blot, à partir d'extraits totaux issus des suspensions cellulaires de moelle osseuse, de rate et de poumons. Le récepteur S1P5 était quantitativement présent de façon plus importante dans les extraits de cellules totales et cellules NK de rate purifiées chez les souris sauvages (Figure 30, a, b, c) par rapport aux cellules de souris FcRn^{-/-} (Figure 30, d, e, f).

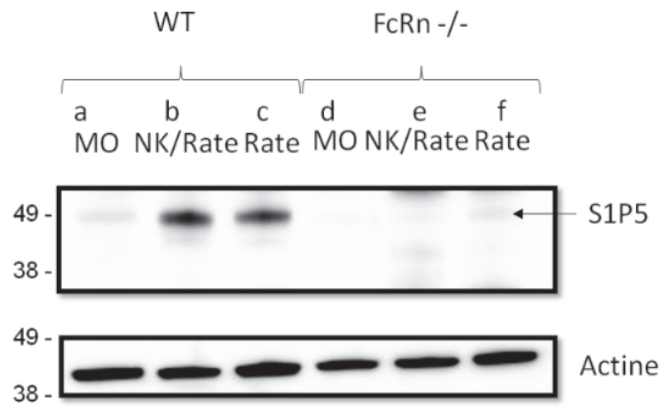


Figure 30: Analyse par western-blot de l'expression du récepteur S1P5 dans des extraits protéiques de cellules de souris.

Souris sauvages WT : Extraits protéiques totaux (a, d) de cellules totales issues de moelle osseuse; (b, e) de cellules NK purifiées à partir de la rate, et (c, f) de cellules totales de rate de souris WT (a, b, c) et de souris FcRn $-/-$ (d, e, f). L'échelle de taille en kDa est figurée à droite. Représentation d'un western-blot représentatif de 2 expériences indépendantes.

Ces résultats suggèrent que l'expression réduite de S1P5 pourrait participer au défaut de maturation observé dans les cellules NK de chez les souris FcRn $-/-$.

L'ensemble de ces résultats supplémentaires sera repris dans la discussion générale.

Discussion

Le FcRn est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme et par de nombreux types cellulaires que l'on retrouve dans le microenvironnement tumoral. Outre son rôle majeur dans l'homéostasie des IgG et de l'albumine, il a été impliqué dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Compte tenu de ces multiples fonctions, il a récemment été montré qu'il intervenait dans la tumorigenèse, via les cellules immunitaires dans la réponse immunitaire anti-tumorale et dans la croissance des cellules cancéreuses.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle complexe du FcRn dans les cancers, notamment les tumeurs solides. Compte tenu des données de la littérature concernant son expression ubiquitaire, sa régulation par différents mécanismes et son implication dans les cancers, nous avons d'abord exploré son expression et sa répartition, au niveau cellulaire, dans le cancer du poumon non à petites cellules. Puis, nous avons étudié son implication dans la réponse immunitaire anti-tumorale, car même si elle est aujourd'hui admise, les mécanismes ne sont pas tous connus.

1) Expression du FcRn dans les cancers

La première étude (article 1) présentée dans cette thèse portait sur l'analyse de l'expression du FcRn dans le cancer du poumon non à petites cellules chez l'Homme.

Dans notre travail, nous avons retrouvé une faible expression du FcRn dans l'épithélium bronchique et l'absence d'expression du FcRn dans le territoire alvéolaire, à l'exception des macrophages alvéolaires. Par contre, nous avons observé peu ou pas d'expression de FcRn par les cellules cancéreuses pulmonaires, par immunohistochimie. Ces données sont en accord avec les résultats de la littérature (Swiercz et al. 2016) et celles de l'analyse de la banque de données publiques « The Human Protein Atlas » qui permettent d'extrapoler nos observations à d'autres cellules cancéreuses comme dans le cancer du sein, de la prostate et du foie. Des travaux effectués au sein du laboratoire, dans le projet PlasTICO (ccordinatrice Pr V Catros, Université de Rennes) soutenu par le Canceropôle Grand Ouest, indiquent que cette notion peut être également appliquée au cancer épithélial de l'ovaire.

De façon tout à fait intéressante, les travaux de Swiercz et al. ont révélé que la diminution d'expression du FcRn par les cellules tumorales elles-mêmes, était associée à une augmentation de la prolifération cellulaire due à une consommation d'albumine excessive qui n'est plus recyclée par le FcRn (Swiercz et al. 2016). L'utilisation de cellules tumorales modifiées pour leur expression de FcRn puis greffées dans des souris « nude », indique que l'inhibition d'expression du FcRn est responsable d'une croissance tumorale plus importante.

Ces résultats apportent des éléments supportant le rôle du FcRn dans la tumorigenèse. Cependant, ils soulèvent une problématique importante liée au rôle du FcRn dans la pharmacocinétique - pharmacodynamique des Ac thérapeutiques. En effet un grand nombre de cancer dont les cancers du poumon peuvent actuellement être traités par Ac thérapeutiques (Gasser and Waaga-Gasser 2016) dont les effets mettent en jeu l'accessibilité de la tumeur par ces Ac. Celle-ci fait en partie intervenir le FcRn qui joue un rôle dans leur biodistribution. Se pose alors la question de l'efficacité des Ac vis-à-vis de la tumeur et surtout de son accessibilité lorsque l'expression du FcRn est au plus bas.

Enfin, un parallèle intéressant peut-être retenu concernant la diminution de l'expression du FcRn dans les cancers. En effet, le FcRn est une molécule structurellement apparentée à la famille des molécules CMH de classe I qui sont elles aussi exprimées de manière ubiquitaire et surtout dont l'expression est diminuée à la surface des cellules cancéreuses dans les cancers de mauvais pronostic (Leone et al. 2013). Des mécanismes de régulation communs sont peut-être mis en jeu pour cette famille de protéine.

La dérégulation de l'expression du FcRn dans les cellules cancéreuses pulmonaires et plus généralement dans les cellules cancéreuses pourrait être due à plusieurs éléments.

Premièrement, la diminution de l'expression du FcRn pourrait être consécutive à la modification de certaines cytokines dans l'environnement tumoral (pulmonaire). D'après la littérature, le TNF- α pourrait moduler l'expression du FcRn soit en l'augmentant, soit en le diminuant selon le type cellulaire (van et al. 2011). Si on se replace dans le contexte des cancers, le TNF- α est produit par diverses cellules tumorales, dont les cellules cancéreuses pulmonaires (Sethi et al. 2012) et aurait un rôle plutôt pro-tumoral (Balkwill 2009). Il pourrait donc contribuer à réduire l'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral. Il serait intéressant de déterminer s'il existe une corrélation inverse entre l'expression du FcRn et du TNF- α dans le cancer. Selon certaines études, l'IFN- γ pourrait induire une diminution de l'expression du FcRn (X. Liu et al. 2007, 2008). Dans l'environnement tumoral, l'IFN- γ est principalement produit par les cellules immunitaires (notamment les cellules NK) et aurait un rôle dual, soit un effet pro-tumoral en favorisant l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, soit un effet anti-tumoral en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses et l'angiogenèse (Mojic, Takeda, and Hayakawa 2017). Au sein de notre laboratoire, nous avons récemment initié l'exploration de l'effet de certaines cytokines sur l'expression du FcRn, *in vitro*. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression

de FcRn par le GM-CSF lors de la différenciation *in vitro* de monocytes de témoins sains en macrophages M1 décrit comme cellules à activité anti-tumorale. L'inverse est observé pour le M-CSF dans la différenciation vers les macrophages M2 plutôt décrites comme cellules à activité pro-tumorale (projet PlasTICO : (Anthony Larue 2018)). Ces éléments soulignent une nouvelle fois la participation du FcRn dans les processus liés à la tumorigenèse. D'autres résultats indiquent que l'IL-17 diminue l'expression du FcRn dans les cellules cancéreuses monocytaires THP-1. Cette cytokine produite par les lymphocytes Th17 a également un rôle complexe dans la tumorigenèse (Asadzadeh et al. 2017).

Deuxièmement, des facteurs épigénétiques pourraient eux aussi influencer l'expression du gène qui code le FcRn. On pense en premier lieu à la méthylation de l'ADN car la séquence de *FCGRT* est riche en îlots CpG. D'ailleurs, les travaux de Ferguson et Blanco ont montré que le traitement des cellules HepG2 avec un agent de déméthylation (5-azacytidine) entraînait une augmentation de l'expression de *FCGRT* (Ferguson 2017). Dans les cancers, comme celui du poumon, du sein et du cancer colorectal, il existerait des profils de méthylation caractéristiques (Toyooka, Matsuo, and Gazdar 2008; Pouliot et al. 2015; Draht et al. 2018). Il serait donc intéressant de pouvoir analyser la méthylation du gène *FCGRT* dans la cohorte de patients atteints du cancer du poumon ou dans d'autres cohortes pour étudier le lien entre la diminution d'expression du FcRn et la méthylation de son gène. L'expression de *FCGRT* pourrait également être influencée par des micros ARN, comme cela a été décrit récemment (Ferguson and Blanco 2018). Des travaux associant le rôle de micros ARN dans le cadre du cancer ont révélé que leur altération pouvait avoir comme effet la promotion tumorale (Adams, Kasinski, and Slack 2014). En résumé, il serait intéressant d'explorer la régulation de l'expression de *FCGRT* pour mieux comprendre l'origine de la dérégulation de FcRn dans les cellules cancéreuses.

Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'expression du FcRn dans la zone tumorale versus le tissu non cancéreux (adjacent à la tumeur). D'après nos analyses immuno-histochimiques, l'expression du FcRn dans les tumeurs pulmonaires est principalement retrouvée au niveau des cellules immunitaires, notamment les macrophages et les cellules dendritiques. L'expression du FcRn dans le tissu cancéreux pourrait donc être un reflet de l'infiltrat ou des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral. Ceci est en accord avec les travaux de Baker et al., sur le cancer colorectal chez l'Homme qui observe une diminution du nombre de cellules dendritiques exprimant le FcRn au site tumoral (Baker

et al. 2013). Cela renforce également l'implication du FcRn dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Notre travail a aussi permis de montrer l'intérêt du FcRn dans le suivi des patients atteints du cancer du poumon, puisqu'une diminution de l'expression du FcRn est corrélée à un mauvais pronostic. Les résultats de cette étude proviennent d'une analyse rétrospective sur une cohorte avec un faible nombre de patients et la valeur pronostique du FcRn a été confirmée par des analyses *in silico* à partir d'autres cohortes disponibles publiquement ; ces résultats ont été valorisés par un brevet. Il est assez intéressant de constater que Baker et al. ont également décrit que le niveau d'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral, en quantifiant les cellules dendritiques exprimant le FcRn dans des tumeurs colorectales, était corrélé à la survie des patients. Compte tenu que l'expression du FcRn pourrait être le reflet de l'infiltrat tumoral pulmonaire et de son impact dans la réponse immunitaire anti-tumorale, la quantification du FcRn pourrait être un marqueur additionnel à l'Immunoscore®, qui mesure le lien entre l'infiltrat immunitaire et la survie des patients atteints de cancers. La corrélation entre l'expression du FcRn et la survie des patients a aussi été avérée dans le tissu non cancéreux, dans la cohorte de patients atteints d'un cancer du poumon. Ce résultat est en accord avec le fait que le profil d'expression génique au sein du tissu non cancéreux permet de prédire la présence de tumeurs pulmonaires (Gomperts et al. 2011). Compte tenu du rôle du FcRn dans la réponse immunitaire innée et adaptative, notamment la présentation des complexes immuns, l'altération de son expression pourrait être un marqueur précoce d'anomalie de la réponse immunitaire, conduisant *in fine* au développement tumoral.

Afin de mieux comprendre l'influence de l'expression du FcRn dans la tumorigenèse, nous avons ensuite étudié les mécanismes par lesquels le FcRn était impliqué dans la réponse anti-tumorale. Les études de cohortes rétrospectives et les modèles *in vitro* ont des limites et ne permettent pas d'appréhender ces aspects. Ainsi, les modèles *in vivo* (ex : les modèles murins) sont complémentaires à ces études et constituent un moyen puissant pour explorer les mécanismes complexes impliqués dans la réponse anti-tumorale.

2) Influence de l'expression du FcRn dans la réponse immunitaire anti-tumorale

Les travaux de Baker et al. dans les modèles murins ont apporté la première pièce du puzzle en démontrant que la réponse anti-tumorale nécessitait l'implication du FcRn via son rôle dans le processus de présentation croisée des complexes immuns (IgG-antigènes tumoraux) par les cellules dendritiques. Ce phénomène entraîne la sécrétion d'IL-12 par ces cellules qui vont alors activer les cellules T CD8 spécifiques de la tumeur (Baker et al. 2013, 2014b, 2011). La participation des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD8 dans l'immunité anti-tumorale dépendante du FcRn est confirmée par la diminution de ces populations cellulaires dans le modèle murin syngénique de métastases pulmonaires suite à l'injection intraveineuse de cellules de mélanomes B16F10 chez les souris FcRn^{-/-}.

Ainsi, l'implication du FcRn dans la réponse immunitaire anti-tumorale repose sur sa participation dans deux mécanismes essentiels que sont la phagocytose et la présentation des antigènes mettant en jeu des complexes immuns. Les travaux de Vidarsson et al. avaient déjà montré les conséquences de l'absence de FcRn sur la phagocytose des complexes IgG-bactéries par les neutrophiles et les macrophages dans la réponse immunitaire anti-bactérienne (Gestur Vidarsson et al. 2006). Cependant, de façon inattendue dans notre travail concernant l'immunisation de souris par des anticorps thérapeutiques anti-TNF- α , la présence de complexes immuns est nécessaire à la formation d'anticorps anti-anticorps anti-TNF- α , contrairement à la présence du FcRn (Arnoult et al. 2017). Les résultats de cette publication à laquelle je suis associée en troisième auteur sont présentés en annexe. Cette discordance concernant le rôle du FcRn dans la réponse immunitaire, pourrait s'expliquer par l'intervention des cellules dendritiques et de la présentation croisée comme décrit dans le modèle de Baker et al. Cette dernière n'interviendrait pas dans notre modèle où les lymphocytes T CD4 plutôt que les lymphocytes T CD8 sont impliqués. Ces résultats confortent l'importance du FcRn dans la présentation antigénique croisée des complexes immuns, elle-même nécessaire à la réponse anti-tumorale via les cellules dendritiques.

Le mécanisme de présentation croisée serait dépendant de la protéine RAB15, protéine impliquée dans le trafic des complexes immuns dans les compartiments lysosomiaux et endosomiaux (Silvin et al. 2017). Ce sont dans ces derniers que se fait l'interaction, à pH acide, du FcRn avec les IgG et l'albumine permettant leur recyclage et leur transcytose. Ces deux fonctions reposent sur l'intervention de protéines RAB, respectivement RAB 4, RAB 5

et RAB 11 pour le recyclage et RAB 11 et RAB 25 pour la transcytose (Ward et al. 2005; Tzaban et al. 2009; Dickinson et al. 2008). Même si le « trafficking » du FcRn dans le processus de présentation croisée des complexes immuns est encore inconnu, nous pouvons imaginer qu'il « croise » le processus de recyclage et de transcytose dans les endosomes et fasse intervenir RAB 15 ou un membre apparenté de cette famille de protéines.

En dehors des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD8, d'autres populations cellulaires que celles décrites par Baker et al. sont affectées dans notre modèle tumoral B16F10 chez les souris FcRn^{-/-}. Nous avons, de façon tout à fait originale, identifié une diminution du nombre et de la proportion des cellules NK dans les poumons et la rate des animaux FcRn^{-/-}. Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes effectrices appartenant au système immunitaire inné. Elles sont capables de reconnaître et de tuer les cellules infectées par des agents infectieux et jouent un rôle important dans la surveillance immunitaire contre les tumeurs (Morvan and Lanier 2015). Le rôle des cellules NK dans la réponse anti-tumorale a largement été étudié chez l'homme et la souris (Waldhauer and Steinle 2008; Sungur and Murphy 2014). En particulier, ce modèle B16F10 de métastases pulmonaires a été utilisé pour l'exploration de la réponse anti-tumorale (Overwijk and Restifo 2001; Grundy, Zhang, and Sentman 2007). Il a permis de montrer que les cellules NK intervenaient précocement dans l'élimination des cellules tumorales B16F10 (Grundy, Zhang, and Sentman 2007). Ainsi, dans le modèle de tumeurs chez les souris FcRn^{-/-}, la diminution de cellules NK pouvait expliquer l'amplification du développement des métastases pulmonaires B16F10. Une analyse plus poussée du phénotype des cellules NK présentes chez les souris FcRn^{-/-} a révélé un phénotype immature caractérisé par les marqueurs de surface CD11b et CD27 (Chiossone et al. 2009). Les cellules NK les plus touchées par cette immaturité étaient les cellules NK DP (CD27⁺/CD11b⁺) et CD27⁻, capables de proliférer dans un contexte inflammatoire et douées de fonctions effectrices (Vahlne et al. 2008). Ce modèle, la distribution des sous-types de cellules NK est modifiée entre les poumons (sites des métastases) et la rate (absence de métastases). Ces résultats suggèrent que l'altération phénotypique des cellules NK est plus prononcée dans les tissus associés aux tumeurs. Cette altération pourrait être due à une altération de la maturation *in situ* dans le microenvironnement pulmonaire de la tumeur, induite par des facteurs solubles liés à la tumeur (Hochweller et al. 2008; Stabile et al. 2017). L'importance du contexte du microenvironnement anti-tumoral est décisif pour la fonctionnalité des NK (Grundy, Zhang, and Sentman 2007). C'est le cas, dans le modèle B16F10, où l'élimination des cellules tumorales par les cellules NK dépend de leur activation

par les cytokines comme l'IL-2, IL12, IL-18 et l'IL-15 (Hüber, Doisne, and Colucci 2015). Dans le modèle de souris FcRn^{-/-} B16F10, cette activation par les cytokines est défectueuse, puisqu'une stimulation *ex vivo* des cellules NK par IL-12, IL-18 et IL-15 n'entraîne pas la mobilisation de CD107a. Enfin, un déficit intrinsèque de la cellule NK elle-même suite à un défaut de signalisation donné par les cellules exprimant le FcRn pourrait expliquer l'altération de fonctionnalité des cellules NK dans ce modèle. Par exemple, des travaux ont montré que la protéine CDK8 qui fait partie de la famille des protéines-kinases dépendantes des cyclines (CDK) pouvait être à l'origine du dysfonctionnement des cellules NK dans la réponse anti-tumorale. Ainsi, une répression du gène qui code pour CDK8 a révélé une augmentation de l'activité et de l'efficacité des cellules NK dans le modèle de métastases pulmonaires B16F10 (Krzywinska et al. 2017). L'expression de ce facteur est inversement corrélée avec la survie des patients atteints du cancer du côlon, de l'ovaire ou du sein chez l'Homme (Broude et al. 2015; Liang et al. 2018). Certains facteurs liés directement ou indirectement à l'expression de FcRn pourraient être à l'origine d'une augmentation de l'activité de CDK8 dans notre modèle.

D'autres cellules sont également affectées par l'absence de FcRn. Chez les souris FcRn^{-/-} nous avons identifié une augmentation des neutrophiles et des monocytes/macrophages dans l'infiltrat cellulaire pulmonaire et splénique que nous avons déjà décrit dans le modèle d'immunisation par Ac thérapeutiques anti-TNF- α (cf. annexe figure 6). Ces populations cellulaires interagissent avec les cellules NK. De nombreux travaux décrivent la coopération entre les neutrophiles et cellules NK dans divers contextes (modèles de cancer, infection fongique, bactérienne ou virale) (Spörri et al. 2008; Jaeger et al. 2012; Scapini and Cassatella 2014; Ogura et al. 2018; Naranjo-Gomez et al. 2018). Dans un contexte tumoral, certaines populations de neutrophiles et de monocytes/macrophages, respectivement les « TAN » (Tumor associated neutrophils) et les « TAM » (Tumor associated macrophages) peuvent avoir un effet de promotion de la tumeur en altérant les fonctions des cellules NK (Uribe-Querol and Rosales 2015; Mantovani 2014). L'absence d'expression de FcRn dans les neutrophiles et les monocytes/macrophages pourrait être à l'origine d'un défaut de communication entre ces populations cellulaires et les cellules NK. Les données que nous avons obtenues sur l'effet du GM-CSF et du M-CSF sur l'expression de FcRn dans l'orientation vers la différenciation de monocytes en macrophages de type M1 ou M2 vont dans ce sens.

3) Influence de l'expression du FcRn dans le développement/ maturation et fonctions des cellules NK

De nombreuses équipes se sont efforcées de comprendre la biologie des cellules NK en raison de leur importance dans l'immunosurveillance anti-tumorale. Ainsi, de façon inattendue, notre travail a permis d'identifier un acteur supplémentaire dans le développement /maturation et les fonctions des cellules NK. En effet, après avoir établi que le défaut d'expression de FcRn favorisait le développement tumoral via le phénotype immature des cellules NK, nous avons montré que ce phénotype était présent chez les animaux FcRn $-/-$ naïfs (absence de tumeur). L'analyse des différents compartiments cellulaires indique que l'absence d'expression de FcRn affecte précocement le développement des cellules NK, dès la moelle osseuse et se répercute sur leur maturation et leurs fonctions en périphérie.

La proportion de précurseurs de cellules NK était plus élevée chez les souris FcRn $-/-$ que chez les souris WT suggérant un blocage partiel à un stade précoce. Le développement des cellules NK se fait à partir d'un progéniteur commun aux cellules lymphoïdes B et T (Crinier et al. 2017). Au sein de la moelle osseuse, plusieurs facteurs extrinsèques et intrinsèques sont nécessaires à leur développement /maturation (Marçais et al. 2013; Stabile et al. 2018; Hesslein and Lanier 2011). Suite à nos résultats, deux éléments peuvent nous guider sur les facteurs éventuellement impliqués. Il s'agit, d'une part, de l'expression du CD122 qui n'est pas affectée dans la moelle osseuse (Figure 6) mais l'est en périphérie (Figure 28 des résultats complémentaires) ; or son expression est nécessaire pour le développement des cellules NK. D'autre part, l'altération de la capacité des cellules NK de souris FcRn $-/-$ à répondre aux cytokines IL-2, IL-15, IL-12 et IL-18 essentielles dans la biologie des cellules NK pourrait aussi rendre compte du défaut de maturation cellulaire. Cela a déjà été décrit pour l'IL-15 (Geiger and Sun 2016) concernant la maturation et pour l'IL-2 sur l'activation des cellules NK (Granucci et al. 2004). Un défaut d'expression / fonctionnement d'un membre des facteurs de transcription de la famille ETS pourrait être envisagé, comme par exemple Ets-1. En effet, chez des souris Ets-1 $-/-$, le développement des cellules NK est altéré au stade 1 des NK immatures (défaut d'expression de CD49b) et celles-ci sont incapables de répondre à une stimulation par IL-15 ou IL-2 (Hesslein and Lanier 2011). Par ailleurs, des études ont révélé que les cellules stromales produisaient de l'IL-15. L'expression de FcRn par ces cellules en lien avec la capacité à produire de l'IL-15 en font des candidates à explorer (C. C. Liu, Perussia, and Young 2000). A cela s'ajoute, les cellules dendritiques qui sont, elles aussi,

capables de produire et sécréter de l'IL-15. Les cellules dendritiques sont connues pour avoir un effet sur la maturation et l'activité des cellules NK (Walzer et al. 2005). L'ensemble de ces éléments est à prendre en compte dans le modèle FcRn^{-/-} B16F10 où le rôle des cellules dendritiques qui expriment FcRn est particulièrement ciblé.

En lien avec nos résultats concernant les neutrophiles dont le nombre était altéré dans la rate des souris naïves FcRn^{-/-}, une étude a rapporté le rôle des neutrophiles dans le développement et la maturation des cellules NK dans la moelle osseuse et en périphérie. Leur déplétion provoquerait une hyperprolifération, une faible survie et un blocage des cellules NK à un stade immature associé à une hyporéactivité (Jaeger et al. 2012). Ainsi, il ne serait pas improbable que l'altération des neutrophiles voire même celle des monocytes/macrophages (Soderquest et al. 2011) en rapport direct ou indirect avec un défaut d'expression de FcRn, ait un effet sur le développement des cellules NK.

Pour conclure, les hypothèses concernant le défaut de maturation à partir de la moelle osseuse, les résultats complémentaires sur l'expression du S1P5 permettent d'évoquer une possible participation du FcRn sur la circulation des cellules NK. En effet, l'albumine est impliquée dans le processus de sortie des cellules NK de la moelle osseuse vers la périphérie (Rouzaire et al. 2012). Cette sortie est gouvernée en partie par deux protéines solubles, la chimiokine CXCL12 et plus particulièrement la lipoprotéine S1P. La S1P, ligand de S1P5, est transportée par l'albumine (Knudsen Sand et al. 2015). Donc, potentiellement, le défaut d'albumine lié à l'absence du FcRn chez les souris FcRn^{-/-} pourrait être en lien avec un défaut des signaux S1P-S1P5 (Walzer et al. 2007; Mayol et al. 2011). Dans notre hypothèse, l'absence de FcRn, via l'hypoalbuminémie, induirait un défaut de l'expression du récepteur S1P5 qui aurait pour conséquence un défaut de circulation des cellules NK. Cela expliquerait alors en partie, pourquoi les cellules NK issues de souris FcRn^{-/-} restent bloquées dans la moelle à un stade immature. L'effet direct de l'hypoalbuminémie sur la sortie des cellules NK de la moelle doit être également envisagé. La diminution d'expression de S1P5 ne serait alors que la conséquence de ce phénomène.

En périphérie, la maturation des cellules NK se caractérise par la présence de 4 sous-populations dont les proportions relatives sont spécifiques des tissus et se distinguent par l'expression relative du CD27 et CD11b (Chiossone et al. 2009). Chez les souris FcRn^{-/-} naïves, les proportions des sous-populations les plus immatures sont plus importantes que chez les souris sauvages aussi bien dans la rate que dans les poumons, comme dans le modèle tumoral (Figure 5).

D'après la littérature, plusieurs éléments pourraient expliquer le défaut observé en périphérie. Notamment, un défaut de sécrétion ou de signalisation en relation avec les IFN de type I. En effet, les souris déficientes en récepteurs des Interférons de type I (souris IFNAR1 $-/-$) impliqués dans l'activation des cellules NK (Mizutani et al. 2012) ont un nombre de cellules NK matures diminué. La signalisation par les interférons de type I via leurs récepteurs a la capacité d'influencer la production d'IFN- γ (Swann et al. 2007). Cependant, les cellules NK issues des souris IFNAR1 $-/-$ ne présentent pas de défaut de production d'IFN- γ ni d'expression du CD107a. Même si le phénotype des souris IFNAR1 $-/-$ diffère de celui des souris FcRn $-/-$, il serait intéressant d'explorer l'intervention des interférons de type I dans notre modèle. Ce défaut des cellules NK en périphérie pourrait également être causé par un défaut de signalisation lié aux cytokines IL-2, IL-12, IL-15 et IL-18 observé dans nos expériences de stimulation *in vitro*. Comme pour les étapes du développement, l'IL-15 et IL-2 sont importantes pour leurs fonctions effectrices en périphérie (C. C. Liu, Perussia, and Young 2000). A cela s'ajoute l'IL-18 qui en association avec les précédentes permet aux cellules NK d'assurer la production d'IFN γ (Lusty et al. 2017). Un argument supplémentaire en faveur d'un problème lié à la signalisation via les cytokines est suggéré dans les résultats complémentaires. Ils montrent que l'absence du FcRn entraîne une expression plus importante de CD122 à la surface des cellules NK de poumons et de rate. Ce phénomène pourrait être lié à un mécanisme d'épuisement comme cela a été observé pour les cellules T CD8 entraînant une incapacité des cellules à répondre à la stimulation par cytokines telles qu'IL-15 et IL-2 (Beltra et al. 2016). L'étude de Felices et al. appuie notre hypothèse d'épuisement des cellules NK. Ils ont montré, chez l'Homme, qu'une stimulation en continu par l'IL-15 pouvait induire un épuisement des cellules NK. Ceci se traduit par une surexpression du CD122 accompagnée d'une incapacité des cellules NK à produire de l'IFN- γ et d'une expression de CD107a réduite par rapport aux conditions contrôles (Felices et al. 2018). L'exploration de l'expression des autres chaînes constituant les récepteurs pour l'IL-15 et IL-2, l'expression des cytokines et d'autres récepteurs de cytokines en lien avec les cellules NK et les populations cellulaires modifiées par l'absence de FcRn semblent nécessaire. Il faut donc envisager l'analyse des cytokines en lien avec les cellules dendritiques. Cela est d'autant plus vrai qu'il est admis que les cellules dendritiques influencent les cellules NK et que les NK sont également capables d'agir en retour sur les cellules dendritiques (Ferlazzo and Morandi 2014). Mais également les cytokines et chimiokines permettant la coopération entre les cellules NK et les neutrophiles et monocytes/macrophages dont le nombre est altéré en absence d'expression de FcRn.

Une autre notion intéressante à développer concernant les cytokines, est la sensibilité des cellules NK de souris FcRn $-/-$ à la mortalité en présence d'IL-2 (Figure 7 G). Ceci pourrait être en lien avec le défaut de ces cellules à produire le CD107a. Le CD107a n'est, en effet, pas seulement un marqueur de dégranulation mais il a également comme fonction de protéger les cellules NK contre leur propre fonction cytotoxique (Cohnen et al. 2013). Nous pourrions envisager une susceptibilité des cellules NK de FcRn $-/-$ à leur propre mortalité expliquant ainsi leur inefficacité fonctionnelle *in vivo* dans un contexte tumoral. A ce défaut de réponse aux cytokines, s'ajoute l'effet observé sur l'expression de NKG2D qui est diminué sur les cellules NK de la rate et des poumons des souris FcRn $-/-$. A l'inverse, l'expression du CD69 était augmentée uniquement dans les poumons (et non la rate) des animaux FcRn $-/-$ présentant les métastases. Ces modifications d'expression de marqueurs des cellules NK souligne l'effet direct de l'absence du FcRn sur les fonctions des cellules NK déjà apparent sur les cellules naïves. En effet, d'après la littérature un défaut de NKG2D peut altérer la capacité des fonctions de production d'IFN- γ et de dégranulation des cellules NK (Wiemann et al. 2005; J. Zhu, Huang, and Yang 2010). Par ailleurs, en présence des cellules tumorales un défaut de ce récepteur conduit à un défaut d'immunosurveillance par les cellules NK (Guerra et al. 2008; Paul et al. 2016). Cette diminution de NKG2D sur les cellules naïves pourrait donc participer au développement tumoral dans le modèle B16F10 chez les animaux FcRn $-/-$. Pour ce qui est du CD69, bien qu'il soit décrit comme un récepteur caractéristique de l'activation de NK, sa surexpression a également été associée à la promotion tumorale (Esplugues et al. 2003, 2005; Paul et al. 2016).

4) Expression du FcRn et développement thérapeutique

L'ensemble des données présentées sur les nouvelles propriétés fonctionnelles associées au FcRn en fait une molécule importante à cibler en thérapeutique. Si nous arrivons à décortiquer finement les mécanismes par lequel il intervient dans la réponse anti-tumorale et en particulier dans la présentation croisée des complexes immuns, nous pourrions générer des anticorps facilitant ce processus. En effet, une présentation antigénique efficace via le FcRn permettrait un recrutement accru des cellules T CD8, des cellules NK et d'autres acteurs cellulaires permettant la régression des tumeurs.

L'augmentation de l'affinité des Ac pour le FcRn, même si elle est importante, n'est pas suffisante puisqu'elle ne prend pas en compte l'expression du FcRn diminuée dans un contexte tumoral. Celle-ci est importante pour l'amélioration de la pharmacocinétique des Ac.

Les données présentées dans cette thèse posent le problème de la cinétique d'administration des Ac en fonction de la diminution de l'expression du FcRn au cours du développement tumoral. Le ciblage du FcRn lui-même est donc essentiel dans la problématique de la présentation antigénique. Les travaux sur les cytokines prennent alors ici toute leur place, puisqu'il est alors possible d'envisager le couplage d'une cytokine impliquée dans la modulation de l'expression du FcRn avec un Ac d'intérêt.

Les éléments qui donnent un sens à ces idées, sont les travaux sur les souris transgéniques qui surexpriment le FcRn, qui après immunisation développent une présentation antigénique améliorée avec une réponse T et une réponse humorale supérieures à celles des souris sauvages (J. Cervenak et al. 2011; Végh et al. 2012; Schneider et al. 2015). Ces travaux ont été exploités dans l'amélioration de la production d'Ac monoclonaux vis-à-vis d'antigènes peu immunogènes. Néanmoins, à notre connaissance il n'y a pas encore de données sur la réponse anti-tumorale et en particulier la réponse à un traitement par anticorps thérapeutique dans le contexte d'un microenvironnement surexprimant le FcRn. Ces analyses concernent surtout l'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral. Une autre alternative serait d'augmenter l'expression du FcRn dans les cellules tumorales elles-mêmes et d'étudier l'effet de cette expression sur la réponse anti-tumorale. Dans cette optique, nous avons transfecté les cellules B16F10 avec du FcRn murin et obtenus des clones cellulaires surexprimant le FcRn. L'évaluation de l'effet de cette surexpression est en cours dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces travaux permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

Conclusion

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'expression du FcRn dans la tumorigenèse et la réponse immunitaire. Pour la première fois, nous avons montré que l'expression du FcRn était diminuée dans le cancer pulmonaire non à petites cellules et que le niveau d'expression du FcRn dans le tissu cancéreux et dans le tissu « sain » adjacent à la tumeur était inversement corrélé à la survie des patients. L'expression transcriptionnelle de FcRn a une valeur pronostique et prédictive chez les patients atteints de cancer pulmonaire et cela indépendamment de tout autre paramètre clinique. Comme l'expression de FcRn est principalement retrouvée dans cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques et macrophages) dans le cancer du poumon, le niveau de FcRn pourrait donc refléter une quantification de ces cellules, dans lesquelles il joue un rôle important dans la phagocytose et la présentation des antigènes.

Pour mimer l'influence de l'expression du FcRn au niveau des cellules immunitaires et étudier l'influence de sa dérégulation dans la réponse immunitaire anti-tumorale, nous avons utilisé des souris déficientes en FcRn (souris FcRn $-/-$) dans lesquelles nous avons induit des métastases pulmonaires expérimentales (B16F10). Le développement tumoral dans les souris FcRn $-/-$ serait favorisée par l'atteinte de différents types cellulaires : les cellules dendritiques, les cellules TCD8, les neutrophiles, les cellules de la lignée monocyttaire comme cela avait déjà été décrit dans la littérature et les cellules NK. Dans ce travail, nous avons démontré pour la première fois que le niveau d'expression du FcRn dans le microenvironnement tumoral affectait le développement/la maturation et les fonctions des cellules NK, ce qui limiterait *in fine* la réponse immunitaire anti-tumorale. L'impact du FcRn sur ces cellules s'étend au-delà de la tumorigenèse, puisqu'il existe un défaut du phénotype des cellules NK, hors du contexte tumoral, en l'absence de FcRn. Même s'il reste à décortiquer les mécanismes moléculaires, un défaut de facteurs solubles pourrait être à l'origine du phénotype anormal des cellules NK dans un microenvironnement dépourvu de FcRn. Parmi ces facteurs, nous avons identifié les cytokines IL-15, IL-2 et la lipoprotéine S1P.

Le schéma suivant reprend les données de la littérature et nos résultats sur l'expression et le rôle du FcRn dans les cancers.

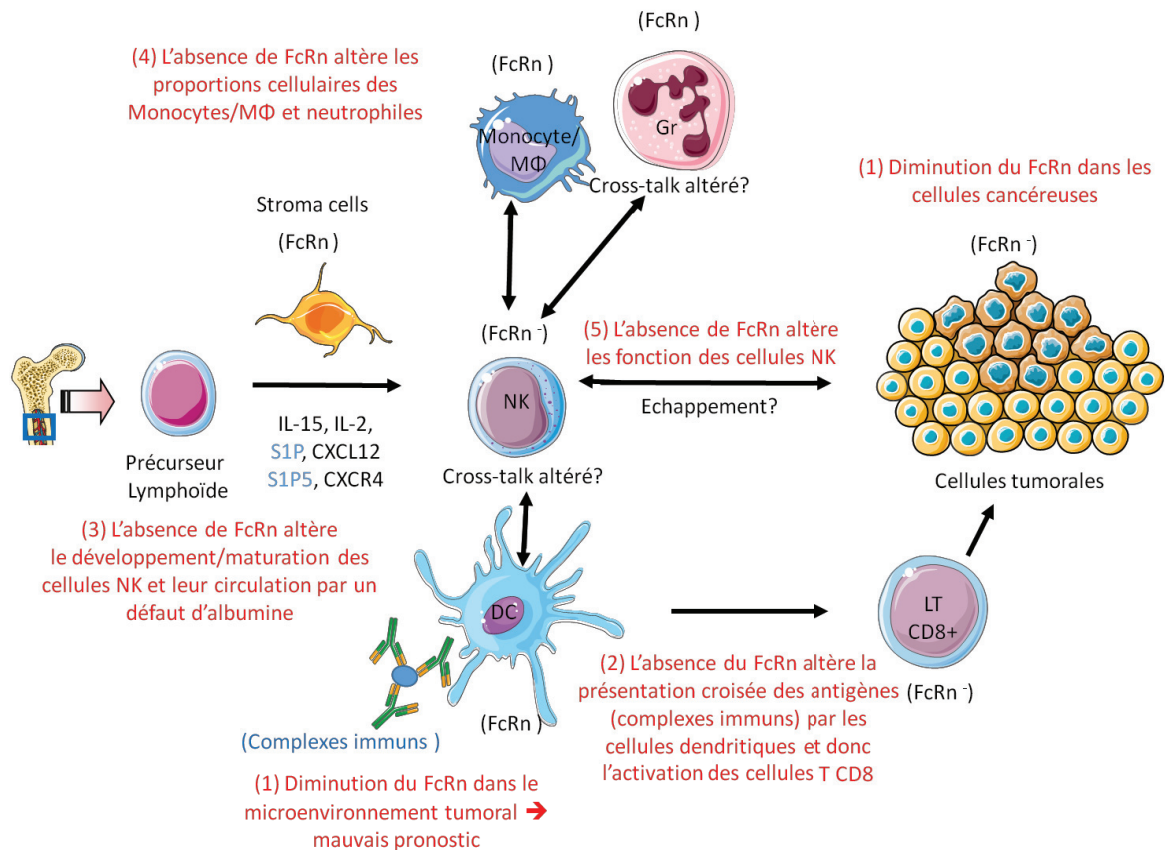


Figure 31: Schéma récapitulatif de l'implication du FcRn dans la réponse anti-tumorale

En rouge, ce sont les observations sur l'impact de l'absence ou la diminution du FcRn sur la tumorigenèse et la réponse anti-tumorale. En bleu, ce sont les molécules associées au FcRn : complexes immuns (IgG-antigène) pris en charge par les cellules dendritiques, la lipoprotéine S1P (transportée par l'albumine) et son récepteur S1P5 dont l'interaction permet en partie la circulation des cellules NK.

Dans les cancers, la diminution des cellules présentatrices d'antigène exprimant le FcRn est associée à une moins bonne réponse immunitaire anti-tumorale. La diminution du FcRn dans les cellules cancéreuses va participer à l'augmentation de la croissance tumorale, via le métabolisme de l'albumine. Enfin, l'absence de FcRn dans le microenvironnement modifie le comportement des cellules NK (qui n'expriment pas le FcRn).

Perspectives

Notre travail ouvre de nouvelles questions quant à la régulation de l'expression de FcRn dans le microenvironnement tumoral et son influence dans la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment via les cellules NK.

1) Régulation de l'expression du FcRn dans les cellules et le microenvironnement tumoral

Les données de la littérature et nos résultats préliminaires indiquent que l'expression du FcRn est régulée par certaines cytokines (X. Liu et al. 2007; Xindong Liu et al. 2008; Anthony Larue 2018). Cet effet pourrait être évalué, par RT-qPCR, d'une part sur les cellules néoplasiques elles-mêmes et les cellules du système immunitaire, exprimant le FcRn, comme les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles.

Enfin, il serait intéressant d'explorer l'impact des facteurs épigénétiques tels que la méthylation mais aussi l'impact des miARN sur l'expression du gène FCGR1 par RT-qPCR, d'une part sur les cellules néoplasiques elles-mêmes et les cellules du système immunitaire.

Cela nous permettrait de mieux comprendre les éléments susceptibles de moduler l'expression du FcRn. Ces facteurs pourraient être utilisés pour augmenter l'expression du FcRn, *in vivo*, dans le microenvironnement et d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale.

2) Influence de l'expression du FcRn dans les cellules cancéreuses

Le niveau d'expression du FcRn dans les cellules cancéreuses pourrait intervenir sur la croissance tumorale, comme cela a déjà été décrit dans la littérature et dans la réponse aux anticorps thérapeutiques. Lors de ma thèse, j'ai développé des clones cellulaires B16F10 surexprimant le FcRn. Avec ces cellules, nous pourrions étudier l'influence de l'expression du FcRn sur l'accessibilité des anticorps thérapeutiques dans les tumeurs et son rôle dans la présentation des antigènes tumoraux aux cellules du système immunitaire. Il est possible d'appréhender l'impact de l'expression du FcRn sur la biodistribution et la dégradation des anticorps thérapeutiques *in vitro*, en utilisant des cultures cellulaires en 3D et des anticorps marqués à un fluorophore. Les nouveaux systèmes d'évaluation *in vitro* de l'infiltration de cellules immunitaires pourraient également être utilisés pour évaluer la présentation des antigènes (Sherman, Gitschier, and Rossi 2018). Des expériences *in vivo*, chez des souris immunocompétentes, pourraient aussi permettre d'évaluer l'impact de la surexpression du FcRn

sur la tumorigenèse, la réponse anti-tumorale mais également sur la réponse au traitement par anticorps.

3) Impact du niveau d'expression du FcRn sur l'efficacité de la réponse anti-tumorale

Comme cela a déjà été démontré, l'absence de FcRn influence les interactions entre les cellules dendritiques et les lymphocytes TCD8. Elle pourrait aussi avoir des répercussions sur les interactions entre d'autres cellules, notamment au travers des modifications de facteurs solubles. Il serait intéressant d'élaborer des modèles de co-cultures entre divers types de cellules du système immunitaire, en présence ou en absence de FcRn. D'après la littérature, les cellules NK peuvent être activées par les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages. Il serait donc intéressant de comparer le phénotype des cellules NK en présence de cellules dendritiques de souris WT et de souris FcRn $-/-$. Afin de différencier les interactions directes, des interactions indirectes via des médiateurs solubles, nous pourrions utiliser des « transwell » pour éviter les contacts directs entre les cellules.

Il serait aussi intéressant d'explorer l'existence d'un ligand du FcRn sur les cellules NK, qui pourrait être inhibé chez les animaux FcRn $-/-$ et à l'origine du défaut de développement/maturation des cellules NK. Pour cela, nous pourrions réaliser des co-cultures de cellules NK de souris FcRn $-/-$ ou de WT avec les cellules B16F10 qui surexpriment le FcRn et d'utiliser la technique de cytométrie en flux couplée à de la microscopie (Amnis). En effet, cette technique permet d'avoir une première approche à la synapse immunologique qui se forme entre une cellule NK et sa cellule cible. Ainsi, nous pourrions évaluer les co-marquages de surface entre le FcRn des B16F10 et les récepteurs des cellules NK, comme par exemple NKG2D qui est connu pour lier des molécules CMH-I like (ex: MICA et MICB)

4) Impact de l'absence de FcRn sur le développement/maturation et les fonctions des cellules NK

Compte tenu de l'influence de l'absence du FcRn sur le développement médullaire des cellules NK, il serait intéressant de mettre en place un modèle de "sauvetage" du développement/maturation des cellules NK. Pour cela nous pourrions compléter les souris FcRn $-/-$ avec du FcRn recombinant. En effet, nous produisons au sein de notre laboratoire, la protéine recombinante FcRn associée à la $\beta 2m$. Ainsi, nous pourrions « compléter » en

continu les souris FcRn^{-/-} avec la protéine recombinante et suivre le « sauvetage » du développement/maturation et des fonctions des cellules NK en fonction du temps. L'efficacité de la supplémentation pourrait être évaluée par cytométrie selon les protocoles disponibles au laboratoire et qui correspondent à ceux de notre article N°2.

Par ailleurs, compte tenu de l'influence du FcRn dans la biodistribution de l'albumine et vu l'importance de cette protéine dans la circulation des cellules NK. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'hypoalbuminémie sur la circulation des cellules NK à partir de la moelle osseuse. Pour cela, selon la même stratégie que pour le FcRn recombinant, nous pourrions supplémenter les animaux FcRn^{-/-} avec de l'albumine murine et suivre le développement/maturation et fonctions des cellules NK au cours du temps.

Nos résultats *in vitro* indiquent qu'un défaut de certaines cytokines - IL-2, IL-15 et IL-18 - pourrait être à l'origine du phénotype immature des cellules NK dans les souris déficientes en FcRn. L'addition de cytokines exogènes chez les souris FcRn^{-/-} pourrait permettre d'évaluer *in vivo* la pertinence de nos résultats. De même, une analyse exhaustive des récepteurs de ces cytokines sur les cellules NK permettrait de progresser dans la compréhension des mécanismes induisant ce phénotype immature.

Ces travaux pourraient permettre de mieux appréhender l'influence de la dérégulation du FcRn dans les cancers sur la réponse immunitaire anti-tumorale et la répercussion sur la réponse aux anticorps thérapeutiques.

Bibliographie

- “003982 - B6.129X1-Fcgrt/DcrJ.” n.d. Accessed September 20, 2018. <https://www.jax.org/strain/003982>.
- Abram, Clare L., and Clifford A. Lowell. 2007. “The Expanding Role for ITAM-Based Signaling Pathways in Immune Cells.” *Science’s STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*.
- Adams, Brian D, Andrea L Kasinski, and Frank J Slack. 2014. “Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer.” *Current Biology : CB* 24 (16). NIH Public Access: R762-76.
- Adamski, F M, A T King, and J Demmer. 2000. “Expression of the Fc Receptor in the Mammary Gland during Lactation in the Marsupial *Trichosurus Vulpecula* (Brushtail Possum).” *Molecular Immunology* 37 (8): 435–44.
- Ahouse, J J, C L Hagerman, P Mittal, D J Gilbert, N G Copeland, N a Jenkins, and N E Simister. 1993. “Mouse MHC Class I-like Fc Receptor Encoded Outside the MHC.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (11): 6076–88.
- Akilesh, S., T. B. Huber, H. Wu, G. Wang, B. Hartleben, J. B. Kopp, J. H. Miner, D. C. Roopenian, E. R. Unanue, and A. S. Shaw. 2008. “Podocytes Use FcRn to Clear IgG from the Glomerular Basement Membrane.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (3): 967–72.
- Akilesh, Shreeram, Gregory J. Christianson, Derry C. Roopenian, and Andrey S. Shaw. 2007. “Neonatal FcR Expression in Bone Marrow-Derived Cells Functions to Protect Serum IgG from Catabolism.” *The Journal of Immunology* 179 (7): 4580–88.
- Alberio, Tiziana, Greta Forlani, Marta Lualdi, Giovanna Tosi, Roberto S Accolla, and Mauro Fasano. 2018. “Neonatal Fc Receptor Is Involved in the Protection of Fibrinogen after Its Intake in Peripheral Blood Mononuclear Cells.” *Journal of Translational Medicine* 16 (1): 64. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1446-2>.
- Ali, Alaa Kassim, Jun Seok Oh, Eric Vivier, Meinrad Busslinger, and Seung-Hwan Lee. 2016. “NK Cell–Specific Gata3 Ablation Identifies the Maturation Program Required for Bone Marrow Exit and Control of Proliferation.” *The Journal of Immunology* 196 (4): 1753–67.
- Alifano, Marco, Audrey Mansuet-Lupo, Filippo Lococo, Nicolas Roche, Antonio Bobbio, Emelyne Canny, Olivier Schussler, et al. 2014. “Systemic Inflammation, Nutritional Status and Tumor Immune Microenvironment Determine Outcome of Resected Non-Small Cell Lung Cancer.” *PloS One* 9 (9). Public Library of Science: e106914.
- Andersen, Jan Terje, Bjørn Dalhus, Jason Cameron, Muluneh Bekele Daba, Andrew Plumridge, Leslie Evans, Stephan O. Brennan, et al. 2012. “Structure-Based Mutagenesis Reveals the Albumin-Binding Site of the Neonatal Fc Receptor.” *Nature Communications* 3: 1–9.
- Andersen, Jan Terje, and Inger Sandlie. 2009. “The Versatile MHC Class I-Related FcRn Protects IgG and Albumin from Degradation: Implications for Development of New Diagnostics and Therapeutics.” *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 24 (4): 318–32.
- Anthony Larue, Rapport de stage Master 2 IMCVAT. 2018. “Expression et Modulation Du FcRn Dans Les Macrophages et Les Cellules Cancéreuses de l’ovaire.”
- Aquino-López, Arianexys, Vladimir V. Senyukov, Zlatko Vlastic, Eugenie S. Kleinerman, and Dean A. Lee. 2017. “Interferon Gamma Induces Changes in Natural Killer (NK) Cell Ligand Expression and Alters NK Cell-Mediated Lysis of Pediatric Cancer Cell Lines.” *Frontiers in Immunology* 8 (APR). Frontiers Media SA: 391.
- Armitage, Charles W, Connor P O’Meara, Marina C G Harvie, Peter Timms, Richard S

- Blumberg, and Kenneth W Beagley. 2014. "Divergent Outcomes Following Transcytosis of IgG Targeting Intracellular and Extracellular Chlamydial Antigens." *Immunology and Cell Biology* 92 (5): 417–26.
- Arnold, James N., Mark R. Wormald, Robert B. Sim, Pauline M. Rudd, and Raymond A. Dwek. 2007. "The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins." *Annual Review of Immunology* 25 (1): 21–50.
- Arnoult, Christophe, Guillaume Brachet, Diana Cadena Castaneda, Nicolas Azzopardi, Christophe Passot, Celine Desvignes, Gilles Paintaud, Nathalie Heuzé-Vourc'h, Hervé Watier, and Valérie Gouilleux-Gruart. 2017. "Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF- α Antibodies after a Single Injection in Mice." *The Journal of Immunology* 199 (2): 418–24.
- Asadzadeh, Zahra, Hamed Mohammadi, Elham Safarzadeh, Maryam Hemmatzadeh, Ahmad Mahdian-shakib, Farhad Jadidi-Niaragh, Gholamreza Azizi, and Behzad Baradaran. 2017. "The Paradox of Th17 Cell Functions in Tumor Immunity." *Cellular Immunology* 322 (December). Academic Press: 15–25.
- B. Jaeger. E. Vivier. 2012. "Natural Killer Cell Tolerance : Control by Self or Self-Control?" 1: 1–12.
- Bai, Yu, Lilin Ye, Devin B Tesar, Haichen Song, Deming Zhao, Pamela J Björkman, Derry C Roopenian, and Xiaoping Zhu. 2011. "Intracellular Neutralization of Viral Infection in Polarized Epithelial Cells by Neonatal Fc Receptor (FcRn)-Mediated IgG Transport." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (45): 18406–11.
- Baker, Kristi, Shuo-Wang Qiao, Timothy T. Kuo, Victoria G. Aveson, Barbara Platzter, Jan-Terje Andersen, Inger Sandlie, et al. 2011. "Neonatal Fc Receptor for IgG (FcRn) Regulates Cross-Presentation of IgG Immune Complexes by CD8-CD11b+ Dendritic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (24): 9927–32.
- Baker, Kristi, Timo Rath, Magdalena B. Flak, Janelle C. Arthur, Zhangguo Chen, Jonathan N. Glickman, Inti Zlobec, et al. 2013. "Neonatal Fc Receptor Expression in Dendritic Cells Mediates Protective Immunity against Colorectal Cancer." *Immunity* 39 (6). NIH Public Access: 1095–1107.
- Baker, Kristi, Timo Rath, Michal Pyzik, and Richard S. Blumberg. 2014a. "The Role of FcRn in Antigen Presentation." *Frontiers in Immunology* 5 (August): 408.
- Baker, Kristi, Timo Rath, Michal Pyzik, and Richard S Blumberg. 2014b. "Neonatal Fc Receptors for IgG Drive CD8 + T Cell-Mediated Anti-Cancer Immunosurveillance at Tolerogenic Mucosal Sites." *OncImmunology* 3 (2): e27844.
- Bal, Wojciech, Magdalena Sokołowska, Ewa Kurowska, and Peter Fallér. 2013. "Binding of Transition Metal Ions to Albumin: Sites, Affinities and Rates." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
- Balkwill, Frances. 2009. "Tumour Necrosis Factor and Cancer." *Nature Reviews Cancer* 9 (5). Nature Publishing Group: 361–71.
- Baranyi, Mária, Judit Cervenak, Balázs Bender, and Imre Kacs Kovics. 2013. "Transgenic Rabbits That Overexpress the Neonatal Fc Receptor (FcRn) Generate Higher Quantities and Improved Qualities of Anti-Thymocyte Globulin (ATG)." Edited by Jean Kanellopoulos. *PloS One* 8 (10): e76839.
- Beck, Alain, Liliane Goetsch, Charles Dumontet, and Nathalie Corvaia. 2017. "Strategies and Challenges for the next Generation of Antibody–drug Conjugates." *Nature Reviews Drug Discovery* 16 (5): 315–37.
- Beltra, Jean-Christophe, Sara Bourbonnais, Nathalie Bédard, Tania Charpentier, Moana Boulangé, Eva Michaud, Ines Boufaied, et al. 2016. "IL2R β -Dependent Signals Drive

- Terminal Exhaustion and Suppress Memory Development during Chronic Viral Infection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (37). National Academy of Sciences: E5444-53.
- Bender, Balázs, Lilla Bodrogi, Balázs Mayer, Zita Schneider, Yaofeng Zhao, Lennart Hammarström, André Eggen, Imre Kacs Kovics, and Zsuzsanna Bosze. 2007. “Position Independent and Copy-Number-Related Expression of the Bovine Neonatal Fc Receptor α -Chain in Transgenic Mice Carrying a 102 Kb BAC Genomic Fragment.” *Transgenic Research* 16 (5): 613–27.
- Bernardini, Giovanni, Giorgia Benigni, Fabrizio Antonangeli, Andrea Ponzetta, and Angela Santoni. 2014. “Multiple Levels of Chemokine Receptor Regulation in the Control of Mouse Natural Killer Cell Development.” *Frontiers in Immunology* 5 (February). Frontiers: 44.
- Bertolotti-Ciarlet, Andrea, Weirong Wang, Rebecca Lownes, Pavlo Pristatsky, Yulin Fang, Troy McKelvey, Yingzhe Li, et al. 2009. “Impact of Methionine Oxidation on the Binding of Human IgG1 to Fc Rn and Fc Gamma Receptors.” *Molecular Immunology* 46 (8–9): 1878–82.
- Bevaart, Lisette, Marco J H Jansen, Martine J. Van Vugt, J. Sjef Verbeek, Jan G J Van De Winkel, and Jeanette H W Leusen. 2006. “The High-Affinity IgG Receptor, FcgammaRI, Plays a Central Role in Antibody Therapy of Experimental Melanoma.” *Cancer Research* 66 (3): 1261–64.
- Bibeau, Frédéric, Evelyne Lopez-Crapez, Frédéric Di Fiore, Simon Thezenas, Marc Ychou, France Blanchard, Aude Lamy, et al. 2009. “Impact of Fc γ RIIa-Fc γ RIIIa Polymorphisms and KRAS Mutations on the Clinical Outcome of Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With Cetuximab Plus Irinotecan.” *Journal of Clinical Oncology* 27 (7): 1122–29.
- Bitonti, A. J., J. A. Dumont, S. C. Low, R. T. Peters, K. E. Kropp, V. J. Palombella, J. M. Stattel, et al. 2004. “Pulmonary Delivery of an Erythropoietin Fc Fusion Protein in Non-Human Primates through an Immunoglobulin Transport Pathway.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (26): 9763–68.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987. “Structure of the Human Class I Histocompatibility Antigen, HLA-A2.” *Nature* 329 (6139): 506–12.
- Blumberg, Laurence, John E Humphries, Kenneth C Lasseter, and Richard S Blumberg. 2017. “SYNT001: A Humanized IgG4 Monoclonal Antibody That Disrupts the Interaction of FcRn and IgG for the Treatment of IgG-Mediated Autoimmune Diseases.” *Blood* 130 (Suppl 1). http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/3483.
- Blumberg, R S, T Koss, C M Story, D Barisani, J Polischuk, A Lipin, L Pablo, R Green, and N E Simister. 1995. “A Major Histocompatibility Complex Class I-Related Fc Receptor for IgG on Rat Hepatocytes.” *The Journal of Clinical Investigation* 95 (5): 2397–2402.
- Boieri, Margherita, Aina Ulvmoen, Amanda Sudworth, Clare Lendrem, Matthew Collin, Anne M. Dickinson, Lise Kveberg, and Marit Innngjerdengen. 2017. “IL-12, IL-15, and IL-18 Pre-Activated NK Cells Target Resistant T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Delay Leukemia Development in Vivo.” *OncImmunity* 6 (3). Taylor & Francis: 1–12.
- Borvak, J, J Richardson, C Medesan, F Antohe, C Radu, M Simionescu, V Ghetie, and E S Ward. 1998. “Functional Expression of the MHC Class I-Related Receptor, FcRn, in Endothelial Cells of Mice.” *International Immunology* 10 (9): 1289–98.
- Brambell, F. W. Rogers. 1958. “The Passive Immunity of the Young Mammal.” *Biological Reviews* 33 (4). Wiley/Blackwell (10.1111): 488–531.
- . 1969. “The Transmission of Immune Globulins from the Mother to the Foetal and

- Newborn Young.” *Proceedings of the Nutrition Society* 28 (01): 35–41.
http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665169000103.
- Brambell FW. 1966. “The Transmission of Immunity from Mother to Young and the Catabolism of Immunoglobulins.” *Lancet*, no. January: 2(7473):1087-93.
- Brambell FW, Hemmings WA and Morris IG. 1964. “A Theoretical Model of γ -Globulin Catabolism.” *Nature*, no. September: 33–35.
- “Breakthrough Medicines | Syntimmune.” n.d. Accessed August 20, 2018.
<https://www.syntimmune.com/breakthrough-medicines/#synt001>.
- Broude, Eugenia V, Balázs Györfy, Alexander A Chumanevich, Mengqian Chen, Martina S J McDermott, Michael Shtutman, James F Catroppo, and Igor B Roninson. 2015. “Expression of CDK8 and CDK8-Interacting Genes as Potential Biomarkers in Breast Cancer.” *Current Cancer Drug Targets* 15 (8). NIH Public Access: 739–49.
- Brown, J R. 1976. “Structural Origins of Mammalian Albumin.” *Federation Proceedings* 35 (10): 2141–44.
- Bruhns, Pierre. 2015. “Properties of Mouse and Human IgG Receptors and Their Contribution to Disease Models.” *Blood* 119 (24): 5640–50.
- Bruhns, Pierre, and Friederike Jönsson. 2015. “Mouse and Human FcR Effector Functions.” *Immunological Reviews* 268 (1). Wiley/Blackwell (10.1111): 25–51.
- Burmeister, W P, L N Gastinel, N E Simister, M L Blum, and P J Bjorkman. 1994. “Crystal Structure at 2.2 Å Resolution of the MHC-Related Neonatal Fc Receptor.” *Nature* 372 (6504): 336–43.
- Burmeister, W P, A H Huber, and P J Bjorkman. 1994. “Crystal Structure of the Complex of Rat Neonatal Fc Receptor with Fc.” *Nature* 372 (6504): 379–83.
- Burton, D. R., A. J. Hessel, B. F. Keele, P. J. Klasse, T. A. Ketas, B. Moldt, D. C. Dunlop, et al. 2011. “Limited or No Protection by Weakly or Nonneutralizing Antibodies against Vaginal SHIV Challenge of Macaques Compared with a Strongly Neutralizing Antibody.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (27): 11181–86.
- “Cancer Du Poumon | Ligue Contre Le Cancer.” n.d. Accessed September 18, 2018.
https://www.ligue-cancer.net/article/54_cancer-du-poumon.
- Casburn-Budd, R, P Youinou, H Hager, D Elkington, I Baxter, J M Berthelot, P Le Goff, and D A Isenberg. 1992. “Asialylated IgG in the Serum and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis.” *The Journal of Rheumatology* 19 (7): 1070–74.
- Catunda Lemos, Ana Paula, Judit Cervenak, Balázs Bender, Orsolya Ivett Hoffmann, Mária Baranyi, Andrea Kerekes, Anita Farkas, Zsuzsanna Bosze, László Hiripi, and Imre Kacs Kovics. 2012. “Characterization of the Rabbit Neonatal Fc Receptor (FcRn) and Analyzing the Immunophenotype of the Transgenic Rabbits That Overexpresses FcRn.” Edited by Pierre Boudinot. *PLoS ONE* 7 (1): e28869.
- Cauza, Karla, Gabriele Hinterhuber, Ruth Dingelmaier-Hovorka, Karin Brugger, Gabriele Klosner, Reinhard Horvat, Klaus Wolff, and Dagmar Foedinger. 2005. “Expression of FcRn, the MHC Class I-Related Receptor for IgG, in Human Keratinocytes.” *Journal of Investigative Dermatology* 124: 132–39.
- Cervenak, J., B. Bender, Z. Schneider, M. Magna, B. V. Carstea, K. Liliom, A. Erdei, Z. Bosze, and I. Kacs Kovics. 2011. “Neonatal FcR Overexpression Boosts Humoral Immune Response in Transgenic Mice.” *The Journal of Immunology* 186 (2): 959–68.
- Cervenak, Judit, Márton Doleschall, Balázs Bender, Balázs Mayer, Zita Schneider, Zoltán Doleschall, Yaofeng Zhao, et al. 2013. “NF κ B Induces Overexpression of Bovine FcRn: A Novel Mechanism That Further Contributes to the Enhanced Immune Response in Genetically Modified Animals Carrying Extra Copies of FcRn.” *Landeis Bioscience* 5: 860–871.
- Chames, Patrick, and Daniel Baty. 2009. “[The Future of Antibody Fragments, Made of a

- Single Immunoglobulin Domain].” *Medecine Sciences : M/S* 25 (12): 1159–62.
- Chaudhury, Chaity, Charles L. Brooks, Daniel C. Carter, John M. Robinson, and Clark L. Anderson. 2006. “Albumin Binding to FcRn: Distinct from the FcRn-IgG Interaction.” *Biochemistry* 45 (15): 4983–90.
- Chaudhury, Chaity, Samina Mehnaz, John M. Robinson, William L. Hayton, Dennis K. Pearl, Derry C. Roopenian, and Clark L. Anderson. 2003. “The Major Histocompatibility Complex-related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan.” *The Journal of Experimental Medicine* 197 (3): 315–22.
- Chiossone, Laura, Julie Chaix, Nicolas Fuseri, Claude Roth, Eric Vivier, and Thierry Walzer. 2009. “Maturation of Mouse NK Cells Is a 4-Stage Developmental Program.” *Blood* 113 (22): 5488–96.
- Christianson, Gregory J., Victor Z. Sun, Shreeram Akilesh, Emanuele Pesavento, Gabriele Proetzel, and Derry C. Roopenian. 2012. “Monoclonal Antibodies Directed against Human FcRn and Their Applications.” *MAbs* 4 (2). Taylor & Francis: 208–16. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3361656>.
- Cianga, P, C Medesan, J A Richardson, V Ghetie, and E S Ward. 1999. “Identification and Function of Neonatal Fc Receptor in Mammary Gland of Lactating Mice.” *European Journal of Immunology* 29 (8): 2515–23.
- Cianga, Petru, Corina Cianga, Laurette Cozma, E. Sally Ward, and Eugen Carasevici. 2003. “The MHC Class I Related Fc Receptor, FcRn, Is Expressed in the Epithelial Cells of the Human Mammary Gland.” *Human Immunology* 64 (12): 1152–59.
- Claypool, Steven M, Bonny L Dickinson, Jessica S Wagner, Finn-Eirik Johansen, Nanda Venu, Jason A Borawski, Wayne I Lencer, and Richard S Blumberg. 2004. “Bidirectional Transepithelial IgG Transport by a Strongly Polarized Basolateral Membrane Fcγ- Receptor.” *Molecular Biology of the Cell* 15 (4): 1746–59.
- Cohnen, André, Samuel C Chiang, Ana Stojanovic, Hendrik Schmidt, Maren Claus, Paul Saftig, Ottmar Janßen, Adelheid Cerwenka, Yenan T Bryceson, and Carsten Watzl. 2013. “Surface CD107a/LAMP-1 Protects Natural Killer Cells from Degranulation-Associated Damage.” *Blood* 122 (8): 1411–18.
- Colucci, Francesco, James P Di Santo, and Paul J Leibson. 2002. “Natural Killer Cell Activation in Mice and Men: Different Triggers for Similar Weapons?” *Nature Immunology* 3 (9): 807–13.
- Concetti, Fabio, and Valerio Napolioni. 2010. “Insights into the Role of Fc Gamma Receptors (FcγRs) Genetic Variations in Monoclonal Antibody-Based Anti-Cancer Therapy.” *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 5 (3): 197–204.
- Cosimi, A B, R C Burton, R B Colvin, G Goldstein, F L Delmonico, M P LaQuaglia, N Tolkoff-Rubin, R H Rubin, J T Herrin, and P S Russell. 1981. “Treatment of Acute Renal Allograft Rejection with OKT3 Monoclonal Antibody.” *Transplantation* 32 (6): 535–39.
- Costantini, Claudio, and Marco A Cassatella. 2011. “The Defensive Alliance between Neutrophils and NK Cells as a Novel Arm of Innate Immunity.” *Journal of Leukocyte Biology* 89 (2): 221–33.
- Crinier, Adeline, Charlotte Viant, Mathilde Girard-Madoux, and Éric Vivier. 2017. “Les Cellules Lymphoïdes Innées.” *Médecine/Sciences* 33 (5). Éditions EDK, Groupe EDP Sciences: 534–42.
- Curry, Stephen. 2009. “Lessons from the Crystallographic Analysis of Small Molecule Binding to Human Serum Albumin.” *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 24 (4). Elsevier Masson SAS: 342–57.
- Dall’Acqua, W. F., P. A. Kiener, and H. Wu. 2006. “Properties of Human IgG1s Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn).” *Journal of Biological*

- Chemistry* 281 (33): 23514–24. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M604292200>.
- Dalloneau, Emilie, Nadine Baroukh, Konstantinos Mavridis, Agnès Maillet, Fabien Gueugnon, Yves Courty, Agnès Petit, et al. 2016. “Downregulation of the Neonatal Fc Receptor Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Tissue Is Associated with a Poor Prognosis.” *Oncotarget* 7 (34): 54415–29.
- Daro, E, P van der Sluijs, T Galli, and I Mellman. 1996. “Rab4 and Cellubrevin Define Different Early Endosome Populations on the Pathway of Transferrin Receptor Recycling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18): 9559–64.
- Datta-mannan, Amita, Chi-kin Chow, Craig Dickinson, David Driver, Jirong Lu, Derrick R Witcher, and Victor J Wroblewski. 2012. “FcRn Affinity-Pharmacokinetic Relationship of Five Human IgG4 Antibodies Engineered for Improved In Vitro FcRn Binding.”
- Datta-Mannan, Amita, Derrick R. Witcher, Ying Tang, Jeffry Watkins, and Victor J. Wroblewski. 2007. “Monoclonal Antibody Clearance.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (3): 1709–17.
- Datta-Mannan, Amita, Derrick R Witcher, Jirong Lu, and Victor J Wroblewski. 2012. “Influence of Improved FcRn Binding on the Subcutaneous Bioavailability of Monoclonal Antibodies in Cynomolgus Monkeys.” *MAbs* 4 (2): 267–73.
- Daussy, Cécile, Fabrice Faure, Katia Mayol, Sébastien Viel, Georg Gasteiger, Emily Charrier, Jacques Bienvenu, et al. 2014. “T-Bet and Eomes Instruct the Development of Two Distinct Natural Killer Cell Lineages in the Liver and in the Bone Marrow.” *The Journal of Experimental Medicine* 211 (3): 563–77.
- Deng, R., K. M. Loyet, S. Lien, S. Iyer, L. E. DeForge, F.-P. Theil, H. B. Lowman, P. J. Fielder, and S. Prabhu. 2010. “Pharmacokinetics of Humanized Monoclonal Anti-Tumor Necrosis Factor- Antibody and Its Neonatal Fc Receptor Variants in Mice and Cynomolgus Monkeys.” *Drug Metabolism and Disposition* 38 (4): 600–605.
- Dickinson, Bonny L, Kamran Badizadegan, Zhen Wu, Jeremy C Ahouse, Xiaoping Zhu, Neil E Simister, Richard S Blumberg, and Wayne I Lencer. 1999. “Bidirectional FcRn-Dependent IgG Transport in a Polarized Human Intestinal Epithelial Cell Line.” *Journal of Clinical Investigation* 104 (7): 903–11.
- Dickinson, Bonny L, Steven M Claypool, June A D’Angelo, Martha L Aiken, Nanda Venu, Elizabeth H Yen, Jessica S Wagner, et al. 2008. “Ca²⁺-Dependent Calmodulin Binding to FcRn Affects Immunoglobulin G Transport in the Transcytotic Pathway.” Edited by Keith Mostov. *Molecular Biology of the Cell* 19 (1): 414–23.
- Dixon, F. J., P. H. Maurer, and M. P. Deichmiller. 1953. “Half-Lives of Homologous Serum Albumins in Several Species.” *Experimental Biology and Medicine* 83 (2): 287–88.
- Domagala-Kulawik, Joanna. 2015. “The Role of the Immune System in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Potential for Therapeutic Intervention.” *Translational Lung Cancer Research* 4 (2). AME Publications: 177–90.
- Draht, Muriel X. G., Danny Goudkade, Alexander Koch, Heike I. Grabsch, Matty P. Weijnenberg, Manon van Engeland, Veerle Melotte, and Kim M. Smits. 2018. “Prognostic DNA Methylation Markers for Sporadic Colorectal Cancer: A Systematic Review.” *Clinical Epigenetics* 10 (1). BioMed Central: 35.
- Dumet, Christophe, Jérémy Pottier, Valérie Gouilleux, and Hervé Watier. 2018. “New Structural Formats of Therapeutic Antibodies for Rheumatology.” *Joint Bone Spine* 85 (1): 47–52.
- Dunn, Gavin P, Catherine M Koebel, and Robert D Schreiber. 2006. “Interferons, Immunity and Cancer Immunoediting.” *Nature Reviews. Immunology* 6 (11): 836–48.
- Dutertre, Charles-Antoine, and Jean-Luc Teillaud. 2006. “[Monoclonal Antibodies, Act Two: New Molecules for New Challenges].” *Journal de La Societe de Biologie* 200 (4): 377–

- Esplugues, Enric, David Sancho, Javier Vega-Ramos, Carlos Martínez, Uta Syrbe, Alf Hamann, Pablo Engel, Francisco Sánchez-Madrid, and Pilar Lauzurica. 2003. "Enhanced Antitumor Immunity in Mice Deficient in CD69." *The Journal of Experimental Medicine* 197 (9). The Rockefeller University Press: 1093–1106.
- Esplugues, Enric, Javier Vega-Ramos, David Cartoixa, Berta N Vazquez, Ignasi Salaet, Pablo Engel, and Pilar Lauzurica. 2005. "Induction of Tumor NK-Cell Immunity by Anti-CD69 Antibody Therapy." *Blood* 105 (11). American Society of Hematology: 4399–4406.
- Fasano, Mauro, Stephen Curry, Enzo Terreno, Monica Galliano, Gabriella Fanali, Pasquale Narciso, Stefania Notari, and Paolo Ascenzi. 2005. "The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin." *IUBMB Life* 57 (12): 787–96.
- Felices, Martin, Alexander J Lenvik, Ron McElmurry, Sami Chu, Peter Hinderlie, Laura Bendzick, Melissa A Geller, Jakub Tolar, Bruce R Blazar, and Jeffrey S Miller. 2018. "Continuous Treatment with IL-15 Exhausts Human NK Cells via a Metabolic Defect." *JCI Insight* 3 (3). American Society for Clinical Investigation.
- Ferguson, Daniel C., and Javier G. Blanco. 2018. "Regulation of the Human Fc-Neonatal Receptor Alpha-Chain Gene FCGRT by MicroRNA-3181." *Pharmaceutical Research* 35 (1): 10.
- Ferguson, Daniel C. 2017. "Elucidating the Epigenetic Determinants of Neonatal Fc Receptor (FcRn) Expression in Humans." *ProQuest Dissertations and Theses*.
- Ferlazzo, Guido, and Barbara Morandi. 2014. "Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells." *Frontiers in Immunology* 5 (APR): 1–7.
- Finlay, William J J, and Juan C Almagro. 2012. "Natural and Man-Made V-Gene Repertoires for Antibody Discovery." *Frontiers in Immunology* 3: 342. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00342>.
- Firan, M, R Bawdon, C Radu, R J Ober, D Eaken, F Antohe, V Ghetie, and E S Ward. 2001. "The MHC Class I-Related Receptor, FcRn, Plays an Essential Role in the Maternofetal Transfer of Gamma-Globulin in Humans." *International Immunology* 13 (8): 993–1002.
- Fogel, L. A., M. M. Sun, T. L. Geurs, L. N. Carayannopoulos, and A. R. French. 2013. "Markers of Nonselective and Specific NK Cell Activation." *The Journal of Immunology* 190 (12): 6269–76.
- Freiberger, T, L Grodecká, B. Ravčuková, B. Kuřecová, V Postránecká, J. Vlček, J. Jarkovský, et al. 2010. "Association of FcRn Expression with Lung Abnormalities and IVIG Catabolism in Patients with Common Variable Immunodeficiency." *Clinical Immunology* 136 (3): 419–25.
- Freiberger, T, B Ravcuková, L Grodecká, B Kurecová, J Jarkovský, D Bartonková, V Thon, and J Litzman. 2010. "No Association of FCRN Promoter VNTR Polymorphism with the Rate of Maternal-Fetal IgG Transfer." *Journal of Reproductive Immunology* 85 (2): 193–97.
- Freud, Aharon G., and Michael A. Caligiuri. 2006. "Human Natural Killer Cell Development." *Immunological Reviews* 214 (1): 56–72.
- Freud, Aharon G, Akihiko Yokohama, Brian Becknell, Melissa T Lee, Hsiaoyin C Mao, Amy K Ferketich, and Michael A Caligiuri. 2006. "Evidence for Discrete Stages of Human Natural Killer Cell Differentiation in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 203 (4): 1033–43.
- Fucikova, Jitka, Etienne Becht, Kristina Iribarren, Jeremy Goc, Romain Remark, Diane Damotte, Marco Alifano, et al. 2016. "Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis." *Cancer Research* 76 (7). American Association for Cancer

- Research: 1746–56.
- Gasser, Martin, and Ana Maria Waaga-Gasser. 2016. “Therapeutic Antibodies in Cancer Therapy.” In , 95–120. Springer, Cham.
- Gasteiger, Georg, Saskia Hemmers, Matthew A Firth, Audrey Le Floc’h, Morgan Huse, Joseph C Sun, and Alexander Y Rudensky. 2013. “IL-2-Dependent Tuning of NK Cell Sensitivity for Target Cells Is Controlled by Regulatory T Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 210 (6): 1167–78.
- Geiger, Theresa L, and Joseph C Sun. 2016. “Development and Maturation of Natural Killer Cells.” *Current Opinion in Immunology* 39 (April). Elsevier Current Trends: 82–89.
- Germain, Claire, Sacha Gnjjatic, Fella Tamzalit, Samantha Knockaert, Romain Remark, Jérémy Goc, Alice Lepelley, et al. 2014. “Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189 (7): 832–44.
- Getman, Kate E, and Joseph P Balthasar. 2005. “Pharmacokinetic Effects of 4C9, an Anti-FcRn Antibody, in Rats: Implications for the Use of FcRn Inhibitors for the Treatment of Humoral Autoimmune and Alloimmune Conditions.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (4): 718–29.
- Ghetie, V, J G Hubbard, J K Kim, M F Tsen, Y Lee, and E S Ward. 1996. “Abnormally Short Serum Half-Lives of IgG in Beta 2-Microglobulin-Deficient Mice.” *European Journal of Immunology* 26 (3): 690–96.
- Ghetie, Victor, and E. Sally Ward. 2000. “Multiple Roles for the Major Histocompatibility Complex Class I- Related Receptor FcRn.” *Annual Review of Immunology* 18 (1): 739–66.
- Ghetie, Victor, and E Sally Ward. 2002. “Transcytosis and Catabolism of Antibody.” *Immunologic Research* 25 (2): 097-114.
- Gill, Saar, Adrienne E Vasey, Alysha De Souza, Jeanette Baker, Aaron T Smith, Holbrook E Kohrt, Mareike Florek, et al. 2012. “Rapid Development of Exhaustion and Down-Regulation of Eomesodermin Limit the Antitumor Activity of Adoptively Transferred Murine Natural Killer Cells.” *Blood* 119 (24): 5758–68.
- Goebel, Nancy A, Clifford M Babbey, Amita Datta-Mannan, Derrick R Witcher, Victor J Wroblewski, and Kenneth W Dunn. 2008. “Neonatal Fc Receptor Mediates Internalization of Fc in Transfected Human Endothelial Cells.” *Molecular Biology of the Cell* 19 (12): 5490–5505.
- Goh, Wilford, and Nicholas D. Huntington. 2017. “Regulation of Murine Natural Killer Cell Development.” *Frontiers in Immunology* 8 (February). Frontiers: 130.
- Gomperts, Brigitte N, Avrum Spira, Pierre P Massion, Tonya C Walser, Ignacio I Wistuba, John D Minna, and Steven M Dubinett. 2011. “Evolving Concepts in Lung Carcinogenesis.” *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 32 (1). NIH Public Access: 32–43.
- Gordon, Scott M., Julie Chaix, Levi J. Rupp, Junmin Wu, Sharline Madera, Joseph C. Sun, Tullia Lindsten, and Steven L. Reiner. 2012. “The Transcription Factors T-Bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation.” *Immunity* 36 (1): 55–67.
- Gouilleux-Gruart, V., H. Chapel, S. Chevret, M. Lucas, M. Malphettes, C. Fieschi, S. Patel, et al. 2013. “Efficiency of Immunoglobulin G Replacement Therapy in Common Variable Immunodeficiency: Correlations with Clinical Phenotype and Polymorphism of the Neonatal Fc Receptor.” *Clinical and Experimental Immunology* 171 (2). Wiley-Blackwell: 186–94.
- Goupille, Philippe. 2018. “Utilité Pratique de La Surveillance de l’immunogénicité Des Anticorps Monoclonaux En Thérapeutique Dans La Polyarthrite Rhumatoïde.” *Revue Du*

- Rhumatisme Monographies* 85 (1). Elsevier Masson: 10–14.
- Grant, L R, Z-J Yao, C M Hedrich, F Wang, A Moorthy, K Wilson, D Ranatunga, and J H Bream. 2008. “Stat4-Dependent, T-Bet-Independent Regulation of IL-10 in NK Cells.” *Genes and Immunity* 9 (4): 316–27.
- Granucci, Francesca, Ivan Zanoni, Norman Pavelka, Serani L H Van Dommelen, Christopher E Andoniou, Filippo Belardelli, Mariapia A Degli Esposti, and Paola Ricciardi-Castagnoli. 2004. “A Contribution of Mouse Dendritic Cell-Derived IL-2 for NK Cell Activation.” *The Journal of Experimental Medicine* 200 (3). The Rockefeller University Press: 287–95.
- Green, Elizabeth G., Elizabeth Ramm, Nikki M. Riley, David J. Spiro, James R. Goldenring, and Marianne Wessling-Resnick. 1997. “Rab11 Is Associated with Transferrin-Containing Recycling Compartments in K562 Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239 (2): 612–16.
- Grundy, Martin A., Tong Zhang, and Charles L. Sentman. 2007. “NK Cells Rapidly Remove B16F10 Tumor Cells in a Perforin and Interferon-Gamma Independent Manner in Vivo.” *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56 (8): 1153–61.
- Guerra, Nadia, Ying Xim Tan, Nathalie T Joncker, Augustine Choy, Fermin Gallardo, Na Xiong, Susan Knoblauch, et al. 2008. “NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy.” *Immunity* 28 (4). NIH Public Access: 571–80.
- Guimond, Martin, Aharon G Freud, Hsiaoyin C Mao, Jianhua Yu, Bradley W Blaser, Jeffrey W Leong, Jeffrey B Vandeusen, et al. 2010. “In Vivo Role of Flt3 Ligand and Dendritic Cells in NK Cell Homeostasis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (6). NIH Public Access: 2769–75.
- Gunraj, Carolyn, Bernard Fernandes, and Gregory Denomme. 2002. “Synonymous Nucleotide Substitutions in the Neonatal Fc Receptor.” *Immunogenetics* 54 (2): 139–40.
- Guo, Jinyue, Fei Li, Shaoju Qian, Dingren Bi, Qigai He, Hui Jin, Rui Luo, Shaowen Li, Xianrong Meng, and Zili Li. 2016. “TGEV Infection Up-Regulates FcRn Expression via Activation of NF- κ B Signaling.” *Scientific Reports* 6. Nature Publishing Group: 1–10.
- Gupta, Sandeep, Johannes S Gach, Juan C Becerra, Tran B Phan, Jeffrey Pudney, Zina Moldoveanu, Sarah B Joseph, et al. 2013. “The Neonatal Fc Receptor (FcRn) Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Transcytosis across Epithelial Cells.” Edited by Ronald C. Desrosiers. *PLoS Pathogens* 9 (11): e1003776.
- Gupta, Sandeep, Poonam Pegu, David J Venzon, Johannes S Gach, Zhong-Min Ma, Gary Landucci, Christopher J Miller, Genoveffa Franchini, and Donald N Forthal. 2015. “Enhanced in Vitro Transcytosis of Simian Immunodeficiency Virus Mediated by Vaccine-Induced Antibody Predicts Transmitted/Founder Strain Number after Rectal Challenge.” *The Journal of Infectious Diseases* 211 (1): 45–52.
- Hamerman, Jessica A., and Lewis L. Lanier. 2006. “Inhibition of Immune Responses by ITAM-Bearing Receptors.” *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*.
- Hanson, Douglas C., Verne N. Schumaker, and Juan Yguerabide. 1981. “Segmental Flexibility of Immunoglobulin G Antibody Molecules in Solution: A New Interpretation.” *Biochemistry* 20 (24): 6842–52.
- Harris, Nicola L, Iris Spoerri, Jacqueline F Schopfer, Chiara Nembrini, Patrick Merky, Joanna Massacand, Joseph F Urban, et al. 2006. “Mechanisms of Neonatal Mucosal Antibody Protection.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (9): 6256–62.
- Haymann, J P, J P Levraud, S Bouet, V Kappes, J Hagège, G Nguyen, Y Xu, E Rondeau, and J D Sraer. 2000. “Characterization and Localization of the Neonatal Fc Receptor in Adult Human Kidney.” *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 11 (4): 632–39.

- He, X M, and D C Carter. 1992. "Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin." *Nature* 358 (6383): 209–15.
- He, Yuke, and Zhigang Tian. 2017. "NK Cell Education via Nonclassical MHC and Non-MHC Ligands." *Cellular & Molecular Immunology* 14 (4). Nature Publishing Group: 321–30.
- Hesslein, David G.T., and Lewis. L. Lanier. 2011. "Transcriptional Control of Natural Killer Cell Development and Function." *Advances in Immunology* 109 (January). Academic Press: 45–85.
- Hinton, Paul R., Mary G. Johlfs, Joanna M. Xiong, Kelly Hanestad, Kelly C. Ong, Chuck Bullock, Stephen Keller, et al. 2004. "Engineered Human IgG Antibodies with Longer Serum Half-Lives in Primates." *Journal of Biological Chemistry* 279 (8): 6213–16.
- Hinton, Paul R, Joanna M Xiong, Mary G Johlfs, Meina Tao Tang, Stephen Keller, and Naoya Tsurushita. 2006. "An Engineered Human IgG1 Antibody with Longer Serum Half-Life." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (1): 346–56.
- Hochweller, Kristin, Jörg Striegler, Günter J. Hämmerling, and Natalio Garbi. 2008. "A Novel CD11c.DTR Transgenic Mouse for Depletion of Dendritic Cells Reveals Their Requirement for Homeostatic Proliferation of Natural Killer Cells." *European Journal of Immunology* 38 (10): 2776–83.
- Hogarth, P. Mark, and Geoffrey A. Pietersz. 2012. "Fc Receptor-Targeted Therapies for the Treatment of Inflammation, Cancer and Beyond." *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Holmes, Melissa L., Nicholas D. Huntington, Rebecca Pl Thong, Jason Brady, Yoshihiro Hayakawa, Christopher E. Andoniou, Peter Fleming, et al. 2014. "Peripheral Natural Killer Cell Maturation Depends on the Transcription Factor Aiolos." *The EMBO Journal* 33 (22): 1–14.
- Huber, Andrew H., Robert F. Kelley, Louis N. Gastinel, and Pamela J. Bjorkman. 1993. "Crystallization and Stoichiometry of Binding of a Complex between a Rat Intestinal Fc Receptor and Fc." *Journal of Molecular Biology* 230 (3): 1077–83.
- Hüber, Christian M., Jean Marc Doisne, and Francesco Colucci. 2015. "IL-12/15/18-Preactivated NK Cells Suppress GvHD in a Mouse Model of Mismatched Hematopoietic Cell Transplantation." *European Journal of Immunology* 45 (6): 1727–35.
- Huntington, N. D., H. Tabarias, K. Fairfax, J. Brady, Y. Hayakawa, M. A. Degli-Esposti, M. J. Smyth, D. M. Tarlinton, and S. L. Nutt. 2007. "NK Cell Maturation and Peripheral Homeostasis Is Associated with KLRG1 Up-Regulation." *The Journal of Immunology* 178 (8): 4764–70.
- Huntington, Nicholas D, Christian a J Vossenrich, and James P Di Santo. 2007. "Developmental Pathways That Generate Natural-Killer-Cell Diversity in Mice and Humans." *Nature Reviews. Immunology* 7 (9): 703–14.
- Iizuka, K, D D Chaplin, Y Wang, Q Wu, L E Pegg, W M Yokoyama, and Y X Fu. 1999. "Requirement for Membrane Lymphotoxin in Natural Killer Cell Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11). National Academy of Sciences: 6336–40.
- Inngjerdingen, M., L. Kveberg, C. Naper, and J. T. Vaage. 2011. "Natural Killer Cell Subsets in Man and Rodents." *Tissue Antigens* 78 (2): 81–88.
- Ishii-Watabe, Akiko, Yoshiro Saito, Takuo Suzuki, Minoru Tada, Maho Ukaji, Keiko Maekawa, Kouichi Kurose, et al. 2010. "Genetic Polymorphisms of FCGRT Encoding FcRn in a Japanese Population and Their Functional Analysis" 25 (6). The Japanese Society for the Study of Xenobiotics.
- Ishima, Yu, Ulrich Kragh-Hansen, Toru Maruyama, and Masaki Otagiri. 2009. "Albumin as a Nitric Oxide-Traffic Protein: Characterization, Biochemistry and Possible Future Therapeutic Applications." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 24 (4): 308–17.

- Israel, E J, V K Patel, S F Taylor, A Marshak-Rothstein, and N E Simister. 1995. "Requirement for a Beta 2-Microglobulin-Associated Fc Receptor for Acquisition of Maternal IgG by Fetal and Neonatal Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154 (12): 6246–51.
- Israel, E J, S Taylor, Z Wu, E Mizoguchi, R S Blumberg, A Bhan, and N E Simister. 1997. "Expression of the Neonatal Fc Receptor, FcRn, on Human Intestinal Epithelial Cells." *Immunology* 92 (1): 69–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9370926>.
- Jaeger, Baptiste N., Jean Donadieu, Céline Cognet, Claire Bernat, Diana Ordoñez-Rueda, Vincent Barlogis, Nizar Mahlaoui, et al. 2012. "Neutrophil Depletion Impairs Natural Killer Cell Maturation, Function, and Homeostasis." *The Journal of Experimental Medicine* 209 (3): 565–80.
- Jafari, Reza, Naime M. Zolbanin, Houshang Rafatpanah, Jafar Majidi, and Tohid Kazemi. 2017. "Fc-Fusion Proteins in Therapy: An Updated View." *Current Medicinal Chemistry* 24 (12): 1228–37.
- JL Fahey and Robinson AG. 1963. "Factors Controlling Serum Gamma-Globulin Concentration." *J Exp Med* 3 (c): 118, 845–68.
- Jochems, Caroline, and Jeffrey Schlom. 2011. "Tumor-Infiltrating Immune Cells and Prognosis: The Potential Link between Conventional Cancer Therapy and Immunity." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 236 (5). NIH Public Access: 567–79.
- Junghans, R. P., and C. L. Anderson. 1996. "The Protection Receptor for IgG Catabolism Is the Beta2-Microglobulin-Containing Neonatal Intestinal Transport Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (11): 5512–16.
- Kandil, E, M Egashira, O Miyoshi, N Niikawa, T Ishibashi, M Kasahara, and O Miyosi. 1996. "The Human Gene Encoding the Heavy Chain of the Major Histocompatibility Complex Class I-like Fc Receptor (FCGRT) Maps to 19q13.3." *Cytogenetics and Cell Genetics* 73 (1–2): 97–98.
- Kaplon, Hélène, and Janice M. Reichert. 2018. "Antibodies to Watch in 2018." *MAbs* 10 (2). Taylor & Francis: 183–203.
- Keeble, A. H., Z. Khan, A. Forster, and L. C. James. 2008. "TRIM21 Is an IgG Receptor That Is Structurally, Thermodynamically, and Kinetically Conserved." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (16): 6045–50.
- Kennedy, M K, M Glaccum, S N Brown, E A Butz, J L Viney, M Embers, N Matsuki, et al. 2000. "Reversible Defects in Natural Killer and Memory CD8 T Cell Lineages in Interleukin 15-Deficient Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 191 (5): 771–80.
- Kim, Hyuncheol, Robert N Fariss, Connie Zhang, Shaun B Robinson, Michelle Thill, and Karl G Csaky. 2008. "Mapping of the Neonatal Fc Receptor in the Rodent Eye." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (5): 2025–29.
- Kim, J. 2006. "Albumin Turnover: FcRn-Mediated Recycling Saves as Much Albumin from Degradation as the Liver Produces." *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (2): G352–60.
- Kim, J K, M Firan, C G Radu, C H Kim, V Ghetie, and E S Ward. 1999. "Mapping the Site on Human IgG for Binding of the MHC Class I-Related Receptor, FcRn." *European Journal of Immunology* 29 (9): 2819–25.
- Kim, Jonghan, William L Hayton, John M Robinson, and Clark L Anderson. 2007. "Kinetics of FcRn-Mediated Recycling of IgG and Albumin in Human: Pathophysiology and Therapeutic Implications Using a Simplified Mechanism-Based Model." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 122 (2): 146–55.
- Knudsen Sand, Kine Marita, Malin Bern, Jeannette Nilsen, Hanna Theodora Noordzij, Inger Sandlie, Jan Terje Andersen, Kine Marita Knudsen Sand, et al. 2015. "Unraveling the

- Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics." *Frontiers in Immunology* 6 (JAN): 1–21.
- Ko, Sung-Youl, Amarendra Pegu, Rebecca S Rudicell, Zhi-yong Yang, M Gordon Joyce, Xuejun Chen, Keyun Wang, et al. 2014. "Enhanced Neonatal Fc Receptor Function Improves Protection against Primate SHIV Infection." *Nature* 514 (7524): 642–45.
- Kozlowski, P A, S Cu-Uvin, M R Neutra, and T P Flanigan. 1997. "Comparison of the Oral, Rectal, and Vaginal Immunization Routes for Induction of Antibodies in Rectal and Genital Tract Secretions of Women." *Infection and Immunity* 65 (4): 1387–94.
- Krzywinska, Ewelina, Chahrazade Kantari-Mimoun, Yann Kerdiles, Michal Sobecki, Takayuki Isagawa, Dagmar Gotthardt, Magali Castells, et al. 2017. "Loss of HIF-1 α in Natural Killer Cells Inhibits Tumour Growth by Stimulating Non-Productive Angiogenesis." *Nature Communications* 8 (1). Springer US: 1597.
- Kuo, Timothy T., Eric J. de Muinck, Steven M. Claypool, Masaru Yoshida, Takashi Nagaishi, Victoria G. Aveson, Wayne I. Lencer, and Richard S. Blumberg. 2009. "N-Glycan Moieties in Neonatal Fc Receptor Determine Steady-State Membrane Distribution and Directional Transport of IgG." *Journal of Biological Chemistry* 284 (13): 8292–8300.
- Lachmann, P. J. 1971. "The Purification of Specific Antibody as F(Ab')₂ by the Pepsin Digestion of Antigen-Antibody Precipitates, and Its Application to Immunoglobulin and Complement Antigens." *Immunochemistry* 8 (1).
- Lanoue, Astrid, Menna R Clatworthy, Philippa Smith, Sheila Green, Michael J Townsend, Helen E Jolin, Kenneth G C Smith, Padraic G Fallon, and Andrew N J McKenzie. 2004. "SIGN-R1 Contributes to Protection against Lethal Pneumococcal Infection in Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 200 (11). The Rockefeller University Press: 1383–93.
- Larsen, Maja Thim, Matthias Kuhlmann, Michael Lykke Hvam, and Kenneth A Howard. 2016. "Albumin-Based Drug Delivery: Harnessing Nature to Cure Disease." *Molecular and Cellular Therapies* 4. BioMed Central: 3.
- Latvala, Sari, Bjoern Jacobsen, Michael B. Otteneder, Annika Herrmann, and Sven Kronenberg. 2017. "Distribution of FcRn Across Species and Tissues." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 002215541770509.
- Leach, J L, D D Sedmak, J M Osborne, B Rahill, M D Lairmore, and C L Anderson. 1996. "Isolation from Human Placenta of the IgG Transporter, FcRn, and Localization to the Syncytiotrophoblast: Implications for Maternal-Fetal Antibody Transport." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157 (8): 3317–22.
- Leone, Patrizia, Eui Cheol Shin, Federico Perosa, Angelo Vacca, Franco Dammacco, and Vito Racanelli. 2013. "MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells." *Journal of the National Cancer Institute*.
- Li, Zili, Senthilkumar Palaniyandi, Rongyu Zeng, Wenbin Tuo, Derry C Roopenian, and Xiaoping Zhu. 2011. "Transfer of IgG in the Female Genital Tract by MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor (FcRn) Confers Protective Immunity to Vaginal Infection." *PNAS* 108 (11): 4388–93.
- Liang, Jiaxin, Mengqian Chen, Daniel Hughes, Alexander A Chumanevich, Serena Alttila, Vimala Kaza, Chang-Uk Lim, et al. 2018. "CDK8 Selectively Promotes the Growth of Colon Cancer Metastases in the Liver by Regulating Gene Expression of TIMP3 and Matrix Metalloproteinases." *Cancer Research*, September. American Association for Cancer Research, canres.1583.2018.
- Lion, E., E.L.J.M. Smits, Z.N. Berneman, and V.F.I. Van Tendeloo. 2009. "Quantification of IFN- γ Produced by Human Purified NK Cells Following Tumor Cell Stimulation: Comparison of Three IFN- γ Assays." *Journal of Immunological Methods* 350 (1–2): 89–

- Liu, C C, B Perussia, and J D Young. 2000. "The Emerging Role of IL-15 in NK-Cell Development." *Immunology Today* 21 (3). Elsevier: 113–16.
- Liu, Liming, Ana Maria Garcia, Helen Santoro, Yixia Zhang, Kevin McDonnell, Jennifer Dumont, and Alan Bitonti. 2007. "Amelioration of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in Rats by Neonatal FcR Blockade." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (8): 5390–98.
- Liu, X., L. Ye, Y. Bai, H. Mojidi, N. E. Simister, and X. Zhu. 2008. "Activation of the JAK/STAT-1 Signaling Pathway by IFN- Can Down-Regulate Functional Expression of the MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG." *The Journal of Immunology* 181: 449–463.
- Liu, X., L. Ye, G. J. Christianson, J.-Q. Yang, D. C. Roopenian, and X. Zhu. 2007. "NF- κ B Signaling Regulates Functional Expression of the MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG via Intronic Binding Sequences." *The Journal of Immunology* 179 (5): 2999–3011.
- Liu, Xindong, Li Lu, Ziyang Yang, Senthilkumar Palaniyandi, Rongyu Zeng, Lian-Yong Gao, David M. Mosser, Derry C. Roopenian, and Xiaoping Zhu. 2011. "The Neonatal FcR-Mediated Presentation of Immune-Complexed Antigen Is Associated with Endosomal and Phagosomal PH and Antigen Stability in Macrophages and Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (8): 4674–86.
- Liu, Xindong, Lilin Ye, Yu Bai, Habi Mojidi, Neil E Simister, and Xiaoping Zhu. 2008. "Activation of the JAK/STAT-1 Signaling Pathway by IFN-Gamma Can down-Regulate Functional Expression of the MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (1): 449–63.
- Lobo, Evelyn D., Ryan J. Hansen, and Joseph P. Balthasar. 2004. "Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93 (11): 2645–68.
- Lodolce, J P, D L Boone, S Chai, R E Swain, T Dassopoulos, S Trettin, and A Ma. 1998. "IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation." *Immunity* 9 (5): 669–76.
- Luevano, Martha, Alejandro Madrigal, and Aurore Saudemont. 2012. "Transcription Factors Involved in the Regulation of Natural Killer Cell Development and Function: An Update." *Frontiers in Immunology* 3 (OCT): 1–6.
- Lusty, Evan, Sophie M. Poznanski, Karen Kwofie, Talveer S. Mandur, Dean A. Lee, Carl D. Richards, and Ali A. Ashkar. 2017. "IL-18/IL-15/IL-12 Synergy Induces Elevated and Prolonged IFN- γ Production by Ex Vivo Expanded NK Cells Which Is Not Due to Enhanced STAT4 Activation." 88 (August): 138–47.
- Lux, A., X. Yu, C. N. Scanlan, and F. Nimmerjahn. 2013. "Impact of Immune Complex Size and Glycosylation on IgG Binding to Human Fc Rs." *The Journal of Immunology* 190 (8): 4315–23.
- Mahmoud, Ismail S., Jade Louber, Steve K. Dower, Anne M. Verhagen, and Paul A. Gleeson. 2017. "Signal Dependent Transport of a Membrane Cargo from Early Endosomes to Recycling Endosomes." *European Journal of Cell Biology* 96 (5). Urban & Fischer: 418–31.
- Maidji, Ekaterina, Susan McDonagh, Olga Genbacev, Takako Tabata, and Lenore Pereira. 2006. "Maternal Antibodies Enhance or Prevent Cytomegalovirus Infection in the Placenta by Neonatal Fc Receptor-Mediated Transcytosis." *The American Journal of Pathology* 168 (4). American Society for Investigative Pathology: 1210–26.
- Malek, A, R Sager, P Kuhn, K H Nicolaides, and H Schneider. 1996. "Evolution of Maternofetal Transport of Immunoglobulins during Human Pregnancy." *American*

- Journal of Reproductive Immunology* (New York, N.Y. : 1989) 36 (5): 248–55.
- Mantovani, Alberto. 2014. “Macrophages, Neutrophils, and Cancer: A Double Edged Sword.” *New Journal of Science* 2014 (1): 1–14.
- Marçais, Antoine, Sébastien Viel, Morgan Grau, Thomas Henry, Jacqueline Marvel, and Thierry Walzer. 2013. “Regulation of Mouse NK Cell Development and Function by Cytokines.” *Frontiers in Immunology* 4 (DEC): 1–14.
- Marcus, Assaf, and David H Raulet. 2013. “Evidence for Natural Killer Cell Memory.” *Current Biology : CB* 23 (17): R817–20.
- Mayol, Katia, Vincent Biajoux, Jacqueline Marvel, Karl Balabanian, and Thierry Walzer. 2011. “Sequential Desensitization of CXCR4 and S1P5 Controls Natural Killer Cell Trafficking.” *Blood* 118 (18): 4863–71.
- Medesan, C, D Matesoi, C Radu, V Ghetie, and E S Ward. 1997. “Delineation of the Amino Acid Residues Involved in Transcytosis and Catabolism of Mouse IgG1.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 158 (5): 2211–17.
- Miaczynska, Marta, and Marino Zerial. 2002. “Mosaic Organization of the Endocytic Pathway.” *Experimental Cell Research* 272 (1): 8–14.
- Michel, Tatiana, François Hentges, and Jacques Zimmer. 2012. “Consequences of the Crosstalk between Monocytes/Macrophages and Natural Killer Cells.” *Frontiers in Immunology* 3 (JAN). Frontiers: 1–6.
- Mikulska, J E, L Pablo, J Canel, and N E Simister. 2000. “Cloning and Analysis of the Gene Encoding the Human Neonatal Fc Receptor.” *European Journal of Immunogenetics : Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* 27 (4): 231–40.
- Mikulska, J E, and N E Simister. 2000. “Analysis of the Promoter Region of the Human FcRn Gene.” *Biochim Biophys Acta* 1492 (1): 180–84.
- Mikulska, Joanna E. 2015. “Analysis of Response Elements Involved in the Regulation of the Human Neonatal FC Receptor Gene (FCGRT).” Edited by Sebastian D. Fugmann. *PLoS ONE* 10 (8). Public Library of Science: 1–28.
- Mizutani, Tatsuaki, Nina Neugebauer, Eva M Putz, Nadine Moritz, Olivia Simma, Eva Zebedin-Brandl, Dagmar Gotthardt, et al. 2012. “Conditional IFNAR1 Ablation Reveals Distinct Requirements of Type I IFN Signaling for NK Cell Maturation and Tumor Surveillance.” *Oncoimmunology* 1 (7): 1027–37.
- Moffett, Ashley, and Francesco Colucci. 2014. “Uterine NK Cells: Active Regulators at the Maternal-Fetal Interface.” *Journal of Clinical Investigation* 124 (5): 1872–79.
- Mojic, Marija, Kazuyoshi Takeda, and Yoshihiro Hayakawa. 2017. “The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- “Molecular Weight Marker Market Size | Industry Report, 2018-2025.” n.d. Accessed August 7, 2018. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/molecular-weight-marker-market>.
- Monnet, Céline, Sylvie Jorieux, Nathalie Souyris, Ouafa Zaki, Alexandra Jacquet, Nathalie Fournier, Fabien Crozet, et al. 2014. “Combined Glyco- and Protein-Fc Engineering Simultaneously Enhance Cytotoxicity and Half-Life of a Therapeutic Antibody.” *MAbs* 6 (2): 422–36.
- Monnet, Céline, Sylvie Jorieux, Rami Urbain, Nathalie Fournier, Khalil Bouayadi, Christophe De Romeuf, Christian K. Behrens, Alexandre Fontayne, and Philippe Mondon. 2015. “Selection of IgG Variants with Increased FcRn Binding Using Random and Directed Mutagenesis: Impact on Effector Functions.” *Frontiers in Immunology* 6 (February): 1–14. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00039/abstract>.
- Montoyo, Héctor Pérez, Carlos Vaccaro, Martin Hafner, Raimund J Ober, Werner Mueller,

- and E Sally Ward. 2009. "Conditional Deletion of the MHC Class I-Related Receptor FcRn Reveals the Sites of IgG Homeostasis in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (8): 2788–93.
- Morvan, M G, and L L Lanier. 2015. "NK Cells and Cancer: You Can Teach Innate Cells New Tricks." *Nat Rev Cancer* 16 (1). Nature Publishing Group: 7–19.
- Mosconi, E, A Rekima, B Seitz-Polski, A Kanda, S Fleury, E Tissandie, R Monteiro, et al. 2010. "Breast Milk Immune Complexes Are Potent Inducers of Oral Tolerance in Neonates and Prevent Asthma Development." *Mucosal Immunology* 3 (5): 461–74.
- Mould, Diane R, and Kevin R D Sweeney. 2007. "The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies--Mechanistic Modeling Applied to Drug Development." *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 10 (1): 84–96.
- Mrózek, E, P Anderson, and M A Caligiuri. 1996. "Role of Interleukin-15 in the Development of Human CD56+ Natural Killer Cells from CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells." *Blood* 87 (7): 2632–40.
- Müller, Dafne, Anette Karle, Bettina Meißburger, Ines Höfig, Roland Stork, and Roland E. Kontermann. 2007. "Improved Pharmacokinetics of Recombinant Bispecific Antibody Molecules by Fusion to Human Serum Albumin." *Journal of Biological Chemistry* 282 (17): 12650–60.
- Naranjo-Gomez, Mar, Jennifer Lambour, Marc Piechaczyk, and Mireia Pelegrin. 2018. "Neutrophils Are Essential for Induction of Vaccine-like Effects by Antiviral Monoclonal Antibody Immunotherapies." *JCI Insight* 3 (9). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97339>.
- Nausch, N, and A Cerwenka. 2008. "NKG2D Ligands in Tumor Immunity." *Oncogene* 27 (45): 5944–58.
- Newton, Estelle E, Zhen Wu, and Neil E Simister. 2005. "Characterization of Basolateral-Targeting Signals in the Neonatal Fc Receptor." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 11): 2461–69.
- Nimmerjahn, Falk, Pierre Bruhns, Ken Horiuchi, and Jeffrey V. Ravetch. 2005. "FcγRIV: A Novel FcR with Distinct IgG Subclass Specificity." *Immunity* 23 (1): 41–51.
- Nimmerjahn, Falk, and Jeffrey V. Ravetch. 2008. "Fcγ Receptors as Regulators of Immune Responses." *Nature Reviews Immunology*.
- . 2010. "FcγRs in Health and Disease." In , 105–25. Springer, Berlin, Heidelberg.
- O'Shannessy, Daniel J., Katie Bendas, Charles Schweizer, Wenquan Wang, Earl Albone, Elizabeth B. Somers, Susan Weil, et al. 2017. "Correlation of FCGRT Genomic Structure with Serum Immunoglobulin, Albumin and Farletuzumab Pharmacokinetics in Patients with First Relapsed Ovarian Cancer." *Genomics* 109 (3–4): 251–57.
- Ober, Raimund J., Caius G. Radu, Victor Ghetie, and E. Sally Ward. 2001. "Differences in Promiscuity for Antibody-FcRn Interactions across Species: Implications for Therapeutic Antibodies." *International Immunology* 13 (12): 1551–59.
- Ober, Raimund J, Cruz Martinez, Carlos Vaccaro, Jinchun Zhou, and E Sally Ward. 2004. "Visualizing the Site and Dynamics of IgG Salvage by the MHC Class I-Related Receptor, FcRn." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (4): 2021–29.
- Oganesyan, Vaheh, Melissa M. Damschroder, Kimberly E. Cook, Qing Li, Changshou Gao, Herren Wu, and William F. Dall'Acqua. 2014. "Structural Insights into Neonatal Fc Receptor-Based Recycling Mechanisms." *Journal of Biological Chemistry* 289 (11): 7812–24.
- Ogura, Keisuke, Marimo Sato-Matsushita, Seiji Yamamoto, Takashi Hori, Masakiyo Sasahara, Yoichiro Iwakura, Ikuo Saiki, Hideaki Tahara, and Yoshihiro Hayakawa. 2018. "NK Cells Control Tumor-Promoting Function of Neutrophils in Mice." *Cancer Immunology Research* 6 (3): 348–57.

- Orr, Mark T., and Lewis L. Lanier. 2010. "Natural Killer Cell Education and Tolerance." *Cell* 142 (6): Cell Press: 847–56.
- Overwijk, Willem W, and Nicholas P Restifo. 2001. *B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. Current Protocols in Immunology*.
- Pan, Hai, Kenneth Chen, Liping Chu, Francis Kinderman, Izydor Apostol, and Gang Huang. 2009. "Methionine Oxidation in Human IgG2 Fc Decreases Binding Affinities to Protein A and FcRn." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 18 (2): 424–33.
- Parekh, R. B., R. A. Dwek, B. J. Sutton, D. L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T. W. Rademacher, et al. 1985. "Association of Rheumatoid Arthritis and Primary Osteoarthritis with Changes in the Glycosylation Pattern of Total Serum IgG." *Nature* 316 (6027): 452–57.
- Passot, Christophe, Nicolas Azzopardi, Sylvaine Renault, Nadine Baroukh, Christophe Arnoult, Marc Ohresser, Michèle Boisdron-Celle, et al. 2013. "Influence of FCGRT Gene Polymorphisms on Pharmacokinetics of Therapeutic Antibodies." *MAbs* 5 (4): Taylor & Francis: 614–19.
- Paul, Sourav, Neeraja Kulkarni, Shilpi, and Girdhari Lal. 2016. "Intratumoral Natural Killer Cells Show Reduced Effector and Cytolytic Properties and Control the Differentiation of Effector Th1 Cells." *Oncoimmunology* 5 (12): Taylor & Francis: e1235106.
- Paveglione, S, L Puddington, E Rafti, and A P Matson. 2012. "FcRn-Mediated Intestinal Absorption of IgG Anti-IgE/IgE Immune Complexes in Mice." *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 42 (12): 1791–1800.
- Pegram, Hollie J, Daniel M Andrews, Mark J Smyth, Phillip K Darcy, and Michael H Kershaw. 2011. "Activating and Inhibitory Receptors of Natural Killer Cells." *Immunology and Cell Biology* 89 (2): 216–24.
- Peng, Hui, Xiaojun Jiang, Yonglin Chen, Dorothy K Sojka, Haiming Wei, Xiang Gao, Rui Sun, Wayne M Yokoyama, and Zhigang Tian. 2013. "Liver-Resident NK Cells Confer Adaptive Immunity in Skin-Contact Inflammation." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (4): 1444–56.
- Peng, Hui, and Zhigang Tian. 2017. "Natural Killer Cell Memory: Progress and Implications." *Frontiers in Immunology* 8: Frontiers Media SA: 1143.
- Perry, George H., Amir Ben-Dor, Anya Tsalenko, Nick Sampas, Laia Rodriguez-Revena, Charles W. Tran, Alicia Scheffer, et al. 2008. "The Fine-Scale and Complex Architecture of Human Copy-Number Variation." *American Journal of Human Genetics* 82 (3): 685–95.
- Peters, Theodore. 1996. *All About Albumin: Biochemistry, Genetic and Medical Applications. Academic Press*.
- Pincetic, Andrew, Stylianos Bournazos, David J DiLillo, Jad Maamary, Taia T Wang, Rony Dahan, Benjamin-Maximillian Fiebiger, and Jeffrey V Ravetch. 2014. "Type I and Type II Fc Receptors Regulate Innate and Adaptive Immunity." *Nature Immunology* 15 (8): 707–16.
- Poel, Cees E. Van Der, Roos A. Karssemeijer, Peter Boross, Joke A. Van Der Linden, Miranda Blokland, Jan G J Van De Winkel, and Jeanette H W Leusen. 2010. "Cytokine-Induced Immune Complex Binding to the High-Affinity IgG Receptor, FcγRI, in the Presence of Monomeric IgG." *Blood* 116 (24): 5327–33.
- Popov, Sergei, James G. Hubbard, Jin Kyoo Kim, Bertram Ober, Victor Ghetie, and E. Sally Ward. 1996. "The Stoichiometry and Affinity of the Interaction of Murine Fc Fragments with the MHC Class I-Related Receptor, FcRn." *Molecular Immunology* 33 (6): 521–30.
- Pouliot, Marie-Christine, Yvan Labrie, Caroline Diorio, and Francine Durocher. 2015. "The Role of Methylation in Breast Cancer Susceptibility and Treatment." *Anticancer*

- Research* 35 (9). International Institute of Anticancer Research: 4569–74.
- Powner, Michael B., Jenny A. G. McKenzie, Gregory J. Christianson, Derry C. Roopenian, and Marcus Fruttiger. 2014. “Expression of Neonatal Fc Receptor in the Eye.” 55 (3).
- Praetor, Asja, and Walter Hunziker. 2002. “Beta-2-Microglobulin Is Important for Cell Surface Expression and PH-Dependent IgG Binding of Human FcRn.” *J. Cell Sci.* 115 (11): 2389–97.
- Pyzik, Michal, Timo Rath, Wayne I. Lencer, Kristi Baker, Richard S. Blumberg, J Immunol, Michal Pyzik, et al. 2015. “FcRn: The Architect Behind the Immune and Nonimmune Functions of IgG and Albumin.” *The Journal of Immunology* 194 (10): 4595–4603.
- Qi, Wenjie, Xuechang Li, and Jingbo Kang. 2014. “Advances in the Study of Serum Tumor Markers of Lung Cancer.” *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10 Suppl (7). Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.: C95–101.
- Qiao, S.-W. Shuo-Wang S.-W., Kanna Kobayashi, F.-E. Finn-Eirik Johansen, Ludvig M. Sollid, Jan-Terje Terje Andersen, Edgar Milford, Derry C. Roopenian, Wayne I. Lencer, and Richard S. Blumberg. 2008. “Dependence of Antibody-Mediated Presentation of Antigen on FcRn.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (27): 9337–42.
- Raghavan, M, V R Bonagura, S L Morrison, and P J Bjorkman. 1995. “Analysis of the PH Dependence of the Neonatal Fc Receptor/Immunoglobulin G Interaction Using Antibody and Receptor Variants.” *Biochemistry* 34 (45): 14649–57.
- Raghavan, M, M Y Chen, L N Gastinel, and P J Bjorkman. 1994. “Investigation of the Interaction between the Class I MHC-Related Fc Receptor and Its Immunoglobulin G Ligand.” *Immunity* 1 (4): 303–15.
- Raghavan, Malini, and Pamela J. Bjorkman. 1996. “Fc RECEPTORS AND THEIR INTERACTIONS WITH IMMUNOGLOBULINS.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12 (1): 181–220.
- Raghavan, Malini, Louis N. Gastinel, and Pamela J. Bjorkman. 1993. “The Class I Major Histocompatibility Complex Related Fc Receptor Shows PH-Dependent Stability Differences Correlating with Immunoglobulin Binding and Release.” *Biochemistry* 32 (33): 8654–60.
- Ramirez-Montagut, Teresa, Mary Jo Turk, Jedd D Wolchok, José a Guevara-Patino, and Alan N Houghton. 2003. “Immunity to Melanoma: Unraveling the Relation of Tumor Immunity and Autoimmunity.” *Oncogene* 22 (20): 3180–87.
- Ramirez, Kevin, Katherine J. Chandler, Christina Spaulding, Sasan Zandi, Mikael Sigvardsson, Barbara J. Graves, and Barbara L. Kee. 2012. “Gene Deregulation and Chronic Activation in Natural Killer Cells Deficient in the Transcription Factor ETS1.” *Immunity* 36 (6): 921–32.
- Rath, Timo, Kristi Baker, Michal Pyzik, and Richard S. Blumberg. 2015. “Regulation of Immune Responses by the Neonatal Fc Receptor and Its Therapeutic Implications.” *Frontiers in Immunology* 5 (January): 22–29.
- Rath, Timo, Timothy T. Kuo, Kristi Baker, Shuo Wang Qiao, Kanna Kobayashi, Masaru Yoshida, Derry Roopenian, Edda Fiebiger, Wayne I. Lencer, and Richard S. Blumberg. 2013. “The Immunologic Functions of the Neonatal FC Receptor for IGG.” *Journal of Clinical Immunology*, 33 Suppl 1:S9-17.
- Ravetch, Jeffrey V., and Silvia Bolland. 2001. “IgG Fc Receptors.” *Annual Review of Immunology* 19 (1): 275–90.
- Reichert, Janice M. 2010. “Antibodies to Watch in 2010.” *MAbs* 2 (1): 84–100.
- Robbie, Gabriel J, Ryan Criste, William F Dall’acqua, Kathryn Jensen, Nita K Patel, Genevieve A Losonsky, and M Pamela Griffin. 2013. “A Novel Investigational Fc-Modified Humanized Monoclonal Antibody, Motavizumab-YTE, Has an Extended Half-Life in Healthy Adults.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (12): 6147–53.

- Roberts, D M, M Guenther, and R Rodewald. 1990. "Isolation and Characterization of the Fc Receptor from the Fetal Yolk Sac of the Rat." *The Journal of Cell Biology* 111 (5 Pt 1): 1867–76.
- Rodemer, C, and V Haucke. 2008. "Clathrin/AP-2-Dependent Endocytosis: A Novel Playground for the Pharmacological Toolbox?" *Handbook of Experimental Pharmacology*, no. 186: 105–22.
- Rodewald, Richard. 1976. "PH-Dependent Binding of Immunoglobulins to Intestinal Cells of the Neonatal Rat." *Journal of Cell Biology* 71 (2): 666–70.
- Roopenian, Derry C., and Shreeram Akilesh. 2007. "FcRn: The Neonatal Fc Receptor Comes of Age." *Nature Reviews Immunology* 7 (9): 715–25.
- Rousseaux, J., R. Rousseaux-Prévost, and H. Bazin. 1983. "Optimal Conditions for the Preparation of Fab and F(Ab')₂ fragments from Monoclonal IgG of Different Rat IgG Subclasses." *Journal of Immunological Methods* 64 (1–2): 141–46.
- Rouzaire, Paul, Katia Mayol, Sébastien Viel, Jacques Bienvenu, and Thierry Walzer. 2012. "Homéostasie Des Cellules Natural Killer." *Médecine/Sciences* 28 (4): 403–8.
- Sachs, Ulrich J H, Ines Socher, Christian G. Braeunlich, Hartmut Kroll, Gregor Bein, and Sentot Santoso. 2006. "A Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism Influences the Transcriptional Activity of the Neonatal Fc Receptor Alpha-Chain Promoter." *Immunology* 119 (1). Wiley-Blackwell: 83–89.
- Saji, F, Y Samejima, S Kamiura, and M Koyama. 1999. "Dynamics of Immunoglobulins at the Feto-Maternal Interface." *Reviews of Reproduction* 4 (2): 81–89.
- Sakagami, Masahiro, Yadollah Omid, Lee Campbell, Lana E. Kandalaft, Christopher J. Morris, Jaleh Barar, and Mark Gumbleton. 2006. "Expression and Transport Functionality of FcRn within Rat Alveolar Epithelium: A Study in Primary Cell Culture and in the Isolated Perfused Lung." *Pharmaceutical Research* 23 (2): 270–79.
- Sánchez, Luis M., David M. Penny, and Pamela J. Bjorkman. 1999. "Stoichiometry of the Interaction between the Major Histocompatibility- Complex-Related Fc Receptor and Its Fc Ligand." *Biochemistry* 38 (29): 9471–76.
- Santo, James P. Di, and Christian A. J. Vosshenrich. 2006. "Bone Marrow versus Thymic Pathways of Natural Killer Cell Development." *Immunological Reviews* 214 (1): 35–46.
- Sarav, M., Y. Wang, B. K. Hack, A. Chang, M. Jensen, L. Bao, and R. J. Quigg. 2009. "Renal FcRn Reclaims Albumin but Facilitates Elimination of IgG." *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (9): 1941–52.
- Saxena, R K, Q B Saxena, and W H Adler. 1984. "Interleukin-2-Induced Activation of Natural Killer Activity in Spleen Cells from Old and Young Mice." *Immunology* 51 (4). Wiley-Blackwell: 719–26.
- Sayed-Ahmed, Ahmed, Mohamed Kassab, Ahmed Abd-Elmaksoud, Mohamed Elnasharty, and Ahmed El-Kirdasy. 2010. "Expression and Immunohistochemical Localization of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) in the Mammary Glands of the Egyptian Water Buffalo." *Acta Histochemica* 112 (4): 383–91.
- Scapini, Patrizia, and Marco A Cassatella. 2014. "Social Networking of Human Neutrophils within the Immune System." *Blood* 124 (5). American Society of Hematology: 710–19.
- Scharton, T M, and P Scott. 1993. "Natural Killer Cells Are a Source of Interferon Gamma That Drives Differentiation of CD4+ T Cell Subsets and Induces Early Resistance to Leishmania Major in Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 178 (2). The Rockefeller University Press: 567–77.
- Schlachetzki, Felix, Chunni Zhu, and William M Pardridge. 2002. "Expression of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) at the Blood-Brain Barrier." *Journal of Neurochemistry* 81 (1): 203–6.
- Schlothauer, Tilman, Petra Rueger, Jan Olaf Stracke, Hubert Hertenberger, Felix Fingas,

- Lothar Kling, Thomas Emrich, et al. 2013. "Analytical FcRn Affinity Chromatography for Functional Characterization of Monoclonal Antibodies." *MAbs* 5 (4): 576–86.
- Schmidt, Michael M., Sharon A. Townson, Amy J. Andreucci, Bracken M. King, Emily B. Schirmer, Alec J. Murillo, Christian Dombrowski, et al. 2013. "Crystal Structure of an HSA/FcRn Complex Reveals Recycling by Competitive Mimicry of HSA Ligands at a PH-Dependent Hydrophobic Interface." *Structure* 21 (11). Elsevier Ltd: 1966–78.
- Schneider, Zita, Péter Károly Jani, Bence Szikora, Attila Végh, Dorottya Kövesdi, Attila Iliás, Judit Cervenak, Péter Balogh, István Kurucz, and Imre Kacs Kovics. 2015. "Overexpression of Bovine FcRn in Mice Enhances T-Dependent Immune Responses by Amplifying T Helper Cell Frequency and Germinal Center Enlargement in the Spleen." *Frontiers in Immunology* 6. Frontiers Media SA: 357.
- Schoch, Angela, Hubert Kettenberger, Olaf Mundigl, Gerhard Winter, Julia Engert, Julia Heinrich, and Thomas Emrich. 2015. "Charge-Mediated Influence of the Antibody Variable Domain on FcRn-Dependent Pharmacokinetics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (19): 5997–6002.
- Schroeder HW and Cavacini L. 1999. "Structure and Function of Immunoglobulins." *Sepsis* 3 (3). Elsevier Ltd: 197–218.
- Sebat, J., B Lakshmi, Jennifer Troge, Joan Alexander, Janet Young, Pär Lundin, Susanne Månér, et al. 2004. "Large-Scale Copy Number Polymorphism in the Human Genome." *Science* 305 (5683): 525–28.
- Sethi, Gautam, Muthu K Shanmugam, Lalitha Ramachandran, Alan Prem Kumar, and Vinay Tergaonkar. 2012. "Multifaceted Link between Cancer and Inflammation." *Bioscience Reports* 32 (1). Portland Press Limited: 1–15.
- Shah, Uzma, Bonny L Dickinson, Richard S Blumberg, Neil E Simister, Wayne I Lencer, and W Allan Walker. 2003. "Distribution of the IgG Fc Receptor, FcRn, in the Human Fetal Intestine." *Pediatric Research* 53 (2): 295–301.
- Sherman, Hilary, Hannah J. Gitschier, and Ann E. Rossi. 2018. "A Novel Three-Dimensional Immune Oncology Model for High-Throughput Testing of Tumoricidal Activity." *Frontiers in Immunology* 9. Frontiers Media SA.
- Shi, Fu-Dong, Hans-Gustaf Ljunggren, Antonio La Cava, and Luc Van Kaer. 2011. "Organ-Specific Features of Natural Killer Cells." *Nature Reviews Immunology* 11 (10): 658–71.
- Shields, Robert L., Jadine Lai, Rodney Keck, Lori Y. O'Connell, Kyu Hong, Y. Gloria Meng, Stefanie H.A. Weikert, and Leonard G. Presta. 2002. "Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcγRIII and Antibody-Dependent Cellular Toxicity." *Journal of Biological Chemistry* 277 (30): 26733–40.
- Simister, N E, A R Rees, Simister NE and Rees AR, N E Simister, A R Rees, Simister NE and Rees AR, N E Simister, et al. 1985. "Isolation and Characterization of an Fc Receptor from Neonatal Rat Intestine." *European Journal of Immunology* 15 (7): 733–38.
- Simister, N E, C M Story, H L Chen, and J S Hunt. 1996. "An IgG-Transporting Fc Receptor Expressed in the Syncytiotrophoblast of Human Placenta." *European Journal of Immunology* 26 (7): 1527–31.
- Simister NE and Ahouse JC. 1996. "The Structure and Evolution of FcRn." *Res Immunol* 13: 147(5), 333-7.
- Sleep, Darrell. 2015. "Albumin and Its Application in Drug Delivery." *Expert Opinion on Drug Delivery* 12 (5). Informa Healthcare: 793–812.
- Soderquest, Katrina, Nick Powell, Carmelo Luci, Nico van Rooijen, Andrés Hidalgo, Frederic Geissmann, Thierry Walzer, Graham M Lord, and Alfonso Martín-Fontecha. 2011. "Monocytes Control Natural Killer Cell Differentiation to Effector Phenotypes." *Blood* 117 (17). American Society of Hematology: 4511–18.

- Somsel Rodman, J, and A Wandinger-Ness. 2000. "Rab GTPases Coordinate Endocytosis." *Journal of Cell Science* 113 Pt 2 (January): 183–92.
- Sönnichsen, B, S De Renzis, E Nielsen, J Rietdorf, and M Zerial. 2000. "Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." *The Journal of Cell Biology* 149 (4): 901–14.
- Spiegelberg, H L, and B G Fishkin. 1972. "The Catabolism of Human G Immunoglobulins of Different Heavy Chain Subclasses. 3. The Catabolism of Heavy Chain Disease Proteins and of Fc Fragments of Myeloma Proteins." *Clinical and Experimental Immunology* 10 (4): 599–607.
- Spiekermann, Gerburg M., Patricia W. Finn, E. Sally Ward, Jennifer Dumont, Bonny L. Dickinson, Richard S. Blumberg, and Wayne I. Lencer. 2002. "Receptor-Mediated Immunoglobulin G Transport Across Mucosal Barriers in Adult Life." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (3): 303–10.
- Spörri, Roman, Nicole Joller, Hubert Hilbi, and Annette Oxenius. 2008. "A Novel Role for Neutrophils as Critical Activators of NK Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10). American Association of Immunologists: 7121–30.
- Stabile, Helena, Cinzia Fionda, Angela Gismondi, and Angela Santoni. 2017. "Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response." *Frontiers in Immunology* 8 (MAR): 1–8.
- Stabile, Helena, Cinzia Fionda, Angela Santoni, and Angela Gismondi. 2018. "Impact of Bone Marrow-Derived Signals on NK Cell Development and Functional Maturation." *Cytokine & Growth Factor Reviews*, March. Pergamon.
- Stapleton, Nigel M., Helga K. Einarsdóttir, Annette M. Stemmerding, and Gestur Vidarsson. 2015. *The Multiple Facets of FcRn in Immunity. Immunological Reviews*. Vol. 268.
- Story, Craig M, Joanna E Mikulska, and Neil E Simister. 1994. "A Major Histocompatibility Complex Class I-like Fc Receptor Cloned from Human Placenta: Possible Role in Transfer of Immunoglobulin G from Mother to Fetus." *J Exp Med* 180 (December): 2377–81.
- Subedi, Ganesh P., and Adam W. Barb. 2015. "The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions." *Structure* 23 (9): 1573–83.
- Suleiman, Y Ben, M Yoshida, S Nishiumi, H Tanaka, T Mimura, K Nobutani, K Yamamoto, et al. 2012. "Neonatal Fc Receptor for IgG (FcRn) Expressed in the Gastric Epithelium Regulates Bacterial Infection in Mice." *Mucosal Immunology* 5 (1): 87–98.
- Sun, Joseph C. 2015. "Transcriptional Control of NK Cells." In , 1–36. Springer, Cham.
- Sun, Joseph C, and Lewis L Lanier. 2011. "NK Cell Development, Homeostasis and Function: Parallels with CD8⁺ T Cells." *Nature Reviews. Immunology* 11 (10). Nature Publishing Group: 645–57.
- Sungur, Can M, and William J Murphy. 2014. "Positive and Negative Regulation by NK Cells in Cancer." *Critical Reviews in Oncogenesis* 19 (1–2): 57–66.
- Swann, Jeremy B, Yoshihiro Hayakawa, Nadeen Zerafa, Kathleen C F Sheehan, Bernadette Scott, Robert D Schreiber, Paul Hertzog, and Mark J Smyth. 2007. "Type I IFN Contributes to NK Cell Homeostasis, Activation, and Antitumor Function." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (12): 7540–49.
- Swiercz, Rafal, Min Mo, Priyanka Khare, Zita Schneider, Raimund J Ober, and E Sally Ward. 2016. "Loss of Expression of the Recycling Receptor , FcRn , Promotes Tumor Cell Growth by Increasing Albumin Consumption." *Oncotarget* 8 (2): 3528–41.
- Takeda, Kazuyoshi, Erika Cretney, Yoshihiro Hayakawa, Tsuyoshi Ota, Hisaya Akiba, Kouetsu Ogasawara, Hideo Yagita, Katsuyuki Kinoshita, Ko Okumura, and Mark J Smyth. 2005. "TRAIL Identifies Immature Natural Killer Cells in Newborn Mice and Adult Mouse Liver." *Blood* 105 (5). American Society of Hematology: 2082–89.

- Takizawa, Toshihiro, Clark L Anderson, and John M Robinson. 2005. "A Novel Fc Gamma R-Defined, IgG-Containing Organelle in Placental Endothelium." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (4): 2331–39.
- Tao, M H, and S L Morrison. 1989. "Studies of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role of Carbohydrate in the Structure and Effector Functions Mediated by the Human IgG Constant Region." *J Immunol* 143 (8): 2595–2601.
- Ternant, David, Christophe Arnoult, Martine Pugnière, Christine Dhommée, Daniel Drocourt, Eric Perouzel, Christophe Passot, et al. 2016. "IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196 (2): 607–13.
- Ternant, David, and Gilles Paintaud. 2005. "Pharmacokinetics and Concentration–effect Relationships of Therapeutic Monoclonal Antibodies and Fusion Proteins." *Expert Opinion on Biological Therapy* 5 (sup1): S37–47. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.5.1.S37>.
- Tesar, Devin B, and Pamela J Björkman. 2010. "An Intracellular Traffic Jam: Fc Receptor-Mediated Transport of Immunoglobulin G." *Current Opinion in Structural Biology* 20 (2): 226–33.
- Toyooka, Shinichi, Keitaro Matsuo, and Adi F Gazdar. 2008. "DNA Methylation in Lung Cancer." *N Engl J Med* 358 (23). Massachusetts Medical Society: 2513; author reply 2514.
- Traub, Linton M. 2009. "Tickets to Ride: Selecting Cargo for Clathrin-Regulated Internalization." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (9): 583–96.
- Tsirigotis, Panagiotis D., Igor B. Resnick, and Michael Y. Shapira. 2012. "The Role of Natural Killer Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Annals of Medicine* 44 (2): 130–45.
- Tu, Megan M., Ahmad Bakur Mahmoud, and Andrew P. Makrigiannis. 2016. "Licensed and Unlicensed NK Cells: Differential Roles in Cancer and Viral Control." *Frontiers in Immunology* 7 (May). Frontiers: 166.
- Tzaban, Salit, Ramiro H Massol, Elizabeth Yen, Wendy Hamman, Scott R Frank, Lynne A Lapierre, Steen H Hansen, James R Goldenring, Richard S Blumberg, and Wayne I Lencer. 2009. "The Recycling and Transcytotic Pathways for IgG Transport by FcRn Are Distinct and Display an Inherent Polarity." *The Journal of Cell Biology* 185 (4): 673–84.
- Uno, Yasuhiro, Masahiro Utoh, and Kazuhide Iwasaki. 2014. "Polymorphisms of Neonatal Fc Receptor in Cynomolgus and Rhesus Macaques." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 29 (5): 427–30.
- Uribe-Querol, Eileen, and Carlos Rosales. 2015. "Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin." *Journal of Immunology Research* 2015.
- Vaccaro, Carlos, Jinchun Zhou, Raimund J Ober, and E Sally Ward. 2005. "Engineering the Fc Region of Immunoglobulin G to Modulate in Vivo Antibody Levels." *Nature Biotechnology* 23 (10): 1283–88.
- Vahlne, G., S. Becker, P. Brodin, and M. H. Johansson. 2008. "IFN-Gamma Production and Degranulation Are Differentially Regulated in Response to Stimulation in Murine Natural Killer Cells." *Scandinavian Journal of Immunology* 67 (1): 1–11.
- van, Bilsen K, P M van Hagen, J Bastiaans, J C van Meurs, T Missotten, R W Kuijpers, H Hooijkaas, G M Dingjan, G S Baarsma, and W A Dik. 2011. "The Neonatal Fc Receptor Is Expressed by Human Retinal Pigment Epithelial Cells and Is Downregulated by Tumour Necrosis Factor-Alpha." *Br.J.Ophthalmol.* 95 (6): 864–68.
- Vaughn, Daniel E, and Pamela J Bjorkman. 1998. "Structural Basis of PH-Dependent Antibody Binding by the Neonatal Fc Receptor." *Structure (London, England : 1993)* 6:

- Végh, Attila, Anita Farkas, Dorottya Kövesdi, Krisztián Papp, Judit Cervenak, Zita Schneider, Balázs Bender, et al. 2012. “FcRn Overexpression in Transgenic Mice Results in Augmented APC Activity and Robust Immune Response with Increased Diversity of Induced Antibodies.” Edited by Mauricio Martins Rodrigues. *PLoS One* 7 (4): e36286.
- Verhasselt, Valérie, Valérie Milcent, Julie Cazareth, Akira Kanda, Sébastien Fleury, David Dombrowicz, Nicolas Glaichenhaus, and Valérie Julia. 2008. “Breast Milk-mediated Transfer of an Antigen Induces Tolerance and Protection from Allergic Asthma.” *Nature Medicine* 14 (2): 170–75.
- Vidarsson, G, W L van Der Pol, J M van Den Elsen, H Vilé, M Jansen, J Duijs, H C Morton, et al. 2001. “Activity of Human IgG and IgA Subclasses in Immune Defense against *Neisseria Meningitidis* Serogroup B.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (10): 6250–56.
- Vidarsson, Gestur, Annette M. Stemerding, Nigel M. Stapleton, Suzanne E. Spliethoff, Hans Janssen, Frank E. Rebers, Masja de Haas, and Jan G. Van De Winkel. 2006. “FcRn: An IgG Receptor on Phagocytes with a Novel Role in Phagocytosis.” *Blood* 108 (10): 3573–79.
- Vieira, Paulo, and Klaus Rajewsky. 1988. “The Half-lives of Serum Immunoglobulins in Adult Mice.” *European Journal of Immunology* 18 (2): 313–16.
- Villard, Jean. 2011. “The Role of Natural Killer Cells in Human Solid Organ and Tissue Transplantation.” *Journal of Innate Immunity* 3 (4): 395–402.
- Vivier, Eric, Elena Tomasello, Myriam Baratin, Thierry Walzer, and Sophie Ugolini. 2008. “Functions of Natural Killer Cells.” *Nat Immunol* 9 (5): 503–10.
- Vivier, Eric, and Sophie Ugolini. 2010. “NK Cells: Receptors and Functions.” *Nature* 462 (7284): 207–15.
- Waldhauer, I, and A Steinle. 2008. “NK Cells and Cancer Immunosurveillance.” *Oncogene* 27 (45): 5932–43.
- Waldmann TA and Strober W. 1969. “Metabolism of Immunoglobulins.” *Prog Allergy*. 58 (1): 13, 1–110.
- Walzer, Thierry, Laura Chiossone, Julie Chaix, Andrew Calver, Claude Carozzo, Laure Garrigue-Antar, Yannick Jacques, Myriam Baratin, Elena Tomasello, and Eric Vivier. 2007. “Natural Killer Cell Trafficking in Vivo Requires a Dedicated Sphingosine 1-Phosphate Receptor” 8 (12).
- Walzer, Thierry, Marc Dalod, Scott H Robbins, Laurence Zitvogel, and Eric Vivier. 2005. “Natural-Killer Cells and Dendritic Cells: ‘L’union Fait La Force’.” *Blood* 106 (7): 2252–58.
- Wang, Weirong, Ping Lu, Yulin Fang, Lora Hamuro, Tamara Pittman, Brian Carr, Jerome Hochman, and Thomayant Prueksaritanont. 2011. “Monoclonal Antibodies with Identical Fc Sequences Can Bind to FcRn Differentially with Pharmacokinetic Consequences.” *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 39 (9): 1469–77.
- Wang, Weirong, Josef Vlasak, Yunsong Li, Pavlo Pristatsky, Yulin Fang, Tamara Pittman, Jeanette Roman, Yang Wang, Thomayant Prueksaritanont, and Roxana Ionescu. 2011. “Impact of Methionine Oxidation in Human IgG1 Fc on Serum Half-Life of Monoclonal Antibodies.” *Molecular Immunology* 48 (6–7): 860–66.
- Ward, E. Sally, and Raimund J. Ober. 2009. *Chapter 4 Multitasking by Exploitation of Intracellular Transport Functions. The Many Faces of FcRn. Advances in Immunology*. Vol. 103. Academic Press.
- Ward, E. Sally, Ramraj Velmurugan, and Raimund J. Ober. 2014. “Targeting FcRn for Therapy: From Live Cell Imaging to in Vivo Studies in Mice.” *Immunology Letters* 160 (1–2): 1–10.

- (2). Elsevier B.V.: 158–62.
- Ward, E Sally, Cruz Martinez, Carlos Vaccaro, Jinchun Zhou, Qing Tang, and Raimund J Ober. 2005. “From Sorting Endosomes to Exocytosis: Association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc Receptor, FcRn, during Recycling.” *Molecular Biology of the Cell* 16 (4). American Society for Cell Biology: 2028–38.
- Weissman, D N, A F Hubbs, S H Huang, C F Stanley, Y Rojanasakul, and J K Ma. 2001. “IgG Subclass Responses in Experimental Silicosis.” *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 20 Suppl 1: 67–74.
- Wernick, Naomi L B, Volker Haucke, and Neil E Simister. 2005. “Recognition of the Tryptophan-Based Endocytosis Signal in the Neonatal Fc Receptor by the Mu Subunit of Adaptor Protein-2.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (8). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 7309–16.
- West, a.P., and P.J. Bjorkman. 2000. “Crystal Structure and Immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor.” *Biochemistry* 39: 9698–9708.
- Wiemann, Katrin, Hans-Willi Mittrücker, Ute Feger, Stefan A Welte, Wayne M Yokoyama, Thomas Spies, Hans-Georg Rammensee, and Alexander Steinle. 2005. “Systemic NKG2D Down-Regulation Impairs NK and CD8 T Cell Responses in Vivo.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (2): 720–29.
- Williams, A F, and A N Barclay. 1988. “The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition.” *Annual Review of Immunology* 6 (1): 381–405.
- Wong, Kendy K, J Ronald, Nirpjit S Dosanjh, Lindsey R Kimm, Ze Cheng, Douglas E Horsman, Calum Macaulay, et al. 2007. “Comprehensive Analysis of Common Copy-Number Variations in the Human Genome.” *Am J Hum Genet* 80 (January): 91–104.
- Wu, Zhen, and Neil E. Simister. 2001. “Tryptophan- and Dileucine-Based Endocytosis Signals in the Neonatal Fc Receptor.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (7): 5240–47.
- Ye, Lilin, Rongyu Zeng, Yu Bai, Derry C Roopenian, and Xiaoping Zhu. 2011. “Efficient Mucosal Vaccination Mediated by the Neonatal Fc Receptor.” *Nature Biotechnology* 29 (2): 158–63.
- Yeung, Yik Andy, Maya K Leabman, Jonathan S Marvin, Julia Qiu, Camellia W Adams, Samantha Lien, Melissa A Starovasnik, and Henry B Lowman. 2009. “Engineering Human IgG1 Affinity to Human Neonatal Fc Receptor: Impact of Affinity Improvement on Pharmacokinetics in Primates.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (12): 7663–71.
- Yoshida, Masaru, Kanna Kobayashi, Timothy T. Kuo, Lynn Bry, Jonathan N. Glickman, Steven M. Claypool, Arthur Kaser, et al. 2006. “Neonatal Fc Receptor for IgG Regulates Mucosal Immune Responses to Luminal Bacteria.” *Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2142–51.
- Yoshida, Masaru, Atsuhiko Masuda, Timothy T. Kuo, Kanna Kobayashi, Steven M. Claypool, Tetsuya Takagawa, Hiromu Kutsumi, Takeshi Azuma, Wayne I. Lencer, and Richard S. Blumberg. 2006. “IgG Transport across Mucosal Barriers by Neonatal Fc Receptor for IgG and Mucosal Immunity.” *Springer Seminars in Immunopathology* 28 (4): 397–403.
- Yu, H, T A Fehniger, P Fuchshuber, K S Thiel, E Vivier, W E Carson, and M A Caligiuri. 1998. “Flt3 Ligand Promotes the Generation of a Distinct CD34(+) Human Natural Killer Cell Progenitor That Responds to Interleukin-15.” *Blood* 92 (10): 3647–57.
- Yu, Jianhua, Aharon G. Freud, and Michael A. Caligiuri. 2013. “Location and Cellular Stages of Natural Killer Cell Development.” *Trends in Immunology* 34 (12): 573–82.
- Yu, Xiaojie, Snezana Vasiljevic, Daniel A. Mitchell, Max Crispin, and Christopher N. Scanlan. 2013. “Dissecting the Molecular Mechanism of IVIg Therapy: The Interaction

- between Serum IgG and DC-SIGN Is Independent of Antibody Glycoform or Fc Domain.” *Journal of Molecular Biology* 425 (8): 1253–58.
- Yu, Zhiya, and Vanda A. Lennon. 1999. “Mechanism of Intravenous Immune Globulin Therapy in Antibody-Mediated Autoimmune Diseases.” *New England Journal of Medicine* 340 (3): 227–28.
- Zeng, Z. H., A. R. Castaño, B. W. Segelke, E. A. Stura, P. A. Peterson, and I. A. Wilson. 1997. “Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove.” *Science* 277 (5324): 339–45.
- Zhou, Jinchun, James E Johnson, Victor Ghetie, Raimund J Ober, and E Sally Ward. 2003. “Generation of Mutated Variants of the Human Form of the MHC Class I-Related Receptor, FcRn, with Increased Affinity for Mouse Immunoglobulin G.” *Journal of Molecular Biology* 332 (4): 901–13.
- Zhou, X-J, L Yu, L Zhu, P Hou, J-C Lv, F Yu, and H Zhang. 2009. “Association between Polymorphisms in the FCGRT Gene and Lupus Nephritis in Chinese Patients.” *Clinical and Experimental Rheumatology* 27 (4): 609–14.
- Zhu, Jiangao, Xiaopei Huang, and Yiping Yang. 2010. “NKG2D Is Required for NK Cell Activation and Function in Response to E1-Deleted Adenovirus.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (12). NIH Public Access: 7480–86.
- Zhu, X, G Meng, B L Dickinson, X Li, E Mizoguchi, L Miao, Y Wang, et al. 2001. “MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages, and Dendritic Cells.” *J Immunol* 166 (5): 3266–76.
- Zhu, Xiaoping, Junmin Peng, Raktima Raychowdhury, Atsushi Nakajima, Wayne I Lencer, Richard S Blumberg, and Blumberg Richard S . Zhu Xiaoping, Junmin Peng, Raktima Raychowdhury, Atsushi Nakajima, Wayne I Lencer, et al. 2002. “The Heavy Chain of Neonatal Fc Receptor for IgG Is Sequestered in Endoplasmic Reticulum by Forming Oligomers in the Absence of B2-Microglobulin Association.” *Biochemical Journal* 367 (3): 703–14.
- Zijlstra, M, M Bix, N E Simister, J M Loring, D H Raulet, and R Jaenisch. 1990. “Beta 2-Microglobulin Deficient Mice Lack CD4-8+ Cytolytic T Cells.” *Nature*.

Annexe 1 :

Article 3 : Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF- α Antibodies after a Single Injection in Mice

Christophe Arnoult, Guillaume Brachet, **Diana Cadena Castaneda**, Nicolas Azzopardi, Christophe Passot, Celine Desvignes, Gilles Paintaud, Nathalie Heuzé-Vourc'h, Hervé Watier, and Valérie Gouilleux-Gruart. *The Journal of Immunology*, 2017.



ARE YOU A
**SCIENTIFIC
REBEL?**



Unleash your true potential
with the new **CytoFLEX LX**
Flow Cytometer

DARE TO EXPLORE






Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF- α Antibodies after a Single Injection in Mice

This information is current as of June 5, 2017.

Christophe Arnoult, Guillaume Brachet, Diana Cadena Castaneda, Nicolas Azzopardi, Christophe Passot, Celine Desvignes, Gilles Paintaud, Nathalie Heuzé-Vourc'h, Hervé Watier and Valérie Gouilleux-Gruart

J Immunol published online 5 June 2017
<http://www.jimmunol.org/content/early/2017/06/02/jimmunol.1601246>

-
- Subscription** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscription>
- Permissions** Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/alerts>



Crucial Role for Immune Complexes but Not FcRn in Immunization against Anti-TNF- α Antibodies after a Single Injection in Mice

Christophe Arnoult,* Guillaume Brachet,*[†] Diana Cadena Castaneda,* Nicolas Azzopardi,*
Christophe Passot,*[‡] Celine Desvignes,[‡] Gilles Paintaud,*[‡] Nathalie Heuzé-Vourc'h,[§]
Hervé Watier,*[†] and Valérie Gouilleux-Gruart*[†]

The immunogenicity of infliximab and adalimumab is a major concern because patients may develop Abs also called antidrug Abs (ADA), directed against these anti-TNF- α Abs after just a few weeks of treatment. These ADAs can lead to a decrease in biologic concentration, which is associated with lower treatment efficacy. Our aim was to study the involvement of immune complexes and neonatal Fc receptor (FcRn) in the emergence of ADAs in the case of anti-TNF- α Abs. Wild type and FcRn knockout mice were injected once with either infliximab or adalimumab, alone or preincubated with TNF- α . Adalimumab cross-reacts with murine TNF- α whereas infliximab is species specific. When injected alone, only adalimumab elicited a humoral response. By performing immune complexes with TNF- α , an anti-infliximab response was elicited. Surprisingly, both wild type and FcRn knockout mice were able to mount an immune response against anti-TNF- α Abs, suggesting that immune complexes are a major determinant of this immunization. *The Journal of Immunology*, 2017, 199: 000–000.

Anti-TNF- α Abs are widely used; some are even blockbuster biopharmaceuticals. Like adalimumab and infliximab, anti-TNF- α Abs are indicated in severe rheumatoid arthritis, in first-line treatment, or in mild cases when disease-modifying antirheumatic drugs or methotrexate alone have failed to control disease progression (1, 2). Yet immunization issues leading to interindividual variability tarnish their success, frequently forcing clinicians to switch to another treatment line.

The immunogenicity of infliximab and adalimumab is a major concern, because at least 14% and up to a third of the patients develop Abs also called antidrug Abs (ADA), directed against these anti-TNF- α Abs after just a few weeks of treatment (3, 4). These ADAs can lead to adverse effects during infusion or to a

decrease in biologic concentration, which was associated with lower treatment efficacy (4).

Many factors have been suspected to be involved in the immunization against therapeutic Abs. Even though some have been refuted, like the degree of Ab humanization (5), or discussed, such as IgG allotypes (6–8), several other factors have been shown to be involved, like the dosing and administration schedule, underexposure to the anti-TNF- α drug (9), coadministration of other drugs (10), and formation of aggregates (11). Complexes can be formed between several molecules of the therapeutic Ab (aggregates) or with its target Ag as in classical immune complexes (ICs) to constitute target-related ICs (TRICs) (12). It has been shown that mAbs are immunogenic in vivo when they form TRICs (13). This phenomenon can be understood in the light of the recent literature concerning IC presentation by immune cells via the neonatal Fc receptor (FcRn) and with the work of Foss et al. (14), who recently demonstrated that TRICs are more efficiently transcytosed than monomeric mAb via FcRn. These mechanisms bring into play the well-described functions of FcRn, extension of IgG half-life, IgG biodistribution, and involvement in humoral and antitumoral immune response through IC presentation by immune cells (15, 16).

The present work focuses on the ability of TRICs to trigger a primary immune response (i.e., after a single injection) against anti-TNF- α Abs in the presence or absence of FcRn. To investigate this, anti-TNF- α Abs were administered to wild type and FcRn knockout (KO) mice and the formation of ADA was measured. The first Ab, infliximab, specifically recognizes human TNF- α (hTNF- α) whereas the other, adalimumab, cross-reacts with mouse TNF- α (mTNF- α), allowing for the evaluation of the role of TRICs and FcRn in ADA formation.

Materials and Methods

Abs

The following mAbs were used: infliximab and golimumab (anti-TNF- α IgG1; MSD), adalimumab (anti-TNF- α IgG1; Abbvie), and rituximab (anti-CD20 IgG1; Roche).

*Université François Rabelais de Tours, CNRS, UMR 7292, F-37032 Tours, France; [†]Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, F-37032 Tours, France; [‡]Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, F-37032 Tours, France; and [§]Université François Rabelais de Tours, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, INSERM, UMR 1100, F-37032 Tours, France

ORCIDs: 0000-0003-3255-5214 (C.A.); 0000-0002-5256-1868 (G.B.); 0000-0002-2713-7192 (D.C.C.); 0000-0003-1915-9065 (N.A.); 0000-0003-0158-1356 (G.P.); 0000-0002-2139-4171 (H.W.).

Received for publication July 19, 2016. Accepted for publication May 6, 2017.

This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency as part of the Investissements d'Avenir program (reference: ANR-10-LABX-53-01) and by European funds (Fonds Européen de Développement Régional Grant Agreement Presage 4940-37478; Outils Expression et Fonctions du FcRn). Measurement of infliximab serum concentrations was carried out within the Centre Pilote de suivi Biologique des traitements par Anticorps platform. Centre Pilote de suivi Biologique des traitements par Anticorps is cofinanced by the European Union. Europe is committed to the Region Centre with the European Regional Development Fund.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Valérie Gouilleux-Gruart, Université François Rabelais de Tours, CNRS UMR 7292, 10 boulevard Tonnellé, BP3223, 37032 Tours, Cedex 1, France. E-mail address: valerie.gouilleux@univ-tours.fr

Abbreviations used in this article: ADA, antidrug Ab; FcRn, neonatal Fc receptor; hTNF- α , human TNF- α ; IC, immune complex; KO, knockout; mTNF- α , mouse TNF- α ; TRIC, target-related IC; WT, wild type.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$30.00

Administration of anti-TNF- α mAb in wild-type and FcRn KO mice

Six- to eight-week old C57BL/6 wild-type (WT) mice were obtained from Janvier (Saint-Berthevin, France). The B6.129 $\times$ 1-Fcgrt^{tm1} Dcr/DcrJ (*fcgrt*^{-/-}) mice were generated by the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). A targeting vector was designed to replace 1588 nucleotide fragments (encoding promoter sequence 5' of the transcriptional start site, exon 1, intron 2, and most of exon 2) with a PGK-Neor cassette. The vector was electroporated into 129 $\times$ 1/SvJ-derived ESV/J-1182 embryonic stem cells. Correctly targeted embryonic stem cells were injected into recipient C57BL/6J blastocysts. The resulting chimeric animals were crossed to C57BL/6J mice. The mice were then backcrossed to C57BL/6J for 11 generations. All experiments were performed in accordance with national animal care guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree number 87-848), and were approved by the Val-de-Loire Animal Experiments Committee of Ethics (approval number 2012-04-09). Body weight was monitored throughout the study as an indicator of health status. After 1 wk of adaptation period in the same room, WT and FcRn KO mice were anesthetized with isoflurane 2.5% and intravenously injected by a retro-orbital route, with a single dose of 4 mg/kg adalimumab or infliximab. Blood samples were collected at 2 and 6 h, and on days 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, and 21 after adalimumab or infliximab injection. Blood samples were centrifuged at 1500 $\times$ g for 15 min, and sera were stored at -20°C until measurement of infliximab, adalimumab, or ADA levels.

Injection of hTNF- α /anti-TNF- α mAb immune complexes in WT and FcRn KO mice

ICs were generated in vitro by mixing anti-TNF- α Ab and hTNF- α (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), respectively in a 1:2 molar ratio, and left for 1 h at room temperature. The final concentrations in PBS were 500 μ g/ml for anti-TNF- α Ab and 116 μ g/ml for hTNF- α . Next, 200 μ l were intravenously injected by a retro-orbital route. Blood samples were collected before mAb injection, and on days 5, 7, 10, and 21 for infliximab and adalimumab, or on days 3, 10, and 20 for golimumab.

Pharmacokinetic analysis

The serum concentrations of infliximab and adalimumab were measured using validated ELISA techniques (17, 18). Briefly, recombinant hTNF- α was coated on the solid phase and recognized by infliximab or adalimumab, and the therapeutic Ab was detected by an anti-human IgG Fc γ -specific Ab conjugated to HRP.

ADA and TNF- α ELISA

Briefly, 96-well flat-bottom plates were coated with 1 μ g per well of adalimumab, infliximab, or golimumab in 0.1 M NaCO₃/NaHCO₃ buffer (pH 9.6) in the case of ADA ELISA, or with 200 ng per well of human or murine TNF- α (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France) in TNF- α ELISA. The plates were incubated for 12 h at 4°C. Washing steps were performed with PBS, 0.1% tween 20, plus 5% casein in the blocking step or in mAb dilutions. Serum dilutions (1:100 unless otherwise specified) were incubated at room temperature for 1 h. Specific binding was detected by using either peroxidase-labeled donkey anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Laboratory) for 1 h at room temperature in ADA ELISA, peroxidase-labeled goat anti-human IgG (H+L), peroxidase-labeled anti-IgG Ab (anti-Fc; Jackson Laboratory) or with a peroxidase-labeled anti-IgM Ab (anti-Fc; Jackson Laboratory). The reaction was developed by adding 100 μ l of tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) for 20 min and stopped with 50 μ l H₂SO₄ 0.5 M. Absorbance was measured at 450 nm with a Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Thoiry, France).

Flow cytometry analysis

Mice spleens were analyzed 2 or 6 d after Ab injection. Single-cell suspensions were isolated with Spleen Dissociation Kits (Miltenyi Biotec, Paris, France). Total leukocyte cell counts were performed and 1×10^6 cells were analyzed by flow cytometry. Fc γ R were first saturated by cell incubation with an anti-Fc γ RII/Fc γ RIII mAb (2.4G2; BD Pharmingen, San Diego, CA) for 20 min. Then cells were incubated with fluorochrome-conjugated specific Abs, in PBS containing 2% SVF and 0.1% sodium azide at 4°C for 60 min. Cells were analyzed using a FACS Gallios equipped with Kaluza software (Beckman Coulter, Villepinte, France). Anti-mouse CD3-FITC, Ly-6c PE-CF594, CD11c PerCP-Cy5.5, CD45R/B220 PE-Cy7, CD11b APC-Cy7, and corresponding control isotypes were purchased from BD Pharmingen.

Statistical analysis

Flow cytometry and ELISA data are expressed as mean and SD of independent experiments. The Mann-Whitney *U* test was used to determine significant differences unless otherwise specified. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. The α risk was set at 5%. The level of significance is indicated on the figures as **p* $\leq$ 0.05, ***p* $\leq$ 0.01, and ****p* $\leq$ 0.001.

Results

Adalimumab and infliximab have different elimination profiles in WT mice

To measure the relation between anti-TNF- α mAb concentrations and the formation of ADA, adalimumab and infliximab concentrations were monitored for 21 d in the serum of WT and KO mice after a single 4 mg/kg mAb injection (Fig. 1). As expected, serum concentrations of both mAbs were undetectable after 7 d in FcRn KO mice. An acceleration of mAb elimination, with a nonlinear decrease, was observed especially for adalimumab in WT mice, suggesting the formation of ADA.

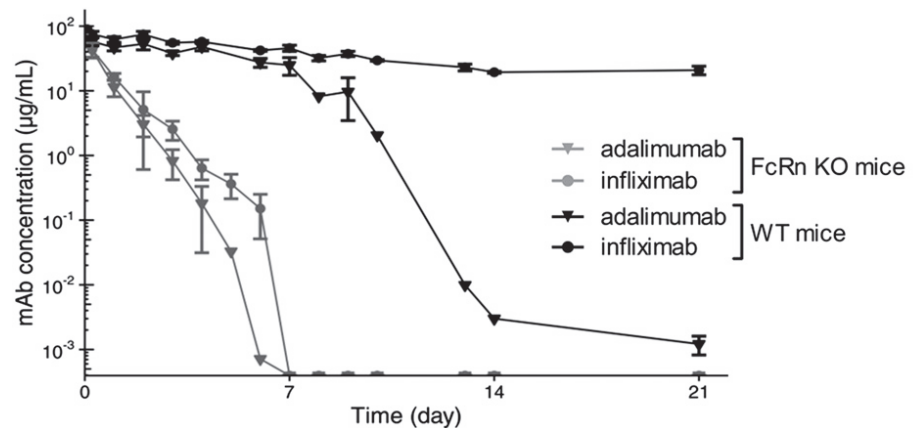
ADA follow-up formation reveals immunization against adalimumab but not infliximab in both WT and FcRn KO mice

ADA formation against adalimumab or infliximab was monitored in both WT and FcRn KO mice after a single mAb injection. The results, presented in Fig. 2, show that ADA are detected earlier in FcRn KO than in WT mice after adalimumab injection (day 4 and day 6 respectively). Even though ADAs occurred earlier in FcRn KO mice, the titers obtained in WT mice seem to be higher (Fig. 2C). The two main mechanistic explanations for this phenomenon are a booster role of FcRn in the humoral response, leading to increased Ab production in WT mice, and the protection of these IgGs from lysosomal degradation by FcRn. ADA detection with an anti-mouse-IgG-specific or an anti-mouse-IgM-specific Ab revealed that the response is mainly an IgG response with very low IgM levels. By contrast, infliximab did not induce any ADA response up to 21 d after injection in both WT and FcRn KO mice (data not shown).

TRICs are involved in ADA development

Our hypothesis was that infliximab did not induce ADA due to the lack of TRIC formation with the endogenous mTNF- α , whereas adalimumab cross-reacts with mTNF- α and therefore generates TRICs following injection. First, the species specificity of anti-TNF- α mAbs was assessed. As shown in Fig. 3, adalimumab binds both human and murine TNF- α whereas infliximab only binds hTNF- α . Rituximab, an anti-CD20 mAb, was used as a negative control. Then, infliximab-containing TRICs were constituted in vitro by mixing hTNF- α and infliximab prior to injection to WT and FcRn KO mice. No ADA could be detected by ELISA in WT or FcRn KO mice injected with infliximab alone. On the contrary, high amounts of infliximab ADA were measured in WT and FcRn KO mice injected with in vitro-formed infliximab-containing TRICs (Fig. 4). No anti-TNF- α Abs were detected in mice injected with recombinant hTNF- α alone. Altogether, these data showed that artificially formed TRICs are able to elicit an immune response to infliximab. In FcRn KO mice, ADA formation has different kinetics depending on the injected mAb, with anti-adalimumab Abs appearing more rapidly than anti-infliximab Abs, whereas ADA decreased more quickly in FcRn KO mice than in WT mice for both mAbs. We injected a 10-fold higher concentration of adalimumab (40 mg/kg), and showed that immunization occurred later in these mice, suggesting that dilution of the immune complexes in a tide of uncomplexed Abs delays ADA formation.

FIGURE 1. Pharmacokinetics of infliximab and adalimumab after a single 4 mg/kg injection. Median serum concentrations over time for adalimumab (triangles) and infliximab (circles) in WT mice (black) and KO mice (gray) for each Ab. Each data set ($n = 7$ per group) corresponds to mean $\pm$ SEM.



Degree of humanization is not responsible for adalimumab immunogenicity

The lack of immunogenicity of infliximab alone could be because its variable domains are murine, whereas adalimumab has human variable domains. To address this, a new set of experiments was

performed with golimumab, a fully human therapeutic anti-TNF- α mAb that is specific to hTNF- α , as shown in Fig. 5A. Golimumab was injected once, either alone or after in vitro IC generation by incubation of golimumab with hTNF- α . Golimumab alone did not elicit an ADA response in WT mice, in contrast to preformed

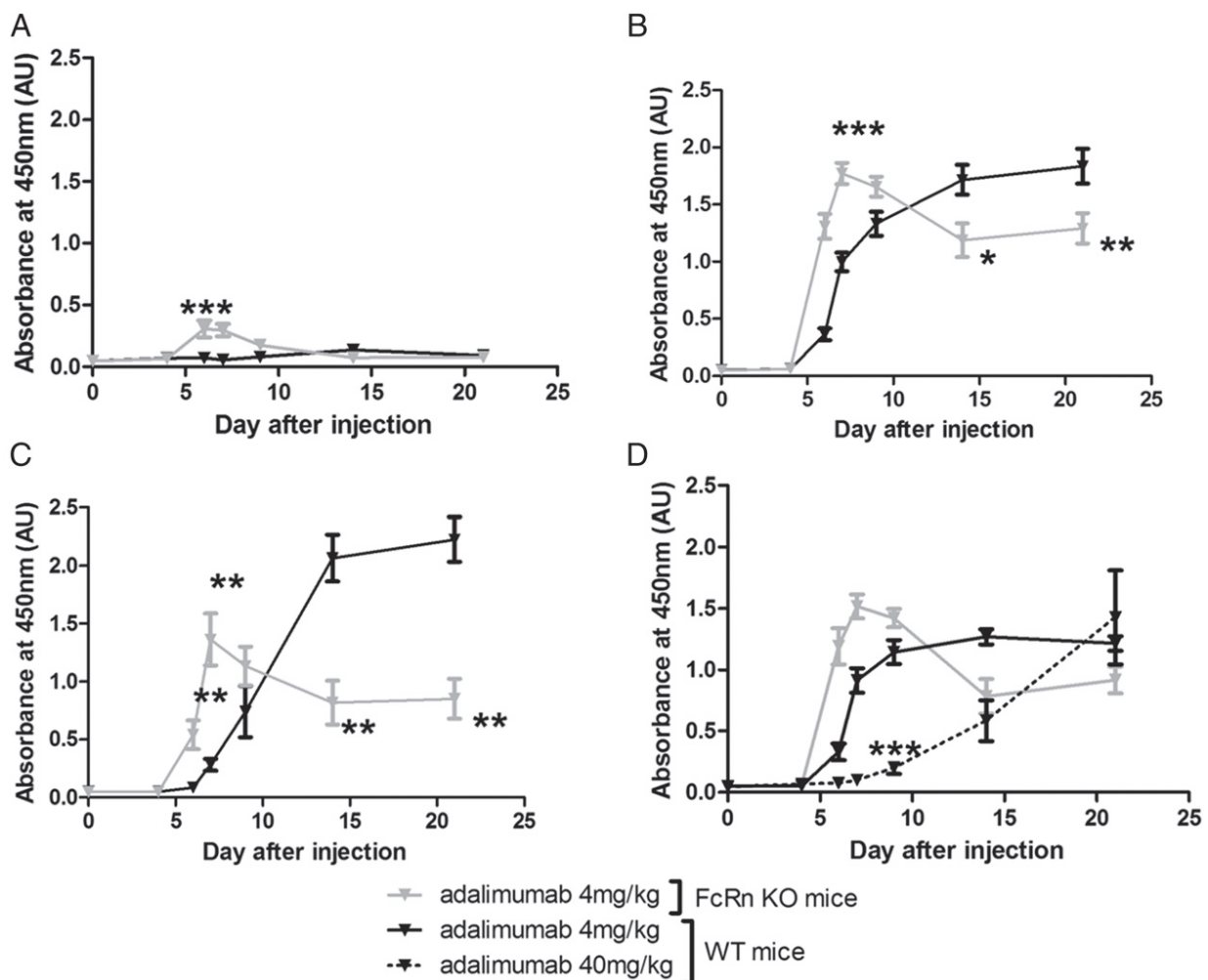


FIGURE 2. Detection of ADA against adalimumab and infliximab in WT (black lines) and FcRn KO (gray lines) mice. ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum. Each data set corresponds to mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). (A) Detection of IgM ADA against adalimumab in WT ($n = 7$) and FcRn KO mice ($n = 8$). ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum (serum dilution 1:100). (B and C) Detection of IgG ADA against adalimumab in WT ($n = 7$) and FcRn KO mice ($n = 8$). ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum, at two different serum dilutions [1:100 for (B) and 1:1000 for (C)]. (D) Detection of IgG ADA against adalimumab at 4 mg/kg in WT ($n = 7$) and FcRn KO mice ($n = 8$) or at 40 mg/kg in WT mice ($n = 7$). ADA formation was evaluated by blood sampling over 3 wk and measured by ELISA in the serum (diluted at 1:100). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

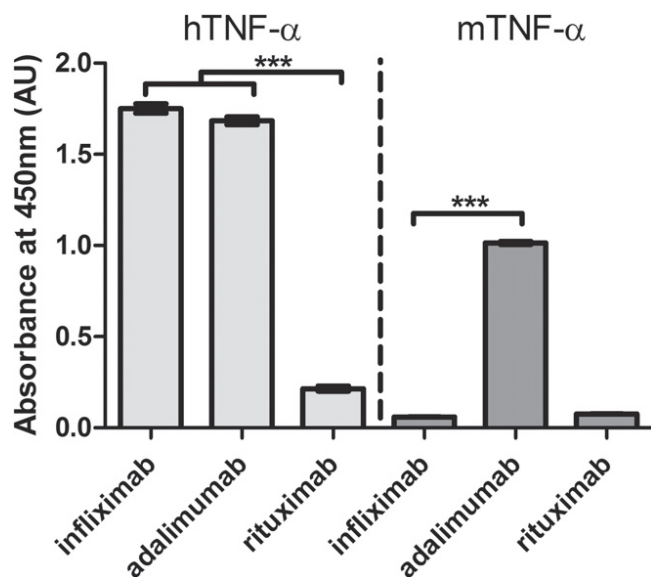


FIGURE 3. Analysis of anti-TNF- α mAb specificity by ELISA. Adalimumab and infliximab were tested in a human and murine TNF- α ELISA. The anti-CD20 rituximab was used as a negative control. Results of three independent experiments are presented as mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). *** $p < 0.001$.

golimumab-TRICs (Fig. 5B). These results were confirmed by repeating the experiment and performing ELISA with an anti-IgG HRPO-labeled murine-Fc γ -specific Ab (data not shown).

TRICs induced a cellular immune response in both WT and FcRn KO mice

Spleens of WT and FcRn KO animals injected with adalimumab were harvested on day 2 or day 6 to examine the cellular population. Spleens from naive animals were used as control (day 0 in Fig. 6). As shown in Fig. 6A, the size of the spleen increased 2 d after adalimumab injection, with a largely more pronounced effect in FcRn KO mice. This phenomenon was described in all mice by total splenocyte count (Fig. 6A), and a return to a normal count was observed on day 6. Flow cytometry analysis revealed that the increase in cell count on day 2 after adalimumab injection was observed for B cells (B220⁺), T lymphocytes (CD3⁺), dendritic cells (Ly6c⁺/CD11b⁺), and neutrophils (CD11c⁺/CD11b⁺) with a 1.43–1.97 ratio (day 2/day 0) compiling all FcRn KO and WT mice data (Fig. 6B). As expected, ratios were higher in FcRn KO (1.73–2.24) as compared with WT mice (1.40–1.57) for all cell types. This increase in cell count was more pronounced for the B cell ratio (2.24 in FcRn KO versus 1.45 in WT mice), and dendritic cells (1.97 in FcRn KO versus 1.40 in WT mice), followed by a milder increase in neutrophils (1.84 in FcRn KO versus 1.43 in WT mice) and T cells (1.73 in FcRn KO versus 1.57 in WT mice).

Discussion

The immunogenicity of therapeutic mAbs is a complex phenomenon that can occur during treatment with them, leading to the formation of ADA-related ICs and a profound alteration in mAb pharmacokinetics in most patients (9, 19, 20). These ADA-related ICs are defined as complexes formed by the binding of ADA to mAbs, particularly to the mAb idiotypes, because paratopes remain immunogenic whatever the degree of humanization of mAbs (5). This phenomenon has been seen in patients treated with infliximab or adalimumab, and measure-

ment of ADA is often a warning sign of upcoming treatment failure after an initial response (9, 21, 22). To prevent immunization, it is necessary to understand the mechanisms leading to the formation of ADA. Our study shows that TRICs, but not FcRn, are essential to trigger an immune response (i.e., after a single injection) against anti-TNF- α Abs. Moreover, although the crucial role played by FcRn in the development of humoral immune responses has been demonstrated by several studies (23, 24), our data fit better with a booster role for FcRn (25). Most of these studies were carried out using OVA because the T epitopes are well characterized and can be followed up, but the specific case of anti-TNF- α Abs is different. In our study, the Ags are Abs that form TRICs that elicit an immune response after the first injection (or not in the case of infliximab). This point could modify the kinetics of the immune response. In our animal model, we first confirmed that the presence of ADA modifies the pharmacokinetics of therapeutic Abs. Adalimumab displayed a faster log-linear elimination than infliximab but, above all, an accelerated terminal elimination, characteristic of the development of ADA (26, 27). This acceleration was observed in all mice treated with adalimumab, independent of the FcRn status even if elimination was clearly faster in FcRn KO mice (28). Adalimumab binds mTNF- α as described by the European Medicines Agency (2) and confirmed by ELISA. We hypothesized that with adalimumab treatment TRICs would be formed and could in turn cause immunization. To address this, we incubated infliximab and TNF- α to form TRICs, which were able to induce anti-infliximab Abs after injection in both WT and FcRn KO mice.

The Abs used differ in several ways, and one could ask whether the results are biased due to confounding factors. Adalimumab is a fully human therapeutic mAb. To discard the possibility that immunization could be a result of the presence of human portions in the protein sequence, we performed similar experiments with golimumab, another fully human anti-TNF- α mAb very specific for hTNF- α . The absence of anti-golimumab Abs supports the idea that mAb humanization is not responsible for the development of ADA in our model. However, as observed with infliximab, golimumab-containing TRICs injected into mice were able to elicit an anti-golimumab response. Apart from the degree of humanization, allotypes have been suspected to participate in the immunization process in chronic inflammatory diseases, even though the results were negative

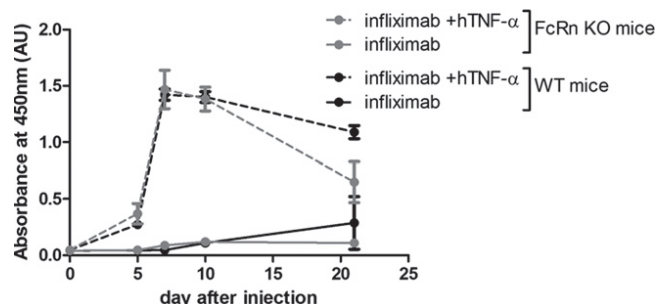


FIGURE 4. In vitro-formed infliximab containing TRICs leads to infliximab ADA development. WT and FcRn KO mice were injected either with the anti-TNF- α mAb alone (solid lines) or with in vitro-formed infliximab containing TRICs (dashed lines). Infliximab ADA were measured in the serum of mice (four mice per group) at indicated times after injection. The results correspond to mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). On day 21, there was no statistically significant difference in the ADA titer between WT or FcRn-KO mice injected with preformed ICs ($p = 0.056$).

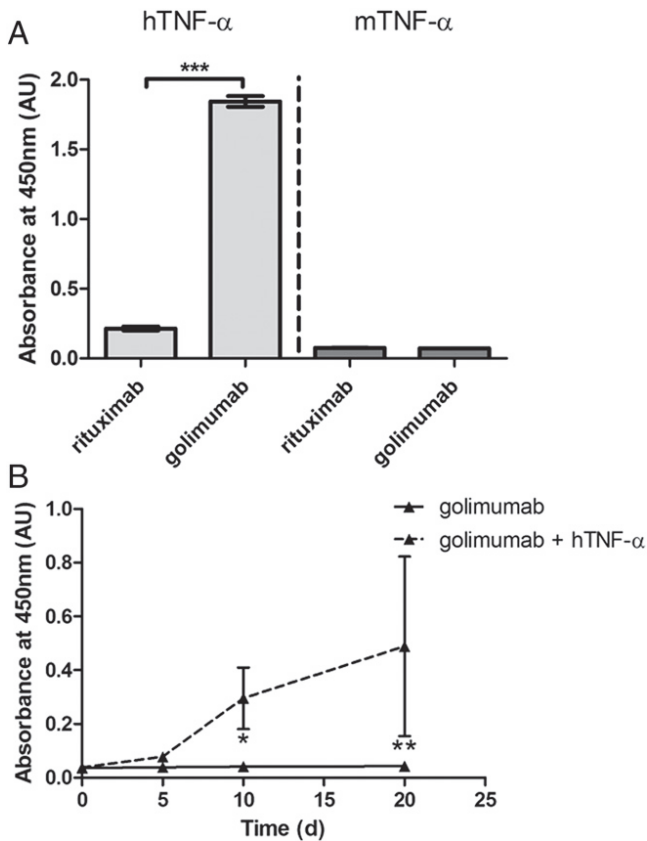


FIGURE 5. (A) Analysis of golimumab specificity for hTNF- α by ELISA. (B) Injection of WT mice with golimumab alone or with in vitro–formed TRICs with golimumab and hTNF- α . Golimumab ADA were measured in the serum of mice (four mice per group) at indicated times after injection. The results correspond to mean $\pm$ SEM of absorbance values in arbitrary units (AU). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

(6). All the Abs used in this study shared the same allotype (G1m17; 1), which discards this hypothesis. Finally, the intrinsic characteristics of the TRICs themselves, such as their size (25), are involved in their trafficking and condition the type of immune response elicited (29). But FcRn $^{-/-}$ mice also mount an immune response against these ICs, which discards this possibility. Moreover, infliximab incubated with hTNF- α also elicits an immune response. Altogether, these data confirmed that TRICs are necessary to elicit a primary immune response in the case of anti-TNF- α Abs.

FcRn is involved in the recycling and transcytosis of IgGs and monovalent immune complexes (30). But, surprisingly, ADAs were detected in both WT and KO FcRn mice, suggesting that FcRn is not necessary for immunization against anti-TNF- α Abs. In addition, anti-adalimumab Abs appeared more rapidly in FcRn KO mice than in WT animals. Several studies performed in FcRn KO models show that mAb pharmacokinetics are clearly impaired and that IgG biodistribution is affected differently depending on the organ tested (28, 31). We hypothesized that, in the absence of FcRn, adalimumab would not be recycled and that, its biodistribution outside the vascular compartment being altered, it would be fully available to form ICs with its target, especially in places such as mesenchymal lymph nodes, where ADA concentrations remain sufficient to form TRICs due to resident plasma cells as described by Baker et al. (16). TRICs would then be able to rapidly induce an immune response, characterized by IgG and

low IgM ADAs, probably via Fc γ R binding and MHC class II presentation (30, 32, 33). Another nonexclusive hypothesis is that the concentrations of free adalimumab are lower in FcRn $^{-/-}$ mice, and that their tolerogenic effect over TRICs is therefore shorter. Although dependence of Ab-mediated presentation of Ag on FcRn has been described in the case of secondary humoral response (15, 25), its absence could probably be overcome by other molecules for IC routing and MHC class II presentation as suggested in our model. The ADA response has a cellular component as observed by the increase in dendritic or monocyte counts as well as B or T cell counts in the spleen of immunized animals. This cellular immune response is necessary to lead to the humoral response and is proportional to the amount of ADA generated. Chen et al. (28) have shown that in the liver or the spleen, FcRn may exert its transcytosis function to transport IgGs out of the tissue. In the absence of FcRn, mAbs or TRICs might be retained in the spleen, thus participating in the increased immune response. Simultaneously, the absence of FcRn leading to accelerated clearance of adalimumab could also explain the faster clearance of ADA in FcRn KO mice as compared with WT. The involvement of this mechanism in ADA kinetic differences is sustained by the kinetics observed with preformed TRICs in our model. In this case, anti-infliximab Ab formation occurs without delay. The question remains as to which Fc γ Rs participate in this immune response. The cellular counts performed on the harvested spleens show an increase in multiple cell populations 2 d after the injection of preformed TRICs, which include dendritic cells (CD11c $^{+}$ /CD11b $^{+}$), neutrophils, and monocytes (LY6c $^{+}$ /CD11b $^{+}$). These cells express the activating murine Fc γ RI (monocytes, dendritic cells), Fc γ RIII, and Fc γ RIV (dendritic cells, neutrophils, and monocytes), which could all play a role in this process. However, because of the numerous differences between humans and mice in terms of Fc γ R (34), caution must be used for extrapolation to the clinical situation.

In humans, ADAs have been detected in a large number of patients treated with anti-TNF- α mAbs. Underexposure to mAbs has been clearly demonstrated in patients as a risk factor of immunization (19, 20). This approach does not take into account the evaluation of specific TRICs, which are known to skew the dosage of ADAs in the serum (35). The nature of the target may also participate in the formation of ICs. In that context, TNF- α is a good candidate because it is composed of a trimer and exists as a soluble Ag that is more prone to form multimeric ICs. The three Abs used in this study target TNF- α in different ways. Adalimumab and infliximab stabilize TNF- α as a trimer, whereas golimumab binding does not prevent monomer exchange with unbound trimers (36), which could explain the rather important variability observed in the anti-golimumab responses. This could explain the higher levels of ADA found with anti-TNF- α than with biologics directed against other molecules, along with the inflammatory profile of the pathologies involving high titers of TNF- α .

It is important to bear in mind that this study was performed using FcRn KO mice, meaning that the bioavailability of the TRICs is altered compared with WT mice, and that full FcRn deficiency has not been seen so far in humans.

It has been documented that low concentrations of anti-TNF- α Abs are associated with increased ADA formation in patients (21), and hypothesized that maintaining high concentrations of monomeric Ab could prevent the immunization process (12). In the case of anti-TNF- α therapy and primary immune response in mice, we show that this is true.

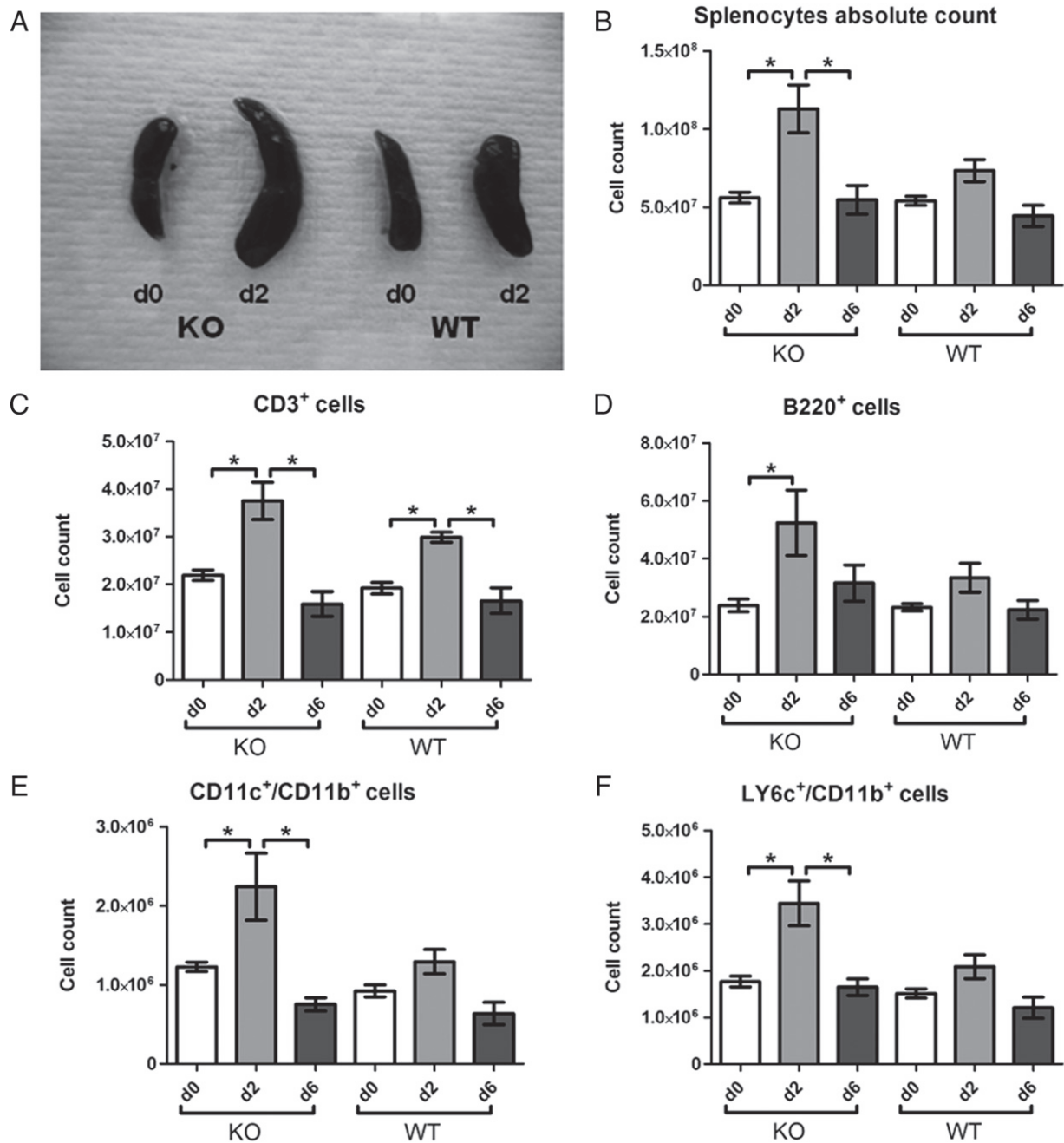


FIGURE 6. Cell content analysis of WT and KO FcRn mice spleens 2 d (d2) and 6 d (d6) post adalimumab injection by flow cytometry. Cells harvested from naive animals represent the time point d0. **(A)** Spleens from adalimumab-treated WT and FcRn KO mice are presented after 2 d of treatment (d2) and compared with spleens from naive mice (d0). Total splenocyte cell count was analyzed in four mice and results correspond to mean $\pm$ SEM. **(B)** CD3⁺ T lymphocytes **(C)**, B220⁺ B lymphocytes **(D)**, CD11b⁺/CD11c⁺ dendritic cells **(E)**, and Ly6c⁺/CD11b⁺ monocytes or neutrophils **(F)** were estimated by specific cell count in four mice and results correspond to mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

Acknowledgments

We thank the animal facility of Université François Rabelais for kind help.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- European Medicines Agency. 2012. Remicade: summary of product characteristics, European Public Assessment Report Product Information WC500050888. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000240/WC500050888.pdf.
- European Medicines Agency. 2004. Humira scientific discussion, European Public Assessment Report Scientific Discussion WC500050867. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000481/WC500050867.pdf.
- Hanauer, S. B., B. G. Feagan, G. R. Lichtenstein, L. F. Mayer, S. Schreiber, J. F. Colombel, D. Rachmilewitz, D. C. Wolf, A. Olson, W. Bao, and P. Rutgeerts. 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 359: 1541–1549.
- Schaeferbeke, T., M.-E. Truchetet, M. Kostine, T. Barnette, B. Bannwarth, and C. Richez. 2016. Immunogenicity of biologic agents in rheumatoid arthritis patients: lessons for clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 55: 210–220.
- van Meer, P. J. K., M. Kooijman, V. Brinks, C. C. Gispén-de Wied, B. Silva-Lima, E. H. M. Moors, and H. Schellekens. 2013. Immunogenicity of mAbs in non-human primates during nonclinical safety assessment. *MAbs* 5: 810–816.
- Bartelds, G. M., E. de Groot, M. T. Nurmohamed, M. H. L. Hart, P. H. van Eede, C. A. Wijbrandts, J. B. A. Crusius, B. A. C. Dijkmans, P. P. Tak, L. Aarden, and G. J. Wolbink. 2010. Surprising negative association between IgG1 allotype disparity and anti-adalimumab formation: a cohort study. *Arthritis Res. Ther.* 12: R221.
- Magdelaine-Beuzelin, C., S. Vermeire, M. Goodall, F. Baert, M. Noman, G. V. Assche, M. Ohresser, D. Degenne, J.-M. Dugoujon, R. Jefferis, et al. 2009. IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab. *Pharmacogenet. Genomics* 19: 383–387.

8. Montes, A., E. Perez-Pampin, F. Navarro-Sarabia, V. Moreira, A. R. de la Serna, B. Magallares, Y. Vasilopoulos, T. Sarafidou, A. Fernández-Nebro, Mdel. C. Ordóñez, et al. Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate (BRAGGSS). 2015. Rheumatoid arthritis response to treatment across IgG1 allotype - anti-TNF incompatibility: a case-only study. *Arthritis Res. Ther.* 17: 63.
9. Baert, F., M. Noman, S. Vermeire, G. Van Assche, G. D' Haens, A. Carbonez, and P. Rutgeerts. 2003. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 348: 601–608.
10. Krieckaert, C. L., M. T. Nurmohamed, and G. J. Wolbink. 2012. Methotrexate reduces immunogenicity in adalimumab treated rheumatoid arthritis patients in a dose dependent manner. *Ann. Rheum. Dis.* 71: 1914–1915.
11. Ahmadi, M., C. J. Bryson, E. A. Cloake, K. Welch, V. Filipe, S. Romeijn, A. Hawe, W. Jiskoot, M. P. Baker, and M. H. Fogg. 2015. Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm. Res.* 32: 1383–1394.
12. Chaigne, B., and H. Watier. 2015. Monoclonal antibodies in excess: A simple way to avoid immunogenicity in patients? *J. Allergy Clin. Immunol.* 136: 814–816.
13. Jonker, M., and F. J. M. Nooij. 1987. The internal image-like anti-idiotypic response to a CD3-specific monoclonal antibody in primates is dependent on the T cell-binding properties of the injected antibody. *Eur. J. Immunol.* 17: 1519–1522.
14. Foss, S., A. Grevys, K. M. K. Sand, M. Bern, P. Blundell, T. E. Michaelsen, R. J. Pleass, I. Sandlie, and J. T. Andersen. 2016. Enhanced FcRn-dependent transepithelial delivery of IgG by Fc-engineering and polymerization. *J. Control. Release* 223: 42–52.
15. Baker, K., T. Rath, M. Pyzik, and R. S. Blumberg. 2014. The role of FcRn in antigen presentation. *Front. Immunol.* 5: 408.
16. Baker, K., T. Rath, M. B. Flak, J. C. Arthur, Z. Chen, J. N. Glickman, I. Zlobec, E. Karamitopoulou, M. D. Stachler, R. D. Odze, et al. 2013. Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity* 39: 1095–1107.
17. Desvignes, C., S. R. Edupuganti, F. Darrouzain, A.-C. Duvieu, A. Loercher, G. Paintaud, and D. Mulleman. 2015. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure adalimumab concentration. *Bioanalysis* 7: 1253–1260.
18. Ternant, D., D. Mulleman, D. Degenne, S. Willot, J.-M. Guillaumin, H. Watier, P. Goupille, and G. Paintaud. 2006. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther. Drug Monit.* 28: 169–174.
19. Bendtzen, K., P. Geborek, M. Svenson, L. Larsson, M. C. Kapetanovic, and T. Saxne. 2006. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor α inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* 54: 3782–3789.
20. Ducourau, E., D. Mulleman, G. Paintaud, D. C. Miow Lin, F. Laufferon, D. Ternant, H. Watier, and P. Goupille. 2011. Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 13: R105.
21. Bartelds, G. M., C. L. M. Krieckaert, M. T. Nurmohamed, P. A. van Schouwenburg, W. F. Lems, J. W. R. Twisk, B. A. C. Dijkmans, L. Aarden, and G. J. Wolbink. 2011. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 305: 1460–1468.
22. Krintel, S. B., V. P. Grunert, M. L. Hetland, J. S. Johansen, M. Rothfuss, G. Palermo, L. Essieux, and U. Klause. 2013. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure. *Rheumatology (Oxford)* 52: 1245–1253.
23. Liu, X., L. Lu, Z. Yang, S. Palaniyandi, R. Zeng, L.-Y. Gao, D. M. Mosser, D. C. Roopenian, and X. Zhu. 2011. The neonatal FcR-mediated presentation of immune-complexed antigen is associated with endosomal and phagosomal pH and antigen stability in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 186: 4674–4686.
24. Baker, K., S.-W. Qiao, T. T. Kuo, V. G. Aveson, B. Platzer, J.-T. Andersen, I. Sandlie, Z. Chen, C. de Haar, W. I. Lencer, et al. 2011. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9927–9932.
25. Qiao, S.-W., K. Kobayashi, F.-E. Johansen, L. M. Sollid, J. T. Andersen, E. Milford, D. C. Roopenian, W. I. Lencer, and R. S. Blumberg. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9337–9342.
26. Chen, X., T. Hickling, E. Kraynov, B. Kuang, C. Parnig, and P. Vicini. 2013. A mathematical model of the effect of immunogenicity on therapeutic protein pharmacokinetics. *AAPS J.* 15: 1141–1154.
27. Ng, T., M. Chan, C. C. Khor, H. K. Ho, and A. Chan. 2014. The genetic variants underlying breast cancer treatment-induced chronic and late toxicities: a systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 40: 1199–1214.
28. Chen, N., W. Wang, S. Fauty, Y. Fang, L. Hamuro, A. Hussain, and T. Prueksaritanont. 2014. The effect of the neonatal Fc receptor on human IgG biodistribution in mice. *Mabs* 6: 502–508.
29. Vidarsson, G., A. M. Stemmerding, N. M. Stapleton, S. E. Splithoff, H. Janssen, F. E. Rebers, M. de Haas, and J. G. van de Winkel. 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* 108: 3573–3579.
30. Baker, K., T. Rath, W. I. Lencer, E. Fiebiger, and R. S. Blumberg. 2013. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 1319–1334.
31. Guilleminault, L., N. Azzopardi, C. Arnoult, J. Sobilo, V. Hervé, J. Montharu, A. Guillon, C. Andres, O. Herault, A. Le Pape, et al. 2014. Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system. *J. Control. Release* 196: 344–354.
32. Amigorena, S., D. Lankar, V. Briken, L. Gapin, M. Viguier, and C. Bonnerot. 1998. Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J. Exp. Med.* 187: 505–515.
33. Simitsek, P. D., D. G. Campbell, A. Lanzavecchia, N. Fairweather, and C. Watts. 1995. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J. Exp. Med.* 181: 1957–1963.
34. Bruhns, P., and F. Jönsson. 2015. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* 268: 25–51.
35. van Schouwenburg, P. A., G. M. Bartelds, M. H. Hart, L. Aarden, G. J. Wolbink, and D. Wouters. 2010. A novel method for the detection of antibodies to adalimumab in the presence of drug reveals “hidden” immunogenicity in rheumatoid arthritis patients. *J. Immunol. Methods* 362: 82–88.
36. van Schie, K. A., P. Ooijevaar-de Heer, L. Dijk, S. Kruihof, G. Wolbink, and T. Rispens. 2016. Therapeutic TNF Inhibitors can differentially stabilize trimeric TNF by inhibiting monomer exchange. *Sci. Rep.* 6: 32747.

Diana Cadena Castaneda

Etude du niveau d'expression du FcRn sur la réponse anti-tumorale : Impact sur les cellules Natural Killer (NK)

Résumé

Le FcRn ou récepteur néonatal du Fc des IgG est un récepteur " clé " qui prolonge la demi-vie des IgG et de l'albumine et assure leur biodistribution. Récemment, son rôle s'est étendu à la réponse immunitaire humorale et anti-tumorale. Par ailleurs, certains travaux indiquent que le niveau d'expression du FcRn dans les différents tissus pourrait être à l'origine d'une modulation de ses fonctions. Dans ce contexte, nous avons démontré que l'expression du FcRn était diminuée dans le tissu cancéreux par rapport au tissu sain, chez des patients atteints du cancer du poumon et que cet effet était corrélé à leur pronostic. Afin de comprendre les répercussions de cette diminution sur la tumorigenèse, nous avons mis en place le modèle murin de métastases pulmonaires B16F10, chez les souris FcRn^{-/-}. L'absence de FcRn influence la réponse anti-tumorale, en altérant le nombre de cellules dendritiques et des TCD8. Pour la première fois, nous avons montré que l'absence du FcRn influençait le développement/maturation et fonctions des cellules NK, fragilisant ainsi encore plus l'immunosurveillance anti-tumorale. Ces résultats mettent en avant un nouveau rôle du FcRn dans la biologie des cellules NK. Les mécanismes à l'origine de cet effet restent à élucider.

Mots-clés: FcRn, cancer pulmonaire, modèle murin B16F10, cellules dendritiques, cellules TCD8, cellules NK

Résumé en anglais

FcRn or neonatal receptor for the Fc portion of IgG is a "key" receptor since it extends the half-life of IgGs and albumin and ensures their biodistribution. Recently, its role has been extended to the humoral and anti-tumor immune. Moreover, some studies indicate that the expression level of FcRn in the different tissues may modulate its functions. In this context, we showed that the expression of FcRn was decreased in lung cancer tissue compared to healthy tissue, in patients with NSCLC. This decreased expression is correlated with the prognosis of the patients. In order to understand the impact of the reduced FcRn expression on tumorigenesis, we implemented a murine model of lung metastases, implanting B16F10 cells in FcRn deficient mice. The absence of FcRn influences the anti-tumor response, by altering the number of dendritic cells and TCD8 cells. We showed for the first time that the lack of FcRn altered the development / maturation and the functional activity of NK cells, thus weakening even more anti-tumor immunosurveillance. These new results on NK highlight a new role of FcRn in the biology of NK cells. The mechanisms underlying this effect need to be elucidated.

Keywords: FcRn, lung tumor, B16F10 mice model, dendritic cells, T CD8 cells, NK cells