



HAL
open science

Etude de l'hétérogénéité des centrocytes humains à travers l'expression du CD23 : différenciation en plasmablastes et expression d'une signature minimale transcriptionnelle au niveau cellule-unique comportant DEC2

Kathleen Santamaria

► **To cite this version:**

Kathleen Santamaria. Etude de l'hétérogénéité des centrocytes humains à travers l'expression du CD23 : différenciation en plasmablastes et expression d'une signature minimale transcriptionnelle au niveau cellule-unique comportant DEC2. Immunologie. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B038 . tel-03213003

HAL Id: tel-03213003

<https://theses.hal.science/tel-03213003>

Submitted on 30 Apr 2021

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Immunologie

Par

Kathleen SANTAMARIA

Etude de l'hétérogénéité des centrocytes humains à travers l'expression du CD23 : différenciation en plasmablastes et expression d'une signature minimale transcriptionnelle au niveau cellule-unique comportant DEC2.

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 9 décembre 2020

Unité de recherche : U1236 Microenvironnement, Cell differentiation, iMmunology And Cancer

Rapporteurs avant soutenance :

Marion ESPELI CR, Université de Paris
Christophe SIRAC PU, Université de Limoges

Composition du Jury :

Président : Karin TARTE PU-PH, Université de Rennes 1
Examineurs : Marion ESPELI CR, Université de Paris
 Christophe SIRAC PU, Université de Limoges
Dir. de thèse : Thierry FEST PU-PH, Université de Rennes 1

Je remercie tout d'abord le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation, l'Université de Rennes 1, ainsi que la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer de m'avoir financé au cours de mes 3 années de doctorat.

Je remercie particulièrement la Professeur Karin Tarte pour m'avoir accueillie dans l'équipe U1236 MICMAC, pour ses précieux conseils et pour avoir présidé mon jury de thèse. Je remercie également le Professeur Thierry Fest pour la supervision de mon doctorat.

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury Marion Espeli et Christophe Sirac qui ont accepté d'examiner mon travail de thèse et pour leurs questions et réflexions qui ont conduit à une discussion intéressante, suite à la soutenance.

Un merci particulier à David Gilot et à Michel Cogné pour leurs conseils constructifs lors de mes comités de thèse.

Merci également aux personnes avec qui j'ai pu collaborer : Laurent Delpy et Anne Marchalot à Limoges pour les ASO, Alexis Saintamand pour la RACE PCR, et Pierre Milpied et Noudjoud Attaf pour leur accueil à Marseille, au cours duquel j'ai pu en apprendre davantage sur les techniques de séquençage de l'ARN.

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité et les membres du SITI pour le travail qu'ils fournissent au quotidien et qui m'a permis de travailler dans d'excellentes conditions, et notamment Yoni Desvois. J'en profite pour remercier Rachel Jean et Céline Nonn pour les bons moments que nous avons partagés. Je tiens à remercier Laurent Deleurme pour m'avoir appris à utiliser le trieur de cellules et pour les longues heures de tri qu'il a effectué.

Merci à Céline Lepine et à Céline Benoist pour leur soutien et leur inestimable aide. Je suis très heureuse d'avoir pu partager avec vous au cours de ces 3 années.

Un merci particulier à David Roulois et à Cédric Menard pour leurs conseils avisés.

Je remercie particulièrement Céline Monvoisin, l'experte en biologie moléculaire pour m'avoir fait comprendre à quel point cette discipline nécessite de la précision et pour sa constante bonne humeur et bienveillance. Merci à Marion Guirriec avec qui j'ai passé d'excellents moments, un café à la main, ou devant le sp8 à scruter les centres germinatifs.

Je remercie particulièrement Fabienne Desmots-Loyer pour le précieux soutien qu'elle m'a apporté et pour tout ce qu'elle m'a appris. Merci d'avoir été là quand je me sentais un peu perdue et de m'avoir remotivée dans les moments compliqués. Je remercie également Céline Delaloy pour ses excellents conseils et pour sa précieuse aide et bienveillance. Je remercie également les bio-informaticiens pour leur aide et plus particulièrement Simon Leonard pour les analyses de qPCR à l'échelle de la cellule unique, Delphine Rossille pour l'analyse des répertoires BCR et pour ses conseils bienveillants et Vonnick Sibut pour ses conseils d'analyse et pour m'avoir assistée pendant la soutenance. Merci également à Fabrice Chatonnet pour son aide.

Je remercie également les post-doc, à savoir mon acolyte « espagnol » Stéphane Rodriguez pour sa gentillesse, Florent Creusat pour sa patience et ses conseils pertinents, Alexis Grasseau pour ses bons conseils et son calme reposant, Jocelyn Plassais pour ses conseils avisés, Maud Lemarie et Francine Padonou pour leur sympathie. Thanks to Ansie Martin for her nice smile and thanks to Ilenia Papa for her advices and for her support. I will be very happy to work with you again. Merci à Murielle Gregoire (Mumu ou Grassouilletta) pour sa bienveillance, ses précieux conseils dans tous les domaines, et pour toutes les discussions que nous avons eu le long de la Vilaine, pendant nos runnings dominicaux.

Un énorme et chaleureux merci aux thésards (doctorants, pardon !) pour avoir rendu ces trois années si belles. Votre soutien, vos blagues, votre bonne humeur et votre bienveillance m'ont tellement apporté. Vous allez énormément me manquer. Je remercie d'abord Nicolas Hipp, pour sa bienveillance et sa bonne humeur à toute épreuve. Merci à Amandine Pignarre de m'avoir initiée à l'étude des lymphocytes B et pour ses parties de soccers bien relevées. Merci à Léa Verdière pour les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eu à l'Amaryllis autour d'une pinte de Chouffe et pour les excellents moments passés ensemble. Merci à Claire Lamaison, une amie très précieuse, avec d'excellentes connaissances et d'une bienveillance inégalable. Je remercie Marvin Sylvestre, pour ses conseils sportifs et nutritionnels, pour ses conseils scientifiques et pour son excellent accent italien qui m'a beaucoup fait rire. Je remercie Juliette Ferrant (JUF) qui m'a appris énormément de choses sur les macrophages mais pas seulement, et notamment dans le domaine musical, toujours avec le sourire. Merci à Juliette Gauthier (JUG) pour son aide pour retrouver les articles perdus et pour sa bonne humeur communicative. Merci à (Jean) Baptiste Brauge pour sa bonne humeur et ses conseils, notamment en cytométrie, mais surtout pour ses imitations de Maïté, réalisées à la perfection. Je remercie également Natsuko Ueda et Marine Cahen avec qui j'ai passés de bons moments à Freiburg en Allemagne. Merci à Steve Genebrier et Ophélie Deze pour leur bonne humeur.

J'en profite pour remercier une doctorante et amie de Suisse, Mathilde Harel qui m'a aidé à forger mon esprit critique scientifique depuis la licence de biologie. Je suis contente que nous ayons gardé contact.

Je remercie particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenue. Je remercie ma mère pour sa gentillesse et ses précieux conseils dans tous les domaines. Ton soutien m'a énormément apporté et m'a permis d'arriver jusqu'ici. Merci d'être toujours présente et à l'écoute, ton réconfort m'est très précieux. Merci à ma sœur Enora pour tous ses bons moments que nous avons passés ensemble et avec Eléna. Ses moments passés avec vous ont vraiment embellis mon doctorat. Merci à mon frère Gaël pour son soutien et ses moments, rares mais précieux, que nous avons passé ensemble. Je remercie ma mamie, ma tante Evelyne et mon oncle Gilles pour leur soutien. Loin des yeux, mais près du cœur.

Je remercie Kiki et Filou qui ont partagé mon quotidien pendant tout mon doctorat et bien avant et qui m'ont remonté le moral pendant les moments difficiles.

Enfin je remercie celui qui partage ma vie, Mehdi, et qui a passé ce doctorat avec moi. Tu m'as permis d'avoir un autre regard sur le monde et de m'adapter à toutes les situations partout dans le monde. Ta présence et tes conseils me font grandir chaque jour.

TABLES DES MATIERES

Liste des abréviations	6
Liste des illustrations	12

Introduction	16
---------------------------	-----------

Chapitre 1 : La différenciation des lymphocytes B naïfs en centrocytes20

I. Le microenvironnement de la différenciation terminale B dans les amygdales palatines	23
1) L'organisation structurale des amygdales.....	23
2) Les acteurs de la différenciation terminale B dans les amygdales	25
a. Les lymphocytes.....	25
i. Les lymphocytes B	25
ii. Les lymphocytes T	27
b. Les autres cellules hématopoïétiques	28
i. Les cellules dendritiques	28
ii. Les macrophages	29
c. Les cellules stromales	29
II. Les étapes précoces de l'engagement dans la différenciation terminale B	33
1) L'arrivée des cellules effectrices dans les amygdales	33
2) La pré-activation des lymphocytes B naïfs	35
3) La pré-activation des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs	38
4) La synapse B-T	40
III. Les étapes de maturation se produisant dans la zone sombre du centre germinatif	44
1) La régulation transcriptionnelle par les facteurs de transcription de l'identité B	46
2) L'expansion clonale des centroblastes	49
3) Les hypermutations somatiques des gènes des immunoglobulines	50

Chapitre 2 : La différenciation des centrocytes en cellules effectrices54

I. La maturation des centrocytes dans la zone claire	55
1) Les commutations de classes des gènes des immunoglobulines	55
2) La sélection des centrocytes	57
a. La sélection des centrocytes par les lymphocytes Tfh	57
i. La sélection positive	58
a) Les molécules de signalisation membranaires	59
b) Les molécules solubles	61
ii. La sélection négative	64

b.	L'interaction entre les centrocytes et les cellules dendritiques folliculaires	67
c.	Le rôle des lymphocytes T folliculaires régulateurs dans la réaction du centre germinatif	71
II.	Le devenir des centrocytes	73
1)	Le retour dans la zone sombre	73
2)	La différenciation des centrocytes en plasmablastes	75
a.	Les stades pré-plasmablastes et plasmablastes	75
b.	La régulation transcriptionnelle des plasmocytes	76
3)	La différenciation en lymphocytes B mémoires	81
III.	La sortie des plasmablastes du centre germinatif et la caractérisation des plasmocytes	83
1)	La sortie centre germinatif et la niche médullaire des plasmocytes	83
2)	La culture des plasmocytes	86
3)	Le CD138 et son rôle dans le myélome multiple	87
IV.	La différenciation extra-folliculaire des lymphocytes B	89
1)	La différenciation extra-folliculaire T-dépendante	89
2)	La différenciation extra-folliculaire T-indépendante	90
V.	L'expression du CD23 par les lymphocytes B matures	91
1)	La structure, la signalisation et la régulation du CD23	91
2)	L'utilisation du CD23 comme marqueur de la différenciation lymphocytaire B	93
3)	Le CD23 dans le lymphome folliculaire	95

Chapitre 3 : La structure et les fonctions du facteur de transcription DEC2 et de son paralogue DEC199

I.	La classification et la structure des membres de la famille bHLH	100
1)	La classification des membres bHLH et la structure des gènes de DEC2 et de DEC1	100
2)	L'expression tissulaire et la structure protéique de DEC2 et de DEC1	101
3)	Les modes d'action	103
a.	La liaison à l'ADN	103
b.	L'interaction protéine-protéine	103
II.	Les fonctions cellulaires régulées par DEC2 et DEC1	104
1)	La différenciation cellulaire	104
2)	La prolifération cellulaire	105
3)	La réponse à l'hypoxie et l'angiogenèse	106
4)	L'apoptose	107
5)	La migration et les capacités de métastase	108
6)	Conclusion sur les fonctions de DEC2 et de DEC1	109

III. Les fonctions de DEC2 et de DEC1 dans les lymphocytes	111
1) Les fonctions de DEC2 et de DEC1 dans les lymphocytes T	111
a. Les études chez la souris	111
i. Le rôle de DEC2	111
ii. Le rôle de DEC1	112
b. Les études chez l'humain	113
2) Les fonctions de DEC2 et de DEC1 dans les lymphocytes B	114
a. Les études chez la souris	114
b. Les études chez l'humain	118
Objectifs	121
Résultats	124
Projet 1 : La perte d'expression du CD23 permet d'identifier les centrocytes qui s'engagent dans la différenciation en plasmablastes	125
Projet 2 : Quelle place pour le facteur de transcription DEC2 dans la différenciation plasmocytaire ?	155
Projet 3 : Comparaison des populations CD23pos et CD23neg tumorales de lymphome folliculaire	197
Discussion et perspectives	221
Conclusion	229
Références	231
Annexe	278

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ABF-1 : Facteur des lymphocytes B activés 1

ADAM10 : Protéine contenant un domaine disintégrine et de métalloprotéinase 10

ADN : Acide désoxyribonucléique

AID : Cytidine désaminase induite par l'activation

AML : Leucémie myéloïde aiguë

APRIL : Ligand induisant la prolifération

ARN : Acide ribonucléique

ATAC-seq : Séquençage des régions accessibles à la transposase de la chromatine

ATX : Autotaxine

B

BACH2 : Protéine contenant un domaine BTB et CNC homologue 2

BAFF : Facteur activant les lymphocytes B

BAFF-R : Récepteur de BAFF

BALT : Tissus lymphoïdes respiratoires

BATF : Facteur de transcription basique de la leucine à glissière

BCL6 : Protéine du lymphome 6 des lymphocytes B

BCL-XL : Protéine extra large des lymphocytes B

BCMA : Antigène de maturation des lymphocytes B

BCR : Récepteur du lymphocyte B

bHLH : Protéine à domaine basique contenant une hélice-boucle-hélice

BIM : Médiateur interagissant avec BCL-2

BIRC6 : Protéine contenant des IAP baculoviraux 6

BLIMP1 : Protéine de maturation induite dans les lymphocytes B 1

BLNK : Protéine se fixant aux lymphocytes B

BTK : Protéine kinase de Burton

C

CB : Centroblaste

CBL : Ubiquitine ligase du lymphome de la lignée Casitas B

CC : Centrocyte

CCL19 : Ligand de la chimiokine à motif CC 19

CCR7 : Récepteur de la chimiokine à motif CC 7

CD : Cluster de différenciation

CD40L : Ligand du CD40

CDK4 : Kinase dépendante des cyclines 4

ChIP-seq : Séquençage par immuno-précipitation de la chromatine

CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité II

CR : Récepteur au complément

CRC : Cellule réticulaire exprimant le CXCL12

CREB3L2 : Protéine 3 de liaison à l'élément de réponse AMPc apparentée 2

CSK : Kinase SRC C-terminale

CSR : Commutation de classe par recombinaison

CTLA-4 : Antigène des lymphocytes T cytotoxiques 4

CXCL13 : Ligand de la chimiokine à motif CXC 13

CXCR5 : Récepteur de chimiokine à motif CXC 5

D

DAMP : Motifs particuliers présents sur des cellules endommagées

DC : Cellule dendritique

DEC1/2 : Protéine différenciellement exprimée dans les chondrocytes 1/2

DLBCL : Lymphome diffus à grandes cellules

DZ : Zone sombre

E

EBI2 : Protéine G induite par le virus d'Epstein-Barr 2

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse

ERK : Protéine kinase activée par des signaux extra-cellulaires

ERN1 : Protéine de signalisation nucléaire du réticulum endoplasmique 1

ETS : Protéine spécifique à la transformation des érythroblastes

EZH2 : Amplificateur de l'homologue zeste 2

F

FcγIIb : Récepteur des fragments cristallins des immunoglobulines G II b

FDC : Cellule dendritique folliculaire

FL : Lymphome folliculaire

FOXO1 : Protéine de la boîte Forkhead O1

FOXP3 : Protéine à boîte Forkhead 3

FRET : Transfert d'énergie par résonance Förster

FRC : Cellule fibroblastique réticulaire

G

GALT : Tissus lymphoïdes digestifs

GATA3 : Facteur de transcription spécifique des cellules T à action trans 3

GC : Centre germinatif

GFP : Protéine fluorescente verte

H

H3K27Ac : Acétylation de la lysine 27 de l'histone 3

H3K27Me3 : Triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3

HDAC : Histone désacétylase

HEV : Veinules à endothélium épais

HIF : Facteur induisant l'hypoxie

I

ICAM1 : Molécule d'adhésion intercellulaire 1

ICOS : Co-stimulateur induit par le lymphocyte T

ICOS-L : Ligand du co-stimulateur induit par le lymphocyte T

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IL-2R : Récepteur de l'interleukine 2

IRF4/8 : Facteur régulateur de l'interféron 4/8

ITAM : Motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine

ITIM : Motifs d'inhibition des récepteurs immuns basés sur la tyrosine

J

JAK : Kinase Janus

L

LAM : Leucémie myéloïde aiguë

LFA-1 : Antigène associé aux fonctions lymphocytaires 1

LPA : Acide lysophosphatidique

LPC : Lysophosphatidylcholine

LPS : Lipopolysaccharides

LT : Lymphotoxine

LZ : Zone claire

M

MAdCAM-1 : Molécule d'adhésion cellulaire de l'adhésine vasculaire mucoale 1

MALT : Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses

MBC : Lymphocyte B mémoire

MCL-1 : protéine de différenciation des cellules de leucémie myéloïde 1

MEF2 : Facteur de renforcement des myocytes 2

mlg : Immunoglobuline membranaire

MM : Myélome multiple

MYD88 : Protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88

MZ : Zone marginale

MZB : Lymphocyte B de la zone marginale

MZM : Macrophage de la zone marginale

N

NBC : Lymphocyte B naïf

NF-κB : Facteur nucléaire κ B

NOTCH1 : Protéine homologue associée à la translocation 1

O

OBF : Co-activateur OCT des lymphocytes B

OLS : Organe lymphoïde secondaire

P

PAMP : Motifs particuliers présents sur des pathogènes

PAX5 : Protéine de boîte appariée 5

PB : Plasmablaste

PC : Plasmocyte

PCA : Analyse en composantes principales

PCR : Réaction en chaîne de la polymérase

PD-1 : Protéine de mort cellulaire programmée 1

PD-L1 : Ligand de la protéine de mort cellulaire programmée

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PI3K : Phospho-inositide 3 kinase

PKC : Protéine kinase C

PLCy2 : Phospholipase C gamma 2

POU2AF1 : Facteur 1 d'association de classe 2 du domaine POU

PRDM1 : Protéine à doigt de zing du domaine PR 1

pSTAT6 : Transducteur de signaux et activateur de transcription phosphorylé 6

R

RAG1/2 : Gènes activant les recombinaisons 1/2

RNAseq : Séquençage de l'ARN

S

S1P : Sphingosine-1-phosphate

S1PR1 : Récepteur 1 de la sphingosine-1 phosphate

SDC-1 : Syndécan 1

SHARP1 : Protéine activatrice du fractionnement et apparentée aux protéines Hairy

SHM : Hypermutations somatiques

SHP1 : Phosphatase contenant le domaine d'homologie SRC

SIGLEC : Lectine de type immunoglobuline liant l'acide sialique

SLAM : Molécule d'activation et de signalisation lymphocytaire

SP1 : Protéine de spécificité 1

STAT3 : Transducteur de signaux et activateur de transcription 3

STRA13 : Protéine stimulée par l'acide rétinoïque 13

SYK : Protéine kinase de la rate

T

T1/2/3 : Lymphocytes B transitionnels 1/2/3

TACI : Activateur transmembranaire et interacteur avec CALM

T-bet : Facteur de transcription induit par l'IFN- γ

TBM : Macrophage à corps tangible

TCR : Récepteur du lymphocyte T

Tfh : Lymphocyte T folliculaire auxiliaire

Tfr : Lymphocyte T folliculaire régulateur

TGF : Facteur de croissance transformant

TGF- β -RI : Récepteur 1 du TGF beta

Th1/2 : Lymphocyte T auxiliaire 1/2

TLR : Récepteur de type Toll

TNF : Facteur de nécrose tumorale

Treg : Lymphocyte T régulateur

U

UNG : Glycosylase de l'ADN Uracile

UPR : Réponse aux protéines mal-conformées

V

VAP-1 : Protéine d'adhésion vasculaire 1

VCAM-1 : Protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1

VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire

VLA-4 : Intégrine $\alpha 4 \beta 1$

X

XBP1 : Protéine de liaison à la boîte X 1

Z

ZBTB20 : Protéine à doigt de zinc et contenant un domaine BTB 20

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- [Figure 1 :](#) La structure des amygdales palatines.
- [Figure 2 :](#) Les cellules stromales impliquées dans la différenciation terminale des lymphocytes B.
- [Figure 3 :](#) L'entrée des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires *via* les veinules à endothélium épais.
- [Figure 4 :](#) La signalisation du récepteur du lymphocyte B.
- [Figure 5 :](#) La pré-activation du lymphocyte T et sa synapse activatrice avec le lymphocyte B correspondant.
- [Figure 6 :](#) La réaction du centre germinatif.
- [Figure 7 :](#) Le réseau transcriptionnel des lymphocytes B activés.
- [Figure 8 :](#) Le mécanisme des hypermutations somatiques dans les lymphocytes B.
- [Figure 9 :](#) Les clonotypes des centres germinatifs.
- [Figure 10 :](#) Le mécanisme de commutation de classes.
- [Figure 11 :](#) L'interaction entre le lymphocyte Tfh et le centrocyte dans le centre germinatif.
- [Figure 12 :](#) La production séquentielle de l'IL-21 puis de l'IL-4 permet la différenciation des B du centre germinatif en plasmocytes chez la souris.
- [Figure 13 :](#) La cinétique de l'apoptose dans le centre germinatif.
- [Figure 14 :](#) La représentation des différentes catégories de cellules dendritiques folliculaires chez la souris.
- [Figure 15 :](#) La migration des lymphocytes B entre la zone claire et la zone sombre dans le centre germinatif.
- [Figure 16 :](#) Le réseau transcriptionnel régulant la différenciation des plasmocytes.
- [Figure 17 :](#) L'analyse du transcriptome au niveau cellule unique des lymphocytes B matures humains.
- [Figure 18 :](#) La sortie des plasmablastes du centre germinatif et la niche médullaire des plasmocytes.

- [Figure 19 :](#) Le modèle de différenciation *in vitro* développé dans notre équipe.
- [Figure 20 :](#) L'expression du CD23 dans le centre germinatif.
- [Figure 21 :](#) La régulation de DEC2 et de DEC1.
- [Figure 22 :](#) Le rôle de DEC2 dans la régulation de la différenciation des lymphocytes Th2 murins.
- [Figure 23 :](#) L'expression de DEC2 dans les lymphocytes B murins.
- [Figure 24 :](#) L'expression de DEC1 dans les lymphocytes B murins sous stimulation T-dépendante.
- [Figure 25 :](#) DEC1 n'a pas d'impact sur la différenciation des lymphocytes B et T mais participe aux réactions du centre germinatif.
- [Figure 26 :](#) La représentation du réseau transcriptionnel régulant la différenciation des PC et incluant DEC2.

INTRODUCTION

Les cellules hématopoïétiques sont essentielles pour assurer une protection immunitaire efficace. Elles sont impliquées dans deux types d'immunité : l'immunité innée qui permet une réponse immédiate de l'organisme et l'immunité adaptative qui met plusieurs jours à se mettre en place et assure une protection plus spécifique et durable dans le temps. Cette dernière est assurée notamment par les lymphocytes T exprimant le cluster de différenciation 4 (CD4), qui orientent la réponse immunitaire en fonction du type de pathogène. Ainsi, en cas d'infection par un pathogène intracellulaire, la réponse cytotoxique est favorisée afin d'éliminer les cellules infectées. Cette réponse passe notamment par le biais des lymphocytes T CD4+ qui produisent des cytokines de type T auxiliaire 1 (Th1), comprenant principalement de l'interleukine 2 (IL-2), de l'interféron γ (IFN- γ) et du facteur de nécrose tumorale β (TNF- β), qui activent les lymphocytes T CD8+ naïfs et mémoires. Dans le cas d'une infection par un pathogène extracellulaire, la réponse humorale est privilégiée. Elle fait intervenir également des lymphocytes T CD4+, qui cette fois-ci, induisent une réponse immunitaire de type Th2 avec la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-13. Ces cytokines favorisent l'activation des lymphocytes B naïfs (NBC) et mémoires (MBC) afin qu'ils se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps appelées également immunoglobulines (Ig) : les plasmocytes (PC). Ainsi, les lymphocytes B sont des cellules essentielles dans la défense de l'organisme contre les pathogènes. Ils sont notamment caractérisés par l'expression d'un récepteur membranaire particulier : le récepteur du lymphocyte B (BCR), qui leur permet de reconnaître un antigène spécifique. Cette reconnaissance initie l'activation du lymphocyte B, son expansion clonale et sa différenciation en PC, qui secrète des anticorps de même spécificité que le BCR d'origine.

Le sujet de ma thèse porte sur la différenciation terminale des lymphocytes B et plus particulièrement sur l'étude de la transition entre le stade de différenciation des lymphocytes B du centre germinatif, appelés centrocytes (CC) et le stade plasmocytaire, à partir de cellules primaires issues d'amygdales palatines humaines.

Dans le premier chapitre nous aborderons les premières étapes de différenciation des NBC en CC. Nous nous intéresserons d'abord au microenvironnement structural et cellulaire dans lequel s'effectue la différenciation terminale des lymphocytes B, et plus particulièrement au

cas des amygdales palatines. Ensuite, nous parlerons des étapes de pré-activations des lymphocytes B et T, nécessaires à la réaction du centre germinatif (GC). Nous expliquerons aussi les premières étapes d'expansion clonale et d'hypermutations somatiques (SHM) qui ont lieu dans la zone sombre (DZ) du GC, et qui permettent la production de milliers de lymphocytes B avec le même BCR à quelques mutations ponctuelles près, définissant leur degré d'affinité.

Dans le second chapitre, nous nous focaliserons sur la différenciation des CC en cellules effectrices : les PC et les MBC. Nous aborderons ainsi les étapes de sélection des lymphocytes B les plus affins pour l'antigène et la commutation isotypique des Ig qui se déroulent dans la zone claire (LZ) du GC. Dans ce chapitre, nous parlerons des devenir possibles des CC et de leur sortie du GC. Nous évoquerons également la différenciation extra-folliculaire. Enfin, nous nous intéresserons à l'expression du CD23 par les lymphocytes B et de son utilisation comme marqueur de la différenciation. Dans ce cadre, nous évoquerons le cas du lymphome folliculaire (FL), où l'expression du CD23 est hétérogène et pourrait être en lien avec un blocage de la différenciation des cellules tumorales.

Le troisième chapitre sera consacré au facteur de transcription différentiellement exprimé dans les chondrocytes 2 (DEC2) : sa structure, son implication au cours des cancers et enfin les éléments connus concernant son rôle dans la différenciation lymphocytaire T et B. Nous parlerons également de son paralogue DEC1, un facteur souvent associé à DEC2 et impliqué dans des fonctions similaires.

Enfin, les travaux que j'ai effectués pendant mon doctorat seront exposés dans la partie « Résultats ». Ainsi, dans la première partie, nous montrerons que les CC qui perdent l'expression du CD23 membranaire et la capacité de réponse à l'IL-4 et au CD40L, sont ceux qui se différencient en PC. Ensuite, dans la deuxième partie des résultats, nous nous intéresserons au rôle de DEC2 dans la différenciation plasmocytaire et la fonctionnalité des PC. Pour terminer, les résultats préliminaires effectués sur les cellules tumorales de FL CD23pos et CD23neg seront présentés dans la troisième partie des résultats.

Chapitre 1 :

La différenciation des lymphocytes B naïfs en centrocytes

Les cellules hématopoïétiques sont produites dans la moelle osseuse, qui correspond à l'organe lymphoïde primaire. Ainsi, la lymphopoïèse B démarre après que les cellules souches hématopoïétiques se soient engagées dans la différenciation en précurseurs lymphoïdes communs CD34⁺ (Kondo M *et al.*, Cell, 1997). Ces précurseurs donnent ensuite une population CD7⁻ CD10⁺ qui évolue ensuite en lymphocytes pro-B (CD34⁺ CD10⁺ CD19⁺). Ils entament les recombinaisons VDJ des gènes des chaînes lourdes des Ig *via* l'activité endonucléase des enzymes codées par les gènes activant les recombinaisons 1 et 2 (*RAG-1* et *-2*) pour former des chaînes lourdes complètes (Hardy R *et al.*, J Exp Med, 1991 ; Tonegawa S, Nature, 1983). Les lymphocytes pré-B perdent l'expression du CD34 et expriment la chaîne lourde membranaire μ et une pseudo-chaîne légère, donnant ainsi un pré-BCR (Ker W *et al.*, Int Immunol, 1989 ; Tsubata T et Reth M, J Exp Med, 1990) dont l'expression réprime celle de *RAG-1* et *RAG-2* (Grawunder U *et al.*, Immunity, 1995). L'assemblage des chaînes lourdes et légères avec un réarrangement productif permet l'expression d'un BCR IgM membranaire au stade B immatures. Les cellules reconnaissant un antigène survivent, y compris les auto réactives : c'est la sélection positive. Entre 55 à 75% de ces cellules produisent des Ig qui reconnaissent des antigènes endogènes (Wardemann H *et al.*, Science, 2003). Ces cellules peuvent 1) subir une révision du BCR (editing) qui va lever la reconnaissance des antigènes endogènes ou empêcher les cellules de répondre à l'antigène et devenir anergiques, 2) mourir par apoptose, c'est le cas pour près de 80% d'entre elles (délétion clonale) (Rolink AG *et al.*, Eur J Immunol, 1998), ou 3) survivre et devenir « B ignorants ». Après cette sélection négative (tolérance centrale), les lymphocytes B immatures quittent la moelle osseuse et rejoignent les circulations sanguine et lymphatique. A ce stade, les lymphocytes B sont dits « transitionnels ». Les lymphocytes transitionnels 1 (T1) (CD38^{fort} CD24^{fort} CD10^{fort} CD21^{faible} CD23^{faible} IgM^{fort}) proviennent directement de la moelle osseuse et évoluent en T2 (CD38⁺⁺ CD24^{fort} CD10⁺ CD21^{faible} CD23^{fort} IgM^{fort}) puis en T3 (CD24^{fort} CD21^{faible} CD23⁺ IgM^{faible}) : une sous-population intermédiaire entre les T2 et les NBC. Les lymphocytes T2 résident dans la rate et se différencient ensuite en cellules matures de type NBC (CD19⁺ IgM^{faible} IgD⁺ CD23⁺). (Palanichamy A *et al.*, J Immunol, 2009). A ce stade, les lymphocytes matures subissent la tolérance périphérique afin d'éliminer ou d'inactiver les cellules reconnaissant des antigènes du soi non détectés dans la moelle osseuse. Ces lymphocytes circulent dans l'organisme et notamment dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) afin de rencontrer l'antigène pour lequel ils sont spécifiques. En cas de rencontre, les NBC peuvent soit se différencier

directement en PC peu affins pour l'antigène (CD19⁺ CD20⁻ CD38^{fort} CD138⁺) ou en MBC (principalement CD27⁺) ; soit interagir avec le lymphocyte T spécifique lui aussi de cet antigène, et initier une différenciation extra-folliculaire rapide, ou plus longue : la réaction du GC (CD19⁺ CD20⁺ CD38⁺ CD10⁺) pour se différencier en PC hautement affins pour l'antigène. Les sous-populations dérivant des différents stades de maturation sont ainsi caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques (**Tableau 1**).

Type cellulaire	Phénotype	Marqueurs de sous-populations
Transitionnel 1 (T1)	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD10 ⁺ CD24 ^{fort} CD38 ^{fort}	
Transitionnel 2 (T2)	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD10 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺	
Transitionnel 3 (T3)	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD10 ⁻ CD24 ^{+/faible} CD38 ^{+/faible}	
Mature – Naïf	IgD ⁺ CD27 ⁻ CD10 ⁻ CD24 ^{+/faible} CD38 ^{+/faible}	CD23, CD69, CD80, CD86
Mémoire double négatif	IgD ⁺ CD27 ⁻	CD21, CD24, CD95, CXCR3
Mémoire non switché	IgD ⁺ CD27 ⁺	CD1c, CD21, CD24
Mémoire IgM	IgD ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺	CD1c, CD21, CD24
Mémoire switché	IgD ⁻ IgM ⁺ CD27 ⁺	CD21, CD24, CD95, CXCR3
Plasmablaste	IgD ⁻ CD27 ^{fort} CD38 ^{fort} CD138 ⁻	CD20
Plasmocyte	IgD ⁻ CD27 ^{fort} CD38 ^{fort} CD138 ⁺	CD20

Tableau 1 : Les marqueurs membranaires des lymphocytes B matures chez l'Homme. Adapté de Kaminski DA et al., *Front Immunol*, 2012.

I. Le microenvironnement de la différenciation terminale B dans les amygdales palatines

Les OLS sont les lieux de rencontre entre les antigènes et les cellules immunitaires puisqu'ils filtrent le sang et la lymphe. Le type d'antigène détermine l'OLS ciblé pour la réaction immune. Ils sont composés de la rate ; des ganglions lymphatiques et des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) qui comprennent les amygdales palatines, les tissus lymphoïdes digestifs (GALT) avec notamment les plaques de Peyer ; et les tissus lymphoïdes respiratoires (BALT). Ces organes ont une structure commune et des composés cellulaires particuliers qui leur permettent d'assurer la réponse immunitaire humorale. Ici, nous nous intéresserons principalement au cas des amygdales palatines.

1) L'organisation structurale des amygdales

Bien que les amygdales palatines aient une structure similaire à celle des autres OLS, elles présentent toutefois quelques particularités. En effet, les amygdales ne sont pas entièrement encapsulées et elles sont composées d'épithélium, caractéristiques qu'elles ne partagent pas avec la rate et les ganglions. De plus, et contrairement aux ganglions, les amygdales ne possèdent pas de vaisseaux lymphatiques afférents (Perry M et Whyte A, *Immunol Today*, 1998). Enfin, on trouve les lymphocytes T CD4+ en plus grande quantité dans les amygdales en comparaison à la rate, du fait de la présence constante d'antigènes aérodigestifs (Geißler K *et al.*, *Plos One*, 2017).

La structure des amygdales a été caractérisée par l'utilisation de la microscopie électronique (Jovic M *et al.*, Rom J Morphol Embryol, 2015) et par des colorations de coupes (**Figure 1**). D'abord, elles sont recouvertes d'un épithélium avec des jonctions intercellulaires fortes qui forment une première barrière contre les pathogènes. Aussi, elles contiennent des cryptes recouvertes d'un épithélium qui diffère de l'épithélium de surface par la présence de lymphocytes, de cellules M (des cellules associées aux cellules dendritiques (DC) et spécifiques des amygdales) et de DC plasmacytoïdes ou classiques, nichés dans les cryptes. Contrairement aux épithéliums classiques, les amygdales sont vascularisées, ce qui facilite l'import/export des cellules immunitaires et des antigènes. Ainsi, les cellules arrivent dans les amygdales par le biais des veinules à endothélium épais (HEV) qui se situent dans le para-cortex (Hafeez A *et al.*, Ann Pak Inst Med Sci, 2008). Dans les HEV, les lymphocytes expriment des molécules d'adhésion telles que la protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1 (VCAM-1), la protéine d'adhésion vasculaire 1 (VAP-1), la sélectine P et la sélectine L, qui permettent leur adhésion aux cellules endothéliales et leur migration jusqu'au tissu (Perry M et Whyte A, Immunol Today, 1998). Dans le para-cortex, on trouve des lymphocytes T, des cellules fibroblastiques réticulaires (FRC) qui favorisent la survie et la migration des lymphocytes, et des DC qui présentent les antigènes aux lymphocytes. Dans cette zone, on trouve également des structures arrondies, composées principalement de NBC, de cellules dendritiques folliculaires (FDC) et de macrophages : les follicules primaires. Lors d'une immunisation ou d'une infection, ces follicules primaires peuvent évoluer en follicules secondaires qu'on appelle les GC. Ces GC peuvent être entourés par la zone du manteau, toujours en regard de la crypte, qui correspond à des lymphocytes B du follicule primaire poussés sur le côté lors de l'expansion du GC. On y trouve donc des NBC qui expriment l'IgM, l'IgD, le CD21 et le CD23, des cellules qui s'apparentent aux lymphocytes B1 murins et qui produisent des anticorps auto réactifs naturels de type IgM et CD23⁺ et des MBC. Enfin, bien que principalement décrite dans la rate, on trouve également une zone marginale (MZ) dans les amygdales. Les lymphocytes B de la MZ (MZB) s'apparentent à ceux qui existent dans la rate mais ils expriment plus faiblement le CD21 et l'IgG. Cette zone est très hétérogène et est composée principalement de MBC et de lymphocytes B T-indépendants qui n'expriment pas le CD23 (Dono M *et al.*, Ann NY Acad Sci, 2003).

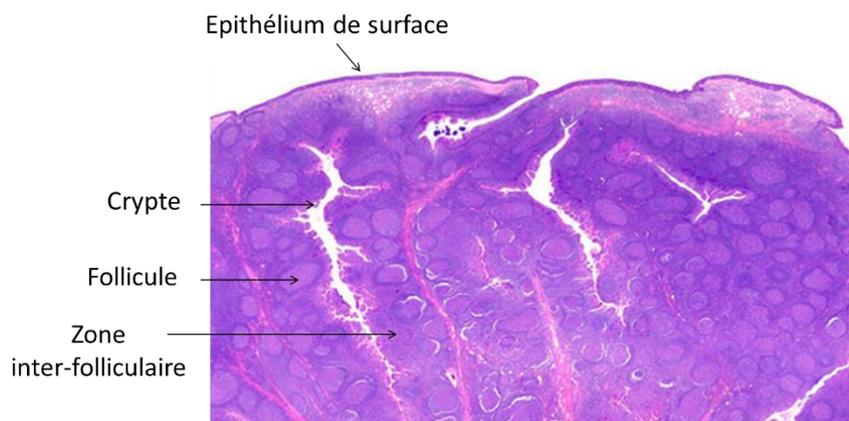


Figure 1 : La structure des amygdales palatines. Coloration à l'Hématoxyline-Eosine-Safran d'une coupe d'amygdale. On peut localiser l'épithélium de surface, les cryptes avec leur épithélium, les follicules et la zone inter-folliculaire dans le para-cortex.

Source : Université de Yale : http://medcell.med.yale.edu/histology/immune_system_lab/palatine_tonsil.php

2) Les acteurs de la différenciation terminale B dans les amygdales

Peu de revues détaillent les différents types cellulaires présents spécifiquement dans les amygdales. Toutefois, leur structure et leurs fonctions étant similaires à celles des autres OLS, on y retrouve globalement les mêmes cellules.

a. Les lymphocytes

i. Les lymphocytes B

Plusieurs populations de lymphocytes B sont présentes dans les amygdales. On trouve d'abord les NBC ou lymphocytes B folliculaires qui proviennent de la circulation sanguine et forment les follicules des amygdales en entrant par les HEV. Une fois l'antigène rencontré, ces cellules peuvent soit se différencier directement en MBC ou en PC sécréteurs d'Ig, peu affins pour l'antigène et à courte durée de vie, *via* la différenciation extra-folliculaire ; soit effectuer la réaction du centre germinatif et se différencier en MBC ou en PC hautement spécifiques de

l'antigène et à longue durée de vie. L'engagement dans la différenciation est en partie orienté par l'affinité du BCR pour l'antigène (Lechouane F *et al.*, Eur J Immunol, 2012). En effet, une forte affinité conduit à une différenciation directe en PC, alors qu'une affinité plus faible conduit à la différenciation dans le GC, ce qui permet d'améliorer l'affinité du BCR. De plus, le type d'antigène conditionne la nature de la différenciation. En effet, soit la différenciation nécessite la présence d'un lymphocyte T, c'est le cas de la réaction du GC et de la différenciation extra-folliculaire T-dépendante, soit la présence d'un lymphocyte T n'est pas requise : c'est le cas de la différenciation extra-folliculaire T-indépendante. Enfin, la capacité d'intégration de la multitude de signaux fournis par le microenvironnement conditionne également le devenir des NBC.

Les PC produits dans les amygdales peuvent produire tous les types d'Ig (Steiniger BC *et al.*, Histochem and Cell Biol, 2020), mais ils produisent en grande partie des IgA qui permettent la protection des muqueuses en empêchant la fixation des bactéries et des virus sur l'épithélium du pharynx (Brandtzaeg FL *et al.*, Acta Oto-Laryngol, 1996). Ainsi, on y retrouve 18 à 30% d'IgA (dont 95% d'IgA1), plaçant les amygdales comme productrices principales d'IgA ; et 55 à 72% d'IgG. Les auteurs l'expliquent notamment par le fait que les amygdales sont stimulées en permanence par la présence constante de pathogènes aérodigestifs. Chez les adultes, la différenciation des lymphocytes B en PC diminue avec l'âge, et ce, de manière irréversible (Brandtzaeg P, Int J Pediatric Otor, 2003).

Il existe d'autres types de lymphocytes B dans les amygdales. Ils participent principalement à la différenciation extra-folliculaire T-indépendantes : il s'agit des MZB. Ces cellules ont pour rôle de capter les antigènes pour les amener dans les follicules (Arnon TI *et al.*, Nature, 2013) et d'activer les lymphocytes T CD4⁺ dans la zone T, dans le para-cortex (Cerutti A, Cols M, Puga I, Nat Rev Immunol, 2013). Par ailleurs, les MZB partagent des caractéristiques communes aux MBC dont l'expression du CD27 et leur localisation dans la MZ. Toutefois, ces cellules sont localisées dans des niches micro-anatomiques spécifiques et différentes de celles des MBC (Zhao Y *et al.*, Nat Commun, 2018).

ii. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T CD4⁺ sont présents en plus grand nombre dans les amygdales que dans les autres OLS. De plus, en cas d'inflammation chronique, on trouve une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs qui répondent plus faiblement à une stimulation du récepteur des lymphocytes T (TCR) que les patients sains puisqu'ils expriment plus fortement à l'état basal le marqueur d'activation CD69. Cela s'explique aussi par le fait que ces lymphocytes T sont en contact permanent avec des antigènes, puisque les amygdales sont des sites très inflammatoires. Aussi, ces lymphocytes T expriment plus fortement le signal inhibiteur de mort cellulaire programmée 1 (PD-1). Ils seraient donc exposés à des conditions immuno-suppressives plus importantes que les LT normaux pour éviter des sur-inflammations (Geißler K *et al.*, Plos One, 2017).

Les lymphocytes T sont situés dans la zone inter-folliculaire, aussi appelée « zone T ». Plusieurs sous-catégories de lymphocytes T CD4⁺ participent à la différenciation terminale B, dont les lymphocytes Th2, les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (Tfh) et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Ainsi, les lymphocytes Th2 favorisent la réponse humorale en augmentant la capacité des lymphocytes B à produire des Ig notamment *via* la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Cantor H *et al.*, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol, 1977). Les lymphocytes pré-Tfh activent les lymphocytes B et initient la réaction du GC. Ce sont les précurseurs des lymphocytes Tfh, des cellules situées dans la LZ du GC. Leur rôle majeur est de sélectionner les clones B les plus affins pour l'antigène. Ces lymphocytes seront décrits plus précisément dans le chapitre 2. Les lymphocytes Treg CD4⁺ Foxp3⁺ (boîte Forkhead 3) CD25⁺ ont une fonction immunosuppressive qui permet à l'organisme de maintenir la tolérance au soi et d'éviter l'auto-immunité (Corthay A, Scand J Immunol, 2009). Une sous-population de Treg CXCR5⁺ est spécifiquement retrouvée dans les GC : les lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr) qui régulent la production de PC en participant à la sélection des clones les plus affins (Kim CH, Hashimoto-Hill S et Kang SG, Meth Mol Biol, 2015).

b. Les autres cellules hématopoïétiques

i. Les cellules dendritiques

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes, tout comme les macrophages et les lymphocytes B. Ainsi, le rôle des DC est de capturer les antigènes, les dégrader, les présenter sur le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) et d'activer les lymphocytes T spécifiques de ces antigènes. Il en existe plusieurs sous-catégories qui jouent des rôles variés dans la réponse immunitaire. Ainsi, dans l'amygdale, il existerait cinq populations de DC (Summers KL *et al.*, Am J Pathol, 2001). Toutefois, il existe majoritairement deux types de DC qui participent à la différenciation terminale : les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC classiques. Les pDC sont des cellules qui répondent principalement aux infections virales mais elles interviennent aussi dans la présentation des antigènes (Rodriguez PF *et al.*, Nat Immunol, 2018). Les DC classiques sont retrouvées en plus faible quantité et sont caractérisées par l'expression du CD11c, elles expriment plus fortement le CMH II et les molécules d'activation CD83 et CD86, ce qui leur permet d'activer plus facilement les lymphocytes T. Les DC des amygdales produisent principalement de l'IL-17 et du facteur de croissance transformant β (TGF- β). Ces DC activent moins bien les lymphocytes T que les DC dérivées de monocytes sanguins. En effet, lorsqu'elles sont cultivées avec des lymphocytes T, ces derniers produisent moins de cytokines et leur prolifération est diminuée. Ces données suggèrent que les DC participent activement à maintenir la tolérance immunitaire dans les amygdales (Hallissey CM *et al.*, J Infect Dis, 2014). L'équipe de Smed-Sørensen a également tiré ces conclusions récemment en comparant les réponses des pDC d'amygdales aux pDC du sang en réponse au virus de l'*Influenza A*. Ainsi, ils ont mis en évidence que les pDC d'amygdales répondaient moins bien que les pDC sanguines, avec notamment une baisse de la sécrétion d'IFN- α (Vangeti S *et al.*, J Immunol, 2019).

ii. Les macrophages

Les macrophages résidents ont un rôle de cellules présentatrices d'antigènes et interviennent également dans la phagocytose des cellules endommagées, des débris cellulaires ou des antigènes opsonisés pour maintenir l'homéostasie (Roberts AW, Immunity, 2017). Il existe plusieurs sous-types de macrophages, en fonction de l'expression de certains récepteurs et de leur localisation. Dans la MZ, on trouve les macrophages de la zone marginale (MZM) et les macrophages métallophiles marginaux (MMM) qui sont impliqués dans le nettoyage des débris cellulaires et dans la tolérance aux antigènes du soi. Les « macrophages à corps tangibles » (TBM), se situent dans les follicules B où ils phagocytent les lymphocytes B apoptotiques (Tabe H *et al.*, Acta Otolaryngol Suppl, 1996).

c. Les cellules stromales

Les cellules stromales organisent la structure des OLS et participent grandement aux réactions immunitaires, notamment en attirant les cellules dans les OLS, mais aussi en leur prodiguant des molécules de survie. Elles ont été principalement étudiées dans les ganglions. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de la podoplanine (GP38) et le fait qu'elles n'expriment ni marqueurs épithéliaux, ni marqueurs endothéliaux (Chang JE et Turley SJ, Trends Immunol, 2015). Les principales cellules présentes dans les amygdales et qui participent à la différenciation terminale B sont récapitulées dans le **Tableau 2**.

Type de cellule stromale	Localisation	Phénotype	Fonction
Cellule dendritique folliculaire (FDC)	Zone claire du centre germinatif	GP38 ⁺ CD21/CD35 ⁺	- Organisation du centre germinatif - Différentiation et sélection des lymphocytes B
Cellule réticulaire exprimant le CXCL12 (CRC)	Zone sombre du centre germinatif	GP38 ⁺ CD21/CD35 ⁻	- Organisation de la zone sombre
Cellule réticulaire marginale (MRC)	Dans le sinus sous-capsulaire dans les ganglions lymphatiques	GP38 ⁺ CD21/CD35 ⁻ MAdCAM ⁺	- Livraison des antigènes
Cellule réticulaire fibroblastique (FRC)	Zone T	GP38 ⁺ CD21/CD35 ⁺	- Livraison des antigènes - Recrutement des lymphocytes B et T et des DC - Survie des lymphocytes B

Tableau 2 : Les principales cellules stromales lymphoïdes participant à la différenciation terminale des lymphocytes B. Adapté de Lamaison C et Tarte K, *Immunol Letters*, 2019.

Les FDC sont des cellules localisées dans les follicules primaires puis dans la zone claire (LZ) du GC. Elles produisent principalement le ligand de la chimiokine à motif CXC 13 (CXCL13) qui attire les CC et les lymphocytes Tfh dans la LZ du GC (Ansel KM *et al.*, *Nature*, 2000 ; Roozendaal R *et al.*, *Immunity*, 2009). Ces cellules ont également un rôle dans la sélection des CC puisqu'elles présentent les antigènes au niveau de leurs longs prolongements cytoplasmiques, et que seuls les CC qui reconnaissent l'antigène pour lequel ils sont spécifiques vont interagir avec le lymphocyte Tfh spécifique lui aussi, et survivre (El Shiks M E *et al.*, *Trends Immunol*, 2010). En parallèle, les lymphocytes B produisent de la lymphotoxine (LT) $\alpha 1\beta 2$ et du TNF- α , indispensables pour le développement des FDC (Ansel KM *et al.*, *Nature*, 2000). Les lymphocytes B sont donc essentiels à la genèse et à la survie des FDC. Ainsi, les souris qui présentent le syndrome d'immunodéficience combinée sévère et donc une absence de lymphocytes B, n'ont pas de FDC (Melchers F *et al.*, *Curr Opin Immunol*, 1995). Par ailleurs, le bon positionnement des FDC est en parti régulé par l'IL-4, puisqu'en son absence, on note une réduction de 50 à 70 % des FDC dans le GC (Cortes-Selva D *et al.*, *Eur J Immunol*, 2019). Enfin, les FDC fournissent des signaux de survie aux lymphocytes B (Wang X *et al.*, *J Exp Med*, 2011) comme l'IL-6 (Ansel KM *et al.*, *Nature*, 2000) et le facteur activant les lymphocytes B (BAFF ou Blys) (Gorelik L *et al.*, *J Exp Med*, 2003).

Les cellules réticulaires exprimant le CXCL12 (CRC), récemment décrites, s'apparentent aux FDC. En effet, elles sont également localisées dans le follicule B et plus particulièrement dans la zone sombre (DZ) du GC. Comme leur nom l'indique, elles produisent du CXCL12 qui attire et maintient dans la DZ les lymphocytes B proliférants : les centroblastes (CB), puisqu'ils expriment le récepteur aux chimiokines à motif CXC 4 (CXCR4) : le récepteur du CXCL12 (Rodda LB *et al.*, J. Immunol, 2015). Une récente étude a caractérisé plus précisément ces cellules en utilisant le séquençage du transcriptome (RNAseq) au niveau cellule unique. Elle révèle notamment que « les FDC de la DZ » (CRC) et celles de la LZ partagent une origine cellulaire commune. De plus, ces cellules expriment différemment certains marqueurs clés, par exemple, les FDC de la LZ expriment CD21 et CD23, ce qui n'est pas le cas des FDC de la DZ (Pikor NB *et al.*, Nat Immunol, 2020).

Les FRC sont localisées dans la zone inter-folliculaire. Elles forment un réseau réticulaire et sécrètent le ligand de chimiokine à motif CC 19 (CCL19) et le CCL21, qui permettent le recrutement et la migration dans la MZ et dans la zone T des cellules qui expriment le récepteur correspondant : le récepteur aux chimiokines à motif CC 7 (CCR7) (Reif K *et al.*, Nature 2002 ; Mueller S N et Ahmed R, Immunol Rev, 2008). La production de ces cytokines par les FRC permet également aux lymphocytes d'être constamment en mouvement et de scanner les antigènes sur les cellules dendritiques (Luther S A *et al.*, PNAS, 2000). Alors que les FRC ont toujours été décrites comme des cellules de soutien, une récente étude révèle leur rôle dans la régulation des étapes finales de la différenciation B. Ainsi, les FRC produisent du CCL2 qui se fixe sur le récepteur au complément 2 (CR2 ou CD21) présent sur les monocytes. Ces derniers produisent ensuite des espèces réactives de l'oxygène qui provoquent la mort des PC (Dasoveanu DC *et al.*, Sci Immunol, 2020). Cette étude va de pair avec celle de l'équipe de Galipeau qui révèle que la production de CCL2 par les cellules stromales diminue la production d'Ig en supprimant la signalisation passant par le transducteur de signaux et l'activateur de transcription 3 (STAT3), et en augmentant l'expression de la protéine de boîte appariée 5 (PAX5) dont l'expression est associée à un phénotype B et non PC (Rafei M *et al.*, Blood, 2008) (**Figure 2**).

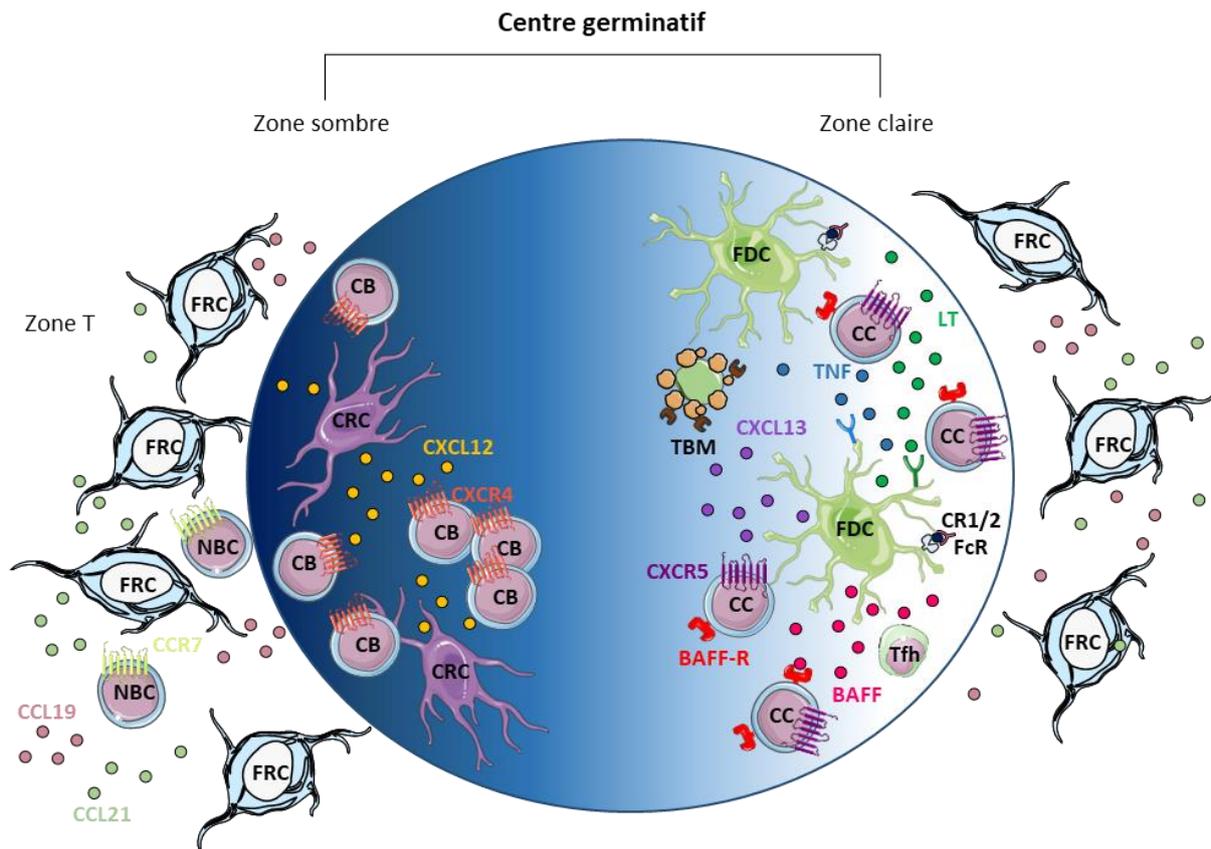


Figure 2 : Les cellules stromales impliquées dans la différenciation terminale des lymphocytes B. Les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) forment un maillage dans la zone T et sécrètent du ligand de la chimiokine à motif CC 19 (CCL19) et du CCL21. Ces chimiokines permettent le recrutement des lymphocytes B naïfs (NBC) qui expriment le récepteur de la chimiokine à motif CC 7 (CCR7). Dans la zone sombre, les cellules réticulaires produisant les chimiokines à motif CXCL 12 (CXCL12) (CRC) attirent et maintiennent les centroblastes (CB) qui expriment le récepteur aux chimiokines à motif CXC 4 (CXCR4). Dans la zone claire, les cellules dendritiques folliculaires (FDC) exprimant les récepteurs au complément 1 et 2 (CR1/2 ou CD35/CD21) produisent du CXCL13 qui attire les centrocytes (CC) et les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (Tfh), qui expriment le CXCR5 en retour. Elles fournissent également du facteur activant les lymphocytes B (BAFF) aux CC. Les FDC survivent grâce au facteur de nécrose tumorale α (TNF) et à la lymphotoxine α 182 (LT) produits par les CC. Les macrophages à corps tangibles (TBM) permettent l'élimination des débris liés à la sélection des CC (Adapté de Lamaison C et Tarte K, *Immunol Letter*, 2019).

Enfin, les cellules réticulaires marginales régulent l'entrée des cellules dans la zone T (Katakai T *et al.*, *J Immunol*, 2008 ; Koning JJ et Mebius RE, *Trends Immunol*, 2012) et transfèrent les antigènes des DC aux lymphocytes B (Phan TG *et al.*, *Nat Immunol*, 2009). Bien qu'elles soient peu caractérisées, on sait qu'elles expriment la molécule d'adhésion cellulaire de l'adhésine vasculaire mucoale 1 (MAdCAM-1) et qu'elles sécrètent du CXCL13 (Katakai T *et al.*, *J Immunol*, 2008). Une étude récente suggère que ces cellules auraient un rôle dans la phagocytose des lymphocytes B apoptotiques (Sato K *et al.*, *J. Immunol*, 2018).

II. Les étapes précoces de l'engagement dans la différenciation terminale B

Les NBC sont des cellules quiescentes qui circulent dans l'organisme et scrutent les DC des OLS afin d'assurer une veille immunologique. Leur arrivée dans les GC est un processus finement contrôlé par des molécules attractives telles que les chimiokines et par des molécules d'adhésion.

1) L'arrivée des cellules effectrices dans les amygdales

L'entrée des cellules dans les OLS a principalement été étudiée dans les ganglions lymphatiques. Les études sur les amygdales ne semblent pas indiquer de différences avec les ganglions, ce qui suppose que les mécanismes impliqués sont similaires. Toutefois, les amygdales ne possèdent pas de vaisseaux lymphatiques afférents et les cellules arrivent par le biais des HEV. Ainsi, les NBC commencent par traverser les HEV *via* l'expression successive de molécules d'adhésion telles que l'intégrine : antigène associé aux fonctions lymphocytaires (LFA-1) qui se lie à la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1) et à ICAM2 sur les cellules endothéliales. Une fois dans l'OLS, les NBC restent à proximité des HEV pendant 3 à 4 heures (Park C *et al.*, Blood, 2012) et se rapprochent des DC (Qi H *et al.*, Science, 2006). Les NBC expriment le CCR7 qui leur permet de migrer le long des FRC qui produisent du CCL19 et du CCL21 dans la zone T. Ensuite, les NBC expriment EB12 (GPR183) : le récepteur des oxystérols, qui permet leur localisation autour des follicules (Pereira JP *et al.*, Nature, 2009). Enfin, ils expriment le CXCR5 : le récepteur au CXCL13 produit par les FDC, qui permet leur entrée dans les follicules B (Bajénoff M *et al.*, Immunity, 2006).

Les lymphocytes T naïfs traversent les HEV de la même manière que les NBC, et expriment en plus la L-sélectine (CD62L). La production de CCL19 et de CCL21 par les FRC dans la zone T attire les lymphocytes T *via* l'expression du CCR7 (Bajénoff M *et al.*, Immunity, 2006) (**Figure 3**).

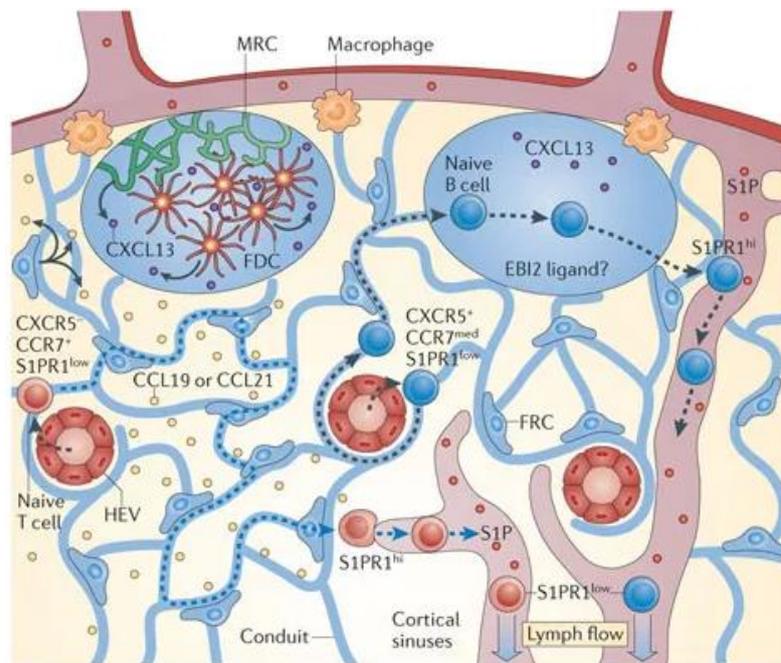


Figure 3 : L'entrée des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires *via* les veinules à endothélium épais. Les lymphocytes B et T naïfs entrent dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) *via* les veinules à endothélium épais (HEV) et interagissent avec des cellules dendritiques (DC) situées autour des HEV. Ils migrent ensuite le long des cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) jusqu'à la zone T, *via* l'expression du récepteur de la chimiokine à motif CC 7 (CCR7), en réponse à la chimiokine à motif CC 19 (CCL19) et au CCL21 produits par les FRC. L'entrée dans les follicules B est contrôlée par l'expression d'EBI2 et par la sécrétion du ligand de la chimiokine à motif CXC 13 (CXCL13) par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les cellules réticulaires marginales (MRC), reconnue par le CXCR5 des lymphocytes B naïfs. Une fois l'OLS exploré, les lymphocytes augmentent l'expression du récepteur à la sphingosine-1-phosphate (S1P1R) qui permet leur sortie de l'OLS en suivant le gradient de sphingosine-1-phosphate (S1P) (Girard JP *et al.*, Nat Rev Immunol, 2012).

Les DC migrent dans les OLS, également grâce au CCR7 et à la L-sélectine (Seth S *et al.*, J Immunol, 2011). Ces cellules régulent l'entrée des NBC et des lymphocytes T naïfs dans les ganglions en produisant notamment du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui promeut la formation des HEV, et la production de CCL21 par les TFR (Wendland M *et al.*, Immunity, 2011).

Par ailleurs, d'autres molécules permettent l'entrée des lymphocytes dans les OLS, dont l'autotaxine (ATX, codée par *ENPP2*) qui est une enzyme qui permet la conversion de la lysophosphatidylcholine (LPC) en acide lysophosphatidique (LPA). Ce LPA est fortement exprimé et sécrété dans les HEV ce qui permet aux lymphocytes de s'y fixer avec une forte affinité et ainsi d'entrer dans les OLS (Kanda H *et al.*, Nat Immunol, 2009).

Les études chez la souris révèlent que les lymphocytes B explorent les ganglions pendant près de 24 heures alors que les lymphocytes T n'y restent que 8 à 12 heures (Tomura M *et al.*, PNAS, 2008). Malgré cette longue période dans les ganglions, la majorité des lymphocytes B ne rencontre pas l'antigène spécifique de leur BCR. Dans ce cas, les lymphocytes B repartent dans la circulation sanguine en suivant le gradient de sphingosine-1-phosphate (S1P) en exprimant le récepteur S1PR1 (Gohda M *et al.*, J Immunol, 2008 ; Girard JP *et al.*, Nat Rev Immunol, 2012). Ce gradient de S1P peut être produit par l'ATX (Clair T *et al.*, Cancer Res, 2003).

2) La pré-activation des lymphocytes B naïfs

Après une infection ou une immunisation, l'antigène entre dans les OLS *via* la circulation sanguine au travers des HEV. L'antigène est sous forme soluble, de complexe immun, ou lié à des cellules présentatrices d'antigènes telles que les DC, les macrophages ou les lymphocytes B (H. Qi *et al.*, Science, 2006 ; Hong S *et al.*, Immunity, 2018). Ces cellules exposent les antigènes en surface *via* les récepteurs aux fragments cristallisables (Fc) des Ig et les récepteurs au complément (CR). Les NBC et les MBC scrutent ensuite ces cellules à la recherche de l'antigène immunogène. Sa reconnaissance et sa fixation s'effectuent par le BCR, qui est composé d'une Ig membranaire mIgM et/ou mIgD, associée à deux chaînes : CD79A (Ig α) et CD79B (Ig β) qui transduisent le signal reçu grâce à des motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM). La fixation de l'antigène sur le BCR conduit à des changements conformationnels qui permettent le recrutement de protéines qui activent la cascade de signalisation. Ainsi, les motifs ITAM du CD79A et du CD79B sont phosphorylés par la protéine tyrosine kinase LYN, formant ainsi des sites d'ancrage pour la tyrosine kinase

de la rate (SYK). La fixation de cette dernière sur les chaînes CD79A et CD79B lui permet de phosphoryler et d'activer la protéine se fixant aux lymphocytes B (BLNK) qui phosphoryle à son tour la protéine tyrosine kinase de Burton (BTK) et la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2). La PLC γ 2 induit une augmentation du calcium intra-cellulaire (Ca^{2+}), active la voie phosphoinositide-3-kinase / AKT (PI3K/AKT) qui promeut la survie des lymphocytes B et active la protéine kinase C (PKC). Enfin, la PKC active la voie des kinases activées par des signaux extra-cellulaires (ERK) impliquées dans la prolifération, et la voie du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) impliquée dans la survie. Ces signaux conduisent à une diminution de l'expression de la protéine du lymphome 6 des lymphocytes B (BCL6) et à la production et la sécrétion des chimiokines CCL3 et 4, toutes les deux impliquées dans l'attraction des lymphocytes T. La signalisation BCR est facilitée par les co-récepteurs CD19, CD21 et CD81. Elle peut être inhibée par le CD22 (un membre de la famille des lectines de type Ig liant l'acide sialique : SIGLEC), le CD5, le CD32 (le récepteur Fc des IgG2b (Fc γ IIb)) *via* le recrutement des phosphatases contenant le domaine d'homologie SRC 1 et 2 (SHP1 et SH2), et le CD45 (**Figure 4**). L'activation de la voie BCR s'accompagne de l'internalisation actine-dépendante et de la dégradation de l'antigène dans les lysosomes. *In fine*, le lymphocyte B activé présente en surface des peptides d'antigènes sur le CMH II. La signalisation BCR se termine lorsque la protéine kinase SRC C-terminale (CSK) active l'ubiquitine ligase du lymphome de la lignée Casistas B (CBL), qui elle-même inhibe le BCR (Bojarczuk K *et al.*, Blood Cells Mol Dis, 2015).

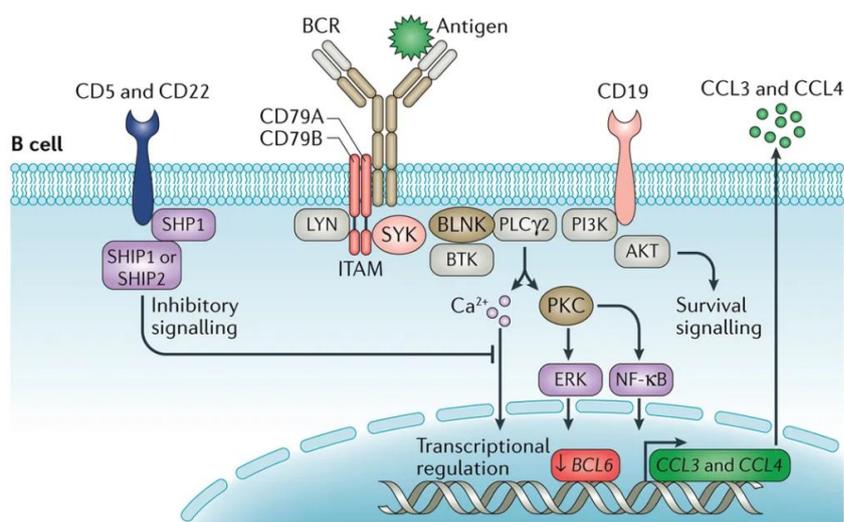


Figure 4 : La signalisation du récepteur du lymphocyte B. La reconnaissance de l'antigène par le récepteur du lymphocyte B (BCR) permet le recrutement de la protéine kinase LYN qui phosphoryle les chaînes CD79A et CD79B au niveau des motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM). Ces phosphorylations permettent le recrutement de la tyrosine kinase de la rate (SYK). SYK phosphoryle la protéine se fixant au lymphocyte B (BLNK) qui elle-même phosphoryle la tyrosine kinase de Burton (BTK). Ces phosphorylations conduisent à l'activation la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2), qui elle-même engendre une augmentation de calcium (Ca^{2+}) ; active la voie de la protéine kinase C et la voie PI3K-AKT. Cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire active la voie des kinases activées par des signaux extracellulaires (ERK) et la voie du facteur nucléaire κB (NF- κB), qui induisent respectivement la prolifération et la survie du lymphocyte B. Ces signaux empêchent l'expression de la protéine du lymphome 6 des lymphocytes B (BCL6) et favorise la production et la sécrétion de chimiokine à motif CC 3 (CCL3) et de CCL4. Le CD5 et le CD22 inhibent la signalisation BCR en recrutant des phosphatases contenant le domaine d'homologie SRC 1 et 2 (SHP1 et SH2) (Burger JA et Wiestner A, Nat Rev Cancer, 2018).

La force du signal BCR influence la différenciation des NBC en PC. En effet, une stimulation BCR forte conduit à la différenciation extra-folliculaire *via* une augmentation de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 et CXCR5, ce qui permet la localisation en dehors du follicule. De plus, ces lymphocytes B diminuent l'expression du ligand du co-stimulateur induit par le lymphocyte T (ICOS-L), dont l'interaction avec son récepteur sur le lymphocyte T (ICOS) facilite l'interaction B-T. Dans ce cadre, les lymphocytes B diminuent également les molécules de co-stimulation CD84 et CD86. Ainsi, la force de stimulation du BCR des lymphocytes B contrôlent également la différenciation Tfh (Sacquin A *et al.*, Eur J Immunol, 2017).

Par ailleurs, les lymphocytes B peuvent reconnaître des antigènes avec des motifs particuliers présents sur des pathogènes (PAMP) comme les lipopolysaccharides (LPS), ou provenant des cellules endommagées de l'organisme (DAMP). Dans ce cas, l'activation du BCR n'est pas suffisante et l'activation synergique des récepteurs de type Toll (TLR) est nécessaire.

Ainsi, il existe 13 TLR dont l'activation est majoritairement associée à la protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MYD88) (Hua Z et Hou B, Cell Mol Immunol, 2012). En plus du signal induit par le BCR, les TLR transmettent un signal supplémentaire qui peut faciliter la différenciation T-dépendante des lymphocytes B en PC (Gantner BN *et al.*, J Exp Med, 2003 ; Ruprecht CR et Lanzavecchia A, Eur J Immunol, 2006) et T-indépendante (Bernasconi NL *et al.*, Blood, 2003).

Après activation du BCR, les NBC et les MBC réactivées par le lymphocyte T correspondant entament un cycle cellulaire en passant de la phase quiescente G0 du cycle à la phase G1 et prolifèrent abondamment. Elles sur-expriment les molécules de costimulation CD80 et CD86, et des molécules d'adhésion comme ICAM-1. Ces cellules expriment également d'une part le CCR7, qui leur permet de suivre les gradients de CCL19 et CCL21 produits par les FRC (Okada T *et al.*, J Exp Med, 2002), et d'autre part EBI2 qui leur permet de migrer jusqu'à la zone T (Cyster JG et Allen CDC, Cell, 2019). Elles diminuent également l'expression de S1PR1 afin de rester dans le tissu.

3) La pré-activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs

Dans la zone T, les cellules présentatrices d'antigènes et principalement les DC, interagissent avec les lymphocytes T CD4⁺. Ainsi, la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T s'effectue *via* son récepteur spécifique (TCR) et le complexe CMH II/peptide présent sur les DC. Les lymphocytes T ayant un répertoire TCR restreint, avec une forte affinité pour le peptide/CMH II sont ceux qui vont se différencier en cellule effectrice (Fazilleau N *et al.*, Nat Immunol, 2009).

L'imagerie intra-vitale chez la souris a permis de caractériser les interactions T-DC. Ainsi, ces interactions se déroulent en trois étapes successives. La première dure quelques minutes et jusqu'à huit heures et correspond à des interactions faibles et rapides. La seconde étape est caractérisée par des interactions longues qui se déroulent pendant les 12 à 24 heures

suyant l'infection. Enfin, la dernière étape se déroule pendant les 48 à 72 heures post-infection et nécessite des interactions d'au moins 10 minutes pour engager la différenciation des lymphocytes T en Tfh (Benson RA *et al.*, eLife, 2015). Ainsi, la pré-activation du lymphocyte T nécessite différents signaux fournis par les DC, tels que les signaux de costimulation du TCR de la famille B7 incluant CD40, OX40L et ICOSL, et des cytokines. L'activation du CD28 par ces molécules de costimulation augmente l'expression de *BCL6*, un gène clé dans la différenciation du lymphocyte T CD4+ en pré-Tfh et associé à la production d'IL-4, d'ICOS et du récepteur au CXCL13 : le CXCR5 (Walker LSK *et al.*, J Exp Med, 1999 ; Lintermann MA *et al.*, eLife, 2014). Le CD28 induit également la surexpression du CCR4 : le récepteur du CCL22 et du CCL17, qui permet aux lymphocytes pré-Tfh de migrer jusqu'aux cellules présentatrices d'antigène et sécrétrices de ces chimiokines (Ghia P *et al.*, Eur J Immunol, 2002 ; D'Ambrosio D *et al.*, J Immunol, 1998). L'activation du CD28 est également facilitée par l'interaction avec le CD80 et le CD86 fournis par les DC (Wang CJ *et al.*, PNAS, 2015). Par ailleurs, la voie des protéines homologues associées à la translocation 1 et 2 (NOTCH 1 et 2) est également impliquée dans la différenciation Tfh en favorisant l'expression de *BCL6*, *CXCR5*, *PD-1* et la production d'IL-21 et d'IL-4. Ces voies diminuent de ce fait l'expression de *BLIMP1* (ou *PRDM1*), un facteur de transcription inhibiteur de la différenciation Tfh (Auderset F *et al.*, J Immunol, 2013).

Parmi les cytokines produites par les DC qui favorisent la différenciation en lymphocyte Tfh, on trouve principalement l'IL-6 qui permet l'expression de *BCL6* et de l'IL-21 (Nurieva RI *et al.*, Science, 2009) mais empêche l'expression de l'IL-4 (Hercor M *et al.*, J Leukoc Biol, 2017). Les DC produisent également de l'IL-12 qui promeut l'expression d'ICOS, de *CXCR5* et d'IL-21 (Ma CS *et al.*, Immunol Cell Biol, 2009).

La différenciation des lymphocytes Tfh peut également être inhibée par les DC, les lymphocytes T eux-mêmes et les NBC, de manière à sélectionner les clones les plus affins pour l'antigène. Ainsi, les DC peuvent produire de l'IL-2 qui empêche la différenciation *via* l'induction de *BLIMP1*. L'augmentation d'expression de ce dernier inhibe l'expression de *BCL6* et de *CXCR5* (Kumar Krishnaswamy J *et al.*, Front Immunol, 2018). Ensuite, les lymphocytes T eux-mêmes peuvent limiter leur différenciation *via* l'expression du *CTLA-4* qui est en

compétition avec le CD28 pour les ligands CD80 et CD86 exprimés sur les DC. Ainsi, l'engagement de CTLA-4 par les lymphocytes T empêche leur différenciation (Peterson L *et al.*, Front Immunol, 2018), d'où son rôle « d'immunité checkpoint ». D'ailleurs, un blocage du CTLA-4 chez la souris entraîne un sur-engagement du CD28 et donc une augmentation du nombre de Tfh, qui conduit à une formation spontanée de GC (Wang CJ *et al.*, PNAS, 2015). Par ailleurs, il faut noter que parmi les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, seuls ceux qui reçoivent un signal TCR fort produisent de l'IL-2 et se différencient en Tfh. Ceux qui n'en produisent pas sont stimulés de manière paracrine par l'IL-2 produite par les Tfh, ce qui bloque l'expression de BCL6 et induit celle de BLIMP1, et donc, empêche leur différenciation en lymphocytes Tfh (DiToro D *et al.*, Science, 2018). Par ailleurs, la production d'IL-2 par les lymphocytes T active les DC CD25⁺ (IL-2RA), qui en retour expriment ICOSL et promeuvent la différenciation en lymphocytes pré-Tfh (Li J *et al.*, Nature, 2016). Enfin, l'interaction des lymphocytes T avec les NBC par le biais de PD-1/PD-L1 limite l'expression de CXCR5 par les lymphocytes T et empêche ainsi leur localisation dans les follicules B, ce qui régule la qualité et la quantité des lymphocytes pré-Tfh qui entrent dans le GC (Shi J *et al.*, Immunity, 2018).

Ces premières interactions dans la zone T permettent *in fine*, aux lymphocytes pré Tfh d'exprimer EB12 et donc de se localiser autour du follicule B, pour interagir avec le lymphocyte B activé correspondant.

4) La synapse B-T

Les lymphocytes B pré-activés et les pré-Tfh se rencontrent en dehors du follicule. Dans cette zone, plus de la moitié des contacts B-T forme des conjugués stables (Allen CDC *et al.*, Science, 2007) notamment par le biais des molécules d'adhésion ICAM-1 et 2 (versant lymphocyte B) et LFA-1 (versant lymphocyte T) (Zaretsky I *et al.*, J Exp Med, 2017), mais aussi par l'interaction CMH II/peptide (lymphocytes B) – TCR (lymphocytes T). Ainsi, la quantité de CMH II et leur liaison au TCR contribuent à la stabilité de l'interaction. Lors d'interactions faibles, les lymphocytes B s'engagent dans la différenciation extra-folliculaire pour former des

PB peu affins pour l'antigène (Chan TD *et al.*, J Immunol, 2009), ou expriment la cytidine désaminase induite par activation (AID, codée par *AICDA*) qui permet la production d'Ig commutés (Marshall JL *et al.*, Eur J Immunol, 2011). Les lymphocytes B et T pré-activés interagissent ensuite par le biais de molécules de costimulation : CD40/CD40L, ICOS/ICOSL (ICOS appartenant à la famille du CD28), PD-1/PD-L1 et des cytokines telles que l'IL-21, l'IL-4 et l'IL-2 (**Figure 5**) (Kumar Krishnaswamy J *et al.*, Front Immunol, 2018).

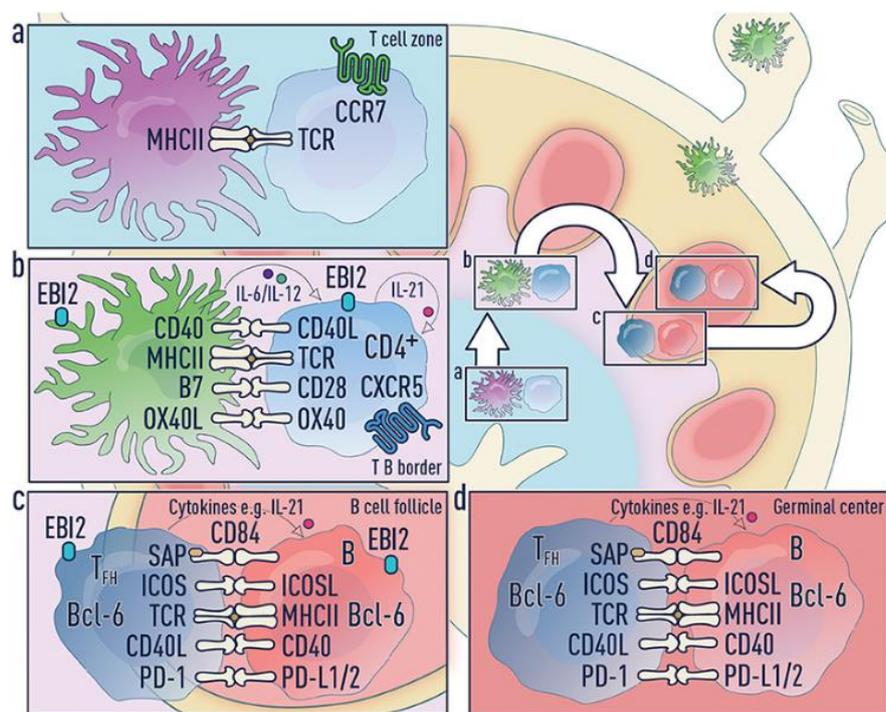


Figure 5 : La pré-activation du lymphocyte T et sa synapse activatrice avec le lymphocyte B correspondant. a. Le lymphocyte T CD4⁺ naïf migre dans la zone T via l'expression du récepteur aux chimiokines à motif CC 7 (CCR7). Il interagit avec la cellule dendritique (DC) qui expose l'antigène sur le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) par le biais de son récepteur du lymphocyte T (TCR). **b.** Le lymphocyte T diminue l'expression du CCR7 en faveur du récepteur aux chimiokines à motifs CXC 5 (CXCR5), récepteur de la chimiokine à motif CXC 13 (CXCL13), et l'EB12 le récepteur des oxystérols, pour se localiser à proximité des follicules, dans la bordure B-T. Il interagit une seconde fois avec les DC, ce qui initie sa différenciation en lymphocyte T pré auxiliaire folliculaire (pré-Tfh). Cette interaction nécessite les couples CMH II/TCR ; CD40/CD40L ; CD80-CD86/CD28 et OX40/OX40 principalement. Elle passe aussi par des molécules solubles : interleukine 6 (IL-6) et IL-12 produites par les DC, et IL-21 produite par les lymphocytes T eux-mêmes. **c.** Le lymphocyte B pré-activé et le lymphocyte pré-Tfh forment une interaction stable via les couples TCR/CMH II ; récepteur du co-stimulateur induit par le lymphocyte T et son ligand (ICOS/ICOSL) ; CD40/CD40L et le signal inhibiteur de mort cellulaire programmée 1 et son ligand (PD-1/PDL-1), et nécessite également l'expression de molécules d'adhésion comme la protéine associée aux protéines SLAM (SAP). Cette interaction finalise la différenciation du lymphocyte pré-Tfh en lymphocyte Tfh et active le lymphocyte B en induisant l'expression de la protéine du lymphome 6 des lymphocytes B (BCL6) dans les deux types cellulaires. Les lymphocytes Tfh produisent également de l'IL-21 pour engager la différenciation du lymphocyte B. **d.** Les lymphocytes Tfh et B entrent dans le centre germinatif et continuent leur maturation (Kumar Krishnaswamy J *et al.*, Front Immunol, 2018).

Ainsi, l'interaction B-T induit la production de CD40L par les lymphocytes pré-Tfh. Cette molécule vient interagir avec le CD40 exprimé par les lymphocytes B, ce qui active les voies NF- κ B et AKT et favorise ainsi la survie et la prolifération des lymphocytes B. Ainsi, les lymphocytes B des souris déficientes en CD40 présentent des défauts de prolifération et de commutation des gènes des Ig en IgG, ainsi qu'une perte de formation des GC (Lee BO *et al.*, J Immunol, 2003). De plus, la force du signal CD40 détermine les capacités de différenciation des MBC : une signalisation CD40 forte conduit à la différenciation des MBC en PB alors qu'une signalisation plus faible engage les MBC dans la réaction du GC (Koike T *et al.*, Elife, 2019). Par ailleurs, l'interaction CD40/CD40L favorise la production d'ICOSL par les lymphocytes B, qui lui-même stimule l'expression de BCL6 (Liu D, Nature, 2015 ; Choi YS *et al.*, Immunity, 2011). Ce signal renforce l'interaction B-T et favorise la différenciation des lymphocytes pré-Tfh en Tfh (Krishnaswamy JK *et al.*, Front Immunol, 2018).

Les cytokines ont également un rôle clé dans cet engagement. Ainsi, l'initiation de la réponse du GC dépend d'abord de l'IL-21, puis de l'IL-4. En effet, la signalisation de l'IL-21 par les protéines kinases Janus (JAK) 1 et JAK3, STAT1 et STAT3, voir STAT5 induit l'expression du facteur BCL6 et diminue l'expression des facteurs PAX5, BLIMP1, la protéine de liaison à la boîte X 1 (XBP1) et AID, pour favoriser la réaction du GC. Ce résultat est tout de même limité à un nombre restreint de NBC, puisque la coculture de NBC avec des fibroblastes exprimant constitutivement le CD40L, avec de l'IL-21, n'induit l'augmentation d'expression de BCL6 et le phénotype GC que d'une faible proportion de cellules (Robinson MJ *et al.*, Immunol Cell Biol, 2019).

Le rôle de l'IL-4 dans l'initiation de la réaction du GC est controversé. En effet, l'IL-4 est souvent mentionnée comme ayant un rôle dans la commutation de classe et principalement en IgE, mais peu décrite comme ayant un rôle dans l'initiation de cette différenciation terminale B. Ainsi, une étude révèle que l'IL-4 bloquerait la différenciation des NBC en limitant l'effet stimulateur de l'IL-21 (Bryant VL *et al.*, J Immunol, 2007), alors que d'autres travaux contredisent ce résultat en montrant que l'IL-4 produite de manière extra-folliculaire favorise les réactions du GC (Turqueti-Neve A *et al.*, Eur J Immunol, 2014). Le groupe de Tarlinton a également travaillé sur cette question. En utilisant un système de coculture des NBC et d'une

lignée de fibroblastes exprimant le CD40L, ils ont obtenu des cellules ayant un phénotype GC. En travaillant sur ces cellules *in vitro*, ils ont montré que l'IL-4 mais pas l'IL-21, était nécessaire pour acquérir le phénotype GC. Cependant, ces cellules ont besoin de l'IL-4 et de l'IL-21 pour entrer en prolifération et induire l'expression de BCL6, et ce, de manière dose-dépendante (Robinson MJ *et al.*, Immunol Cell Biol, 2019).

Enfin, l'IL-2 est également impliquée dans cet engagement. Sa signalisation par STAT3 et STAT5 est corrélée à la force du signal TCR. Une récente publication de notre équipe montre d'ailleurs son importance dans la différenciation B. En effet, l'IL-2 réprime la protéine contenant un domaine BTB et CNC homologue 2 (BACH2) par le biais de la voie ERK dans les lymphocytes B activés, ce qui aboutit à la production de PC switchés (Hipp N, Symington H *et al.*, Nat Commun, 2017).

L'ensemble de ces signaux contrôle donc l'engagement du lymphocyte B dans la différenciation à travers le GC. Même si ces étapes sont très bien documentées, on ne comprend toujours pas concrètement comment les lymphocytes B intègrent ces différents signaux et plusieurs études sont contradictoires.

III. Les étapes de maturation se produisant dans la zone sombre du centre germinatif

Les GC sont les microstructures anatomiques principales dans lesquelles les lymphocytes B prolifèrent, subissent des SHM, des commutations de classes des Ig (CSR) et sont sélectionnés de manière à produire des Ig de hautes affinités et des PC à longue durée de vie. Ces structures permettent aussi la production de MBC très affins pour l'antigène et rapidement mobilisables en cas de seconde infection. Bien que les GC soient décrits comme des structures composées de deux zones : la DZ et la LZ, une récente publication met en avant l'existence d'une « zone grise ». Cette zone est localisée dans la DZ et comprend des B de la DZ proliférants, distincts des B de la DZ engagés dans la différenciation (Kennedy DE *et al.*, Nat Immunol, 2020).

Après activation par le lymphocyte pré Tfh spécifique, le lymphocyte B perd la sensibilité au CCL19 et au CCL21 en faveur du CXCL12, *via* la surexpression du CXCR4 et migre dans le follicule B (Haynes NM *et al.*, J Immunol, 2007) (**Figure 6**). Notre équipe a d'ailleurs montré que l'expression du CXCR4 permet de discriminer les lymphocytes B de la DZ : les CB qui expriment le CXCR4, des lymphocytes B de la LZ : les CC qui ne l'expriment pas (Caron G, Le Gallou S *et al.*, J Immunol, 2009).

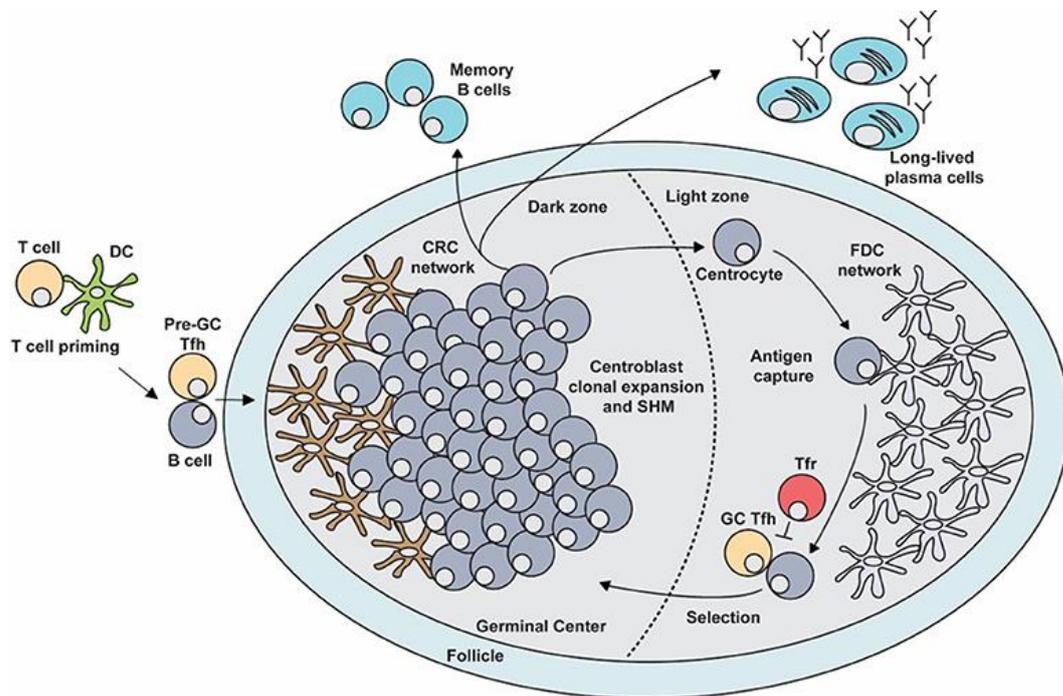


Figure 6 : La réaction du centre germinatif. Le lymphocyte T est pré-activé par une cellule dendritique (DC) dans la zone T et mature en lymphocyte pré auxiliaire folliculaire du centre germinatif (pre-GC Tfh). A ce stade, il interagit avec le lymphocyte B spécifique, ce qui induit sa différenciation en lymphocyte Tfh d'une part, et conduit à la réaction du GC, d'autre part. Le lymphocyte B nouvellement nommé centroblaste (CB) prolifère et subit des hypermutations somatiques (SHM) des gènes codant les immunoglobulines (Ig) dans la zone sombre, où il est attiré par la chimiokine à motif CXC 12 (CXCL12) produite par les cellules réticulaires produisant du CXCL12 (CRC). Les CB migrent dans la zone claire via le CXCL13 produit par les cellules dendritiques folliculaires (FDC), limitent leur prolifération et se différencient en centrocytes (CC). La zone claire est aussi le lieu des commutations de classes (CSR). Les FDC capturent et présentent les antigènes aux CC. Ces derniers sont sélectionnés par les lymphocytes Tfh. Les lymphocyte T folliculaires régulateurs (Tfr) régulent cette sélection en limitant les interactions CC-Tfh. Les CC peuvent à nouveau entrer dans la zone sombre pour subir un nouveau cycle de maturation, ou sortir du GC du côté de la zone sombre pour se différencier soit en lymphocyte B mémoire, soit en plasmocyte sécréteur d'Ig et à longue durée de vie (Stebegg M et al., *Front Immunol*, 2018).

1) La régulation transcriptionnelle par les facteurs de transcription de l'identité B

L'activation du BCR conduit à l'expression de facteurs de transcription particuliers spécifiques de « l'identité B ». Parmi ces facteurs, certains sont indispensables pour la formation des GC comme BCL6 (Kitano M *et al.*, *Immunity*, 2011), BACH2 (Muto A *et al.*, *Nature*, 2004), le coactivateur OCT des lymphocytes B (OBF1, codé par le facteur 1 d'association de classe 2 du domaine POU ou *POU2AF1*), SPIB (lui-même induit par OBF1) et le facteur régulateur de l'interféron 4 (IRF4) (Ochiai K *et al.*, *Immunity*, 2013 ; Klein U *et al.*, *Nat Immunol*, 2006) (**Figure 7**). D'autres sont nécessaires mais non indispensables tels que PAX5, IRF8, les facteurs de la famille des facteurs de renforcement des myocytes 2 (MEF2) : dont MEF2C qui est nécessaire à la prolifération et à la survie (Wilker PR *et al.*, *Nat Immunol*, 2008) et MEF2B qui induit l'expression de BCL6. D'autres facteurs interviennent également dans le phénotype B comme le facteur de transcription basique de la leucine à glissière (BATF) et MYC, par exemple. Par ailleurs, ces facteurs de transcription sont également impliqués dans la répression des gènes de l'identité plasmocytaire, c'est par exemple le cas de BCL6, IRF8 et BACH2 qui inhibent *PRDM1*, le gène clé des PC. Ainsi, la balance d'expression spatio-temporelle de ces différents facteurs conditionne le devenir des lymphocytes B.

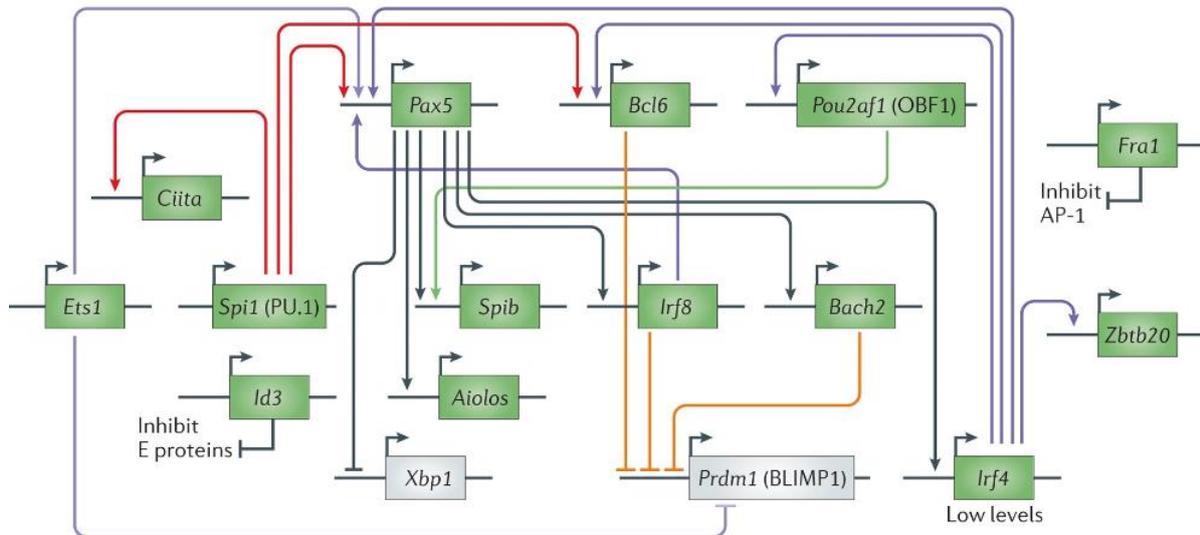


Figure 7 : Le réseau transcriptionnel des lymphocytes B activés. Les lymphocytes B activés expriment notamment les facteurs PAX5, BCL6, IRF8 et BACH2. Ils répriment PRDM1 et XBP1 principalement (Nutt et al., Nat Rev Immunol, 2015).

Les expériences de perte d'expression du gène *bcl6* chez la souris sont majoritairement létales. Lorsque les souris survivantes sont immunisées avec un antigène qui induit une réponse T-dépendante, elles ne forment pas de GC (Dent AL *et al.*, Science, 1997), ce qui montre l'importance de *BCL6* dans la formation des GC. Plus précisément, *BCL6* est induit par les cytokines produites par les lymphocytes Tfh, telles que l'IL-4 et l'IL-21 (Chevrier *et al.*, Immunol Cell Biol, 2017). *BCL6* inhibe ensuite *EBI2*, ce qui retient les lymphocytes B dans le follicule (Shaffer AL *et al.*, Immunity, 2001). Il empêche les lymphocytes B de s'engager directement dans la différenciation en PC en inhibant l'expression du gène *PRDM1* (Tunyaplin C *et al.*, J Immunol, 2004). Au fur et à mesure de l'avancée du lymphocyte B dans sa différenciation en PC, l'expression de *BCL6* est ensuite réprimée par BLIMP1 (Cimmino L *et al.*, J Immunol Baltim, 2008).

L'expression de PAX5 n'est pas indispensable à la formation du GC (Horcher M *et al.*, Immunity, 2001), toutefois, il active la signalisation BCR et induit l'expression de gènes exprimés dans le GC tels que *IRF4* et *IRF8*, *BACH2* et *AICDA* (Schebesta A *et al.*, Immunity, 2007 ; Pridans C *et al.*, J Immunol, 2008). PAX5 a donc un rôle important pour le

développement et le maintien du lignage B puisqu'il supervise l'architecture du génome lors de la différenciation lymphocytaire B (Johanson, TM *et al.*, Nat Immunol, 2018).

IRF8 est en compétition avec IRF4 du fait de leur homologie de séquence pour la fixation sur le gène *BCL6* (Carotta S *et al.*, J Exp Med, 2014). Ainsi, la fixation d'IRF8 en collaboration avec des protéines de la famille des protéines spécifiques à la transformation des érythroblastes (ETS) comme PU-1 et SPIB, conduit à l'activation de *BCL6* et à la réaction du GC, alors que la fixation d'IRF4 conduit à son inactivation. Ainsi, la balance d'expression de ces facteurs de transcription conditionne l'engagement du lymphocyte B dans la différenciation extra-folliculaire ou dans la réaction du GC (Xu H *et al.*, Nat Immunol, 2015). Par ailleurs, même si IRF8 n'est pas indispensable à la formation du GC, son absence conduit à des altérations de la réponse humorale, notamment parce qu'il permet d'éliminer les lymphocytes B auto-réactifs (Pathak S *et al.*, J Immunol, 2013).

Les protéines de la famille ETS telles que SPIB et PU1 (codé par *SPI1*) ont également un rôle dans la différenciation lymphocytaire B et peuvent se compenser mutuellement. Ainsi, la délétion spécifique de *Spi-b* chez la souris affecte peu la réaction du GC puisqu'elle conduit à des GC normaux mais qui durent moins longtemps (Su GH *et al.*, EMBO, 1997). Toutefois, la délétion seule de *PU1* induit une altération de la réponse du GC *in vivo* et une augmentation de la différenciation des PC *in vitro*, ce qui montre que les capacités de compensation de ces deux facteurs ne sont pas similaires. Dans une récente étude, le groupe de Nutt a montré que la délétion de ces deux facteurs empêche la formation de GC. Leurs données de RNAseq révèlent qu'ils régulent la voie de signalisation du BCR et notamment BLNK et BTK, l'expression du CD40 et du récepteur de BAFF (Willis SM *et al.*, Nat Commun, 2017). De plus, associé à IRF8, PU1 bloque la différenciation plasmocytaire en induisant l'expression de *BCL6* et de *PAX5*, et en réprimant *BLIMP1*. De plus, ces facteurs bloquent les CSR des Ig en inhibant l'expression d'AID (Carotta S *et al.*, J Exp Med, 2014).

L'expression de ces différents facteurs de transcription favorisent l'engagement dans la réaction du GC, qui s'accompagne d'une prolifération intense des CB dans la DZ.

2) L'expansion clonale des centroblastes

Lors de la formation du GC, les CB deviennent hautement proliférants et forment la DZ. Leur cycle cellulaire est très rapide, puisqu'il ne dure que 6 à 7 heures (Zhang J *et al.*, Immunol Letter, 1988). Même si la majorité des cellules proliférantes se situent dans la DZ, on trouve également des cellules proliférantes dans la LZ (Gitlin AD *et al.*, Nature, 2014).

L'équipe de Hodgkin a étudié l'effet de l'interaction B-T sur la prolifération des lymphocytes B en cultivant des NBC avec de l'IL-4 et/ou un anticorps anti-CD40 pour mimer une réponse T-dépendante, ou avec du LPS pour mimer une réponse T-indépendante. Elle a mis en évidence que la quantité de signal intégrée par le lymphocyte B détermine sa capacité de prolifération. Ainsi, plus l'interaction B-T est forte, plus il y a de molécules délivrées au lymphocyte B, et donc plus ce dernier va proliférer. Les auteurs ont également montré que cette interaction est régulée dans le temps, puisque le nombre de divisions du lymphocyte B corrèle avec le temps d'interaction avec le lymphocyte T. Toutefois, l'exposition continue des lymphocytes B à ces signaux finit par bloquer leur prolifération. Les auteurs expliquent que les lymphocytes B ont un nombre de divisions limité, ce qu'ils appellent « le destin de divisions » (Turner ML *et al.*, J Immunol, 2008). Ce destin de divisions est contrôlé par MYC, dont l'expression est diluée au fur et à mesure des divisions (Heinzel S *et al.*, Nat Immunol, 2016 ; Dominguez-Sola D *et al.*, Nat Immunol, 2015) et de la protéine de la boîte Forkhead O1 (FOXO1) (Inoue T *et al.*, J Exp Med, 2017).

Dans la DZ, les cellules stromales produisent du CXCL12 qui permet à la fois le maintien des CB et des macrophages qui éliminent les débris cellulaires produits lors de cette intense prolifération (Bannard O *et al.*, Immunity, 2013 ; Roberts AW, Immunity, 2017).

L'expansion clonale permet ainsi d'obtenir rapidement de grandes quantités de lymphocytes B et renforce les processus associés à leur maturation, et notamment les CSR (Hasbold J *et al.*, Nat immunol, 2004).

3) Les hypermutations somatiques des gènes des immunoglobulines

Au fur et à mesure des proliférations, les CB subissent de manière aléatoire les SHM au niveau des régions variables des gènes des Ig, participant à la maturation de l'affinité pour l'antigène. Les SHM sont initiées lorsque les lymphocytes B acquièrent un phénotype de type GC après activation de l'enzyme AID, induite par BCL6 (Marshall JL *et al.*, Eur J Immunol, 2011). Ainsi, l'AID désamine les cytosines de régions cibles de l'ADN en les transformant en uraciles qui sont ensuite dégradés par la glycosylase de l'ADN uracile (UNG) et MutS α . Le site abasique nouvellement créé est soit réparé de manière fiable, soit de manière moins fiable ce qui conduit à la formation de mutations (Methot SP et Di Noia JM, Adv Immunol, 2017) (**Figure 8**). Ces mécanismes sont finement contrôlés de manière à créer les mutations uniquement dans les régions variables. Ainsi, l'induction de l'AID par BCL6 ; son expression restreinte dans le temps et dans l'espace (Le Q et Maizels N, Plos Genet, 2019) et la présence de séquences régulatrices dans son promoteur (Rouaud P *et al.*, J Exp Med, 2013) limitent l'expression d'AID et donc son activation. Ce mécanisme n'est toutefois pas parfait puisque l'on trouve des mutations dans d'autres gènes comme *BCL6* et *PAX5* par exemple.

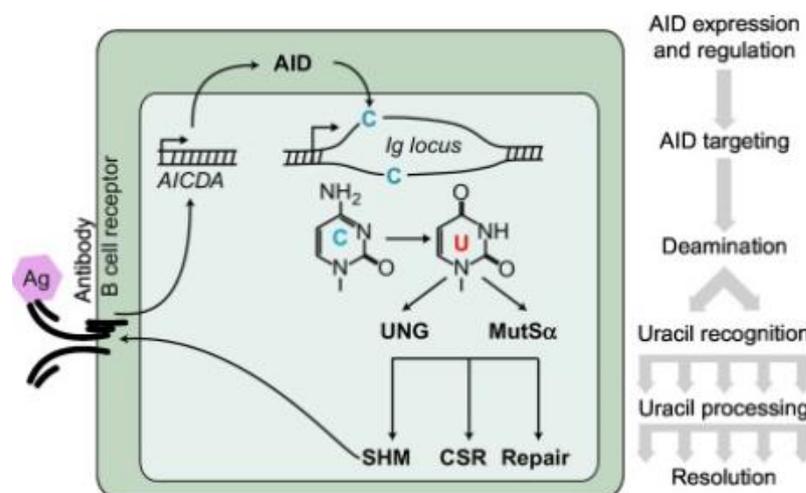


Figure 8 : Le mécanisme des hypermutations somatiques dans les lymphocytes B. L'activation du BCR conduit à l'expression de la cytidine désaminase induite par activation (AID). Cette enzyme désamine les cytosines pour les transformer en uraciles. Ces uraciles peuvent être reconnus soit par la glycosylase de l'ADN uracile (UNG), soit par la MutS α ce qui induit la dégradation de la base puis sa réparation de manière plus ou moins fiable. Cette fiabilité est à l'origine des hypermutations somatiques (SHM) et des commutations de classes (CSR) (Methot SP et Di Noia JM, Adv Immunol, 2017).

Les follicules B sont initialement composés de cellules polyclonales composées de BCR variés. Lors d'une infection, l'expansion clonale conduit à une majorité de GC polyclonaux qui produisent rapidement des PB fonctionnels. Les 15% de GC monoclonaux produits plus tardivement, sont issus d'un seul clone qui a été finement sélectionné au préalable (**Figure 9**) (Mesin L *et al.*, Immunity, 2016).

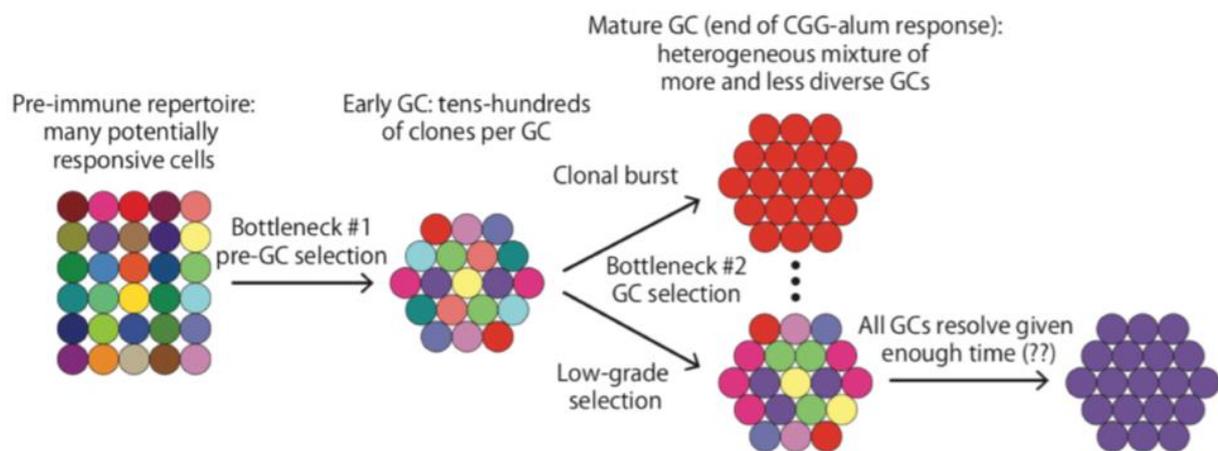


Figure 9 : Les clonotypes des centres germinatifs. L'utilisation d'un système qui permet de colorer différemment chaque cellule du follicule ayant un réarrangement V(D)J distinct a mis en évidence que les follicules B primaires sont composés de lymphocytes B folliculaires naïfs polyclonaux. Lors d'une infection, les lymphocytes B prolifèrent de manière polyclonale dans un premier temps, afin de répondre rapidement à l'infection. Après 15 jours, 15% des GC sont monoclonaux et les 85% restants sont polyclonaux. Les PB issus des GC monoclonaux proviennent d'un unique clone B finement sélectionné, de manière à être hautement spécifique de l'antigène. On ne sait pas en revanche, si les GC polyclonaux deviennent monoclonaux ou s'ils restent polyclonaux (Mesin L *et al.*, Immunity, 2016).

Récemment, le séquençage des régions variables des chaînes lourdes des gènes des Ig de huit tissus différents incluant la moelle osseuse, la rate, le sang, les poumons et différentes parties de l'intestin, mais malheureusement pas les amygdales, a révélé que les clones majoritairement retrouvés sont répartis en deux groupes : les clones des tissus gastro-intestinaux et ceux des autres organes. Les clones spécifiques retrouvés dans les tissus intestinaux sont ceux qui présentent les niveaux les plus élevés de SHM. Selon les auteurs, ces lignées distinctes retrouvées dans le tractus gastro-intestinal existeraient du fait de

l'exposition constante aux antigènes environnementaux et à la présence du microbiote intestinal (Meng W *et al.*, Nat Biotechnol, 2018). Il est possible que les clones B des amygdales aient également un taux élevé de SHM puisque les tissus aéro-digestifs sont également constamment stimulés par des antigènes.

Les SHM permettent d'augmenter l'affinité des Ig produites par les PC et participent donc activement à l'immunité humorale. Cependant, ce processus présente des risques d'induire une auto-immunité due à la synthèse illimitée d'Ig et l'augmentation des cellules apoptotiques. En effet, ces cellules relarguent de l'ADN et de l'ARN qui sont des auto-antigènes potentiels, comme ceux présents au cours de maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (SLE) (Brink R, Curr Opin Immunol, 2014). Ainsi, même si ces étapes ont pour but d'améliorer la qualité des Ig produites par les PB, elles conduisent souvent à la production de cellules auto-réactives ou non fonctionnelles. Afin d'éviter toute réaction auto-immune, l'organisme a mis en place un système de sélection des lymphocytes B hautement spécifiques de l'antigène, qui conduit à la mort par apoptose d'une grande partie d'entre eux dans la LZ. Cette sélection est en grande partie assurée par les lymphocytes Tfh, et dans une moindre mesure par les FDC et les Tfr. Une fois sélectionnés, les CC peuvent se différencier en MBC ou PC, c'est ce que nous allons développer dans le second chapitre.

Chapitre 2 :

La différenciation des centrocytes en cellules effectrices

I. La maturation des centrocytes dans la zone claire

La LZ est histologiquement claire du fait du nombre restreint de CC en comparaison au nombre de CB présents dans la DZ. Bien que le GC soit décrit comme une structure polarisée avec une DZ et une LZ, de récentes études explorent son hétérogénéité et montrent que cette dichotomie n'est pas si évidente. En effet, il existe plusieurs sous-types de lymphocytes B au sein même de la DZ et de la LZ, en fonction de leur état de maturation (Holmes AB *et al.*, J Exp Med, 2020). Il existe également une zone particulière dans la DZ : la zone grise, où l'on trouve des B nouvellement sélectionnés dans la LZ, qui sont en phase de prolifération (Kennedy DE *et al.*, Nat Immunol, 2020). La LZ est notamment caractérisée par la présence de cellules stromales particulières : les FDC, qui produisent du CXCL13 pour attirer les B de la DZ (qui perdent l'expression du CXCR4) dans la LZ (expression du CXCR5) (Allen CDC *et al.*, Nat Immunol, 2004 ; Kennedy DE *et al.*, Nat Immunol, 2020). Une fois dans la LZ, les CC diminuent fortement leur capacité de prolifération mais la maintiennent grâce au CD40L produit par les lymphocytes T, notamment au niveau de la bordure externe du GC (Holmes AB *et al.*, J Exp Med, 2020). Les CC sont également caractérisés par une expression forte du CD83 et du CD86 (Victora GD *et al.*, Cell, 2010), et l'expression d'un BCR muté qui a été modifié dans la DZ. Ce BCR peut, en fonction du type de pathogène et de l'interaction avec le lymphocyte T correspondant, subir des CSR dans la LZ.

1) Les commutations de classes des gènes des immunoglobulines

La CSR est le mécanisme par lequel les lymphocytes B peuvent modifier la partie constante de la chaîne lourde des Ig. Les NBC expriment le transcrite germinale qui leur permet de coexprimer l'IgM et l'IgD. En effet, les domaines C μ et C δ qui codent les régions constantes des IgM et IgD sont situés en amont des autres domaines constants dans le locus des chaînes lourdes des Ig, et sont donc ceux initialement exprimés. Lors de la CSR, les domaines C μ et C δ sont remplacés par un autre domaine : C γ (IgG) ; C ϵ (IgE) ou C α (IgA). Ces recombinaisons de l'ADN ont lieu grâce à l'AID qui désamine les cytosines de régions particulières : les régions

« switch » donneuses ($C\mu$ par exemple) et receveuses ($C\gamma 2a$ par exemple), ce qui crée des cassures doubles brins de l'ADN. Les deux régions nouvellement cassées s'associent en formant une boucle comprenant les domaines constants à remplacer, qui est ensuite déléetée, ce qui explique pourquoi les CC ne peuvent pas reformer des IgD et des IgM après la CSR (Stavnezer J et Schrader CE, J Immunol, 2014) (**Figure 10**).

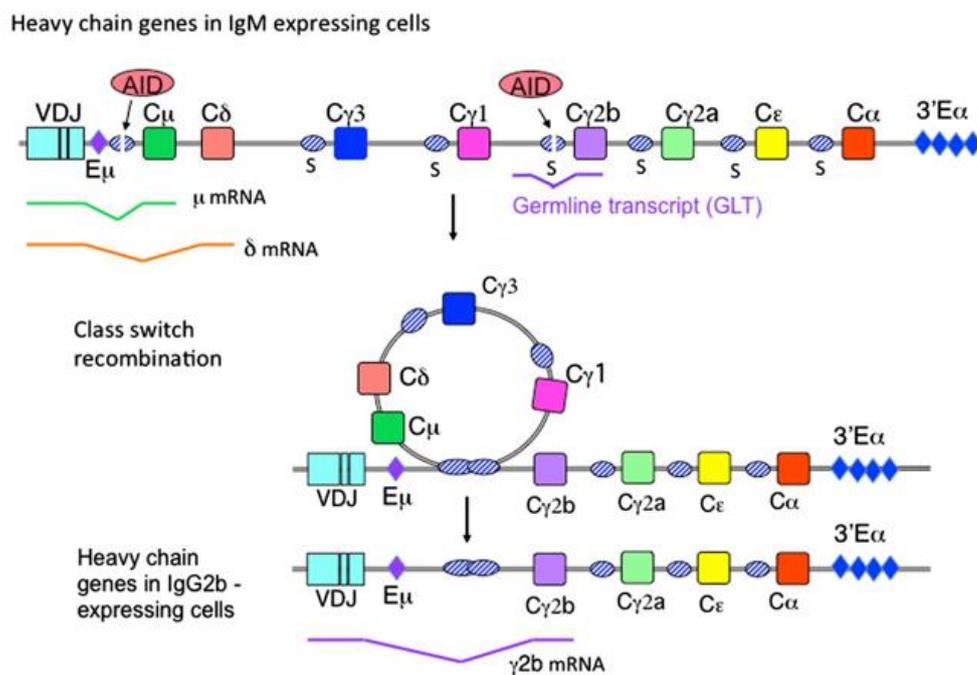


Figure 10 : Le mécanisme de commutation de classes. Le transcript germlinal (GLT) permet la co-expression de l'IgM et de l'IgD par les lymphocytes B naïfs. L'expression de la cytidine désaminase induite par activation (AID) induit la désamination de cytosines dans les régions switch (S) et provoque une cassure double brin du GLT. Les deux extrémités formées se réparent en formant une boucle qui sera perdue après la recombinaison, ce qui permet aux cellules d'exprimer un ARNm réarrangé. Ici, les cellules expriment désormais l'IgG2b (Stavnezer J et Schrader C E, J Immunol, 2014).

Les signaux produits par les lymphocytes Tfh sont fortement impliqués dans la CSR. En effet, l'IL-4 (Avery DT *et al.*, J Immunol, 2008) et l'IL-21 (Pène, J *et al.*, J Immunol, 2004) induisent préférentiellement le switch en IgG1 et l'IL-4 est aussi impliquée dans la production d'IgE, comme le CD40L (Gascan H *et al.*, J Immunol, 1991 ; Ferlin WG *et al.*, Eur J Immunol, 1996). Les CSR ne sont cependant pas limitées au GC. En effet, deux jours seulement après la

réponse immunitaire primaire, on retrouve des Ig switchées, provenant de PB différenciés de manière extra-folliculaire (Fagarasan S *et al.*, Nature, 2001 ; Pape K A *et al.*, J Exp Med, 2003). Roco *et al.* ont récemment montré que l'on trouve des Ig switchés avant la formation du GC et qu'au sein du GC on retrouve de grandes quantités d'IgM. Ils ont développé un modèle transgénique de souris qui leur a permis de distinguer les B du GC et les PB extra-folliculaires. Ils ont ainsi montré que même si les CSR et les SHM requièrent l'AID, les CSR s'arrêtent lorsque débutent les SHM (Roco JA *et al.*, Immunity, 2019). Ces données montrent donc qu'ils existent des facteurs en dehors du GC qui contribuent au CSR et qui nécessitent l'implication des lymphocytes T.

2) La sélection des centrocytes

La sélection des CC est un processus finement contrôlé pour limiter l'apparition de PC et MBC auto-immuns. Cette étape nécessite l'implication de plusieurs types cellulaires, dont les lymphocytes Tfh, les FDC et les Tfr et passe par des signaux membranaires et solubles.

a. La sélection des centrocytes par les lymphocytes Tfh

Plusieurs études ont participé à la compréhension de la dynamique des GC et ont ainsi permis de mettre en évidence l'importance des signaux fournis par les lymphocytes Tfh dans la génération des PC (Victoria GD *et al.*, Cell, 2010 ; Shulman Z *et al.*, Science, 2014 ; Cyster JG et Allen CDC, Cell, 2019). Ces cellules sont caractérisées par l'expression de protéines participant à leur localisation ou à leurs fonctions, telles que CXCR5 (Schaerli *et al.*, J Exp Med, 2000 ; Breitfeld *et al.*, J Exp Med, 2000), PD-1, ICOS, CD40L et IL-21 (Qi H, Nat Rev Immunol, 2016). Les expériences d'inhibition d'expression de ces molécules comme le couple CD40L-CD40 (Bolduc A *et al.*, J Immunol, 2010 ; Ding BB *et al.*, J Immunol, 2013), l'IL-21 (Ding BB *et al.*, J Immunol, 2013), le PD1 (Good-Jacobson KL *et al.*, Nature Immunol, 2010) ou l'ICOSL-ICOS (Liu D *et al.*, Nature, 2014) ont validé l'implication des Tfh dans la production des PC. Toutefois, leur déplétion spécifique n'empêche pas la génération de PC effecteurs, contrairement à la

déplétion de toute la population T CD4⁺, du fait de la possibilité de différenciation extra-folliculaire (Kräutler NJ *et al.*, J exp Med, 2017). De plus, les Tfh sont caractérisés par un temps d'interaction B-T très réduit contrairement à l'interaction entre le lymphocyte B pré-activé et le lymphocyte pré-Tfh en amont du GC. En effet, ces contacts transitoires permettent aux lymphocytes Tfh de constamment scanner les CC et d'empêcher la production d'un nombre restreint de CC de haute affinité (Shulman Z *et al.*, Science, 2014). Enfin, il existe des lymphocytes Tfh mémoires, dont l'activation est plus rapide lors d'une seconde exposition à l'antigène (Fazilleau N *et al.*, Nat Immunol, 2007).

Afin d'éviter la production de PC auto-immuns et d'agrandir le pool de PC hautement spécifiques de l'antigène, les Tfh ont deux procédés de sélection. Le premier procédé est la sélection positive qui permet de conserver les CC fonctionnels et hautement affins *via* la production de signaux de survie et de différenciation. Le second est la sélection négative qui, au contraire, permet d'éliminer les CC non fonctionnels ou auto-réactifs, et donc présentant des risques pour l'organisme.

i. La sélection positive

La sélection des CC est principalement assurée par les lymphocytes Tfh que l'on trouve dans la LZ avec un ratio de 1,5 à 2 pour un CC. Ces cellules sont également trouvées dans la DZ, mais en plus faible proportion (Wittenbrink N *et al.*, J Immunol, 2011). La sélection positive induite par les lymphocytes Tfh nécessite plusieurs signaux qui vont être délivrés lors de contacts intercellulaires avec les CC. Ces interactions doivent durer plus de 5 minutes pour se stabiliser. Ainsi, seulement 4% des interactions B-T vont permettre la genèse des précurseurs de PC (Allen CDC *et al.*, Science, 2007). Ces réactions sont extrêmement régulées puisque même si un Tfh peut être en contact avec plusieurs lymphocytes B, ces derniers ne peuvent réaliser une synapse productive qu'avec une cellule à la fois (Kupfer H *et al.*, J Exp Med, 1994). La régulation de ces interactions passe par des contacts membranaires similaires à ceux nécessaires en amont du GC qui incluent le TCR/CMH II ; le couple CD40/CD40L, l'ICOS/ICOSL mais plus faiblement que lors de la pré-activation ; les molécules d'adhésions telles que ICAM-

1/LFA-1 et les protéines de la famille des molécules d'activation et de signalisation lymphocytaire (SLAM) ; mais aussi par des molécules solubles comme l'IL-4 et l'IL-21 (Figure 11).

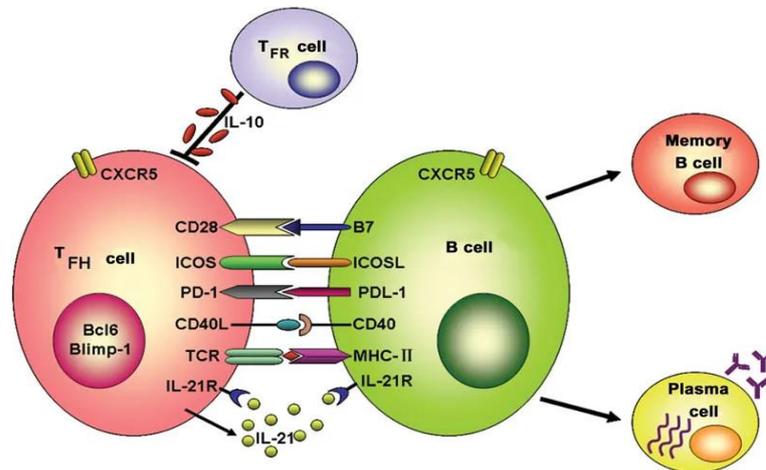


Figure 11 : L'interaction entre le lymphocyte Tfh et le centrocyte dans le centre germinatif. Les lymphocytes Tfh et les centrocytes (CC) expriment le CXCR5 qui permet leur localisation dans la zone claire du centre germinatif. Les Tfh interagissent avec les CC via les couples CMH II-TCR, ICOS-ICOSL, PD-1-PDL-1, CD40-CD40L et IL-21R-IL-21 qui permettent la différenciation des CC en B mémoire ou plasmocyte. Les lymphocytes Tfr empêchent le développement de PC auto-immuns, notamment en sécrétant de l'IL-10. CMH II = complexe majeur d'histocompatibilité II ; TCR = récepteur du lymphocyte T ; ICOS = co-stimulateur induit par le lymphocyte T ; ICOSL = ligand d'ICOS ; PD-1 : programme de mort 1 ; PDL-1 = ligand de PD-1 ; CD40 = cluster de différenciation 40 ; CD40L = ligand de CD40 ; IL-21 = interleukine 21 ; IL-21R = récepteur de l'IL-21 ; IL10 = interleukine 10 (Shekhar S et Yang X, Cellular & Molecular Immunology, 2012).

a) Les molécules de signalisation membranaires

Le CD40L est un signal indispensable pour la survie et le renouvellement des B du GC, comme l'ont montré les expériences de blocage de l'interaction CD40/CD40L chez la souris. Toutefois, le rôle du couple CD40/CD40L dans la différenciation des lymphocytes B est controversé. En effet, certaines études montrent que le CD40L promeut la différenciation des CC en MBC (Casamayor-Palleja *et al.*, J Exp Med, 2005), alors que d'autres montrent qu'il facilite la différenciation des B du GC en PC et met fin à la réaction du GC (Erickson LD, J Clin Invest, 2002 ; Bolduc A *et al.*, J Immunol, 2010). Selon d'autres équipes, le CD40/CD40L est à l'origine de la production de PC précoces (Kishi Y *et al.*, J Immunol, 2010). Au final, ce serait la

quantité de signal CD40/CD40L intégrée qui déterminerait le devenir du CC. En effet, l'équipe de Kurosaki a montré chez la souris, qu'une signalisation CD40 forte contribuait à la production de PB alors qu'une signalisation moins forte favorisait le retour des CC dans la DZ (Ise W *et al.*, *Immunity*, 2018), prouvant l'action dose-dépendante du CD40L. Par ailleurs, l'activation de la voie CD40 induit l'expression des protéines anti-apoptotiques BCL-XL et BCL-2 (Tuscano JM *et al.*, *Blood*, 1996) et diminue celle du fragment inducteur de l'apoptose (FAS) (Hennino A *et al.*, *J Exp Med*, 2001), permettant ainsi la survie des lymphocytes B ayant reçu le signal.

Concernant le couple ICOS/ICOSL, on sait que l'interaction CD40/CD40L favorise la production d'ICOSL par les B du GC lors de l'interaction B-T, et que les cellules ayant un BCR de haute affinité sécrètent de plus grandes quantités d'ICOSL que les autres (Liu D *et al.*, *Nature*, 2015). Toutefois, les NBC expriment fortement l'ICOSL en comparaison aux B du GC et sont donc plus prônes à répondre à l'ICOS. Ces données expliquent donc pourquoi l'absence d'ICOS empêche la production de PC et altère la synthèse des MBC (Liang L *et al.*, *J Exp Med*, 2002, Xu H *et al.*, *Nature*, 2013). Ainsi, le couple ICOSL/ICOS a son rôle principal dans la pré-activation du lymphocyte T.

Enfin, l'interaction B-T dans le GC nécessite trois autres types d'interactions moléculaires pour se stabiliser, résumées par Biram *et al.* (Biram A *et al.*, *Immunol Rev*, 2019). D'une part, les molécules de CMH II couplées aux peptides d'antigènes des CC interagissent avec les TCR des lymphocytes T. D'autre part, on observe une augmentation d'expression d'ICAM1 par le CC, notamment induite par le CD40 (Ise W *et al.*, *Immunity*, 2018), qui interagit avec LFA-1 exprimé par le lymphocyte T (Zaretsky I *et al.*, *J Exp Med*, 2017). Enfin, cette interaction passe par les molécules d'activation lymphocytaires de signalisation homophiles (SLAM), et notamment par SAP, comme cela a été montré par Qi *et al.* par imagerie intra-vitale (Qi H *et al.*, *Nature*, 2008).

b) Les molécules solubles

Les deux cytokines principales produites par les lymphocytes Tfh sont l'IL-4 et l'IL-21. Les récepteurs de ces deux cytokines partagent la même chaîne γ mais activent des protéines STAT différentes, ce qui leur permet de ne pas avoir de rôles redondants (Lin JX et Leonard WJ, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018). La déficience de l'une ou l'autre de ces cytokines conduit à des GC altérés. La déficience des deux induit de gros défauts dans les réponses B (Gonzalez DG *et al.*, J Immunol, 2018).

L'IL-21 est d'abord produite en amont du GC, où elle induit l'expression de BCL6 et initie la réaction du GC (Ozaki K *et al.*, J Immunol, 2004). Sa production par les Tfh dans le GC est induite après interaction avec le CC (Shulman Z *et al.*, Science, 2014). L'IL-21 est particulièrement importante puisque parmi toutes les molécules sécrétées par le lymphocyte Tfh, c'est la cytokine qui régule la plupart des fonctions nécessaires à la production de lymphocytes B fonctionnels, chez la souris et chez l'humain. L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur de l'IL-21 (IL-21R) a permis de mettre en évidence que l'IL-21 intervient dans la production des Ig et dans la CSR *via* la sécrétion d'IgG (IgG3 principalement), d'IgA et d'IgE (avec le CD40L) (Ozaki K *et al.*, Science, 2002), la prolifération des lymphocytes B activés, et leur différenciation en PC (Ozaki A *et al.*, J Immunol, 2004), la production de MBC (Rankin AL *et al.*, J Immunol, 2011) et la sélection des lymphocytes B, notamment en induisant l'apoptose (Mehta DS *et al.*, J Immunol, 2003). Pour réaliser ses différentes fonctions, l'IL-21 induit l'expression de la recombinase AID qui intervient dans les SHM et les CSR, et l'expression des gènes plasmocytaires *PRDM1* et *XBP1*, tout en diminuant celle des gènes B *PAX5* et *BCL6* (Diehl SA *et al.*, J Immunol, 2008 ; Avery DT *et al.*, J Exp Med, 2010). Elle agit ainsi directement sur le maintien du nombre de lymphocyte B dans le GC (Linterman MA *et al.*, J Exp Med, 2010).

Dans les cellules hématopoïétiques, la sous-unité α du récepteur de l'IL-4 et la chaîne γ C s'associent pour former l'IL-4R et signalisent par le biais des protéines JAK1 et JAK3 puis STAT6. Comme l'IL-21, l'IL-4 est produite par les Tfh après interaction avec un CC, ce qui laisse supposer un potentiel rôle de l'IL-4 dans la sélection des CC (Shulman Z *et al.*, Science, 2014 ;

Cunningham AF *et al.*, Eur J Immunol, 2004). Le rôle de l'IL-4 a notamment été mis en évidence par l'utilisation de souris déficientes en IL-4R. Même si ces souris ont des GC de plus petite taille que les souris sauvages, la différenciation en PC et notamment la différenciation extra-folliculaire ne sont pas affectées par l'absence d'IL-4. En revanche, l'IL-4 intervient dans les CSR en IgG1 et IgE (Kuhn R *et al.*, Science, 1991 ; Moens L et Tangye SG, Front Immunol, 2014). Par ailleurs, chez la souris, la signalisation IL-4 induit une diminution de l'expression du CD138, marqueur des PC, ce qui suggère là aussi un rôle de l'IL-4 dans les étapes terminales de la différenciation. Au sein même de notre laboratoire, et grâce à un modèle de différenciation des NBC *in vitro* qui suit l'activation de la voie IL-4 par le biais de l'expression du CD23, nous montrons d'ailleurs que les cellules qui se différencient en PC sont celles qui éteignent la voie IL-4/pSTAT6/CD23 (Caron G *et al.*, Cell Rep, 2015 ; Pignarre A *et al.*, Blood, 2020). Shi *et al.* ont également trouvé une extinction d'expression de STAT6 dans les PC de souris en comparaison aux autres populations B (Shi W *et al.*, Nat Immunol, 2015). L'IL-4 agirait de manière indirecte sur la différenciation des B du GC en limitant le nombre de lymphocytes B qui entrent dans le GC. En effet, les souris déficientes en IL-4 et IL-13 (du fait de leur récepteur commun) présentent un nombre réduit de lymphocytes B du GC puisque ces cellules n'activent pas la voie STAT6 et ne peuvent pas sous-exprimer EBI2, ce qui maintient les lymphocytes B en dehors du follicule (Turqueti-Neves A *et al.*, Eur J Immunol, 2014).

Weinstein *et al.* ont publié une étude chez la souris qui montre que ces deux cytokines sont produites de manière séquentielle dans le temps et dans l'espace, et par des sous-populations de Tfh différentes (**Figure 12**). Ainsi, les lymphocytes Tfh producteurs d'IL-21 agissent dans un premier temps et permettent de sélectionner les clones les plus affins. Dans un second temps, les Tfh producteurs d'IL-21 et d'IL-4, très peu nombreux, sont induits, puis laissent place aux Tfh producteurs d'IL-4, qui interviennent dans la production des PC (Weinstein JS *et al.*, Nat Immunol, 2016). Chez l'humain, aucune étude ne révèle la cinétique de production de ces cytokines. Toutefois, des analyses de cytométrie de flux montrent qu'il existe des lymphocytes Tfh qui exprime l'IL-4, l'IL-21, ou les deux, ce qui suppose qu'en fonction du contexte, les Tfh pourraient sécréter l'une ou l'autre de ces cytokines, ou les deux en même temps (Ma CS *et al.*, Immunol and Cell Biol, 2009 ; Kroenke MA *et al.*, J Immunol, 2012).

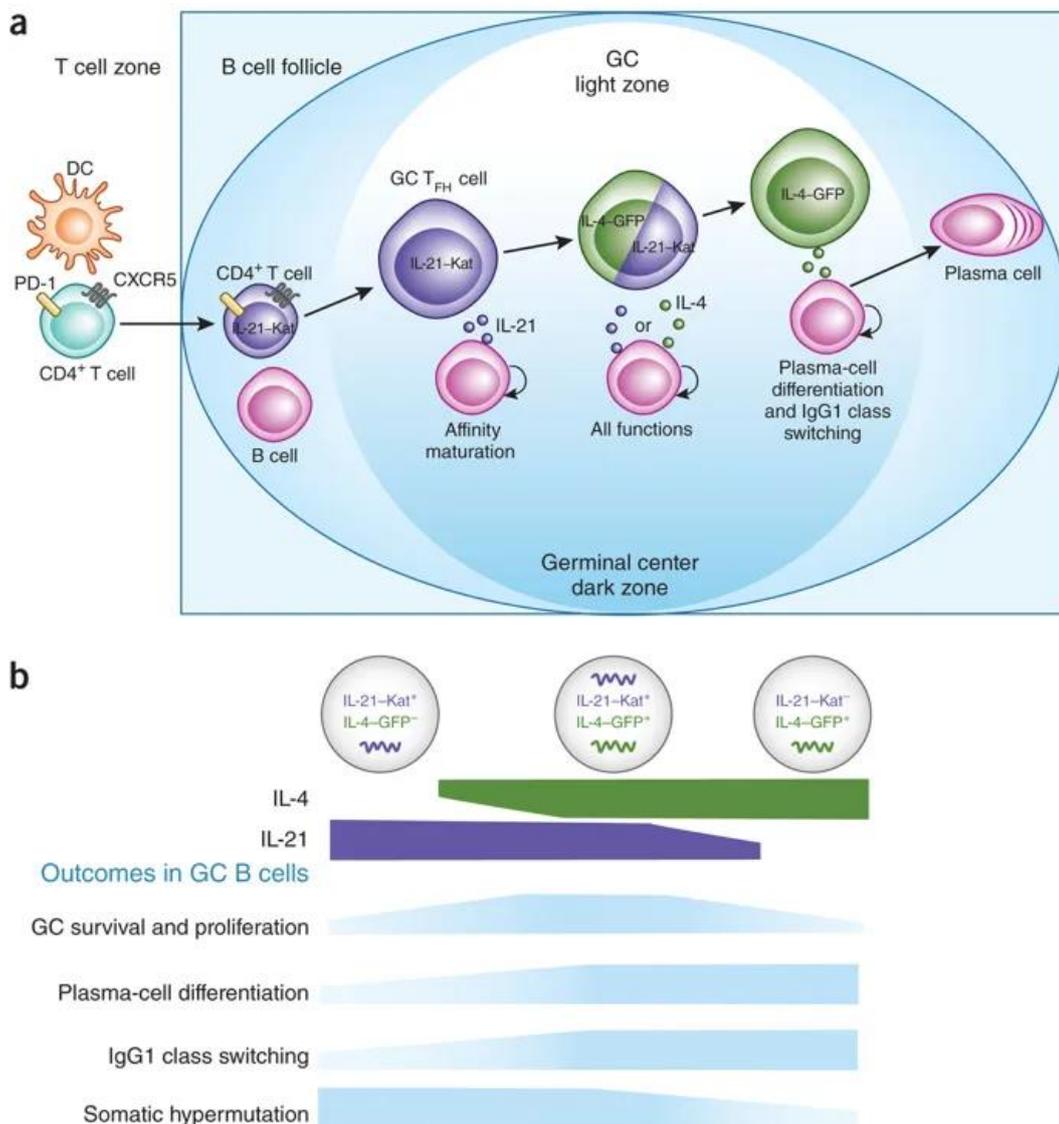


Figure 12 : La production séquentielle de l'IL-21 puis de l'IL-4 permet la différenciation des B du centre germinatif en plasmocytes chez la souris. Weinstein et al. ont développé un modèle murin transgénique dans lequel ils ont transféré des lymphocytes Tfh qui expriment spécifiquement l'IL-4 (IL-4-GFP) ou l'IL-21 (IL-21-Kat). **a.** Après activation par la cellule dendritique (DC), les lymphocytes T CD4⁺ initient la réaction du centre germinatif (GC) et poursuivent leur différenciation en Tfh en produisant de l'IL-21 qui agit sur la maturation d'affinité des B du GC. Une autre sous-population de lymphocytes Tfh, sécrétrice d'IL-4 et d'IL-21 participe ensuite aux fonctions du GC. Enfin, les lymphocytes Tfh sécréteurs d'IL-4 permettent les recombinaisons de classes des Ig, et particulièrement en IgG1 et interviennent potentiellement dans la sélection des B du GC. Ces étapes permettent la différenciation en PC. **b.** Le modèle murin développé par Weinstein et ses collaborateurs met en évidence que l'IL-21 seule agit sur les hypermutations somatiques, combinée à l'IL-4, elle promeut la survie et la prolifération, enfin, l'IL-4 seule facilite les recombinaisons de classe des Ig et la différenciation en PC (Bélanger S et Crotty S, Nat Immunol, 2016, adapté de Weinstein JS et al., Nat Immunol, 2016).

Par ailleurs, l'IL-10 participerait également à la différenciation des B en PC, bien que cette cytokine soit principalement produite par les lymphocytes B et T régulateurs qui ne la produisent que de manière transitoire. Les lymphocytes B qui produisent l'IL-10, produisent également de l'IL-6 qui intervient dans la survie des PC (Lighaam LC *et al.*, Front Immunol, 2018). Enfin, l'IL-10 et l'IL-21 ont des rôles redondants, toutefois, l'IL-10 faciliterait la différenciation des PC IgG (Yoon SO *et al.*, J Leuko Biol, 2009). Le peu de données existantes à ce sujet suggèrent que les lymphocytes B producteurs d'IL-10 seraient des PC immunosuppresseurs (Lino AC *et al.*, Immunity, 2018).

Enfin, la sélection des lymphocytes B du GC passe également par leur propre production d'Ig. En effet, plus il y a d'Ig sécrétées, moins il y a d'antigènes libres. Ce sont donc les lymphocytes B les plus affins qui vont capter l'antigène et tenter une différenciation en PC (Toellner KM *et al.*, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018).

Ces signaux de mieux en mieux décrits ne permettent cependant toujours pas de comprendre complètement comment les lymphocytes Tfh discriminent les CC qui peuvent recevoir les signaux positifs pour leur survie des CC qui n'en recevront pas.

ii. La sélection négative

L'ensemble des processus de maturation des lymphocytes B a pour but d'améliorer l'affinité du BCR contre l'antigène, pourtant de nombreux lymphocytes B auto-réactifs sont produits. L'équipe de Brink a montré que ces lymphocytes B auto-réactifs étaient, toutefois, majoritairement éliminés par sélection négative. Ainsi, dans une première étude, ils ont montré que les B du GC auto-réactifs étaient éliminés ou inactivés par SHM alors que les mutants non-auto-réactifs étaient sélectionnés positivement. Cependant, certains lymphocytes B reconnaissant des antigènes endogènes, rares ou tissus-spécifiques échappaient à ce mécanisme, expliquant l'émergence de maladies auto-immunes (Chan TD *et al.*, Immunity, 2012). Dans une autre étude, où ils ont utilisé un modèle murin dans lequel les

FDC présentaient des auto-antigènes, les lymphocytes B auto-réactifs étaient également éliminés, et les quelques rares persistants ne survivaient pas longtemps, par manque de signaux de survie de la part des lymphocytes T (Yau IW *et al.*, J Immunol, 2013).

Les lymphocytes B qui expriment des BCR reconnaissant des antigènes endogènes ont trois façons de mourir : i) la délétion clonale, ii) l'anergie ou l'absence de réponse à l'antigène et iii) l'édition du récepteur *via* la recombinaison V(D)J des gènes des Ig en activant les recombinases (RAGs) (Meffre E *et al.*, Immunol Rev, 2019). Dans ce cadre, les lymphocytes B auto-immuns ne reçoivent pas de signaux de survie des lymphocytes Tfh, ce qui entraîne leur mort. Ainsi, les CC perdent l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2 et BCL-XL et augmentent l'expression du médiateur interagissant avec BCL-2 (BIM) pro-apoptotique (Yokoyama T *et al.*, Immunol Lett, 2002).

Le couple PD-1/PD-L1 est également impliqué dans la sélection négative des lymphocytes. Les lymphocytes Tfh expriment fortement PD-1, et ses ligands (PD-L1 et PD-L2) sont exprimés de manière variable par les lymphocytes B. Ainsi, PD-L1 est exprimé par les NBC et PD-L1, PD-L2 et PD-1 sont exprimés de manière intermédiaire par les B du GC, et plus fortement par les MBC. L'interaction PD-1/PD-L1 permet de sélectionner les lymphocytes B du GC les plus affins. Ainsi, la déplétion de PD-1 chez la souris conduit à une augmentation des Tfh qui sont cependant de moins bonne qualité puisqu'ils produisent des quantités réduites d'IL-4 et d'IL-21. La diminution de ces cytokines conduit à la mort des lymphocytes B du GC et diminue ainsi le nombre de PC produits, sans pour autant affecter le compartiment mémoire. Ces données montrent donc que PD-1 intervient surtout sur la qualité des Tfh et des lymphocytes B qui entrent et qui sortent du GC, en sélectionnant les cellules les plus affines (Good-Jacobson KL *et al.*, Nat Immunol, 2010). Au final, le couple PD-1/PD-L1 aurait plutôt un rôle inhibiteur dans la différenciation des lymphocytes Tfh et des B du GC (Thibault ML *et al.*, Int Immunol, 2012). Par ailleurs, les lymphocytes B exprimant PD-L1 produisent également de l'IL-10 et sont considérés comme des B régulateurs (Mauri C et Bosma A, Ann Rev Immunol, 2012).

Nussenzweig et son équipe ont particulièrement étudié la question de la mort des B du GC chez la souris. Ils ont ainsi mis en évidence que les B du GC apoptotiques diminuent l'expression de certains marqueurs tels que le CD19, le CD86 et FAS. Ils ont également développé un système de transfert d'énergie par résonance Förster (FRET), qu'ils ont appelé INDIA (INDicateur de l'Apoptose). Ce système contient un fluorochrome vert et un fluorochrome rouge, liés par un peptide contenant le site de clivage de la caspase 3 (DEVVDG). Ainsi, les cellules non apoptotiques fluorescent en jaune (association du rouge et du vert) et les cellules apoptotiques dont le site de clivage de la caspase 3 est coupé, rendant la caspase 3 active, fluorescent en vert (perte du FRET). Ils ont ainsi obtenu des souris transgéniques et ont suivi par microscopie à balayage laser à deux photons la cinétique de l'apoptose (**Figure 13**). Ils ont remarqué que les B du GC montrent les premiers signes de l'apoptose 20 minutes après l'activation de la caspase 3 et ce, de manière équivalente pour les CB et les CC. Ainsi, 3% des lymphocytes B sont en apoptose dans le GC toutes les 20 minutes, soit près de la moitié des cellules en 5 heures. Ces résultats montrent donc l'important turn-over qui existe dans les GC. Par ailleurs, les cellules qui meurent préférentiellement dans la DZ sont des cellules dont le BCR est muté et qui est altéré ou non exprimé, alors que celles qui meurent dans la LZ ont un BCR d'affinité variable (Mayer CT *et al.*, Science, 2017). Une autre étude montre que les cellules qui ont un BCR altéré ou non exprimé sont incapables de retourner dans la LZ, même en cas de surexpression transgénique de BCL-2. Les auteurs supposent que ces cellules doivent exprimer un nouveau BCR avant de pouvoir quitter la DZ (Stewart I *et al.*, Immunity, 2018). Ces résultats sont également retrouvés par Lau et Brink qui montrent que les lymphocytes B du GC qui n'expriment pas de BCR s'accumulent dans la DZ lorsqu'ils perdent l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Lau AW et Brink R, Curr Opin Immunol, 2020). Ces cellules n'arrivent probablement pas à retrouver sur les FDC l'antigène pour lequel elles sont spécifiques.

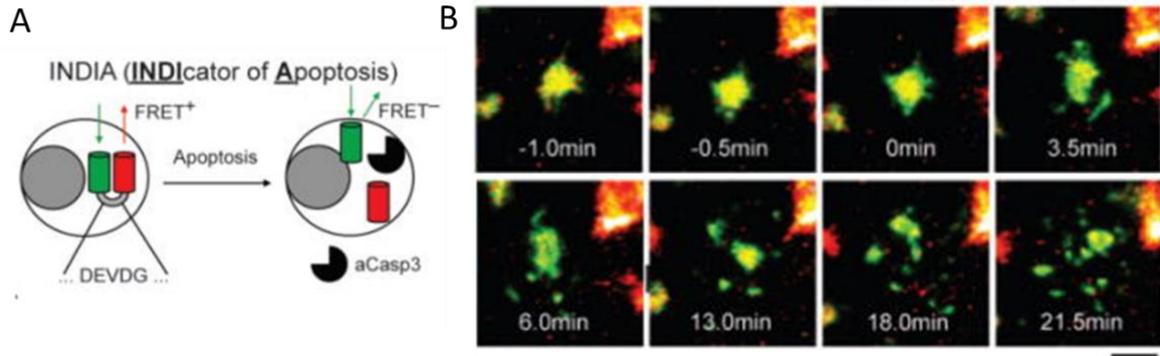


Figure 13 : La cinétique de l'apoptose dans le centre germinatif. **A.** Le système INDicateur de l'Apoptose (INDIA) permet de visualiser par transfert d'énergie par résonance Förster (FRET) les cellules non apoptotiques (cellules jaunes), des cellules apoptotiques qui ont perdu le FRET par coupure du site de clivage de la caspase 3 : DEVDG, qui rend la caspase 3 active (aCasp3) (cellules vertes). **B.** La cinétique de mort par apoptose des lymphocytes B du centre germinatif, suivie par microscopie à balayage laser à deux photons dans les ganglions de souris. Les cellules sont jaunes puis deviennent vertes par perte du FRET et activation de la caspase 3. Ces cellules « bullent » et se transforment en corps apoptotiques 20 minutes après l'activation de la caspase 3 (Adapté de Mayer CT et al., Science, 2017).

b. L'interaction entre les centrocytes et les cellules dendritiques folliculaires

Il existe différents types de FDC qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques en fonction de leur localisation (**Figure 14**). Ainsi, les FDC de la LZ sont caractérisées par l'expression du CD21 (ou CR2), du CD35 (CR1) et du CD23 alors que les FDC de la DZ (CRC) n'expriment pas le CD23 (Allen CDC et Cyster JG, Semin Immunol, 2008 ; Pikor NB *et al.*, Nat Immunol, 2020). Selon une étude, l'expression du CD23 par les FDC serait même restreinte à la zone apicale de la LZ (Steiniger B *et al.*, Histochem and Cell Biol, 2011). Le rôle principal des FDC de la LZ est de capter les antigènes et de les présenter sous leur forme native aux lymphocytes B, d'où leur appellation de « réservoirs à antigènes » (Mandel TE *et al.*, Immunology, 1981). Les antigènes que présentent les FDC proviennent de la circulation sanguine (pour les amygdales) ou lymphatique et arrivent dans le follicule primaire et les GC sous forme de complexes immuns. Ces complexes immuns sont transportés jusqu'aux FDC par le biais des cellules présentatrices d'antigènes : les DC (Qi H *et al.*, Science, 2006) ou les macrophages (Martinez-Pomares L et Gordon S, Cell, 2007), mais aussi par les lymphocytes B naïfs (Phan TG *et al.*, Nat Immunol, 2007). Les FDC capturent et présentent ainsi les complexes

immuns en surface par le biais du CD21 et du CD35, ou *via* les récepteurs de faible affinité aux fragments Fc : FcγRIIB (CD32) (Barrington RA *et al.*, J Exp Med, 2002) et FcεRII (CD23) (Maeda K *et al.*, J Immunol, 1992). Allen et Cyster suggèrent d'ailleurs qu'il existerait plusieurs modes de capture des complexes immuns en plus des récepteurs au complément qui ne sont pas encore élucidés et qui passeraient notamment par CD32 et CD23 (Allen CDC et Cyster JG, Semin Immunol, 2008). D'ailleurs, une récente étude chez la souris montre qu'en l'absence d'expression du CD32 par les FDC, la sélection des B du GC est altérée avec la présence de clones de faible affinité (Van der Poel CE *et al.*, Cell Rep, 2019), prouvant le rôle des FDC dans la maturation d'affinité des Ig (Victoratos P *et al.*, Immunity, 2006). En revanche, aucune étude ne révèle le rôle du CD23 porté par les FDC dans la différenciation terminale B à l'heure actuelle.

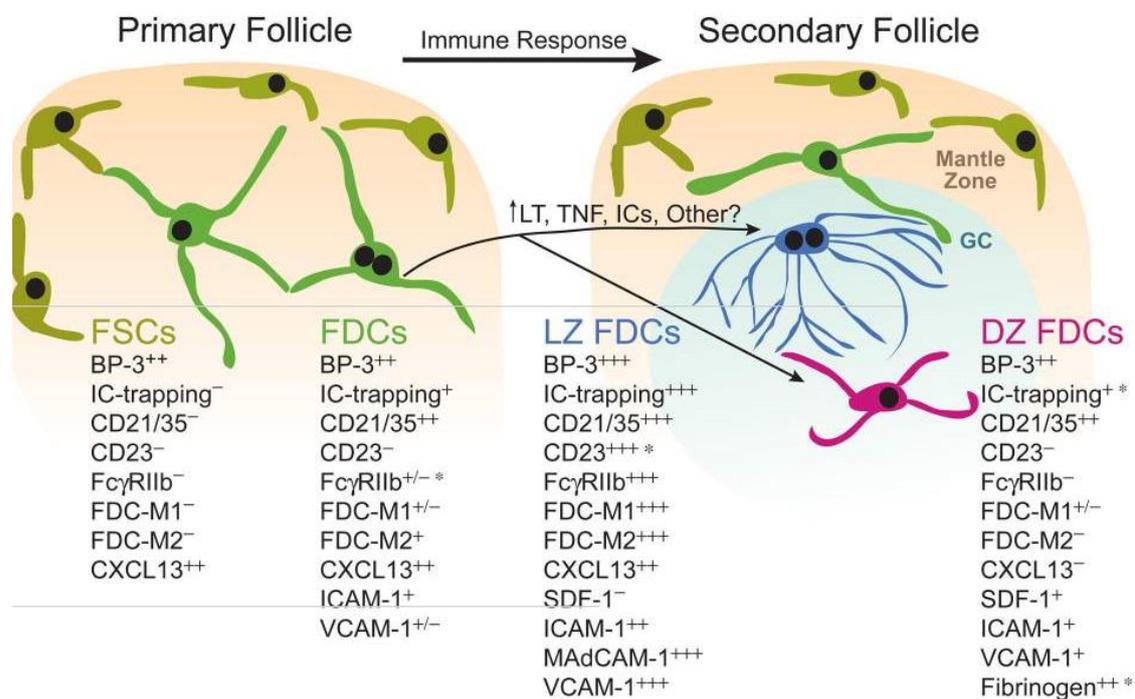


Figure 14 : La représentation des différentes catégories de cellules dendritiques folliculaires chez la souris. Dans le follicule primaire, on retrouve les cellules stromales folliculaires (FSC) et les cellules dendritiques folliculaires (FDC). Ces deux types cellulaires sont distincts notamment par l'expression du CD21/CD35. Le follicule secondaire se forme via la présence de complexes immuns (IC), de la lymphotoxine (LT) et du TNF produits par les lymphocytes B. On distingue les FDC de la zone sombre (DZ) nommées aussi cellules réticulaires sécrétant du CXCL12 (CRC) des FDC de la zone claire (LZ) par leur perte d'expression du CXCL13, en faveur du CXCL12 (ou SDF-1). Les FDC de la DZ n'expriment pas non plus le CD23, FcγRIIb et FDC-M2. Les FDC la LZ expriment le CD23. (Allen CDC et Cyster JG, Semin Immunol, 2008).

La sélection des CC passe par la compétition pour la reconnaissance de l'antigène entre le BCR (signal positif) et le FcγRIIB (signal inhibiteur). Ainsi, les BCR de haute affinité reconnaissent plus facilement les antigènes, se regroupent et activent un signal fort dans les CC ce qui induit leur survie, alors que les CC de faible affinité ont un taux de mortalité plus élevé (Anderson SM *et al.*, J Immunol, 2009). En cas d'affinité faible et de potentielle auto-réactivité, le FcγRIIB est plus engagé et conduit à la mort par apoptose des CC (Ravetch JV et Nussenzweig M, Nat Immunol, 2007). Le rôle des FDC dans la sélection des CC, par leur fonction de présentation d'antigènes, a été largement étudié notamment grâce à des modèles murins. Dans des expériences où les FDC perdent leur capacité de rétention des antigènes, la sélection des CC n'est pas modifiée en présence de quantités élevées d'antigènes mais est réduite pour des quantités faibles (Hannum LG *et al.*, J Exp Med, 2000 ; Chen Z *et al.*, J Immunol, 2000). En revanche, les souris déficientes en LTα et donc totalement déficientes en FDC ne forment pas de GC. Lorsque ces souris sont immunisées avec de faibles doses d'antigènes, les lymphocytes B produits ont un taux d'Ig affines réduites, alors que l'immunisation avec de fortes quantités d'antigènes conduit à une maturation d'affinité des Ig normale (Matsumoto M *et al.*, Nature, 1996). Ces données montrent que les FDC jouent un rôle primordial dans la sélection des CC, mais non indispensable.

Le rôle du BCR dans la sélection des CC est toutefois débattu et les données plus récentes montrent que la signalisation BCR ne suffit pas à sélectionner les CC fonctionnels. En effet, l'équipe de Shlomchik a montré qu'après stimulation par un antigène soluble, la majorité des B du GC qui prolifère n'active pas de signalisation BCR (Khalil AM *et al.*, Science, 2012), supposant un rôle prédominant des Tfh. Aussi, lorsque les B du GC sont stimulés par des antigènes membranaires, ils activent la signalisation BCR sans pour autant activer la voie NF-κB, nécessaire pour leur survie, ce qui prouve que la signalisation BCR n'est pas suffisante (Nowosad CR *et al.*, Nat Immunol, 2016). En revanche, le fait de bloquer l'accès des antigènes au GC ou de dépléter les Tfh n'affectent pas la génération de PC (Kräutler NJ *et al.*, J Exp Med, 2017). Ces PC sont probablement obtenus par différenciation extra-folliculaire. Par ailleurs, Turner *et al.* ont récemment montré que même si la signalisation BCR n'est pas suffisante pour sélectionner les lymphocytes B, lorsque les signaux produits par les Tfh sont trop faibles ou lorsque les Tfh sont saturés, le BCR initie la sélection et la différenciation (Turner JS *et al.*, Cell

Rep, 2018). Enfin, en plus d'agir dans la réponse humorale immédiate, les FDC participent également à la réponse B mémoire en présentant pendant de longues périodes les antigènes (Wu J *et al.*, J Immunol, 1996).

Les FDC ont également pour rôle de sécréter la chimiokine attractive CXCL13 (Allen CDC *et al.*, Nat Immunol, 2004 ; Cosgrove J *et al.*, Nat Commun, 2020) qui attirent les lymphocytes B et T CXCR5+ (récepteur de CXCL13) dans le follicule primaire (Förster R *et al.*, Cell, 1996 ; Haynes NM *et al.*, J Immunol, 2007). Les FDC produisent aussi des cytokines qui promeuvent la survie des lymphocytes B tels que l'IL-6 (Wu Y *et al.*, Int Immunol, 2009) et le BAFF (Suzuki K *et al.*, Immunity, 2010, Rodda LB *et al.*, Immunity, 2018). Elles expriment des molécules d'adhésion comme ICAM-1 et V-CAM-1 qui permettent l'attachement des CC aux FDC et probablement aussi des lymphocytes T.

Il faut noter que peu de données sont disponibles sur les cellules stromales humaines et en particulier sur les FDC. En effet, ces cellules sont peu nombreuses, difficiles à isoler (souvent sur la base de l'expression du CD21, du CD35 et de la podoplanine), ne survivent pas, et perdent leurs capacités fonctionnelles en culture (Mabbott NA *et al.*, Immunology, 2011). Ainsi, toutes les données existantes ont été obtenues soit à partir de modèles murins, soit à partir de lignées cellulaires, mais ces dernières ne reflètent pas la situation *in vivo* car elles ne correspondent pas à des FDC (Aguzzi A et Krautler NJ, J Immunol, 2010 ; Wilke G *et al.*, J immunol, 2010).

c. Le rôle des lymphocytes T folliculaires régulateurs dans la réaction du centre germinatif

Les Tfr sont des lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺ Bcl6⁺ Foxp3⁺, dont l'expression pour le CD25 est plutôt débattue (Wing JB *et al.*, PNAS, 2017 ; Ritvo PG *et al.*, Sci Immunol, 2017). Ces cellules ont un profil intermédiaire entre les lymphocytes Tfh et les Treg. Elles sont localisées en bordure de la zone B-T et expriment faiblement PD-1 et BCL6 (Sayin I *et al.*, J Exp Med, 2018). Leur rôle dans la régulation des Tfh a été mis en évidence par des expériences de cocultures B-Tfr-Tfh. La coculture n'a pas d'impact sur le profil transcriptomique des Tfh mais elle induit une diminution d'expression du marqueur de prolifération Ki-67 et de l'IL-10, et une réduction de la sécrétion de l'IL-4 et de l'IL-21 par les Tfh (Sage PT *et al.*, J Clin Invest, 2014 ; Sage PT *et al.*, Nat Immunol, 2016). Ainsi, les Tfr sélectionnent les Tfh et régulent leur production de cytokines (Wing JB *et al.*, Front Immunol, 2018).

Les Tfr ont aussi un rôle immuno-modulateur envers les B du GC : ils régulent la sortie des PC du GC, contrôlent la taille des GC, la maturation et la sécrétion des Ig *via* les mécanismes de CSR et SHM (Wing JB *et al.*, Front Immunol, 2018). Ainsi, plusieurs études montrent que les Tfr favorisent l'émergence de clones B hautement affins tout en limitant l'expansion des clones moins affins pour l'antigène (Botta D *et al.*, Nat Immunol, 2017 ; Wu H *et al.*, Eur J Immunol, 2016 ; Wing JB *et al.*, Immunity, 2014). Les Tfr ont également un rôle dans la tolérance du soi et évitent les réactions auto-immunes. Ainsi, leur absence n'affecte pas la formation des follicules B (Fonseca VR *et al.*, Sci Immunol, 2017) mais induit une accumulation de PC auto-réactifs (Botta D *et al.*, Nat Immunol, 2017 ; Fu W *et al.*, J Exp Med, 2018).

Les mécanismes par lesquels les Tfr agissent ne sont pas encore bien déterminés mais ils agiraient par le biais de la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β . En effet, lors de l'absence d'IL-10 produite par les lymphocytes T Foxp3⁺ dans des modèles murins, les réactions du GC augmentent et les GC ont une LZ plus développée (Laidlaw BJ *et al.*, Sci Immunol, 2017). Ces mécanismes impliquent également des signaux qui nécessitent des contacts cellulaires (Sage

PT *et al.*, Trends Immunol, 2015). Ainsi, tout comme les Treg, les fonctions immunosuppressives des Tfr passeraient par l'expression de la protéine inhibitrice CTLA-4, qui est en compétition avec la protéine activatrice CD28 et qui inhibe la prolifération des Tfh (Wing K *et al.*, Science, 2008 ; Sage PT *et al.*, Immunity, 2014). De plus, l'activation du CTLA-4 empêche la sécrétion d'IL-4 par les Tfh et bloque les signaux de co-stimulation CD80 et CD86 par les lymphocytes B, ce qui diminue les réponses humorales (Wing JB *et al.*, Immunity, 2014). Toutefois, même si le CTLA-4 semble être le principal facteur de la réponse suppressive des Tfr, des systèmes complémentaires sont nécessaires. Les Tfr produisent également du CD40L (Sayin I *et al.*, J Exp Med, 2018) et du granzyme B, mais les mécanismes mis en jeu ne sont actuellement pas totalement élucidés (Linterman MA *et al.*, Nat Med, 2011).

II. Les devenir des centrocytes

La sélection des CC est étroitement liée à leur devenir. Ainsi, quatre possibilités existent :

- Les CC meurent par apoptose par sélection négative (détaillée précédemment), c'est le cas pour la majorité d'entre eux ;
- Ils retournent dans la DZ et effectuent un nouveau cycle de prolifération/maturation ;
- Ils se différencient en PB puis PC à longue durée de vie, avec un BCR hautement spécifique de l'antigène ;
- Ils se différencient en MBC.

Même si ces étapes de différenciation sont maintenant bien décrites, les mécanismes précis ne sont pas tous élucidés. Des études montrent d'ailleurs que les étapes de maturation subies par les lymphocytes B dans le GC, ne sont pas limitées à certaines zones. Ainsi, à l'aide d'imagerie *in vivo* et de RNA-seq à l'échelle de la cellule unique, des équipes ont montré que la prolifération et la sélection des lymphocytes B n'étaient pas limitées à la DZ et la LZ respectivement (Hauser AE *et al.*, Nat Rev, 2007 ; Holmes AB *et al.*, J Exp Med, 2020).

1) Le retour dans la zone sombre

Partant du fait que les mutations aléatoires des gènes des Ig produites lors d'un cycle de SHM sont peu nombreuses, Perelson et ses collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel les CC sélectionnés positivement par les Tfh, retourneraient dans la DZ pour effectuer un nouveau cycle de maturation (Kepler TB et Perelson AS, Immunol, 1993 ; Oprea M et Perelson AS, J Immunol, 1997). Par la suite, des expériences d'imagerie intra-vitale ont permis de mettre en évidence qu'effectivement, un nombre faible de CC migrait dans la DZ (Schwickert TA *et al.*, Nature, 2007 ; Hauser AE *et al.*, Immunity, 2007). Ces études n'ont pas pour autant validé le retour dans la DZ, du fait du nombre limité de cellules mis en évidence et du temps d'étude trop court. Le retour dans la DZ a été validé par l'équipe de Nussenzweig grâce à un

système de rapporteur fluorescent photo-activable (Victoria GD *et al.*, Cell, 2010). Ils ont ainsi mis en évidence qu'après 4 heures, la moitié des CB avaient migré dans la LZ et moins de 10% des CC vers la DZ. Ils ont ainsi calculé qu'environ 30% des CC retournaient dans la DZ après chaque étape de sélection (**Figure 15**).

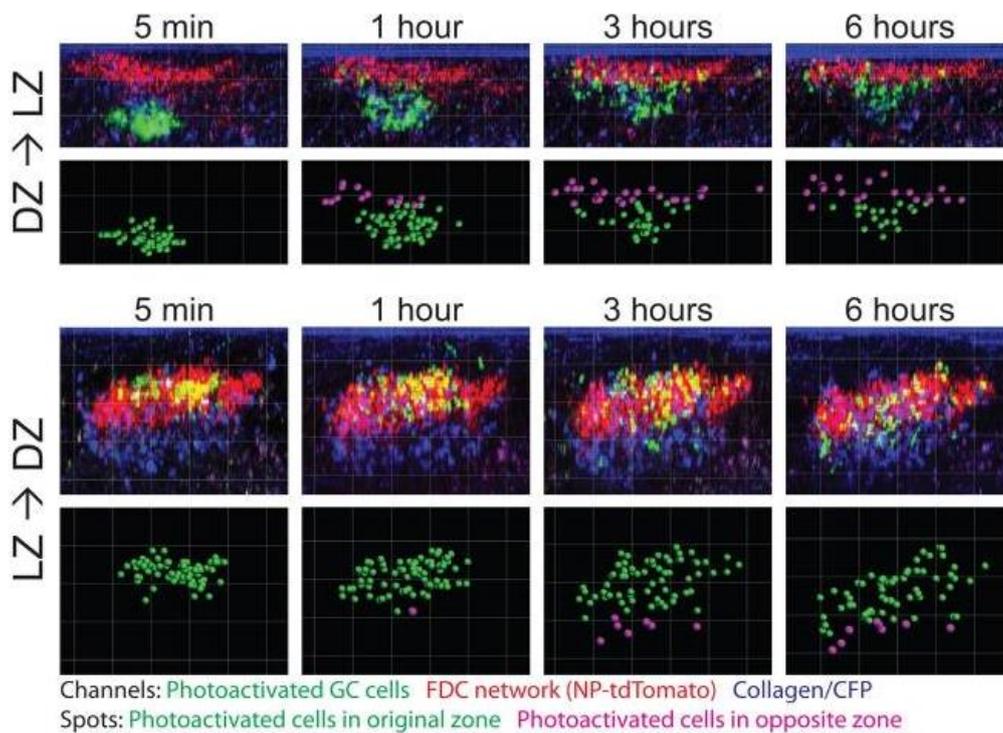


Figure 15 : La migration des lymphocytes B entre la zone claire et la zone sombre dans le centre germinatif. Les cellules photo-activées dans la DZ (en haut) et dans la LZ (en bas) dans des ganglions de souris ont été enregistrées à différents temps par microscopie à balayage laser multiphotonique. Les points verts correspondent aux cellules présentes dans la zone photo-activée et les points violets correspondent aux cellules qui ont rejoint la zone opposée, non photo-activée (Victoria GD *et al.*, Cell, 2010).

Le retour dans la DZ dépend notamment de l'expression du CXCR4 qui permet la migration *via* le CXCL12, et de l'internalisation du CXCR5 (Victoria GD *et al.*, Cell, 2010). Selon une étude récente, les CC (CXCR4⁻ CD83⁺) nouvellement sélectionnés migrent dans une zone particulière de la DZ : la « zone grise ». Après prolifération, ces cellules (CXCR4⁺ CD83⁺) migrent à nouveau dans la DZ pour continuer leur différenciation (CXCR4⁺ CD83⁻) avant de retourner dans la LZ (Kennedy DE *et al.*, Nat Immunol, 2020). La proportion d'antigènes captée par les CC et présentée à leur surface aux Tfh conditionne leurs capacités d'expansion et de SHM. Ainsi, les CC les plus affins pour l'antigène sont finement sélectionnés et sont ceux qui vont proliférer à

nouveau (Hauser AE *et al.*, Immunity, 2007 ; Allen CDC *et al.*, Science, 2007 ; Gitlin AD *et al.*, Nature, 2014), en exprimant notamment la cycline D2 (CCND2) (Victoria GD *et al.*, Cell, 2010) et c-MYC (Dominguez-Sola D *et al.*, Nat Immunol, 2012) dont l'expression dans le GC dépend à la fois du CD40 et du BCR (Luo W *et al.*, Immunity, 2018). Ces résultats ont aussi été validés récemment par Finkin *et al.*, qui montrent que les Tfh induisent l'expression de c-MYC par les CC dans la LZ, de manière proportionnelle à la quantité d'antigènes qu'ils reconnaissent. Cette expression de c-MYC est corrélée au nombre de divisions que va subir le CC dans la DZ, puisque c-MYC va être diluée au fur et à mesure des divisions, constituant ainsi un marqueur temporel de divisions (Finkin S *et al.*, Immunity, 2019).

Après ce nouveau cycle de maturation, les CC sont à nouveau sélectionnés dans la LZ et ont la possibilité de se différencier en PB.

2) La différenciation des centrocytes en plasmablastes

La différenciation des CC en PC passe par des stades intermédiaires : les pré-PB et les PB. De nombreux facteurs interviennent dans la différenciation plasmocytaire tels que le type d'antigène à l'origine de la réponse, la nature de la cellule activée (NBC ou MBC), les marqueurs exprimés par les PC, leur durée de vie, le type et le taux d'Ig qu'ils sécrètent, et font que le compartiment plasmocytaire est un compartiment extrêmement hétérogène (Pellat-Deceunynck C et Defrance T, Front Immunol, 2015 ; Halliley JL *et al.*, Immunity, 2015).

a. Les stades pré-plasmablastes et plasmablastes

Plusieurs études ont montré l'existence de pré-PB : des cellules intermédiaires entre les CC et les PB. Ces cellules sont localisées dans la DZ du GC grâce à la présence de CXCL12 et expriment BLIMP1 (Radtke D et Bannard O, Front Immunol, 2019). Les pré-PB expriment une signature CD40 et BCR prouvant qu'ils ont interagit avec un lymphocyte Tfh (Ise W *et al.*,

Immunity, 2018) et sont caractérisés par l'expression de gènes PC comme *PRDM1*, *XBP1* et *IRF4*, et la répression des gènes de l'identité B tels que *BCL6* et *PAX5* (Zhang Y *et al.*, J Exp Med, 2018). Notre équipe a également participé à la caractérisation de ces cellules par un système de différenciation *in vitro* des MBC en PC. Dans ce système, les pré-PB co-expriment des marqueurs B et PC, commencent à sécréter des Ig et sont capables de se différencier en PC CD20⁻ CD38⁺⁺ CD138⁺ (Jourdan M *et al.*, J Immunol, 2011).

Récemment, Herviou *et al.* ont montré que les transitions des pré-PB en PB puis des PB en PC étaient contrôlées épigénétiquement par l'amplificateur de l'homologue zeste 2 (EZH2). En effet, EZH2 a un rôle dans la prolifération des PB, il appose des marques répressives H3K27me3 (triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3) sur les promoteurs des gènes PC et son expression est perdue au cours de la différenciation (Herviou L *et al.*, Leukemia, 2019).

Enfin, les PB correspondent aux premières cellules effectrices : ils sont produits rapidement et initient la production d'Ig mais meurent rapidement. Ces cellules subissent cinq cycles de division dans les OLS, avant de se différencier en PC non prolifératifs (Sze DM *et al.*, J Exp Med, 2000).

b. La régulation transcriptionnelle des plasmocytes

Les PC sont des cellules totalement différenciées qui permettent l'immunité humorale *via* la production des Ig (Nutt SL *et al.*, Nat Rev Immunol, 2015). La protection de l'organisme est ainsi assurée immédiatement par les PC à courte durée de vie qui résident principalement dans les OLS et qui meurent rapidement, et de manière prolongée *via* les PC à longue durée de vie qui se nichent dans la moelle osseuse et peuvent perdurer plusieurs années (Chang HD *et al.*, Immunol Rev, 2018 ; Kometani K *et al.*, Cur Opin Immunol, 2015). Chez l'humain, ces cellules sont caractérisées par l'expression de marqueurs membranaires comme le CD38 qui est exprimé fortement, le CD20 et le CD138 aussi appelé syndécan 1 (SDC1) et qui correspond à une glycoprotéine composée d'une association de chondroïtines sulfates et d'héparanes

sulfates. Une récente étude a caractérisé précisément les PC des amygdales grâce à des immunohistomarquages. Ils montrent notamment que les PC expriment le CD38, le CD138, le CD27, IRF4 et l'IgG en intra-cellulaire. Ces PC sont produits dans la LZ puis migrent ensuite dans la DZ avant de quitter le GC (Steiniger BS *et al.*, Histochem Cell Biol, 2020). Chez la souris, les PC expriment également le CD138 mais perdent l'expression du CD38.

La différenciation des PC passe par une régulation fine de l'expression des facteurs de transcription (**Figure 16**). Ainsi, les PC répriment l'expression des gènes de l'identité B comme *PAX5*, *BCL6*, *SPIB*, *BACH2* et *IRF8* principalement, et expriment les gènes de l'identité plasmocytaire tels que *PRDM1*, *IRF4* et *XBP1* (Nutt SL *et al.*, Nat Rev, Immunol, 2015). Récemment, Shi W *et al.* ont séquencé le transcriptome de plusieurs populations de lymphocytes B de rate et de moelle osseuse de souris. Ces résultats ont permis d'identifier les gènes spécifiquement exprimés dans les PC en comparaison aux B folliculaires. Ainsi, parmi les gènes les plus exprimés dans les PC, on retrouve *PRDM1* et *SDC1*, mais aussi des gènes de la réponse aux protéines mal-conformées (UPR) tels que le gène de la protéine de signalisation nucléaire 1 du réticulum endoplasmique (*ERN1* qui code pour IRE1), *XBP1* et la protéine 3 de liaison à l'élément de réponse AMPc apparentée 2 (*CREB3L2*) (Shi W *et al.*, Nat Immunol, 2015).

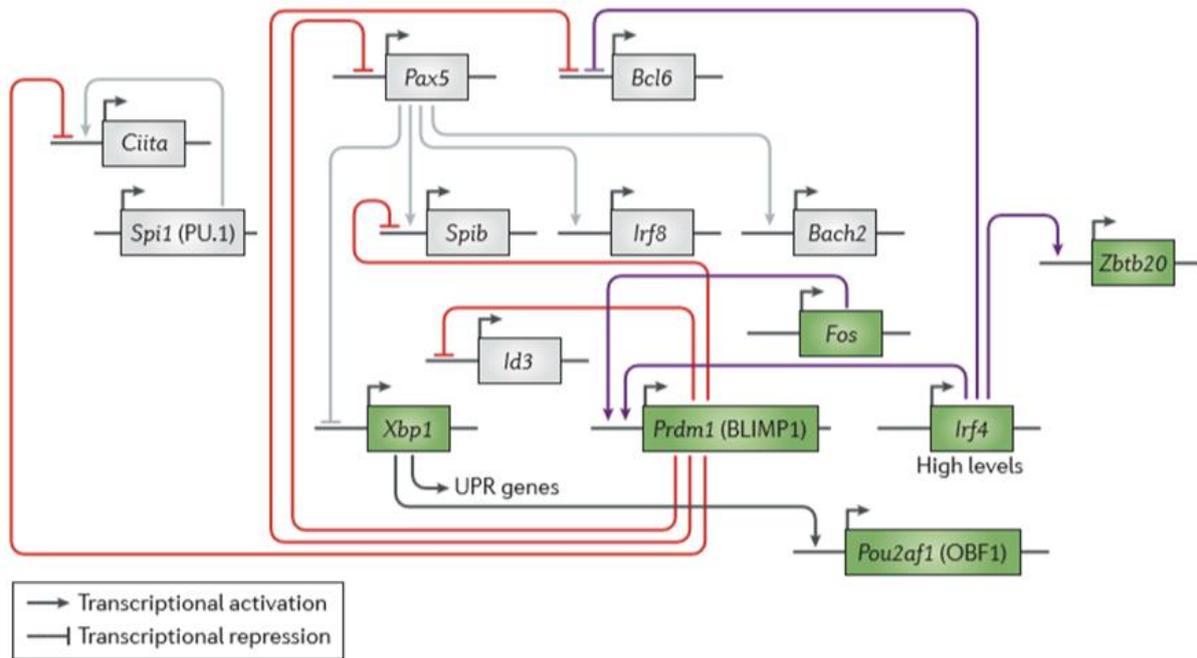


Figure 16 : Le réseau transcriptionnel régulant la différenciation des plasmocytes. Les PC expriment différents facteurs de transcription qui répriment mutuellement les facteurs de transcription de l'identité B. Ainsi, les PC expriment PRDM1, XBP1 et IRF4 majoritairement. Ils répriment CIITA, PAX5, SPIB, BCL6 et BACH2 principalement (Nutt SL et al., Nat Rev Immunol, 2015).

Dans la lymphopoïèse B, *PRDM1*, le gène codant pour la protéine BLIMP1 est exprimé exclusivement dans les PC. Shaffer *et al.* ont montré dans un modèle murin, que *Blimp-1* est nécessaire pour la génération des PC (Shaffer AL *et al.*, Immunity, 2004). Toutefois, l'équipe de Nutt a réussi à différencier des pré-PB déficients pour *Blimp-1* en PC prouvant ainsi que BLIMP1 n'est pas indispensable pour l'initiation de la différenciation mais qu'il est nécessaire pour la production d'Ig et donc la génération de PC complètement différenciés (Tellier J *et al.*, Nat Immunol, 2016). La régulation transcriptionnelle de la différenciation plasmocytaire a notamment été mise en évidence grâce à des modèles de souris avec un rapporteur BLIMP-1-GFP (Kallies A *et al.*, J Exp Med, 2004). L'expression de BLIMP1 induit l'augmentation de l'expression de XBP1 dont le rôle principal est de faciliter les capacités de production des Ig par le biais de l'UPR (Reimold AM *et al.*, Nature, 2001 ; Shaffer AL *et al.*, Immunity, 2004 ; Minnich M *et al.*, Nat Immunol, 2016 ; Tellier J *et al.*, Nat Immunol, 2016). Par ailleurs, BLIMP1 réprime des gènes de l'identité B tels que *BCL6* (Shaffer AL *et al.*, Immunity, 2002) ; *PAX5* (Lin

KI *et al.*, Mol Cell Biol, 2002) et *AICDA* (Minnich M *et al.*, Nat Immunol, 2016). BLIMP1 est également impliqué dans la différenciation des lymphocytes T (Nutt SL *et al.*, Nat Rev Immunol, 2007) et est inhibé par BCL6 dans les lymphocytes Tfh (DiToro D *et al.*, Science, 2018).

La protéine IRF4 a un double rôle et agit de manière dose-dépendante : en faible quantité, elle augmente l'expression des protéines BCL6 et AID alors qu'en forte quantité, IRF4 réprime l'identité GC en faveur d'une différenciation PC avec l'induction de BLIMP1 (Ochiai K *et al.*, Immunity, 2013 ; Klein U *et al.*, Nat Immunol, 2006 ; Teng Y *et al.*, Eur J Cell Biol, 2007). IRF4 active également la protéine 20 à doigt de zinc et contenant un domaine BTB (ZBTB20) (Chevrier S *et al.*, J Exp Med, 2014 ; Lam WY et Bhattacharya D, Trends Immunol, 2018) et OBF1 (Schubart DB *et al.*, Nature, 1996) qui facilitent la différenciation en PC. Enfin, la régulation d'IRF4 nécessite l'intervention de l'ubiquitine ligase CBL-b qui le dégrade. Chez la souris, l'absence d'expression de CBL-b altère la maturation d'affinité et la production des PC (Li X *et al.*, Immunity, 2018), probablement par le biais d'IRF4.

Etant donné leur fonction de cellules sécrétrices d'anticorps et donc leur forte production d'Ig, les PC sont prônes à développer un stress du réticulum endoplasmique (RE). Afin d'éviter une surcharge du RE, les PC activent l'UPR, notamment par le biais de XBP1 (Iwakoshi NN *et al.*, Immunol Rev, 2003). Ainsi, même si XBP1 participe grandement à la génération des PC et des Ig, son inactivation n'empêche pas la formation des PC (Taubenheim N *et al.*, J Immunol, 2012). En effet, la déplétion de XBP1 peut être partiellement compensée par l'activation de la cible de la rapamycine (mTOR) (Benhamron S *et al.*, Mol Cell Biol, 2014). Enfin, le facteur de l'identité B PAX5 réprime XBP1 (Reimold AM *et al.*, J Exp Med, 1996) alors que l'IL-4 l'induit (Iwakoshi NN *et al.*, Immunol Rev, 2003). Il faut noter que IRE1 permet la production d'une forme alternative de XBP1 : XBP1s qui est impliqué dans ces mêmes fonctions.

Enfin, il existe un facteur récemment mis en évidence qui intervient sur la différenciation des lymphocytes B et T : le facteur de transcription induit par l'IFN- γ (T-bet). T-bet a un rôle intermédiaire entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Lazarevic V *et al.*, Nat Rev Immunol, 2013). Dans les lymphocytes T CD8⁺, T-bet régule notamment l'expression de BCL6 et BLIMP1 (Xin A *et al.*, Nat Immunol, 2016) ce qui n'est pas le cas dans les lymphocytes B (Stone SL *et al.*, J Immunol, 2019). En revanche, T-bet intervient dans la CSR des Ig sous l'induction de l'IFN- γ (Peng SL *et al.*, PNAS, 2002). Enfin, T-bet intervient dans la différenciation des lymphocytes B activés en réponse à l'IFN- γ et dans le cadre d'une infection virale, en facilitant leur différenciation en PC ce qui n'est pas le cas avec une stimulation de type Th2 avec de l'IL-4 (Stone SL *et al.*, Immunity, 2019). Récemment, l'équipe de Shlomchik a montré que l'IL-12 induite dans le cadre d'une infection par *Salmonella* (et donc une réponse immunitaire de type Th1) augmente l'expression de T-bet dans les lymphocytes T ce qui bloque leur différenciation en Tfh et empêche la formation des GC (Elsner RA et Shlomchik MJ, Cell Rep, 2019).

Ces dernières années, les techniques d'étude du transcriptome au niveau cellule unique et les analyses bio-informatiques se sont énormément développées. Ces analyses permettent de mettre en évidence l'hétérogénéité qui existe au sein des populations lymphocytaires B, de valider les facteurs impliqués dans les différentes sous-populations cellulaires et d'établir des trajectoires moléculaires de l'engagement dans la différenciation (Milpied P *et al.*, Nat Immunol, 2018 ; Scharer CD *et al.*, Nat Commun, 2020 ; Dermadi D *et al.*, iScience, 2020 ; Holmes AB *et al.*, J Exp Med, 2020) (**Figure 17**).

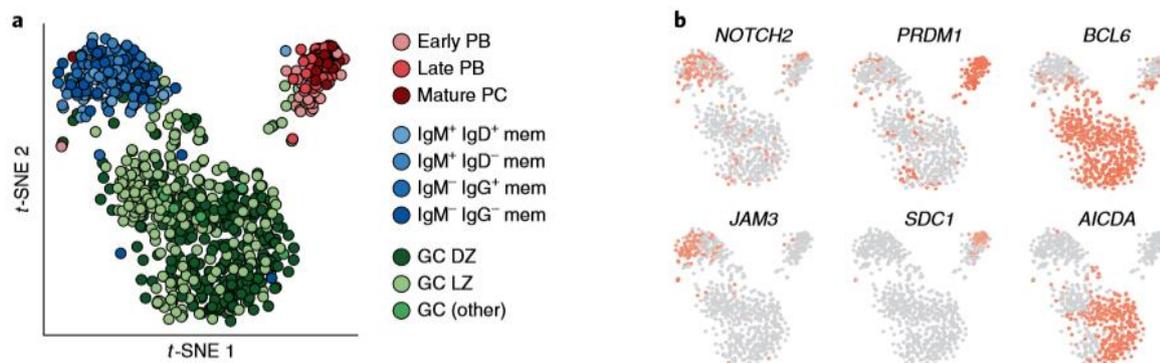


Figure 17 : L'analyse du transcriptome au niveau cellule unique des lymphocytes B matures humains. a. Représentation en t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) de 767 lymphocytes B du centre germinatif (GC), B mémoires (mem), plasmablastes (PB) et plasmocytes (PC) sur la base de l'expression de 91 gènes. Les différentes populations de B du GC, de B mémoire ou de PB/PC sont bien distinctes les unes des autres. **b.** Expression de différents marqueurs spécifiques des populations correspondantes. Les B mémoires sont caractérisés par l'expression de NOTCH2 et de JAM3, les PC par l'expression de PRDM1 et de SDC1 et les B du GC par BCL6 et AICDA (Milpied P et al., Nat Immunol, 2018).

3) La différenciation en lymphocytes B mémoires

La différenciation des B du GC est maintenant bien décrite mais on n'explique toujours pas complètement comment un B va « prendre la décision » de se différencier en PB plutôt qu'en MBC. Il existe cependant quelques éléments de réponse. D'abord, Chiu et ces collaborateurs ont montré que le facteur des lymphocytes B activés 1 (ABF-1) activé par l'IL-21 et l'anti-CD40, favorise la différenciation des B du GC en MBC notamment parce qu'ABF-1 et BLIMP1 se répriment mutuellement (Chiu YK et al., J Immunol, 2014). Par ailleurs, une étude récente a montré que l'IL-9 produite par une faible proportion de Tfh favorisait la différenciation en MBC (Wang Y et al., Nat Immunol, 2017). Enfin, d'autres études montrent que la force d'affinité du BCR conditionne le devenir du lymphocyte B. En effet, les PC ont un BCR de plus forte affinité que les MBC, et donc avec une charge mutationnelle plus importante au niveau des gènes des Ig (Smith KG et al., EMBO J, 1997 ; Shinnakasu R et al., Nat Immunol, 2016 ; Ise W et al., Immunity, 2018). Ces études sont en lien avec celle de Weisel et al. qui montre que la durée de la différenciation impacte le « choix » du lymphocyte B de se différencier, avec la production de MBC qui précède celle des PC (Weisel FJ et al., Immunity, 2016). D'ailleurs, la différenciation des MBC n'est pas autant affectée que celle des PC en absence de CXCR4. En

effet, les MBC qui retournent dans la DZ pour améliorer l'affinité de leur BCR sont moins nombreux que les PC (Bannard O *et al.*, *Immunity*, 2013). Les MBC dérivent en revanche des clones les plus affins (Mesin L *et al.*, *Cell*, 2020).

La différenciation des MBC est particulièrement compliquée à étudier du fait de l'absence de gène spécifiquement exprimé dans les MBC, même si la majorité de ces cellules exprime le CD27 (Wu YC *et al.*, *Front Immunol*, 2011). Bien que les MBC aient un profil transcriptionnel proche de celui des NBC, ces cellules sont fonctionnellement très différentes. En effet, les MBC, et particulièrement les MBC avec un BCR commuté se différencient plus rapidement en PC que les NBC après une deuxième infection (Dogan I *et al.*, *Nat Immunol*, 2009). Cette capacité accrue de différenciation pourrait en partie être expliquée par une expression plus élevée de *BACH2* par ces cellules (Kometani K *et al.*, *Immunity*, 2013 ; Shinnakasu R *et al.*, *Nat Immunol*, 2016). Tout comme les NBC, les MBC sont des cellules quiescentes et expriment *PAX5*. Les MBC présentent toutefois quelques différences avec les NBC comme une surexpression des molécules de costimulation CD80 et CD86 et des protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2 et la protéine 6 contenant des IAP baculoviraux (BIRC6) (Bhattacharya D *et al.*, *J Immunol*, 2007 ; Good-Jacobson KL et Shlomchik MJ, *J Immunol*, 2010). Ces surexpressions augmentent leur capacité d'activation et de survie ce qui leur permet de se différencier plus rapidement en PC que les NBC. Aussi, cette différenciation est renforcée par le CD40L puisque les MBC qui se différencient en PC lors d'une seconde exposition au pathogène, sont ceux qui ont une signalisation CD40 forte, et donc, une interaction forte avec les Tfh (Koike T *et al.*, *elife*, 2019).

Enfin, certaines équipes ont identifié des précurseurs de MBC chez la souris : c'est le cas de Laidlaw *et al.* qui ont isolé une population de B du GC située dans la LZ qui exprime l'Ephrine B1. Ces cellules perdent l'expression de BCL6, augmentent celle du CD38 et d'EBI2 et ont une meilleure survie que les B du GC (Laidlaw BJ *et al.*, *J Exp Med*, 2017). Suan *et al.* ont aussi isolé des précurseurs des MBC basés sur l'expression du CCR6 qui leur permet de résider dans les tissus lymphoïdes (Suan D *et al.*, *Immunity*, 2017) et qui n'est pas exprimé par les PB (Elgueta R *et al.*, *J Immunol*, 2015).

III. La sortie des plasmablastes du centre germinatif et la caractérisation des plasmocytes

1) La sortie du centre germinatif et la niche médullaire des plasmocytes

Deux vagues successives de PB sont issues des GC : la première est composée de PB à courte durée de vie qui résident dans les OLS mais qui peuvent aussi coloniser la moelle osseuse, où ils ne survivront pas longtemps (Zhang Y *et al.*, J Exp Med, 2018). La seconde correspond aux PB à longue durée de vie et les PC issus de cette vague résideront à long terme dans la moelle osseuse (Weisel FJ *et al.*, Immunity, 2016). Il faut noter que les PB et les MBC émergents des GC sont finement sélectionnés afin d'éviter la production d'anticorps auto-immuns (Mayer CT *et al.*, PNAS, 2020).

Différents signaux permettent la sortie des PB des OLS. D'abord, les PB perdent l'expression du CXCR5 et sur-expriment le CXCR4 en réponse au CXCL12 produit par les CRC, ce qui leur permet de sortir du GC au niveau de la DZ (Meyer-Hermann M *et al.*, Cell Rep, 2012 ; Fooksman DR *et al.*, Immunity, 2010). L'équipe de Tarlinton a mis en évidence que la migration *via* le CXCL12 ne dépend pas seulement de CXCR4 mais dépend également de l'expression de c-MYB. En effet, les souris dont l'expression de c-MYB est bloquée dans les lymphocytes B ont une altération de la migration des PB dans le sang et dans la moelle osseuse (Good-Jacobson KL *et al.*, J Exp Med, 2015). Ensuite, les cellules stromales et principalement les FRC fournissent d'autres signaux qui attirent les PB dans la zone T comme le CCL19 et le CCL21. Ces cellules stromales promeuvent la survie et la prolifération des PB *via* le ligand induisant la prolifération (APRIL) (dont le récepteur est l'activateur transmembranaire qui interagit avec CAML (TACI) qui promeut l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-XL (Belnoue E *et al.*, Blood, 2008) ; l'IL-6 et le BAFF (Zhang Y *et al.*, J Exp Med, 2018). Reijmers *et al.* ont montré qu'APRIL induit ses fonctions de survie en se liant aux héparanes sulfates comme le CD138, présents en surface des PC. En effet, ils ont délété l'épimérase glucuronyl

C5 qui permet aux héparanes sulfates d'acquérir une conformation particulière et d'effectuer certaines de leurs fonctions. Dans cette situation, les lymphocytes B continuent de lier le CXCL13 et le CCL21 mais ne fixent plus APRIL et le CXCL12- α . En conséquence, la maturation des lymphocytes B est altérée et le nombre de PC et les taux d'Ig produites sont réduits (Reijmers RM *et al.*, Blood, 2011). Dans la zone T, les PB suivent ensuite le gradient de S1P qui s'étend des OLS jusqu'à la circulation sanguine (Schwab SR *et al.*, Science, 2005 ; Kabashima K *et al.*, J Exp Med, 2006), puis rejoignent la moelle osseuse, toujours grâce au gradient de CXCL12 (Nguyen DC *et al.*, Front Immunol, 2019). Pabst *et al.* ont montré que la migration des PB jusqu'à la moelle osseuse dépend non seulement des gradients de chimiokines, mais également l'expression de protéines membranaires et notamment de l'intégrine β 2 (LFA-1), dont la déplétion bloque complètement la migration (Pabst O *et al.*, J Immunol, 2005).

Au sein de la niche médullaire, de nombreux types cellulaires produisent des signaux qui permettent à la fois la migration des PB, leur différenciation en PC, leur survie et leur maintien (**Figure 18**). Parmi eux (et de manière non-exhaustive), on trouve les mégacaryocytes (Winter O *et al.*, Blood, 2010), les polynucléaires basophiles (Rodriguez Gomez M *et al.*, J Immunol, 2010), les DC (Lightman S *et al.*, Front Immunol, 2019), ainsi que les précurseurs myéloïdes (Matthes T *et al.*, Blood, 2011). Ces cellules peuvent être en contact direct avec les PC *via* des récepteurs particuliers (CD80-CD86 sur les DC qui se lient au CD28 sur les PC, par exemple) ou produire des facteurs solubles comme le CXCL12, l'IL-4, l'IL-6 et l'APRIL (Lindquist RL *et al.*, Front Immunol, 2019) et l'ENPP1 (Wang H *et al.*, Sci Rep, 2017).

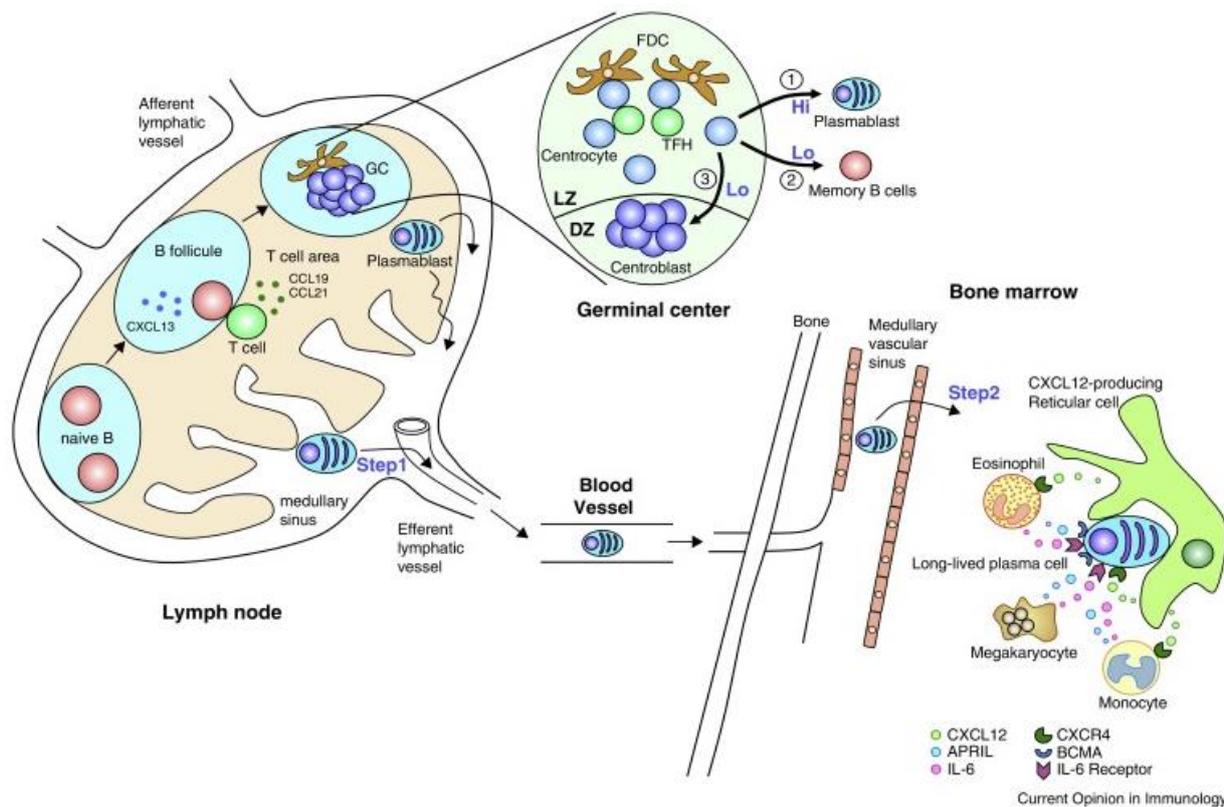


Figure 18 : La sortie des plasmablastes du centre germinatif et la niche médullaire des plasmocytes. Dans la zone claire (LZ) du centre germinatif, les centrocytes les plus affins se différencient en plasmablastes (1), les moins affins se différencient en lymphocytes B mémoire (2) et certains retournent dans la zone sombre (DZ) (3). Les plasmablastes quittent les organes lymphoïdes secondaires et rejoignent la circulation sanguine (**Step 1**). Ensuite, ils traversent les vaisseaux sanguins par transmigration et arrivent dans la niche médullaire (**Step 2**). Les cellules stromales expriment du CXCL12 qui attirent les plasmablastes. Les éosinophiles, les monocytes et les mégacaryocytes sécrètent de l'APRIL et de l'IL-6 qui leur permettent de se différencier en plasmocytes à longue durée de vie (Kometani K et Kurosaki T, *Curr Opin Immunol*, 2015).

Les PC sont en contact étroit avec les cellules stromales mésenchymateuses médullaires *via* l'expression de protéines d'adhésion comme LFA-1 qui se lie sur VLA-4 (Zehentmeier S *et al.*, *Eur J Immunol*, 2014). Ces cellules produisent principalement des signaux de survie ou nécessaires aux fonctions des PC sous forme soluble, et les contacts intercellulaires avec les PC ne sont donc pas indispensables (Nguyen DC *et al.*, *Nat Commun*, 2018). Cependant, une récente étude contredit ces résultats en suggérant que les contacts cellulaires entre les PC et les cellules stromales seraient nécessaires pour le maintien des PC dans ma moelle osseuse, et qu'ils passeraient notamment par des intégrines (Cornelis R *et al.*, *Cell Rep*, 2020). Parmi les signaux produits par les cellules stromales, on trouve notamment BAFF et APRIL. BAFF peut se lier à trois récepteurs : BAFF-R ; TACI et l'antigène de maturation

des lymphocytes B (BCMA). BAFF-R est exprimé par les NBC alors que BCMA est exprimé par les PC de la moelle osseuse. APRIL peut lier les mêmes récepteurs que BAFF : BCMA, et TACI quand il est associé aux héparanes sulfates. La fixation de BAFF sur TACI induit l'expression de la protéine anti-apoptotique de différenciation des cellules de leucémie myéloïde induite 1 (MCL-1) (Peperzak V *et al.*, Nat Immunol, 2013) et l'activation des voie canoniques et non canoniques de survie NF- κ B via la protéine PIM2, qui inhibe elle-même la protéine pro-apoptotique BAD (Mackay F et Schneider P, Cytokine Growth Fact Rev, 2008). Enfin, les PC sont des cellules qui survivent mieux en conditions hypoxiques (Nguyen DC *et al.*, Nat Commun, 2018).

2) La culture des plasmocytes

La mise en place d'un système de culture qui maintien le phénotype des PC et les garde en vie est difficile à développer, notamment parce que ces cellules dépendent des cellules présentes et des signaux produits par leur micro-environnement. Ainsi, plusieurs modèles ont été développés dans différentes équipes en combinant les différents signaux décrits précédemment (Arpin C *et al.*, Science, 1995 ; Jourdan M *et al.*, Blood, 2009 ; Cocco M *et al.*, J Immunol, 2012, par exemple). Notre équipe a également développé un système de culture en deux étapes qui permet d'obtenir des PB en six jours (**Figure 19**). Ce système de culture ne permet cependant pas de maintenir en vie les PB (Caron G *et al.*, Cell Rep, 2015).

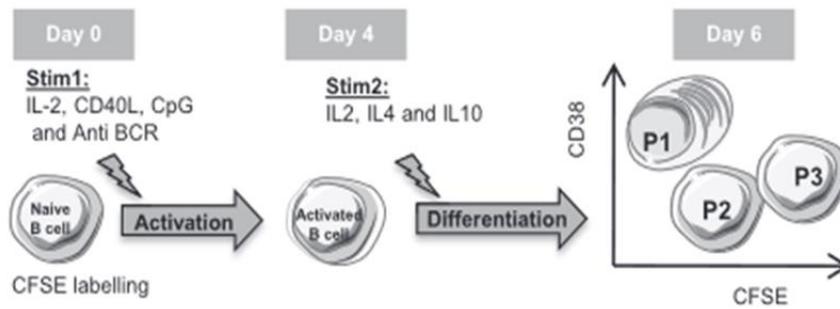


Figure 19 : Le modèle de différenciation *in vitro* développé dans notre équipe. Les NBC de sang humains sont d'abord cultivés pendant 4 jours avec la Stim 1, comprenant de l'IL-2, du CpG, de l'anti-BCR et du CD40L, puis pendant 2 jours avec la Stim 2 composée de : l'IL-2, IL-4 et IL-10. Au sixième jour de culture, il existe 3 populations qui diffèrent par leur capacité de prolifération (suivie par la dilution du CFSE) et par l'expression du CD38 : la population P3 qui est prône à mourir, la population P2 qui contient les précurseurs des PB et la population P1 : CD38⁺⁺ CFSE^{faible} qui correspond aux PB (Caron G *et al.*, Cell Rep, 2015).

Certaines équipes utilisent également des « feeders » qui correspondent à des cellules stromales, ou des surnageants de culture de ces feeders, pour mimer l'interaction B-stroma *in vitro*. C'est par exemple le cas de l'équipe de Moreaux qui a développé un système de culture en trois étapes, dans lequel elle différencie des MBC en PC. Ainsi, elle cultive les MBC avec 30% de surnageant de culture de Resto, une lignée cellulaire de FRC. Pour activer les MBC, elle les cultive d'abord avec une combinaison de molécules incluant : des oligonucléotides CpG, du CD40L, de l'IL-2, de l'IL-10 et de l'IL-15 pendant les quatre premiers jours. Les trois jours suivants, elle enlève les CpG et le CD40L et ajoute de l'IL-6, en plus de l'IL-2, l'IL-10 et l'IL-15 pour différencier les cellules activées en PB. Enfin, pendant les jours 7 à 10, elle les différencie en PC avec de l'IL-6, IL-15 et IFN- α (Herviou L *et al.*, Leukemia, 2019).

3) Le CD138 et son rôle dans le myélome multiple

Le CD138 exprimé par les PC joue un rôle primordial dans leur survie. En effet, les chaînes d'héparanes sulfates du CD138 permettent aux PC de capter et de concentrer des signaux de survie tels que l'IL-6 et l'APRIL (McCarron MJ *et al.*, Blood, 2017). Par ailleurs, le CD138 se lie au collagène de type I dans la moelle osseuse (Ridley RC *et al.*, Blood, 1993) et permet ainsi le

maintien des PC dans la niche médullaire. Il faut noter que le CD138 n'est pas le seul syndécan exprimé par les PC. Ils expriment également le SDC-4 à titre d'exemple (Yamashita Y *et al.*, J Immunol, 1999).

Le myélome multiple (MM) dérive de la prolifération clonale d'un PC dans la moelle osseuse et est donc caractérisé par une forte production d'Ig monoclonales. Même si l'expression du CD138 est hétérogène, il a un rôle dans la progression de la pathologie (Khotskaya YB *et al.*, J Biol Chem, 2009 ; Yang Y *et al.*, Blood, 2002 ; Jung O *et al.*, Oncogenesis, 2016) et sa délétion réduit fortement la croissance du MM *in vitro* et conduit à la mort par apoptose des cellules tumorales *in vivo* (Wu YH *et al.*, J Immunol, 2012). Le groupe de Fooksman s'est intéressé à la caractérisation des populations CD138⁺ et CD138⁻ dans le MM. En utilisant un modèle murin qui développe un MM, ils ont montré que les cellules exprimant le CD138 sont plus prolifératives et induisent une signalisation IL-6R qui promeut leur survie. De plus, ces cellules forment de plus grosses tumeurs que celles n'exprimant pas le CD138. Ces dernières sont, en revanche, plus apoptotiques et plus mobiles. Les auteurs suggèrent que l'expression du CD138 régulerait la localisation et la survie des cellules de MM dans la moelle osseuse et que son expression serait perdue lorsque la tumeur devient trop importante et n'a plus les ressources nécessaires pour se développer, ce qui permettrait aux cellules de MM de migrer et métastaser (Fooksman DR *et al.*, Blood, 2015 ; Akhmetzyanova I *et al.*, Leukemia, 2020). Récemment, certains groupes ont caractérisé des cas de MM dont la totalité des cellules tumorales n'exprimait pas le CD138. Ils supposent que ces cellules pourraient être des cellules souches plus agressives que les cellules de MM classiques (Mykytiv V *et al.*, Hematol Oncol and Stem Cell Therapy, 2019 ; Setiadi AF et Sheikine Y, BMJ Case Rep, 2019).

IV. La différenciation extra-folliculaire des lymphocytes B

La différenciation extra-folliculaire permet de produire des PC rapidement. Cependant, les PC produits de cette manière sont de moins bonne affinité pour l'antigène et ne persistent pas à long terme dans l'organisme. Ainsi, il existe deux voies de différenciation extra-folliculaires en fonction du type d'antigène à l'origine de la réaction immunitaire.

1) La différenciation extra-folliculaire T-dépendante

Les antigènes qui initient ce type de différenciation correspondent aux mêmes antigènes qui induisent les réactions du GC et ils stimulent de la même manière les NBC et les lymphocytes T. Les NBC sur-expriment d'abord le récepteur au CCL19 et au CCL21 : le CCR7 pour se localiser dans la zone T, où ils interagissent avec les lymphocytes T spécifiques. Ces lymphocytes T, bien qu'indispensables pour la différenciation des NBC en PC, sont bien distincts des lymphocytes Tfh puisqu'ils n'expriment pas les gènes Tfh tel que *PD-1*, et ne migrent pas selon le gradient de CXCL13. Toutefois, ces lymphocytes T produisent des cytokines communes aux Tfh et impliquées dans la différenciation des PC comme l'IL-21 et le CD40L (Odegard JM *et al.*, J Exp Med, 2008). Les lymphocytes B activés ne quittent pas la zone B-T avant d'avoir subi au moins deux étapes de division. Aussi, cette interaction B-T induit une surexpression de l'AID à l'origine des CSR, que l'on ne trouve pas exclusivement dans le GC (Xu W *et al.*, Nat Immunol, 2007). Ensuite, les lymphocytes B activés migrent grâce au gradient d'oxystérol *via* leur récepteur EB12 autour du follicule B, où ils prolifèrent et se concentrent dans les foci extra-folliculaires pour se différencier en PC. Dans ces foci, les lymphocytes B interagissent avec les DC CD11c⁺⁺ qui participent à leur survie et à leur différenciation (MacLennan IC *et al.*, Immunol Rev, 2003). Les PC issus de la différenciation extra-folliculaire produisent des Ig, potentiellement commutées, pendant 3 jours puis meurent par apoptose (Smitch KG *et al.*, Eur J Immunol, 1997 ; Nutt SL *et al.*, Nat Rev Immunol, 2015). La génération de ces PC est régulée notamment par l'affinité du BCR pour l'antigène (Kräutler NJ *et al.*, J Exp Med, 2017 ; Luo W *et al.*, Immunity, 2018). En effet, les lymphocytes B dont le BCR est le plus

affin se différencient en PC et ceux dont le BCR est le moins affin forment le pool de B mémoires IgM (Toyama H *et al.*, *Immunity*, 2002) ou IgM/IgG de plus faible affinité (Weisel FJ *et al.*, *Immunity*, 2016). Les PC produits de cette manière ont longtemps été décrits comme ayant un répertoire BCR non muté (Jacob J *et al.*, *J Exp Med*, 1991 ; McHeyzer-Williams MG *et al.*, *J Exp Med*, 1993), mais des études plus récentes montrent que ces PC peuvent subir des SHM et exprimer un BCR muté (William J *et al.*, *Science*, 2002 ; Cattoretti G *et al.*, *Blood*, 2006 ; Di Niro R *et al.*, *Immunity*, 2015).

2) La différenciation extra-folliculaire T-indépendante

Deux catégories d'antigènes sont à l'origine de ce type de différenciation : les antigènes T-indépendants de type I, qui correspondent à des agents mitotiques tels que le LPS, et les antigènes T-indépendants de type II qui sont composés de motifs répétés viraux ou bactériens. La différenciation extra-folliculaire T-indépendante passe par le biais des MZB ou des lymphocytes B-1. Ces derniers expriment exclusivement l'IgM et produisent des anticorps naturels sans exposition préalable à l'antigène (Baumgarth N *et al.*, *Nat Rev Immunol*, 2011). Ces cellules sont localisées exclusivement dans les cavités pleurales et péritonéales et dans le tissu adipeux associé à la rate. Parmi les deux catégories qui existent, différenciées selon l'expression du CD5 : les CD5⁺ (ou B1a) sont celles qui produisent les anticorps naturels et les CD5⁻ (B1b), celles qui produisent des anticorps T-indépendants et qui participent aux réponses mémoires (Haas KM *et al.*, *Immunity*, 2005).

Les antigènes solubles ou opsonisés par le complément sont d'abord captés par les cellules présentatrices d'antigènes comme les MZM ou les DC avant d'être transférés aux MZB, ou sont directement captés par les MZB (Nutt SL *et al.*, *Nat Rev Immunol*, 2015). Les antigènes de type I comme le LPS, activent la voie des TLR (TLR4 pour le LPS, souvent utilisé chez la souris), alors que les antigènes de type II activent le BCR et renforcent leur signal par regroupement des BCR (Haas KM *et al.*, *J Immunol*, 2009). Les MZB se différencient en pré-PB en seulement 48 heures car ils expriment BLIMP1 plus fortement que les lymphocytes B

folliculaires (Jones DD et al., J Immunol, 2015). Ils expriment aussi plus fortement TACI qui va indirectement faciliter la différenciation et la CSR en activant la voie mTOR, elle-même à l'origine de la répression de *BACH2* et l'activation de *c-MYC* et de *PRDM1*, et de deux facteurs de transcription peu connus dans la lymphopoïèse B : *DEC1* et *DEC2*, qui seront décrits dans le Chapitre 3 (Sintes J et al., Nat Commun, 2017). Les PC nouvellement générés survivent jusqu'à six jours dans la rate et produisent de grandes quantités d'Ig. Ces cellules ne meurent pas par l'activation classique de la caspase 3. Du fait de leur production rapide et intense d'Ig, ces cellules sont plus aptes à résister au stress du RE. Ainsi, ces cellules meurent par activation de la caspase 12, induite lors d'un stress du RE prolongé (Auner HW et al., Blood, 2010).

V. L'expression du CD23 par les lymphocytes B matures

1) La structure, la signalisation et la régulation du CD23

Le CD23 est le récepteur de faible affinité aux IgE et est codé par le gène *FCER2*. Il est principalement impliqué dans les réponses allergiques avec forte production d'IgE (Selb R *et al.*, *J Allergy Clin Immunol*, 2017). C'est une protéine transmembranaire qui contient un domaine de type lectine-C et qui existe sous deux formes : CD23a et CD23b dont les extrémités N-terminales cytoplasmiques diffèrent de 6 à 7 acides aminés (Yokota A *et al.*, *Cell*, 1988). Ces deux isoformes proviennent du même gène mais sont issus d'un site d'initiation de la transcription différent. Par ailleurs, le récepteur de haute affinité aux IgE (*FCER1*) et celui de faible affinité (*FCER2*) se répriment mutuellement. De plus, *FCER1* lie préférentiellement les IgE libres alors que *FCER2* fixe plutôt les IgE sous forme de complexes immuns (Engeroff P *et al.*, *J Allergy Clin Immunol*, 2020). Concernant sa régulation protéique, le CD23 doit se trouver sous forme trimérique pour pouvoir capter les complexes immuns contenant des IgE (Sutton BJ et Davies AM, *Immunol Rev*, 2015). Il est clivé par la protéine contenant un domaine de disintégrine et de métalloprotéinase 10 (ADAM10) qui produit ainsi du CD23 soluble, soit monomérique : dont le rôle est de diminuer la synthèse d'IgE, soit trimérique et qui permet l'augmentation de la synthèse des IgE (Cooper AM *et al.*, *J Immunol*, 2012). De manière générale, les lymphocytes B ont plutôt un rôle de régulateurs négatifs de la production des IgE (Yabuuchi S *et al.*, *Int Immunopharmacol*, 2002 ; Cheng LE *et al.*, *J Immunol*, 2010 ; Fellmann P *et al.*, *Immun Inflamm Dis*, 2015).

Le CD23a est exprimé constitutivement par les lymphocytes B activés et est régulé par PAX5 (Visan I *et al.*, *Eur J Immunol*, 2003). Le CD23b est induit sous stimulation anti-CD40, anti- μ , ou IL-4 *via* STAT6 dans les lymphocytes B d'amygdales (Yokota A *et al.*, *Cell*, 1988 ; Challa AJD *et al.*, *Allergy*, 1999 ; Ewart MA *et al.*, *Genes and Immunity*, 2002). Une fois activé, le CD23 signale notamment par la voie ERK dans les lymphocytes B (Chan MA *et al.*, *Clin Immunol*, 2010). Des études récentes sur des cultures d'échantillons de sang humains sains (Ramadani F

et al., Allergy, 2017) et des analyses au niveau cellules uniques de patients allergiques (Croote D *et al.*, Science, 2018) révèlent que les lymphocytes B IgE se différencient plus difficilement en PC que les autres. D'ailleurs, les PC IgE⁺ sont des PC à courte durée de vie, ils sont rares et se différencient indépendamment du GC (Yang Z *et al.*, Curr Opin Immunol, 2014). A noter qu'il n'existe pas de MBC IgE⁺ et que les PC IgE⁺ sont produits rapidement après une seconde exposition. D'ailleurs, les travaux de He *et al.* ont permis d'identifier une sous-catégorie de MBC IgG1 à l'origine des PC IgE (He JS *et al.*, Nat Commun, 2017).

Le CD23 est par ailleurs un marqueur caractéristique des FDC (Allen CDC et Cyster JG, Semin Immunol, 2009). Une étude chez la souris a mis en évidence que la régulation du CD23 était différente dans les lymphocytes B et dans les FDC. Pour se faire, les auteurs ont isolé des FDC de ganglions de souris par digestion enzymatique et séparation sur colonne magnétique basée sur l'expression de FDC-M1, CD40, CD21, CD35 et FcγRII. Ils ont ensuite montré que la stimulation avec de l'anti-CD40 et de l'IFN-γ induisait l'expression du CD23 par les FDC mais pas par les lymphocytes B. Au contraire, une stimulation avec de l'IL-4 associée à de l'anti-CD40, induit l'expression du CD23 par les lymphocytes B mais pas par les FDC (Maeda KGF *et al.*, J Immunol, 1992 ; Sukumar S *et al.*, J Immunol, 2006). Ces résultats sont tout de même à prendre avec précaution puisque les cibles régulées par l'IL-4 ne sont pas tout à fait les mêmes chez la souris et chez l'humain (Ruiz-Lafuente N *et al.*, Biochem Biophys Rep, 2018).

2) L'utilisation du CD23 comme marqueur de la différenciation lymphocytaire B

Chez la souris, le CD23 est un marqueur des lymphocytes B folliculaires. C'est d'ailleurs pour cela que les scientifiques utilisent régulièrement des modèles murins dans lesquels ils délètent leur gène d'intérêt dans l'ensemble des cellules exprimant le CD23, lorsqu'ils veulent inhiber l'expression de ce gène dans les lymphocytes B du GC. Son expression *in situ* est difficile à étudier, du fait de sa forte expression par les FDC (Maeda KGF *et al.*, J Immunol,

1992). L'équipe de Waldschmidt s'est intéressée à la cinétique d'expression du CD23 au cours de la différenciation lymphocytaire B chez la souris. Ainsi, elle a montré que les lymphocytes B folliculaires qui expriment le CD23, perdent l'expression de l'IgD membranaire et du CD38 avant celle du CD23, lorsqu'ils se différencient en lymphocytes B du GC et que les MBC et les PB n'expriment pas le CD23 (Shinall SM *et al.*, J Immunol, 2000). Ses données sont contradictoires avec celles de Victora *et al.*, qui montrent une augmentation d'expression du CD23 par les lymphocytes B de la LZ en comparaison à ceux de la DZ par : i) cytométrie de flux chez la souris (**Figure 20A**), il faut tout de même noter que l'expression du CD23 reste inférieure ou égale à celle des lymphocytes B non GC (B220⁺ FAS⁻ CD38⁺) (Victora GD *et al.*, Cell, 2010), et ii) par immunohistofluorescence chez l'humain (**Figure 20B**), avec des CC exprimant le CD23 dans les amygdales et dans les ganglions réactifs (Victora GD *et al.*, Blood, 2012), résultat potentiellement faussé par la forte expression de ce marqueur par les FDC. Chez l'humain, le CD23 n'est pas utilisé pour différencier les sous-catégories de lymphocytes B. Toutefois, Kolar *et al.* ont isolé une population IgD⁺ CD38⁻ CD23⁻ dans les amygdales humaines, qu'ils caractérisent comme étant une population pré-GC et montrent que les NBC expriment de manière hétérogène le CD23 (Kolar GR *et al.*, Blood, 2007). Notre équipe s'y est également intéressée : nous avons ainsi montré qu'à partir de NBC humains différenciés *in vitro*, ce sont majoritairement les lymphocytes B activés qui n'expriment pas le CD23 qui se différencient en PB (Caron G *et al.*, Cell Rep, 2015 ; Pignarre A *et al.*, Blood, 2020).

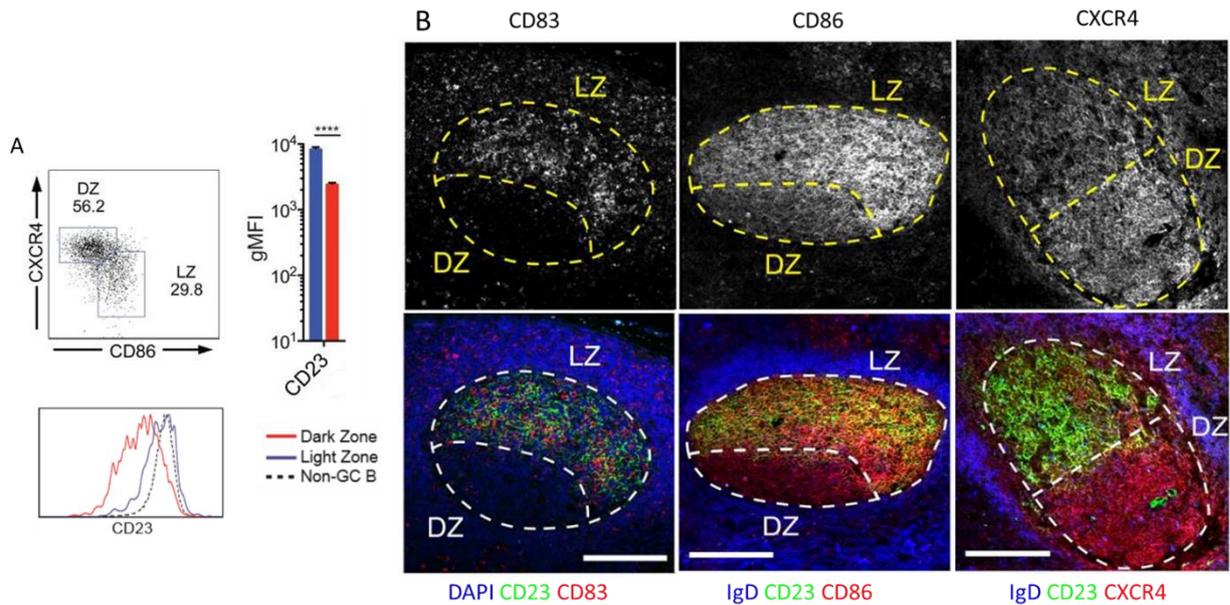


Figure 20 : L'expression du CD23 dans le centre germinatif. A. Expression du CD23 chez la souris déterminée par cytométrie de flux. Les lymphocytes B de la zone claire (LZ) $CXCR4^- CD86^+$ expriment plus fortement le CD23 que les lymphocytes B de la zone sombre (DZ) $CXCR4^+ CD86^-$. Le CD23 est exprimé autant par les B de la LZ que les B non GC. **B.** Le CD23, le CD83, le CD86 et le CXCR4 permettent de distinguer la DZ de la LZ en immunohistofluorescence. Les 4 premières images correspondent à des coupes d'amygdales humaines congelées, et les deux suivantes à des ganglions réactifs humains emparaffinés (Adapté de Victora GD et al., *Cell*, 2010 et Victora GD et al., *Blood*, 2012).

3) Le CD23 dans le lymphome folliculaire

Le lymphome folliculaire (FL) est un cancer indolent, principalement caractérisé par la translocation $t(14:18)(q32;q21)$ qui place le gène *BCL2* sous le contrôle du promoteur du gène *IGH*, ce qui provoque une surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL2 (Rabkin CS et Janz S, JNCI Monographs, 2008). Cette translocation est accompagnée d'autres événements génétiques, dont souvent des mutations des gènes modifiant la chromatine (*KMT2D*, *CREBBP*, *EZH2*) (Green MR et al., *Blood*, 2018). Les FL sont caractérisés par l'expression monoclonale de la chaîne légère des Ig, l'expression du CD19, du CD20, du CD10 et de BCL-6. Ce lymphome dérive des lymphocytes B du GC et plus particulièrement des CC (Roulland S et al., *Adv in Immunol*, 2011). En effet, en plus de leur localisation dans le GC, les lymphocytes B tumoraux ont un transcriptome proche de celui des B du GC et notamment des CC (Victora GD et al., *Blood*, 2012 ; Carbone A et al., *Nat Rev*, 2019) et ils expriment l'AID qui permet les SHM de

leur BCR (Hardianti MS *et al.*, Leukemia, 2004). Les B tumoraux de FL sont décrits comme étant des cellules bloquées dans leur différenciation (Basso K et Dalla-Favera R, Nat Rev Immunol, 2015 ; Victora GD *et al.*, Blood, 2012). Pourtant, Milpied et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence grâce à des analyses du transcriptome au niveau cellule unique qu'il existe plusieurs stades cellulaires au sein d'un même patient atteint de FL, prouvant que ces cellules ne sont pas toutes bloquées au même stade de leur progression vers la différenciation et qu'il existe une hétérogénéité tumorale. Ces dernières études sur l'hétérogénéité du GC au niveau cellule unique apportent ainsi de nouvelles informations quant à l'origine et au développement des lymphomes (Milpied P *et al.*, Nat Immunol, 2018, Holmes AB *et al.*, J Exp Med, 2020). Enfin, pour une proportion variable de patients (10 à 70%), le FL se transforme en une forme plus agressive : le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL).

Les lymphocytes B tumoraux des patients expriment de manière variable le CD23, ce qui appuie encore l'idée d'une hétérogénéité tumorale intra et inter-patients. Ainsi, les patients ayant des lymphocytes B tumoraux exprimant le CD23 auraient une meilleure survie que ceux n'en ayant pas (Olteanu H *et al.*, Am J Clin Pathol, 2011). C'est également le cas, dans le DLBCL, où les patients exprimant le CD23 sont ceux qui survivent le mieux en comparaison à ceux qui ne l'expriment pas (Linderoth J *et al.*, Clin Canc Res, 2003). Siddigi *et al.* ont caractérisé spécifiquement les FL CD23⁺ et pour 9 patients sur 11, ils ont trouvé une mutation gain de fonction de *STAT6* et l'expression de sa forme phosphorylée (et active) dans le noyau. Ainsi, dans cette étude, 82% des patients souffrant d'un FL CD23⁺ ont une mutation de *STAT6*, un pourcentage bien plus important que le pourcentage global retrouvé dans tous les FL (11%) (Siddig IN *et al.*, Mod Pathol, 2016). Bösl *et al.* ont également fait le lien entre les mutations gain de fonction de *STAT6* et le CD23 en utilisant la lignée cellulaire OCY-Ly1 qui exprime soit *STAT6* sous sa forme normale, soit une version de *STAT6* mutée. Ils ont ainsi constaté qu'après stimulation à l'IL-4, les lignées exprimant *STAT6* muté produisaient plus de CD23 soluble que celles exprimant la version normale (Bösl MW *et al.*, Blood, 2015). Cependant, aucune étude à l'heure actuelle n'explique le rôle du CD23 dans le lymphome folliculaire.

Ainsi, dans ce chapitre, nous avons décrit les principales caractéristiques de la différenciation des CC en PC. Au cours de mon doctorat, j'ai également travaillé sur cette question et mis en évidence l'expression de DEC2, exclusivement exprimé dans les cellules en fin de différenciation. Encore peu étudié, ce facteur pourrait être impliqué dans les fonctionnalités des PC. Nous allons donc nous intéresser aux données déjà publiées sur DEC2 et sur son paralogue DEC1 dans le chapitre 3.

Chapitre 3 :

La structure et les fonctions du
facteur de transcription DEC2 et
de son paralogue DEC1

L'étude du facteur de transcription DEC2 aussi connu sous le nom de BHLHB3 (domaine basique contenant une hélice-boucle-hélice de classe 3), ou chez la souris : BHLHE41 (domaine basique contenant une hélice-boucle-hélice E41), ou chez le rat : SHARP1 (protéine activatrice du fractionnement et apparentée aux protéines Hairy), est souvent associée à celle de DEC1, aussi connu sous les noms de BHLHB2, BHLHE40, SHARP2 et STRA13 (protéine stimulée par l'acide rétinoïque 13) puisqu'ils sont homologues à 42% (Fujimoto K *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2001). Ces facteurs ont été initialement décrits dans la différenciation neuronale (Rossner MJ *et al.*, Mol Cell Neurosci, 1997), puis dans le rythme circadien (Honma S *et al.*, Nature, 2002). Au cours de ces dernières années, l'intérêt pour ces facteurs de transcription a pris de l'ampleur puisque qu'ils interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires et ont été décrits dans plusieurs cancers. Pour faciliter la lecture, nous utiliserons les termes DEC2 et DEC1 tout au long de ce chapitre, puisque ce sont les termes les plus employés chez l'humain.

I. La classification et la structure des membres de la famille bHLH

1) La classification des membres bHLH et la structure des gènes de DEC2 et de DEC1

Les facteurs de transcription bHLH ont été identifiés en 1989 (Murre C *et al.*, Cell, 1989). Ils sont caractérisés par la présence d'une boîte E (E-box) composée de l'hexanucléotide CANNTG ou d'une boîte N : CANNAG dans leur séquence nucléotidique, qui sont des domaines de liaison pour les facteurs de transcription. Ils ont d'abord été classés selon leur localisation tissulaire et leur capacité de dimérisation et de liaison à l'ADN (Murre C *et al.*, Biochim Biophys Acta, 1994). La classification de ces facteurs a ensuite été revue par Atchley et Fitch grâce à une analyse phylogénétique. Ils ont ainsi établi cinq classes (A à E) en fonction de la composition nucléotidique de la boîte E (Atchley WR et Fitch WM, PNAS, 1997). Enfin, la

classification de Ledent *et al.* répertorie les 125 gènes bHLH en 6 groupes (A-F) en tenant compte de la présence de domaines additionnels protéiques à l'extrémité C-terminale comme le domaine PAS qui permet la dimérisation protéique ; le domaine Orange qui permet l'activité transcriptionnelle répressive des facteurs de transcription et le domaine Leucine-Zipper, aussi impliqué dans la dimérisation protéique (Ledent *V et al.*, Genome Biol, 2002) (**Tableau 3**). DEC2 et DEC1 appartiennent au groupe E.

Groupe phylogénétique	Description	Exemples de protéines
A	Liaison sur CAGCTG ou CACCTG	MyoD, Twist, Net
B	Liaison sur CACGTG ou CATGTG	Mad, Max, Myc
C	Liaison sur ACGTG ou GCGTG Présence d'un domaine PAS	HIF, Clock
D	Absence de domaine basique Pas de liaison à l'ADN Formation de dimères protéiques qui antagonisent le groupe A	ID
E	Liaison sur CACGCG ou CACGAG Présence d'un domaine Orange Présence d'un peptide WRPW	Hairy, DEC1, DEC2
F	Présence d'un domaine COE impliqué dans la dimérisation et la liaison de l'ADN	Coe (Col/Olf-1,EBF)

Tableau 3 : Classification des protéines de la famille bHLH. Il existe 6 groupes de protéines bHLH classés en fonction de la composition de la boîte E, de leur site de liaison sur l'ADN et de la présence de domaines additionnels. A titre d'exemple, on trouve le facteur c-MYC dans le groupe B, les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) dans le groupe C et les facteurs DEC1 et DEC2 dans le groupe E (adapté de Jones S, Genome Biol, 2004).

Les gènes *DEC2* et *DEC1* sont situés sur les chromosomes 12 et 3 respectivement, et contiennent 5 exons. Il existe 3 variants issus d'épissages alternatifs de *DEC2* et de *DEC1*, dont deux ne codant pas pour des protéines. Les boîtes E de *DEC2* sont composées de l'hexanucléotide CANNTG et situées à 0,3 et 1,8 kb en amont de son promoteur. Celles de *DEC1* sont composées de l'hexanucléotide : CACGTG et sont situées à 3,1 ; 1,4 et 0,5 kb en amont du promoteur. Les boîtes E correspondent à des domaines de fixation pour DEC1 et DEC2, d'autres protéines comme MYC leur permettent également de former des dimères avec d'autres membres de la famille bHLH *via* leur structure hélice-boucle-hélice, dont ils partagent 97% d'homologies (Fujimoto K *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 2001). Ils reconnaissent plusieurs boîtes E en plus de la leur : TCAGGTGA, CACATG, et CACGCG et la boîte E' : CACGTT (Kato Y *et al.*, Curr Topics Dev Biol, 2014). De plus, ils contiennent un domaine Orange pour

assurer leurs fonctions répressives. Ces deux facteurs partagent 52% d'homologie dans ce domaine au niveau de la région C-terminale, ce qui suggère qu'ils présentent de nombreuses fonctions communes, en plus de celles qui leur sont propres (Fujimoto K *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2001).

2) L'expression tissulaire et la structure protéique de DEC2 et de DEC1

La protéine DEC2 est composée de 482 acides aminés, soit un poids moléculaire de près de 50 kDa. Elle est exprimée de manière ubiquitaire, mais on la trouve principalement dans le cerveau, le muscle, le tissu adipeux jaune, les poumons et plus faiblement dans les reins, la rate et les testicules. La protéine DEC1 contient 412 acides aminés, pour un poids moléculaire de 45,5 kDa et est exprimée dans de nombreux tissus tels que le cartilage, la rate et les intestins (Noshiro M *et al.*, *J of Biol Rythms*, 2005). DEC2 et DEC1 contiennent une région conservée riche en acides aminés basiques dans la région N-terminale, et particulièrement en prolines, qui permet leur fixation sur l'ADN au niveau des boîtes E. DEC2 contient en plus, une région riche en glycines et en alanines qui se superpose à la région riche en prolines, que ne possède pas DEC1. De plus, ils contiennent un domaine hélice-boucle-hélice dans la région C-terminale, qui leur permet de former des homo- ou des hétérodimères (Murre C *et al.*, *Biochem Biophys Acta*, 1994). D'ailleurs, ces protéines sont régulièrement retrouvées sous forme d'hétérodimères DEC1/DEC2, ce qui permet notamment à DEC1 de réprimer l'expression de DEC2 (Li Y *et al.*, *J Biol Chem*, 2003). Enfin, contrairement aux autres membres du groupe E, DEC2 et DEC1 ne possèdent pas de séquence WRPW qui permet l'interaction avec les corépresseurs de la famille GROUCHO.

3) Les modes d'action

a. La liaison à l'ADN

Des expériences avec un reporter luciférase ont montré que DEC2 et DEC1 impactent la transcription de gènes cibles par fixation sur les boîtes E. D'autres protéines reconnaissent également ces régions, telles que le dimère CLOCK:BMAL1, ce qui suggèrent que ces protéines régulent l'expression de DEC1 et DEC2 et sont en compétitions avec eux. Ainsi, les protéines DEC empêchent la transcription du gène de la cycline D1, de *MYC*, et leur propre expression par exemple (Li Y *et al.*, J Biol Chem, 2003). De par leur similarité structurale, DEC2 et DEC1 sont régulés de la même manière. Par exemple, ils recrutent des histones désacétylases (HDAC) comme l'HDAC1 et l'HDAC2 au niveau de leur boîte E, ce qui réprime leur expression (Fujimoto K *et al.*, Int J Mol Med, 2007 ; Sun H et Tajena R, PNAS, 2000). Le traitement avec un inhibiteur d'HDAC atténue la répression médiée par les facteurs DEC *via* la fixation sur la boîte E, ce qui suggère que la présence d'HDAC au niveau des gènes DEC2 et DEC1 contribue à leur effet répresseur induit par fixation sur les boîtes E (Garriga-Canut M *et al.*, J Biol Chem, 2001 ; Sun H et Taneja R, PNAS, 2000).

b. L'interaction protéine-protéine

Les facteurs de transcription DEC1 et DEC2 ont également la possibilité d'interagir avec des protéines et de réguler par ce biais leur expression, mais les mécanismes précis impliqués sont encore flous à l'heure actuelle. Par exemple, dans les lignées de cancer du sein, DEC2 favorise la dégradation des facteurs induits par l'hypoxie (HIF) par interaction directe (Montagner M *et al.*, Nature, 2012). En ce qui concerne DEC1, une étude révèle qu'il interagit directement avec STAT3 α et β pour induire l'apoptose (Ivanova AV *et al.*, J Mol biol, 2004).

II. Les fonctions cellulaires régulées par DEC2 et DEC1

Les facteurs de transcription DEC2 et DEC1 ont été bien décrits pour leurs rôles dans le rythme circadien et notamment à travers la mutation Y362H de DEC2 qui induit une réduction du temps de sommeil. Beaucoup de travaux descriptifs ont été effectués afin de comprendre leurs rôles fonctionnels dans la cellule et leur implication dans les cancers, principalement sur des lignées cellulaires. A ce jour les données sur ces facteurs de transcription sont encore parcellaires et souvent contradictoires. Cela peut s'expliquer en partie par le fait que ces facteurs de transcription ont des fonctions parfois différentes, parfois similaires, dans le noyau et dans le cytoplasme. Par exemple, dans le cytoplasme DEC1 bloque la progression dans le cycle cellulaire alors qu'il la promeut lorsqu'il est exprimé dans le noyau (Zawel L *et al.*, PNAS, 2002 ; Kiss Z *et al.*, Genes Cancer, 2020 ; Bhawal UK *et al.*, J Pathol, 2011). La répression mutuelle, l'homologie de séquences et l'expression cyclique (du fait de leur rôle dans le rythme circadien) de DEC2 et DEC1 laissent penser qu'ils seraient exprimés l'un après l'autre pour induire leurs fonctions à la fois communes, mais aussi propres (Azmi S *et al.*, J Biol Chem, 2003).

1) La différenciation cellulaire

DEC2 est décrit comme un inhibiteur de la différenciation cellulaire, notamment dans les chondrocytes (Sasamoto T *et al.*, Int J Mol Med, 2016) et les spermatogonies (Makino Y *et al.*, Sci Rep, 2019). DEC1 lui, favorise la différenciation des cellules souches mésenchymales en chondrocytes et en adipocytes (Shen M *et al.*, J Biol Chem, 2002 ; Iwata T *et al.*, Eur J Cell Biol, 2006). Enfin, en conditions physiologique, DEC2 et DEC1 promeuvent la différenciation des monocytes en macrophages alvéolaires (Rauschmeier R *et al.*, EMBO, 2019).

DEC2 serait donc un inhibiteur de la différenciation cellulaire alors que DEC1 serait plutôt un inducteur.

2) La prolifération cellulaire

DEC2 a particulièrement été étudié pour son rôle dans la prolifération cellulaire. Ainsi, dans les lignées de glioblastome, DEC2 favorise la prolifération en facilitant l'entrée des cellules dans la phase S, *via* l'augmentation de l'expression des cyclines D1, D3 et E1, et active la voie MAPK/ERK (Wang C *et al.*, Canc Manag Res, 2019). Ce résultat a également été mis en évidence dans les neurones (Sun Y *et al.*, Mol Cell Biochem, 2019). De plus, il existe des sites potentiels de fixation pour c-MYC et E2F en amont du site d'initiation de la transcription de DEC2, des protéines impliquées dans la prolifération (Hu T *et al.*, J Exp Clin Cancer Res, 2015) et DEC2 induit l'expression de c-MYC, favorisant ainsi la prolifération (Wu Y *et al.*, Int J Mol Med, 2015).

Paradoxalement, certaines études montrent le rôle suppresseur de tumeur de DEC2 avec un effet sur la quiescence cellulaire. En effet, dans les carcinomes de la tête et du cou, l'activation de la voie TGF- β 2 dans les cellules dormantes tumorales de la moelle osseuse (environnement riche en TGF- β 2) induit d'une part, l'expression de DEC2 qui inhibe la CDK4 et donc la transition G1/S du cycle cellulaire, et induit d'autre part la protéine p27, inhibitrice du cycle cellulaire. Dans le poumon où la concentration de TGF- β 2 est faible, les cellules tumorales sont réactivées ainsi que leur dissémination, ce qui suppose que la perte d'expression de DEC2 suite à l'absence de TGF- β 2 faciliterait la prolifération cellulaire (Bragado P *et al.*, Nat Cell Biol, 2013). De plus, DEC2 empêche la prolifération, notamment en bloquant la voie MAPK/ERK dans des lignées de cancer gastrique (Li P *et al.*, Am J Cancer Res, 2016) et en bloquant l'expression de la cycline D1 et donc la progression dans le cycle cellulaire dans les lignées cellulaires de cancer des poumons (Falvella FS *et al.*, Oncogene, 2008).

Selon plusieurs études, DEC1 bloque la prolifération des cellules tumorales en retardant notamment la transition G1/S du cycle cellulaire. En effet, DEC1 intervient au niveau de la formation du complexe Cycline E/CDK2 en retardant l'association de la CDK2 avec la cycline A, ce qui prolonge la phase S et bloque la croissance cellulaire (Bi H *et al.*, Cell Death Dis, 2015). Au contraire, d'autres études montrent que DEC1 favorise la prolifération comme dans les lignées d'ostéosarcome (Li S *et al.*, Exp Ther Med, 2020) et de cancer de la prostate (Liu Q *et al.*, Mol Med Rep, 2018). Toutefois, des études montrent que les fonctions de DEC1 varient en fonction de sa localisation cellulaire. En effet, DEC1 se lie à la cycline E ce qui empêche sa translocation nucléaire et inhibe la progression dans le cycle cellulaire, alors que dans le noyau, DEC1 empêche directement la transcription de la cycline D1 et donc son expression (Kiss Z *et al.*, Genes Cancer, 2020 ; Bhawal UK *et al.*, J Pathol, 2011).

3) La réponse à l'hypoxie et l'angiogenèse

La réponse cellulaire à l'hypoxie est induite principalement par le régulateur clé HIF-1 α . En normoxie, HIF-1 α est dégradé par le protéasome après ubiquitinylation alors qu'il est induit spécifiquement en condition hypoxique. Dans ces conditions, HIF-1 α forme un hétérodimère dans le noyau avec HIF-1 β qui lui, est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire. Cet hétérodimère se fixe ensuite au niveau des promoteurs des gènes qu'il régule comme des gènes impliqués dans l'angiogenèse tels que *VEGF* et *EPO*.

HIF-1 α régule l'expression de DEC2 en se fixant en amont de son site d'initiation de la transcription, dans une région transcriptionnellement très active où l'on trouve beaucoup de marques H3K27Ac (acétylations de la lysine 27 de l'histone 3) qui permettent d'ouvrir la chromatine et de faciliter son accès aux facteurs de transcription. En effet, dans cette région, il existe trois sites potentiels de fixation pour HIF-1 α (Hu T *et al.*, J Exp Clin Cancer Res, 2015). HIF-2 α (un isoforme de HIF-1 α) induit lui aussi l'expression de DEC2, notamment dans la lignée MCF-7 (Wu Y *et al.*, Int J Mol Med, 2015). DEC2 forme une boucle de rétrocontrôle négatif en favorisant la dégradation des facteurs HIF dans les lignées de

cancer du sein (Montagner M *et al.*, Nature, 2012), et de cancer de l'endomètre (Liao Y *et al.*, Plos One, 2014), ou en empêchant la fixation d'HIF-1 α sur les promoteurs de ces gènes cibles tel que *VEGF* (Sato F *et al.*, Genes Cells, 2008). En revanche, dans les lignées d'ostéosarcome, DEC2 facilite l'activation d'HIF-1 α et l'expression de ses cibles : *ANGPTL4*, *VEGFA*, *HK2* et *PGK1* (Hu T *et al.*, J Exp Clin Cancer Res, 2015).

Enfin, dans le carcinome rénal multiple, le polymorphisme mononucléotidique (SNP) sur le locus 12p12.1 conduit à une surexpression de DEC2. Cette surexpression favorise l'angiogenèse sans pour autant affecter la voie HIF, et la croissance tumorale notamment en induisant l'expression de l'IL-11 (Bigot P *et al.*, Nat Commun, 2016).

Plusieurs équipes ont montré dans des lignées cellulaires que DEC1 comme DEC2, est induit en condition hypoxique par HIF-1 α et qu'il inhibe l'expression de ce facteur (Currie MJ *et al.*, J Clin Pathol, 2004 ; Zheng Y *et al.*, Mol Biol Rep, 2012 ; Wanshan Ma *et al.*, Oncol Rep, 2013 ; Murakami K *et al.*, Biomed Res, 2017).

4) L'apoptose

Plusieurs études descriptives révèlent le rôle anti-apoptotique de DEC2. Ces études se basent sur la surexpression transgénique ou la perte d'expression de DEC2 dans des lignées cellulaires et sur l'exploration des protéines impliquées dans l'apoptose. Ainsi, dans la lignée MCF-7, DEC2 limite l'expression des protéines pro-apoptotiques BAX, de la caspase 8 clivée et de PARP clivé (Liu Y *et al.*, Genes Cell, 2010). Ce résultat a également été trouvé dans les lignées de carcinome de l'œsophage, où la surexpression transgénique de DEC2 diminue l'expression de BIM, PARP clivé et des caspases 8 et 3 clivées, et augmente celle de la protéine anti-apoptotique BCL-XL (Sato H *et al.*, Mol Med Rep, 2017). De plus, dans les lignées de cancer de la prostate, la perte d'expression de DEC2 conduit à une augmentation de PARP clivé, suggérant là aussi un rôle anti-apoptotique de DEC2 (Liu Q *et al.*, Int J Mol Med, 2016). Enfin, dans le sous-type de leucémie myéloïde aiguë (LAM) qui

contient des fusions des gènes MLL, et particulièrement celle de mauvais pronostic : la LAM MLL-AF6, DEC2 a un rôle oncogénique en empêchant la mort cellulaire. En effet, les souris déficientes en DEC2 survivent plus longtemps et ont un nombre de leucocytes sériques plus élevé (+20%) que les souris contrôles (Numata A *et al.*, Nat Commun, 2018).

Les fonctions pro-apoptotiques de DEC1 ont été largement décrites. En effet, après induction par des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-15, le TNF- α , et l'IFN- β , DEC1 interagit par sa région C-terminale avec STAT3 α et β , qui interagissent ensuite avec FAS et induisent ainsi l'apoptose (Ivanova AV *et al.*, J Mol Biol, 2004). Aussi, dans les lignées de cancer de l'œsophage, DEC1 a des fonctions pro-apoptotiques *via* l'augmentation du PARP clivé (Seino H *et al.*, Biomed Res, 2015). Cet effet a également été mis en évidence dans le cancer du sein traité (Wu Y *et al.*, Int J Mol Med, 2011). En revanche, certaines études montrent que DEC1 a plutôt une action anti-apoptotique en empêchant l'activation de la caspase 3 dans les lignées de carcinome hépatocellulaire (Peng Y *et al.*, Toxicol, 2012) ; en induisant l'expression de BIRC5 (un inhibiteur de l'apoptose) en conditions hypoxiques dans les lignées de cancer gastrique (Jia Y *et al.*, Gastric Cancer, 2018) ; ou sous induction par TGF- β dans les lignées de carcinome mammaire (Ehata S *et al.*, Cancer Res, 2007).

5) La migration et les capacités de métastase

Les rôles de DEC1 et de DEC2 dans la migration cellulaire ont principalement été étudié dans des lignées de cellules tumorales à travers la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ce processus se caractérise par la perte d'expression des protéines d'adhésion inter-cellulaires (la E-cadhérine, les laminines) en faveur des protéines d'interaction et de dégradation de la matrice extra-cellulaire (la N-cadhérine, la Vimentine, SNAIL, TWIST, les fibronectines, le syndécan 1, les métalloprotéases (MMP)) et est à l'origine des métastases.

DEC2 empêche l'EMT *in vitro* dans des lignées cellulaires de cancers gastrique et mammaire et la métastase vers les ganglions lymphatiques *in vivo* (Li P *et al.*, Am J Cancer Res, 2016 ; Montagner M *et al.*, Nature, 2012). Il bloque aussi la migration dans les lignées de cancer de la thyroïde (Zhou ZH *et al.*, Mol Med Rep, 2016) ou du pancréas (Sato F *et al.*, Int J Mol Med, 2012). Enfin, dans le cancer de l'endomètre, DEC2 est moins exprimé dans les tissus métastatiques que dans la tumeur primaire et empêche l'EMT et les métastase en bloquant le voie de signalisation NOTCH1 (Liao Y *et al.*, BMC Cancer, 2014). Au contraire, d'autres études montrent que DEC2 augmente le potentiel métastatique : c'est le cas dans les lignées d'ostéosarcome (Hu T *et al.*, J Exp Clin Cancer Res, 2015) et de carcinome rénal (Shen Z *et al.*, Oncol Rep, 2019).

DEC1 favorise la migration cellulaire et l'EMT dans les lignées d'ostéosarcomes (Li S *et al.*, Exp Ther Med, 2020), de carcinome hépatocellulaire (Murakami K *et al.*, Biomed Res, 2017), de cancer du sein (Sethuraman A *et al.*, Breast Cancer Res, 2018) et de cancer de la prostate (Liu Q *et al.*, Mol Med Rep, 2018). De plus, il intervient dans la régulation du collagène, la formation de la matrice extra-cellulaire et la formation des vaisseaux (Gallo C *et al.*, Cell Death Dis, 2018).

La double déplétion de DEC1 et de DEC2 dans des lignées de cancer de l'endomètre induit l'EMT en promouvant la transcription de *SNAI1*, *SNAI2*, et *TWIST1* (Asanoma K *et al.*, Mol Cell Biol, 2015), montrant ainsi que ces deux facteurs bloquent l'invasion tumorale.

6) Conclusion sur les fonctions de DEC2 et de DEC1

DEC2 et DEC1 sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires physiologiques et tumorales (**Figure 21**). De manière générale, DEC2 réprime la voie HIF, les molécules pro-apoptotiques, les molécules pro-inflammatoires et les facteurs impliqués dans l'EMT, mais il induit le cycle cellulaire. DEC1, au contraire bloque le cycle cellulaire et favorise la quiescence, il induit l'apoptose et facilite l'EMT.

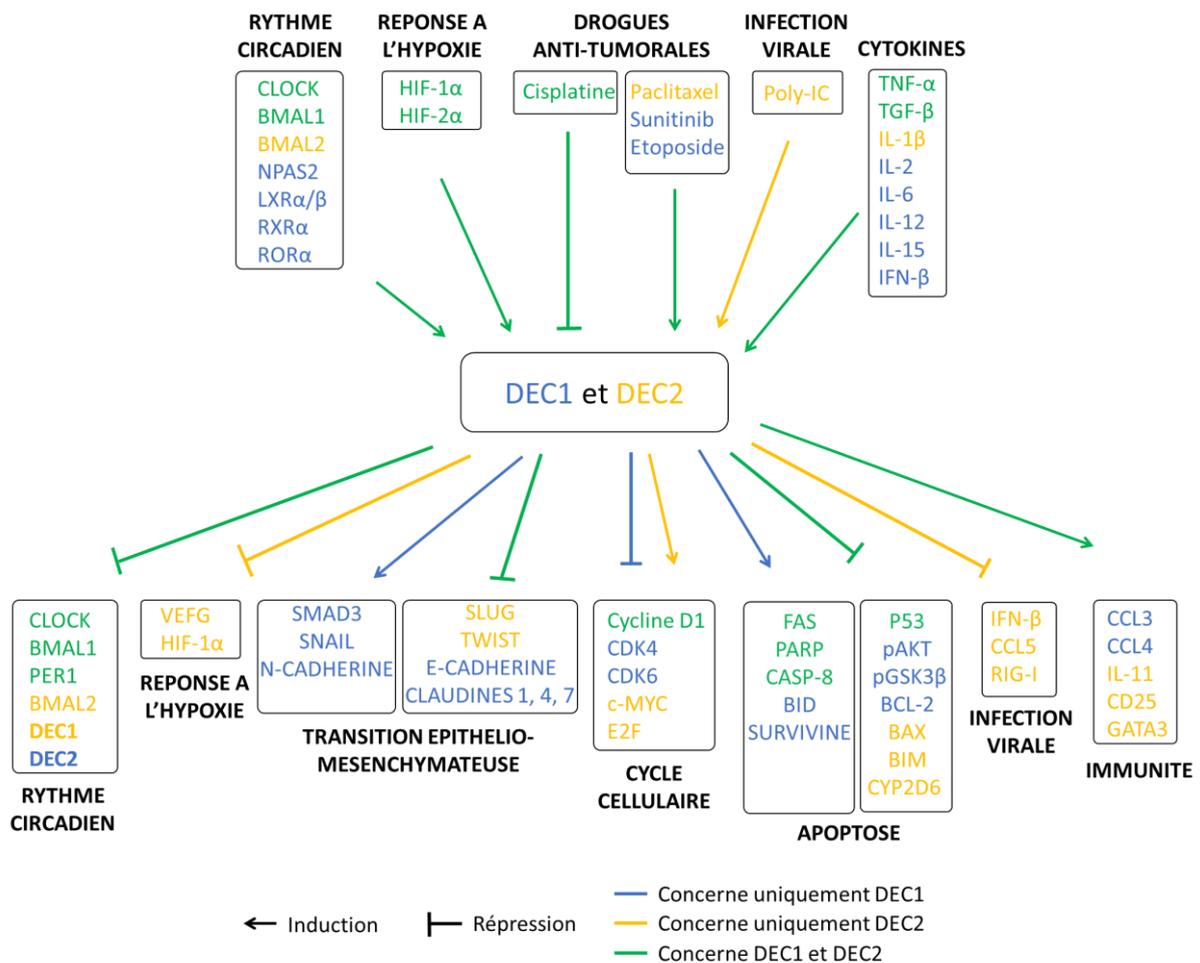


Figure 21 : La régulation de DEC2 et de DEC1. DEC2 et DEC1 sont globalement régulés de la même manière : ils sont induits par les protéines du rythme circadien, certaines cytokines et des drogues anti-tumorales. DEC2 est également induit lors d'infections virales. DEC2 est plutôt un répresseur transcriptionnel puisqu'il bloque la plupart des fonctions cellulaires, alors que DEC1 a plutôt un rôle opposé à DEC2 (Adapté de Sato F et al., J Cancer, 2016).

Ainsi, DEC1 et DEC2 ont été décrits principalement dans des lignées cellulaires et les résultats sont souvent contradictoires. Les études sont majoritairement descriptives, sans réelles démonstrations physiopathologiques et elles montrent que la régulation de ces facteurs varie en fonction des tissus. Ce constat illustre les difficultés qui entourent l'exploration de leurs fonctions.

III. Les fonctions de DEC2 et de DEC1 dans les lymphocytes

Les protéines bHLH sont impliquées dans le développement des lymphocytes B et T, elles régulent leur survie, leur prolifération et le réarrangement des gènes des récepteurs. La délétion chez la souris de certaines de ces protéines bloque complètement la différenciation des lymphocytes : c'est le cas de E2A pour les lymphocytes B et d'ID3 pour les thymocytes, par exemple (Murre C, Nat Immunol, 2005 ; Wöhner M *et al.*, J Exp Med, 2016).

1) Les fonctions de DEC2 et de DEC1 dans les lymphocytes T

a. Les études chez la souris

i. Le rôle de DEC2

DEC2 est exprimé exclusivement dans les lymphocytes Th2 et son expression est augmentée pendant la différenciation de ces lymphocytes par le biais de l'IL-4 et de STAT6, et du CD25 (**Figure 22**). Il promeut la production de cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Liu Z *et al.*, J Immunol, 2009 ; Yang XO *et al.*, Nat Immunol, 2010). De plus, DEC2 se fixe sur le promoteur de *GATA3*, un facteur indispensable pour la différenciation Th2, et induit son expression. *GATA3* induit lui aussi l'expression de *DEC2* ce qui montre qu'il existe une boucle de rétrocontrôle positif entre DEC2 et *GATA3*, qui facilite la différenciation Th2 (Yang XO *et al.*, Nat Immunol, 2009).

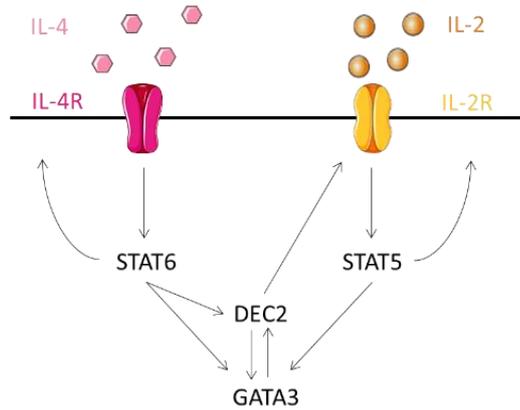


Figure 22 : Le rôle de DEC2 dans la régulation de la différenciation des lymphocytes Th2 murins. Les voies IL-2/IL-2R/STAT5 et IL-4/IL-4R/STAT6 induisent l'expression de GATA3, ce qui promeut l'activation de ces voies en retour. GATA3 peut également être induit par DEC2. DEC2 favorise la différenciation Th2 en induisant GATA3 et la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 : le CD25 (Zhu J, Cytokine, 2016).

ii. Le rôle de DEC1

DEC1 est exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ après stimulation du TCR avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 (Sun H *et al.*, Nat Immunol, 2001) ou lors d'infections, par *Mycobacterium Tuberculosis* par exemple (Huynh JP *et al.*, J Exp Med, 2018). Il permet le recrutement des lymphocytes T sur le lieu de l'infection en induisant la production de CCL3 et de CCL4 (Huynh JP *et al.*, J Exp Med, 2018). Dans les encéphalomyélites auto-immunes expérimentales et les infections par *Mycobacterium Tuberculosis*, DEC1 promeut la production de cytokines pro-inflammatoires comme le GM-CSF et l'IFN- γ et diminue celle de la cytokine immunosuppressive IL-10 par les lymphocytes Th1 et Th17 (Lin CC *et al.*, Nat Commun, 2014 ; Yu F *et al.*, J Exp Med, 2018).

DEC1 intervient dans la différenciation des lymphocytes T. En effet, son expression dans ces cellules favorise la production d'IL-2 qui promeut la prolifération, la différenciation en lymphocytes T effecteurs et la survie (Sun H *et al.*, Nat Immunol, 2001 ; Martínez-Llordella M *et al.*, J Exp Med, 2013). DEC1 permet également la différenciation des Treg en

promouvant l'expression du CD25 par les thymocytes (Miyazaki K *et al.*, J Immunol, 2010). De plus, DEC1 est nécessaire pour la transcription des gènes Th2 et la production de cytokines Th2 (Jarjour NN *et al.*, J Immunol, 2020).

Enfin, l'expression de DEC1 par les lymphocytes T impacte la survie des lymphocytes B, puisque les lymphocytes T déficients en DEC1 ne peuvent pas éliminer les lymphocytes B prêts à entrer en apoptose et qui expriment FAS, puisqu'ils perdent l'expression de FASL, ce qui engendre une accumulation de lymphocytes B activés et une hyperplasie des OLS, voire le développement de maladie auto-immune (Sun H *et al.*, Nat Immunol, 2001).

b. Les études chez l'humain

Chez l'humain, DEC1 a principalement été décrit dans les lymphocytes T mémoires, où il est co-exprimé avec T-BET et associé à un profil pro-inflammatoire. DEC1 induirait indirectement la voie NF- κ B par son rôle de répresseur transcriptionnel (Li C *et al.*, Immunity, 2019 ; Hu G et Chen J, Nat Commun, 2013). Une récente étude a révélé que DEC1 était exprimé plus fortement par les lymphocytes T résidents dans les tissus que par les T circulants, et qu'il permettait l'expression de gènes impliqués dans la rétention de ces cellules dans le tissu comme *Cxcr6* et *Itgae*. De plus, DEC1 promeut le métabolisme mitochondrial dans ces cellules, ce qui permet de fournir l'énergie aux T mémoires résidents et de les maintenir en vie (Li C *et al.*, Immunity, 2019).

Il n'existe pas d'étude sur DEC2 dans les lymphocytes T humains.

2) Les fonctions de DEC2 et de DEC1 dans les lymphocytes B

a. Les études chez la souris

De rares mais récentes études se sont intéressées au rôle de DEC2 dans les lymphocytes B. Ainsi, chez la souris l'expression de DEC2 est retrouvée spécifiquement dans les lymphocytes B-1 (**Figure 23**) et il est indispensable pour le développement des lymphocytes B-1a de la rate et de la cavité péritonéale (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2017).

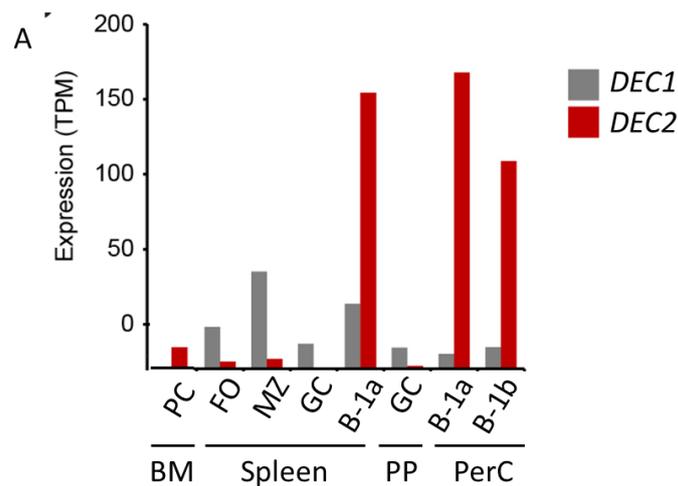
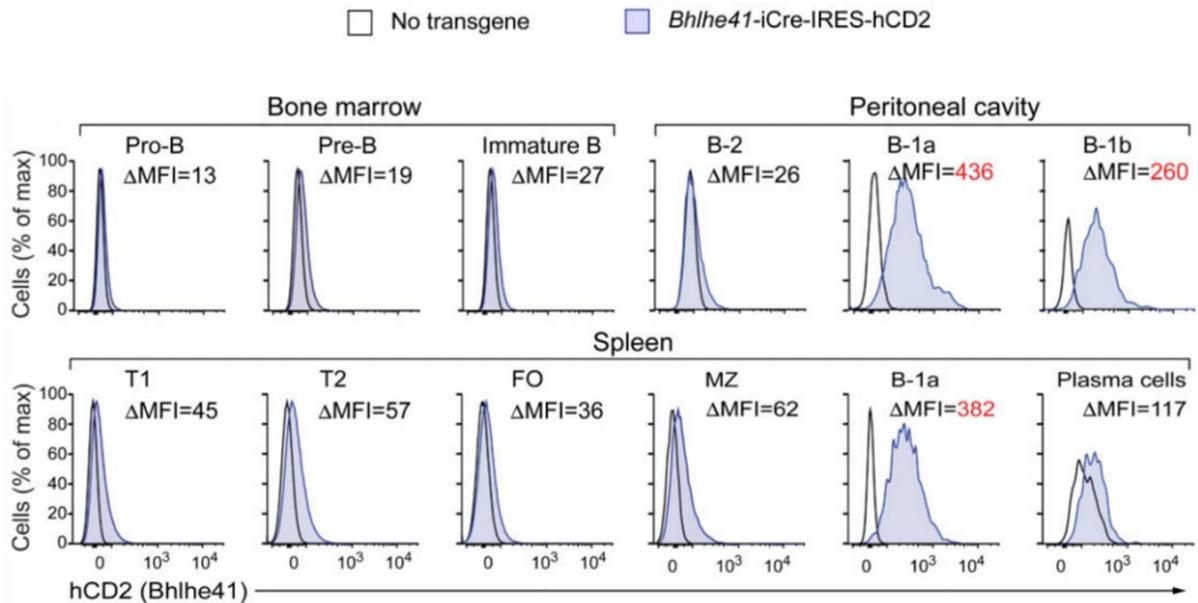


Figure 23 : L'expression de de DEC2 dans les lymphocytes B murins. A. L'expression transcriptomique de DEC2 (*Bhlhe41*) dans différentes populations de lymphocytes B. Données issues du séquençage de l'ARN des lymphocytes B. Les valeurs d'expression sont exprimées en transcrits par million (TPM). PC = Plasmocytes ; FO = B folliculaires ; MZ = B de la zone marginale ; GC = B du centre germinatif ; BM = Moelle osseuse ; PP = Plaque de Peyer ; PerC = Cavité péritonéale.

B



B. L'expression de DEC2 a été analysée dans les lymphocytes B murins de souris transgéniques *Bhlhe41-iCre-IRES-hCD2* et sauvage via l'expression du CD2 humain en cytométrie de flux. MFI = médiane d'intensité de fluorescence. T1/T2 = B transitionnels 1 et 2 ; FO = B folliculaires ; MZ = B de la zone marginale. *Bhlhe41* = DEC2

Kreslavsky *et al.*, ont travaillé sur des souris dont les lymphocytes B-1a étaient doublement déficients en DEC1 et DEC2. Ils ont pu mettre en évidence les cibles spécifiques de DEC2 en superposant les résultats de RNAseq obtenus sur les souris doublement déficientes et les résultats de ChIP-seq de DEC2 obtenus chez des souris contrôles. Ainsi, les gènes les plus exprimés dans les souris n'exprimant pas DEC1 et DEC2, et liés par DEC2 dans les lymphocytes B-1a normaux ont été identifiés comme cibles réprimées de DEC2. En couplant ces données au séquençage des régions de la chromatine accessibles à la transposase (ATAC-seq), ils ont montré que 63% des sites de fixation de DEC2 se situaient dans des régions promotrices et dans des régions ouvertes de la chromatine. Ils ont également révélé 41 gènes potentiellement activés et 90 gènes potentiellement réprimés par DEC2. Parmi les cibles réprimées, on trouve : 6 cyclines H, un gène apparenté au CDK : la CDKL1, et des membres de la famille E2F. Ce résultat suggère que DEC2 bloque la prolifération cellulaire des lymphocytes B-1a. Ils ont également mis en évidence le rôle de DEC2 et de DEC1 sur la formation et la signalisation du BCR, puisque ces souris ont notamment des altérations de l'expression des gènes variables des chaînes des Ig et une diminution des phosphorylations de BLNK, BTK, ERK, SYK et PLC γ 2. De plus, pour ces souris

doublement déficientes en DEC2 et DEC1, 168 gènes sont activés et 151 gènes sont réprimés avec, un fold change supérieur à 2, dont des gènes du cycle et du BCR. Ces données suggèrent donc que DEC2 et DEC1 contrôlent les stades précoces de sélection du répertoire BCR (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2017), hypothèse qui a également été émise dans d'autres équipes (Xu X *et al.*, PNAS, 2020).

Enfin, ils ont montré que DEC2 n'est pas exprimé dans les lymphocytes B folliculaires murins mais qu'il peut être induit avec du LPS, ou une combinaison d'IL-4, d'anti-CD40 et/ou d'anti-IgM, simulant une stimulation T-dépendante. En revanche, DEC2 n'affecte pas le développement des lymphocytes B folliculaires et des MZB (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2017).

Par ailleurs, les lymphocytes classiques B-2 murins peuvent se différencier en lymphocytes B-1 et cette transition passe par l'expression de DEC2 (Graf R *et al.*, Science, 2019).

Selon une étude plus ancienne, DEC1 est exprimé dans les lymphocytes B murins non stimulés et son expression est réprimée après stimulation de type T-dépendante comprenant du CD40L, de l'anti-IgM, du LPS ou de l'IL-4 (**Figure 24**) (Seimiya M *et al.*, Bioch Biophys Res Commun, 2002).

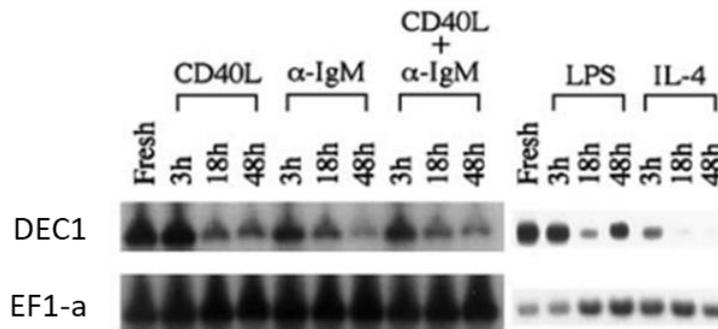


Figure 24: L'expression de DEC1 dans les lymphocytes B murins sous stimulation T-dépendante. L'expression de DEC1 a été suivie après 3h, 18h ou 48h de stimulation avec du CD40L, de l'anti-IgM seul ou couplé au CD40L, du LPS ou de l'IL-4, et révélée par western-blot. EF1-a a été utilisé comme témoins de charge (Seimiya M et al., Bioch Biophys Res Commun, 2002).

Dans une seconde étude, les auteurs ont développé un modèle murin qui exprime fortement DEC1 dans la rate (Tg (2-3)) et un qui l'exprime moyennement dans le thymus (Tg (3-5)) et ont montré que la différenciation des lymphocytes B et T n'était pas impactée en comparaison aux souris sauvages. Toutefois, après immunisation avec du DNP-OVA, les souris avaient un nombre plus faible de B du GC (B220⁺ PNA⁺) et une production d'anticorps réduite (**Figure 25**) (Seimiya M et al., Cell Immun Resp, 2004) prouvant le rôle de DEC1 dans les réactions du GC.

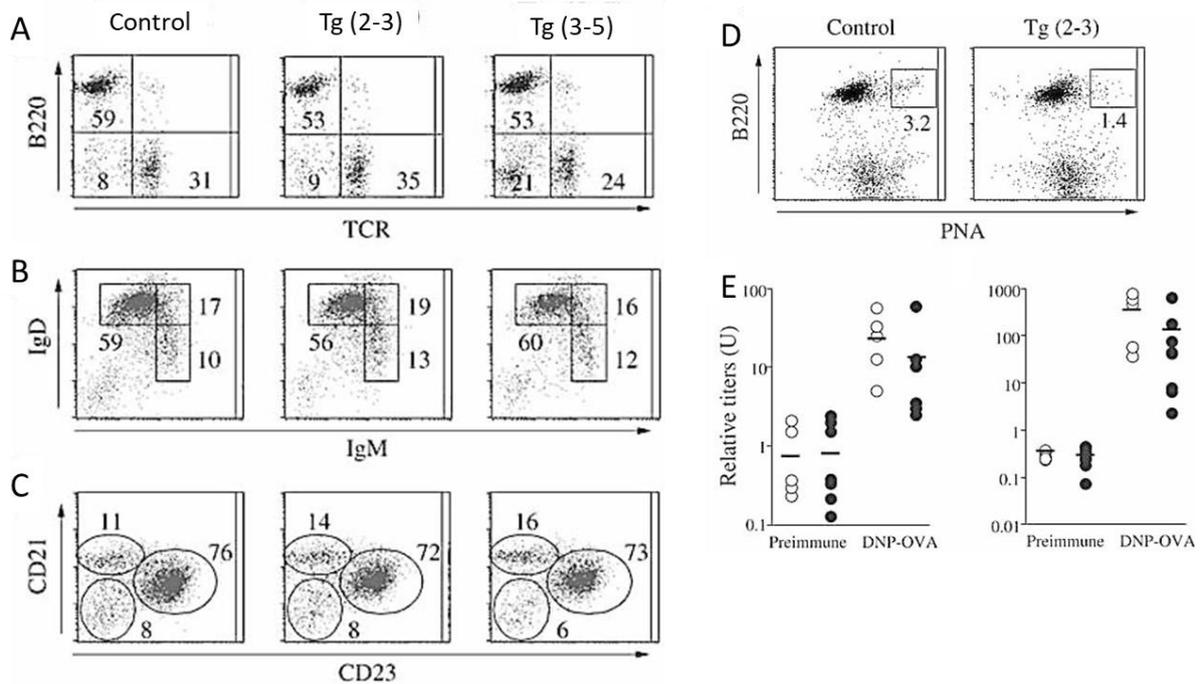


Figure 25 : DEC1 n'a pas d'impact sur la différenciation des lymphocytes B et T mais participe aux réactions du centre germinatif. Les auteurs ont utilisé des modèles murins exprimant fortement DEC1 dans la rate (Tg (2-3)) et un autre l'exprimant moyennement dans le thymus (Tg (3-5)). **A.** Les proportions de cellules non-lymphoïdes (TCR⁻ B220⁻), de lymphocytes T (TCR⁺), de lymphocytes B (B220⁺), **B.** de B immatures (IgM⁺ IgD⁺), B transitionnels (IgM⁺ IgD⁻), B matures (IgM⁻ IgD⁺), **C.** de B de la zone marginale (CD21⁺ CD23⁻), B folliculaires (CD21⁻ CD23⁺) ont été évaluées par cytométrie de flux. **D.** Analyse du pourcentage de B du GC (B220⁺ PNA⁺) après immunisation au DNP-OVA, et **E.** Quantification des IgM (à gauche) et IgG1 (à droite) produits par ces cellules et spécifiques au DNP (Seimiya M et al., Cell Immun Resp, 2004).

b. Les études chez l'humain

Chez l'humain, l'expression de DEC1 est induite dans les NBC ou les MBC par stimulation du BCR ou de TLR9. Sous cette stimulation, il bloque la prolifération cellulaire des lymphocytes B activés. De plus, son expression est plus importante dans les lymphocytes B anergiques clonaux de patients atteints de cryoglobulinémie mixte associée au virus de l'hépatite C, qui sont des patients pour lesquels les lymphocytes B ne prolifèrent pas en réponse au BCR ou au TLR9. La perte d'expression de DEC1 ne suffit pas à restaurer un phénotype normal mais augmente légèrement les capacités de prolifération de ces cellules (Camponeschi A et al., Immunol Letter, 2018).

Une étude chez l'homme révèle que contrairement à la souris, le facteur DEC2 est exprimé dans les PC et il est également exprimé dans les myélomes multiples. Dans cette étude, les auteurs suggèrent d'ailleurs que son expression exclusive dans les PC pourrait jouer un rôle dans la différenciation terminale B (De Vos J *et al.*, Immunol Rev, 2006) (Figure 26).

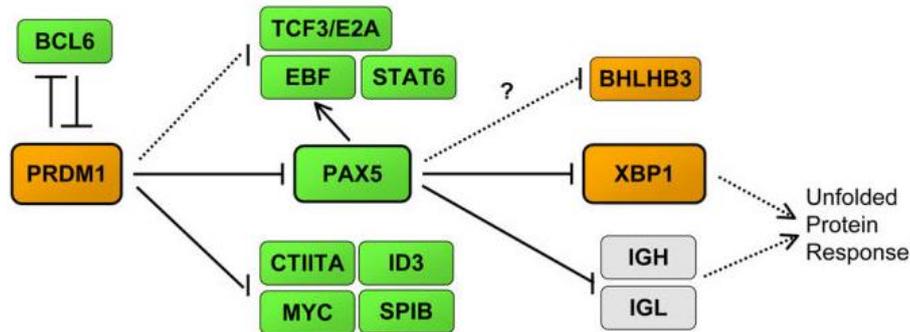


Figure 26 : Représentation du réseau transcriptionnel régulant la différenciation des PC et incluant DEC2. Les rectangles verts correspondent à des gènes de l'identité B et les rectangles orange à des gènes plasmocytaires. Les lignes foncées correspondent à des interactions directes avec le promoteur du gène cible et les lignes en pointillés correspondent à des interactions indirectes. DEC2 (BHLHB3) serait potentiellement réprimé par PAX5 lors de la différenciation terminale B (De Vos J *et al.*, Immunol Rev, 2006).

Ces données montrent donc que DEC2 et DEC1 sont régulées différemment chez l'humain et chez la souris et qu'ils sont induits par des stimuli différents, supposant donc qu'ils réguleraient des fonctions spécifiques au cours des réactions humérales.

OBJECTIFS

Les publications portant sur la différenciation terminale des lymphocytes B sont nombreuses et ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus chez la souris et chez l'humain. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas de comprendre l'ensemble des mécanismes mis en jeu, notamment chez l'humain. Notre équipe a développé un système de culture mimant les étapes terminales de la différenciation des lymphocytes B matures (Caron G *et al*, Cell Rep, 2015). Ce système a permis de mettre en évidence que les cellules qui s'engagent dans la différenciation en PB, sont celles qui perdent la capacité de réponse à l'IL-4, et donc qui n'expriment pas le CD23 (Pignarre A *et al.*, Blood, 2020). Le premier objectif de ma thèse a été de valider que la voie IL-4 s'éteint également dans les lymphocytes B issus d'organes lymphoïdes secondaires lorsqu'ils se différencient en PB et d'établir une cinétique de la différenciation de ces cellules à travers des analyses du transcriptome au niveau cellule unique (Partie 1 des résultats).

Dans ce contexte, nous avons mis en évidence une signature particulière exprimée par les PB et leurs précurseurs, qui comprend le facteur DEC2. Bien que décrit dans la différenciation des lymphocytes T et dans les B-1a murins, aucune étude ne s'intéresse au rôle de DEC2 dans les PB humains. Ainsi, le second objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle de DEC2 dans ces cellules (Partie 2 des résultats).

Enfin, dans le FL, l'expression du CD23 par les lymphocytes B tumoraux est très hétérogène et est associée à un bon pronostic (Olteanu H *et al*, Am J Clin Pathol, 2011). Puisque nos précédents résultats montrent que les lymphocytes B perdent l'expression du CD23 au cours de leur différenciation en PB, nous avons supposé que la population tumorale CD23pos était bloquée dans une étape plus précoce de la différenciation que la contrepartie CD23neg. Ainsi, le troisième objectif de ma thèse a été de caractériser les B tumoraux CD23pos et CD23neg et d'étudier leurs capacités de différenciation en PB (Partie 3 des résultats).

RESULTATS

PROJET 1 :

La perte d'expression du CD23 permet d'identifier les centrocytes qui s'engagent dans la différenciation en plasmablastes.

The CD23 cell surface marker labels the light zone of human germinal center and its downregulation identify plasmablast-committed B cells

Introduction (*in progress*)

Germinal center (GC) are the site of affinity maturation of B cells and lead to the production of plasmablasts (PB) and then plasma cells (PC) highly affine for the antigen. First, this differentiation requires the proliferation of $_{GC}B$ cells in the dark zone (DZ), where they acquire somatic hypermutations to produce highly affinity antibodies. Then, DZ $_{GC}B$ cells migrate into the light zone (LZ), where they are selected by the follicular dendritic cells (FDC) and follicular helper T (Tfh) cells to differentiate into PB. Thanks our *in vitro* model of terminal B cell differentiation, we have shown that activated B cells lose the capacity to respond to IL-4 with the CD23 downregulation (Caron *et al.*, 2015; Pignarre *et al*, 2020). Furthermore, $IgD^+ CD38^- CD23^-$ cells have an intermediate profile between naïve B cells (NBC) and $_{GC}B$ cells, supposing that CD23 downregulation is associated with PB commitment (Kolar GR *et al*, Blood, 2007). In mice also, PB differentiation is also accompanied by the loss of CD23 expression with follicular B cells expressing CD23 and PB and MBC that do not express it (Shinall *et al*, 2000). Finally, LZ $_{GC}B$ cells express CD23 more strongly than DZ B cells (Victora *et al*, Cell, 2010).

However, CD23 expression is induced by IL-4 and CD40 in murine and human B cells (Sukumar *et al*, 2006; Yokota A *et al*, 1988; Challa *et al*, 1999; Ewart *et al*, 2002), both produced by Tfh cells, which led us to wonder why LZ $_{GC}B$ cells lose CD23 expression after their productive synapse with cognate Tfh cells. Here, we report that CD23 expression is lost during PB commitment, with $CD23^- LZ_{GC}B$ cells which express a similar phenotype of PB. Furthermore, we show a kinetics of LZ $_{GC}B$ cells differentiation at the single cell level, through the CD23 expression that confirm previously published data about terminal B cell differentiation.

Materials and methods

Human samples and primary B cell purification

Tonsils were obtained from children undergoing routine tonsillectomy in the clinic La Sagesse of Rennes (France). Tonsil-derived LZ_{GC}B cells were isolated by negative selection using magnetic cell separation with the MojoSort Human Pan B cell Isolation Kit (Biolegend) following the manufacturer's instructions and using an IgD Biotine antibody, with the AutoMACS depletes-sensitive program. LZ_{GC}B cells (CD19⁺ IgD⁻ CD10⁺ CD38⁺ CXCR4^{lo}) and PB (CD19⁺ IgD⁻ CD38⁺⁺) were sorted by the BD FACS Aria cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA).

Cell culture

All cultures were performed in complete medium consisting of RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FCS (Biowest, Nuaille, France) and antibiotics (Invitrogen).

Tonsil-derived LZ_{GC}B cells were cultured at 0.8×10^5 cells/ml and stimulated for 12h or 24h with 10 ng/ml Human IL-4 (R&D Systems), 50 ng/ml recombinant human soluble CD40L (NCI) and 50 µg/mL Human IL-21 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany).

For differentiation experiments, CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells obtained after 24h of culture with IL-4, CD40L and IL-21 were sorted by the BD FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, CA) and were cultured 48h with 50 U/ml human IL-2 (Proleukin Novartis), 10 ng/ml IL-4 (R&D Systems) and 12 ng/ml recombinant human IL-10 (R&D Systems).

For LZ_{GC}B cells-Tfh coculture, autologous CD4⁺ T cells were purified by negative selection using magnetic cell separation with CD19⁺, CD8⁺, CD16⁺ and CD14⁺ microbeads (Miltenyi Biotech) with the AutoMACS depletes-sensitive program. Tfh cells (CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁺) were then sorted by the BD FACS Aria cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA). Tfh cells were added to LZ_{GC}B cells (ratio 1T:2B) with 0.2 µg/ml anti-CD3 plus 0.2 µg/ml anti-CD28 (PeliCluster Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) or 250 µg/mL *Staphylococcal Enterotoxin B* (SEB) during 24h.

For pSTAT6 inhibition, LZ_{GC}B cells were cultured with 1µM of pSTAT6 inhibitor (#AS1517499, Axon Medchem) or 1µM of DMSO during 24h in complete medium.

Surface and intracellular staining for flow cytometry

Naïve B cells were defined as CD19⁺ IgD⁺ CD38⁻, memory B cells as CD19⁺ CD38⁻ CD27⁺ and GC_B cells as CD19⁺ IgD⁻ CD38⁺.

For intracellular staining of pSTAT6, cells were fixed with 1.6% paraformaldehyde in complete medium during 10 minutes at room temperature. After a wash in PBS, cells were permeabilized with cold methanol during 15 minutes at 4°C. Cells were then labelled with STAT6(pY641)-Alexa 488 and CD23-PE antibodies for 15 minutes at 4°C. Data were acquired on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using FlowJo software.

All monoclonal antibodies (mAbs) used are detailed in **Table I**.

RNA extraction, reverse transcription and real time quantitative PCR

RNA was extracted by using NuclioSpin RNA Plus XS Kit (Macherey-Nagel) and reverse transcribed into cDNA with Superscript II (Invitrogen). Multiplex qPCR were performed with Assay-on-demand primers and the TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fischer) on a 96.96 Dynamic Array IFC using the Fluidigm BioMark HD system. Gene expression was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with the *ABL1* gene as endogenous control. Taqman assays used are recapitulated in **Table II**.

Single cell qPCR

Single cell qPCR were performed accordingly to manufacturer recommendations using the C1 Single-Cell system in 96.96 C1 small-cell (5-10 μ M) microfluidic plates (Fluidigm). Number of cells per well was determined by microscopy to eliminate doublets or empty wells. After cell lysis, reverse transcription and pre-amplification, multiplex qPCRs were made with Assay-on-demand primers and TaqMan Universal Master Mix on a 96.96 Dynamic Array IFC using the Fluidigm BioMark HD system. Expression data was imported in R (version 3.6.2) with the fluidigmSC package (version 3.6.2) (Sun and Wang, 2017). Quality control, data scaling and dimensionality reduction analysis were performed using the Seurat package (version 3.1.3) (Stuart *et al.*, 2019). Particularly, UMAP computation was executed on PCA coordinates using the following parameters: `dims=1:5`, `n.neighbors=15`, `min.dist=0.45`. Based on this UMAP results, Monocle3 package (version 0.2.0) was used to produce cell trajectory, which was ordered according to LZ_{GC}B cells and PB coordinates. Graphical representations of gene expression according to pseudotime were performed using ggplot2 (version 3.3.0) (Wickham *et al.*, 2016) and pheatmap (version 1.0.12) (Kolde *et al.*, 2019) packages.

5' Rapid Amplification of cDNA Ends PCR (RACE PCR)

A mix containing mRNAs of CD23⁺ and CD23⁻ lymph node-derived LZ_{GC}B cells, 1 μ L of 10 μ M reverse primer complementary to IGHM IGHG, IGL and IGK constant regions (5'-CGGGTRCTGCTGATGTCAGA-3', 5'-GTGTTGCTGGGCTTGTGAT-3', 5'-GACTTCGCAGGCGTAGACTT-3', 5'-CTGGCCGCYACTTGTGTT-3', respectively), and 1 μ L-deoxynucleoside 5'-triphosphate solution mix (New England Biolabs), adjusted to a final volume of 12 μ L with water, was incubated for 3 minutes at 72°C and 2 minutes at 42°C. After a short spin, the mix was placed on ice for 2 minutes. Then, 4 μ L ProtoScript buffer, 2 μ L dithiothreitol solution, 1 μ L ProtoScriptII (New England Biolabs), and 1 μ L cap-race primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACAT[GGGG]-3', with the 4 G between brackets being ribonucleotides) was added. This mix was incubated 90 minutes at 42°C and 10 minutes at 70°C. At the end of the reaction, 20 μ L RNase free water was added.

The cDNA was amplified with TaqPhusion (New England Biolabs), using a universal forward universal primer mix (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' and 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3', in a ratio of 4:1) and a reverse primer hybridizing within the to IGHM IGHG, IGL and IGK constant exons (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAGCTCGTATCCGACGGGGAATT-3', 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAGCGGTTCCGGGGAAGTAGTCC-3', 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAGGCGGGAAGATGAAGACAGAT-3', 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGACAGGTTGGCTTGYAGCTCCTCAG-3').

Each PCR was performed in four replicates. Cycling conditions were 30 seconds at 98°C, 32 cycles of 30 seconds at 98°C, 30 seconds at 65°C, 30 seconds at 72°C, final elongation 5 minutes at 72°C. The 4 replicates were pooled and migrated on an agarose gel, and the fragments of interest were purified using the kit Nucleospin gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel). Then, Illumina sequencing adapter and tag sequences were added by primer extension using Taq Phusion. Four PCR replicates of 25 μ L were made using primers containing a unique couple of tags per sample. Cycling conditions were 30 seconds at 98°C, 12 cycles of 30 seconds at 98°C, 30 seconds at 65°C, 30 seconds at 72°C, and final elongation 5 minutes at 72°C. The 4 replicates were mixed, gel purified as previously.

Resulting amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq sequencing system using MiSeq Reagent Kit V3 600 cycles. Paired reads were merged using FLASH software. Repertoire

analysis was performed using IMGT/HighV-QUEST tool (<http://imgt.org/>) for sequence alignments and annotations, and in house R script to identify clonotypes (Li *et al.*, 2013). Briefly, reads were considered to originate from the same clonotype if they share the same V and J genes and a significant similarity in their CDR3 sequence. To define the extent of variability allowed between CDR3, each CDR3 amino acid (AA) sequence was aligned against itself to define a maximum alignment score. Then all CDR3 from reads bearing the same V and J genes were aligned against each other. CDR3 were considered as coming from the same clonotype if their alignment score was superior or equal to 70% of their maximum alignment score, and grouped together.

RACE PCR Analysis

CDR3 AA clonotypes were filtered to remove any CDR3 AA clone in each clonotype identified by less than 3 sequences, or including a stop codon. The B-cell repertoire was studied for each IgM and IgG libraries for each patient. The Venn diagram shows distribution of unique and overlapping CD23pos and CD23neg CDR3 AA clonotypes (VennDiagram R package v1.6.20). The CDR3 AA clonotypes in common between IgG and IgM for each patient are represented in a Circos plot (circlize R package v0.4.10). The histogram track, displayed for each population, illustrates the relative proportion of the number of sequences representing each CDR3 AA clonotype as a fraction of the total number of sequences for a sample. V-gene usages complement the characterization of each repertoire. The Fisher exact test was used to compare V-gene usage between the two populations for each repertoire.

Immunohistofluorescence

Human tonsils and reactive lymph nodes were embedded in Optimal Cutting Temperature Compound (OCT, Sakura) and conserved at -80°C. Cryostat sections (18µm thick) were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature. Sections were then incubated during 1h with a blocking solution (PBS, 2% Bovine Serum Albumin, 4% donkey serum and 0.1% saponin) at room temperature and incubated in a humidified chamber overnight at 4°C with primary antibodies. Sections were washed with PBS 0.1% saponin and incubated with secondary antibodies for 1h at room temperature. Finally, tissue sections were mounted with Mowiol (Merck) antifade reagent containing 20µM of SytoxBlue nucleic acid stain (Thermo Fischer) and analyzed by confocal microscopy on a SP8 (Leica Microsystems). ImageJ software (National Institutes of Health) was used for image analysis. The list of primary and secondary antibodies used for immunohistofluorescence is provided in **Supplemental Table III**.

Statistical analysis Quantitative variables were expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 software and R 3.6.0. Significance was tested using the Mann-Whitney nonparametric U test and one-way analysis of variance (*P ≤ .05; **P < .01; ***P < .001).

Table I: Flow cytometry antibodies list

Antibody target	Fluorochrome	Clone	Manufacturer	Reference
CD19	BV421	HIB19	BD Biosciences	562440
CD19	FITC		BD Biosciences	555412
CXCR4 (CD184)	PE		BD Biosciences	555974
CD38	APC	HIT2	Biologend	303510
CD38	PC5.5		BD Biosciences	551400
CD23	PE		BD Biosciences	555711
CD23	APC	M-L233	BD Biosciences	558690
CD23	PC7	M-L233	BD Biosciences	561167
IgD	FITC		BD Biosciences	555778
CD2	BV421	RPA-2.10	BD Biosciences	562639
CD10	PC7	HI10a	BD Biosciences	565282
CD4	APC-H7	RPA-T4	BD Biosciences	560158
CXCR5	BV421	RF8B2	BD Biosciences	562747
PD1 (CD279)	PerCP eFluor 710	eBioJ105	eBiosciences	46-2799-42
pSTAT6 (pY641)	AF488		BD Biosciences	612600
CD44	APC		BD Biosciences	559942
CD27	PE	M-T271	BD Biosciences	560985
CD27	APC	O323	eBiosciences	17-0279-73
CD138	PE		Beckman Coulter	A54190
CD138	BV421	MI15	BD Biosciences	562935
IgD	Biotine		BD Biosciences	555777
CD20	APC		BD Biosciences	559776
IL4R	PE		BD Biosciences	552178
IL21R	PE-CF594	17A12	BD Biosciences	564122
CD40	BUV395	5C3	BD Biosciences	566454
CD86	BV421	BU63	BD Biosciences	566454

Table II: List of Taqman primer assays

<i>Gene</i>	<i>Reference</i>	<i>Gene</i>	<i>Reference</i>	<i>Gene</i>	<i>Reference</i>	<i>Gene</i>	<i>Reference</i>
<i>AICDA</i>	HS00221068_m1	<i>CCNE1</i>	HS01026536_m1	<i>EZH2</i>	HS00172783_m1	<i>NFKB1</i>	HS00765730_m1
<i>ATF5</i>	HS01119208_m1	<i>CD21</i>	HS00153398_m1	<i>FAS</i>	HS00163653_m1	<i>NLRP14</i>	HS00698226_m1
<i>ATF6</i>	HS00232586_m1	<i>CDC25A</i>	HS00947994_m1	<i>FOXO1</i>	Hs01054576_m1	<i>PAX5</i>	HS00277134_m1
<i>CD38</i>	hs01120071-m1	<i>CREB3L2</i>	HS01592193_m1	<i>FCER2</i>	HS00233627_m1	<i>PIM2</i>	HS00179139_m1
<i>BACH2</i>	HS00222364_m1	<i>CDK6</i>	HS01026371_m1	<i>FOXO3</i>	HS00818121_m1	<i>POU2AF1</i>	HS01573371_m1
<i>BCL2</i>	HS00236808_s1	<i>ICAM1</i>	Hs00164932_m1	<i>HIF1a</i>	HS00153153_m1	<i>PPIB</i>	HS00168719_m1
<i>BCL2L1</i>	HS00236329_m1	<i>CDKN1B</i>	HS00153277_m1	<i>CD86</i>	hs99999104-m1	<i>PRDM1</i>	HS00153357_m1
<i>BCL2L11</i>	HS00708019_s1	<i>VCAM1</i>	hs00365485_m1	<i>IL-2 RA</i>	HS00907779_m1	<i>RPN2</i>	HS00955802_m1
<i>BCL6</i>	HS00153368_m1	<i>SDC1</i>	HS00896423_m1	<i>IL-21R</i>	HS00222310_m1	<i>SOCS1</i>	HS00705164_s1
<i>DEC1</i>	HS00186419_m1	<i>CIITA</i>	HS00172106_m1	<i>IL-4 R</i>	HS00166237_m1	<i>SOCS3</i>	HS02330328_s1
<i>DEC2</i>	HS00229146_m1	<i>MYC</i>	HS00153408_m1	<i>IL-6 R</i>	HS01075666_m1	<i>SOCS5</i>	HS00751962.s1
<i>ICOSL</i>	hs00323621-m1	<i>CDK4</i>	HS01565683_g1	<i>IRF4</i>	HS00180031_m1	<i>SPIB</i>	HS00162150_m1
<i>CASP3</i>	HS00234387_m1	<i>CXCR4</i>	HS00607978_s1	<i>IRF8</i>	HS00175238_m1	<i>STAT3</i>	HS00234174_m1
<i>CD40</i>	hs00374176_m1	<i>PD1</i>	hs00169472_m	<i>LFA1</i>	Hs00164957_m1	<i>STAT4</i>	HS01028017_m1
<i>CAV1</i>	HS00971716_m1	<i>DNMT1</i>	HS00945875_m1	<i>MAPK1</i>	HS01046830_m1	<i>STAT5A</i>	HS00559643_m1
<i>CCL22</i>	HS00171080_m1	<i>PDL1</i>	hs01125299-m1	<i>MCL1</i>	HS00172036_m1	<i>STAT5B</i>	HS00560035_m1
<i>CCNB1</i>	HS00259126_m1	<i>PDL2</i>	Hs01057777_m1	<i>MEF2B</i>	HS01021285_m1	<i>STAT6</i>	HS00598618_m1
<i>MS4A1</i>	hs00544819-m1	<i>E2F1</i>	HS00153451_m1	<i>MEF2C</i>	HS00231149_m1	<i>TET2</i>	HS00325999_m1
<i>CBL</i>	Hs01011446_m1	<i>ERN1</i>	HS00176385_m1	<i>MKI67</i>	HS01032443_m1	<i>TET3</i>	HS00379125_m1
<i>CBL-b</i>	Hs00180288_m1	<i>CD80</i>	Hs01045163_m1	<i>TET1</i>	HS00286756_m1	<i>TGFBR1</i>	HS00610320_m1
<i>SMAD3</i>	HS00969210_m1	<i>SOCS2</i>	HS00919620_m1	<i>TLR4</i>	HS00152939_m1	<i>TNF</i>	HS00174128_m1
<i>SMAD7</i>	HS00998193_m1	<i>NLRP7</i>	HS00373683_m1	<i>NR4A3</i>	HS00545009_g1	<i>TNFR1</i>	HS01042313_m1
<i>CCND1</i>	HS00765553_m1	<i>TLR7</i>	HS01933259_s1	<i>FASLG</i>	HS00899442_m1	<i>XIAP</i>	HS00236913_m1
<i>CCND2</i>	HS00153380_m1	<i>TP53</i>	HS01034249_m1	<i>LMO2</i>	HS00153473_m1	<i>ATG5</i>	HS00169468_m1
<i>CDKN1A</i>	HS00355782_m1	<i>XBP1</i>	HS02856596_m1	<i>LTB</i>	HS00242737_m1	<i>CASP1</i>	HS00354836_m1
<i>CDKN2B</i>	HS00793225_m1	<i>XBP1s</i>	HS03929085_g1	<i>MAPK3</i>	HS00385075_m1	<i>CASP6</i>	HS00154250_m1
<i>CDKN2C</i>	HS00176227_m1	<i>DNMT3a</i>	HS01027166_m1	<i>DNMT3b</i>	HS00171876_m1	<i>ESR1</i>	HS00174860_m1

Table III: List of antibodies for immunohistofluorescence

Antibody target	Fluorochrome	Manufacturer	Reference
Anti-rabbit PAX5	Unconjugated	Abcam	Ab109443
Anti-rat CD3	Unconjugated	Abcam	Ab11089
Anti-rabbit CD20	Unconjugated	Abcam	Ab78237
Anti CD23	Unconjugated	Abcam	
Anti CD21L	Unconjugated	Dako Cytomation	-
Anti-pSTAT6	Unconjugated	Abcam	
Anti-PD1	Unconjugated	Abcam	
Anti-CXCL12			
Anti-Mouse	Alexa-Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	715-606-151
Anti IgM Mouse	Alexa-Fluor 594	Jackson ImmunoResearch	715-606-020
Anti-Rabbit	Alexa-Fluor 488	Jackson ImmunoResearch	711-546-152
Anti-Rabbit	Alexa-Fluor 647	Jackson ImmunoResearch	711-606-152
Anti-Rabbit	Alexa-Fluor 594	Jackson ImmunoResearch	711-586-152
Anti-Rat	Alexa-Fluor 488	Jackson ImmunoResearch	712-546-153

Results

In the germinal center, CD23⁺ cells are mainly light zone FDC

By using an *in vitro* B cell differentiation model, we demonstrated that activated B cells need the IL-4/STAT6 signaling to upregulated *FCER2* expression which encodes the CD23 cell surface marker (Pignarre *et al.*, 2020). In this study, we explored LZ germinal center B cells (LZ _{GC}B cells) in human tissues using tonsils and reactive lymph nodes (rLN). By immunofluorescence, we analyzed the expression of CXCL12, CD21 and CD23. CXCL12 staining allowed to distinguish the DZ (CXCL12⁺) and the LZ (CXCL12⁻), while the CD21L protein targeted specifically follicular dendritic cells (FDC) (Allen & Cyster, 2009). CD23 expression was restricted to the light zone (LZ) of the GC as previously described by Victora *et al.* (Victora *et al.*, 2012) (Figure 1A). By replacing CXCL12 by PAX5, we identified _{GC}B cells and noticed that CD23 staining did not really match with these cells (Figure 1B). We then reasoned that IL-4 was delivered to _{GC}B cells by Tfh cells. We did not find CD23⁺ _{GC}B cells in the vicinity of T_{GC}-cells, but we found dendritic extensions surrounding some T_{GC}-cells and expressing the CD23 in tonsils (Figure 1C) and in rLN (Figure 1D). Altogether, our results reveal that CD23 expression is confined to the LZ of the GC and restricted to FDC as previously described (Allen & Cyster, 2009). Microscopic examination of GC do not really allow discriminating CD23⁺ _{GC}B cells because of FDC that express it strongly and with a different pattern than CD21L.

IgD⁻ _{GC}B cells are mainly CD23⁻ and share a common progenitor with the CD23⁺ counterpart

Tonsils and rLN tissues were dislocated, cells resuspended and subsequently analyzed by flow cytometry to determine the percentage of CD23⁺ cells in the different B cell populations. Unlike naïve B cells (NBC) and IgD⁺ _{GC}B cells which expressed strongly CD23, IgD⁻ _{GC}B cells, PB (PB) and memory B cells (MBC) presented less than 30% of CD23⁺ cells for tonsils and rLN (Figure 2A, Figure S2A). We focused on CXCR4^{hi} CD86^{lo} DZ and CXCR4^{lo} CD86^{hi} LZ _{GC}B cells as described previously (Le Gallou *et al.*, 2013; Victora *et al.*, 2010) and found that LZ _{GC}B cells expressed stronger CD23 than DZ B_{GC}-cells. Moreover, CD23 expression was higher in rLN than tonsil LZ B_{GC}-cells with respectively 6.99% +/- 1.45 and 7.7% +/- 3.99 of CD23⁺ LZ _{GC}B cells (Figure 2B and S2B). In B cells, CD23 expression is induced by Tfh-derived cytokines and especially IL-4 which binds to its receptor and induces a STAT6 signaling (Pignarre *et al.*, 2020). We found similar levels of the expression of IL-4 receptor (CD124), IL-21 receptor (CD360) and CD40 on the cell surface of CD23⁺ and CD23⁻ LZ _{GC}B cells (Figure 2C). Since a minority of LZ _{GC}B cells expressed CD23, we reasoned that these cells may indicate the

presence of productive B-Tfh synapses between cognate cells which could drive a restrained BCR repertoire diversity compared to CD23⁻ cells. We explored this hypothesis on CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells isolated from rLN of three different subjects. To this end, we applied a RACE PCR approach for fragment analyses and interrogated CDR3 regions to constitute clusters and to assess variable (V) genes identity for both IgM and IgG. Our investigations for the three subjects showed common CDR3 clusters and no significant difference for V genes for IgM and IgG. Altogether, these results signed that both, CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells share a common progenitor without specific clonal selection within the CD23⁺ compartment (Figure 2D and Supplemental Figure 2D).

***FCER2*/CD23 expression delineates specific LZ_{GC}B cell subsets**

To capture the transcriptional differences that may exist between LZ_{GC}B cells according to *FCER2* expression, we analyzed *in silico* single-cell (sc) transcriptomic data obtained from tonsil derived GC_B cells by Holmes *et al.* (Holmes *et al.*, 2020). The comparison between DZ and LZ_{GC}B cells of sc-RNAseq profiles showed respectively 3% versus 15% of *FCER2* expressing cells (Figure 3A and Supplemental Figure 3A). To investigate the heterogeneity of the LZ compartment for the *FCER2* expression, we interrogated non-proliferating LZ_{GC}B cells (in G0-G1 cell cycle) for the 12 clusters described by Holmes *et al.* (Holmes *et al.*, 2020) in Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) (Figure 3B and Supplemental Figure 3B). The *FCER2* expression levels were increased for clusters related to cell activation and BCR engagement (Figures 3C-3E). In contrast, the expression of *FCER2* was significantly weaker in 6 clusters including one associated to plasmablast signature, two related to cell entering or exiting the DZ and one associated with Ox-Phos metabolism (Figures 3D-3E). Cells expressing genes associated with the S-G2-M phases of the cell cycle (proliferating cells) showed significant changes in *FCER2* expression for only 2 of the 11 clusters, including S phase cluster (upward regulation) and DZ re-entry (downward regulation) (Supplemental Figures 3C-F).

Taking as a whole, these insights show that the *FCER2* expression is linked to non-proliferating, BCR-active B cells, which could correspond to GC_B cells that are at the end of the differentiation process, diverted from a fate of PC. Moreover, despite the small size of the “precursor memory B cells” cluster, 6 cells of 34 expressed *FCER2* (Figure 3D-E). Therefore, we reasoned that CD23⁻ LZ_{BGC} cells could hold committed cells for plasma cell differentiation as shown recently in our *in vitro* differentiation model (Pignarre *et al.*, 2020). To explore this hypothesis, we developed a sensitive sc-qPCR approach using Fluidigm platform with a panel of 89 genes selected from the RNA-seq comparison between CD23⁺ versus CD23⁻

compartments of post-activated B cells (Pignarre *et al.*, 2020). We analyzed freshly sorted CD19⁺IgD⁻CD10⁺CD38⁺ CXCR4^{lo} CD23-positive or -negative LZ_{GC}B cells and CD19⁺IgD⁻CD38^{bright} PB. Unsupervised clustering analysis delimited two cell compartments associated either with B cell or plasma cell identity genes (Figure 3F). Five PB were ranked in the B cell compartment because of their B cell genes expression and especially *PAX5*. However these cells expressed also plasma cell genes including *PRDM1*, *XBP1* and even for some of them *XBP1s*. The comparison between CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells showed only limited differences with a slightly higher expression of *PRDM1*, *IRF4*, *XBP1* & *XBP1s* genes in CD23⁻ LZ_{GC}B cells, closer to the plasmablast identity than the CD23⁺ counterpart (Figure 3G). Interestingly, besides of a trend of a higher number of proliferating cells in the CD23⁻ compartment based on the global expression of *MKI67* and *E2F1* (Figure 3G), we identified a proliferative signature expressed by a specific subset of 16 cells constituted by 12 CD23⁻, 3 CD23⁺ LZ_{GC}B cells and one plasmablast (Figure 3F). Finally, the *CD86* expression was significantly higher in CD23⁺ LZ_{GC}B cells, a marker induced by IL-21 in B cells and present on memory B cells (Figure 3G) (Good KL *et al.*, 2009; Attridge K *et al.*, 2014).

Tfh driven LZ_{GC}B cells stimulation leads to a CD23-dichotomized response

To investigate the functional response of LZ_{GC}B cells to Tfh-type stimulation, we sorted CD19⁺IgD⁻CD38⁺CD10⁺CXCR4^{lo} LZ_{GC}B cells and cultured them for 12h with IL-4, CD40 and IL-21, alone or in combination. Both, IL-4 and CD40, and even better their association, were efficient to induce a significant CD23 response but more than 50% of the cells remained negative for this marker (Figure 4A). Both, CD23⁺ and CD23⁻ resulting cell compartments express similar levels of IL-4R, IL-21R and CD40 (Supplemental Figure 4A). We selected for our subsequent experiments the combination of these three cytokines since the combination of IL-21 and IL-4 expression by GC-Tfh cells maximally supports LZ_{GC}B cells in addition to CD40L (Weinstein JS *et al.*, 2016; Crotty S, 2019). CD23 expression was pSTAT6-dependent and STAT6 inhibition blocked CD23 expression (Figure 4B and Supplemental Figure 4B). We then cocultured LZ_{GC}B cells with autologous CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ Tfh cells for 24h and analyzed subsequently the CD23 expression. Although only few CD23⁺ LZ_{GC}B cells appeared after coculture, this number raised when Tfh cells were activated either with aCD3/aCD28 or *Staphylococcal Enterotoxin B* (SEB) with up to 14% and 34% cells respectively (Figure 4C). The number of CD23⁺ LZ_{GC}B cells reached almost 100% when the stimulation was maintained up to 48h (Supplemental Figure 4C). In total, these results suggested to us at this point of our investigations two possible interpretations: (i) considering the low number of CD23⁺ LZ_{GC}B cells in tonsils and rLN GC, only a small number of LZ_{GC}B cells experienced an efficient or

complete Tfh cell help - which one is a key limiting resource in GC and B cells compete for it - therefore majority of LZ_{GC}B cells are CD23⁻ (Crotty S, 2019), or (ii) after early Tfh:GCB synaptic engagement and in absence of a sustained Tfh help, CD23⁺ B_{GC} cells disappear most likely die within 24h of antigen recognition (Akkaya *et al.*, 2018). Previously, we showed that CD23⁺ activated B cells generated *in vitro* are more susceptible to cell death than their CD23⁻ counterpart (Pignarre *et al.*, 2020). Tonsil derived CD23⁺ LZ_{GC}B cells were also more susceptible to die than CD23⁻ cells as their viability was rescued using a pan-caspase inhibitor (Supplemental Figure 4D). By immunohistostaining we identified rare B:Tfh synapses in tonsil GC, based on the following staining PD1 (Tfh cells), CD20 (B cells) and pSTAT6 expression in GCB cells; with pSTAT6 expression induced logically, as shown above, the CD23 expression (Figure 4D). Weinstein *et al.* described in mice that Tfh cells localized in the proximity of the GC DZ and provided firstly IL-21 to B cells and then switched upon full differentiation of Tfh cells to an IL-4 production into the GC, associated with a robust expression of the co-stimulator CD40L (Weinstein JS *et al.*, 2016). When applying a two-step culture model build firstly by 12h of IL-21 followed by 12h of IL-4 w/wo CD40L and compared the number of generated CD23⁺ LZ_{GC}B cells without IL-21 priming, we found that IL-21 impeded significantly the CD23 expression (Figure 4E). This latter result may complete the above list of reasons explaining the low number of CD23⁺ LZ_{GC}B cells noted in GC. However, our findings show that an appropriate stimulation of LZ_{GC}B cells for few hours is not enough to upregulate CD23 expression in every single cell.

CD23⁻ LZ_{GC}B cells contain plasmablast precursors

We then focused our investigations on the CD23⁻ compartment and to this end, we undertook a paired analysis of *BCL6*, *PAX5*, *XBP1* and *PRDM1* gene expression on freshly purified CD19⁺IgD⁻CD38⁺CD10⁺CXCR4^{lo} LZ_{GC}B cells, LZ_{GC}B cells cultured 12h with IL-4, CD40L and IL-21 before subsequent CD23⁻ and CD23⁺ cell sorting, and CD19⁺IgD⁻CD38^{bright} PB. Compared to fresh LZ_{GC}B cells, both CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells downregulated B cell identity genes expression as *BCL6* and *PAX5* and upregulated *XBP1*. However, only CD23⁻ LZ_{GC}B cells upregulated *PRDM1* expression, the master plasma cell gene (Figure 5A). The capacity of CD23⁻ and CD23⁺ subsets to differentiate into PB (CD38^{bright}) and PC (CD138⁺) was next assessed. We sorted CD23⁻ and CD23⁺ LZ_{GC}B cells and maintained them in culture for 48h with a differentiation cocktail containing IL-2, IL-4 and IL-10. The three independent experiments showed that only the CD23⁻ subpopulation of LZ_{GC}B cells had the capacity to differentiate into PB and PC (Figure 5B).

Cellular trajectories of human GC^{B} cells after Tfh-type stimulation

Since $\text{CD}23^+$ and $\text{CD}23^-$ subsets of 24h stimulated GC^{B} cells presented distinct ability to differentiate into PC, we decided to explore both populations at the transcriptional level using a sc-qPCR approach with 93 selected genes. Sorted tonsillar LZ GC^{B} cells (T0h) and PB were compared to T4h, T24h $\text{CD}23^+$ and T24h $\text{CD}23^-$ cultured LZ GC^{B} cells (Figure 6A). The UMAP projection was colored based on the pseudotime by using Monocle and showed an ordered stage progression from T0h LZ GC^{B} cells, T24 h $\text{CD}23^-$ LZ GC^{B} cells and PB, while the T24h $\text{CD}23^+$ LZ GC^{B} cells were inferred in a distinct cluster (Figure 6B). The UMAP reduction drew two cell trajectories with different *BCL6*, *PAX5*, *IRF4*, *XBP1* and *PRDM1* gene expression pattern and showed distinct cell destinies: one toward a plasmablast differentiation, and another that remained B cell fate (Figures 6B-E). As early as 4h, LZ GC^{B} cells migrated along the axis of plasma cell fate. *FCER2* expression was present in early time points (T0h and T4h LZ GC^{B} cells) and mainly as expected in $\text{CD}23^+$ GC^{B} cells, while *CCL22* a well-characterized IL-4/STAT6 target (Takemura *et al.*, 2018), was expressed in both T24h $\text{CD}23^+$ and $\text{CD}23^-$ GC^{B} cells but not into the final cluster of cells from the trajectory, which contained PB and also some T24h $\text{CD}23^-$ LZ GC^{B} cells (Figure 6B-C).

Insights in gene expression kinetics throughout the differentiation trajectory

The heatmap generated by Monocle ordered cells as expected with genes informing the pseudotime order and displaying a pattern of expression leading to the linear transition from $\text{CD}19^+\text{IgD}^-\text{CD}38^+\text{CD}10^+\text{CXCR}4^{\text{lo}}$ LZ GC^{B} cells to $\text{CD}19^+\text{IgD}^-\text{CD}38^{\text{bright}}$ plasmablast group of cells, which present some T24h, T4h cells and 2 fresh LZ GC^{B} cells (Figure 7A). Using this ordering we could dynamically analyze gene expression by dividing in quadrants the pseudotime. Thus, we identified six Modules of genes with specific expression kinetics related to transcription factors and cell functions or identity (Figure 7A-B). Module 1 and 2 corresponded to PC differentiation with an early expression for genes of the Module 1 and a latter expression for the Module 2. However, Module 1 expressed also *POU2AF1*, described in mice as an enhancer of antibody-secreting cell differentiation (Emslie *et al.*, 2008) and as an activator of GC^{B} cells in GC formation during T-dependent B cell responses, especially after IL-4 stimulation (Nutt *et al.*, 2015). Interestingly, Module 5 depicted an enhanced B cell signature that peaks at the end of the third quadrant, before a sharp decrease and extinction in PB. This expression pattern was preceded by the Module 3 that encompassed several transcription factors including *MYC*. Module 4 presented a transient expression, likely in response to upstream factors, characterized notably by the *ATF5* expression, a transcription factor involved in the CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway and which acts as a stress sensor (Sheng *et al.*,

2010). Finally, Module 6 represented a proliferation signature that increased sharply and transiently in quadrant 3 before its extinction.

The kinetic of expression of transcription factors are in agreement with previous knowledge on these factors (Willis & Nutt, 2019). Indeed, we found a bimodal expression of *IRF4* with a first peak that preceded B cell identity gene upregulation like *PAX5*, *BCL6*, *BACH2* and *SPIB*, while the second peak appeared after the sharp decrease of these 4 factors (Figure 7C). Interestingly, *PAX5* expression showed a striking increase which peaks at the end of the third quadrant before a sharp decrease. Since *PAX5* repress the expression of non-lineage B cell genes including *PRDM1* and in the meantime drives the expression of *IRF8*, *BACH2* and *SPIB*, our data suggested that before the shift to plasmablast generation, LZ_{GC}B cells went to a B cell activation state (Willis & Nutt, 2019). While *XBP1* increased early in the differentiation process, *PRDM1* and *XBP1s* were late transcription factors that sealed the destiny as PB. The pseudotime shed lights on the expression pattern of *MYC* which sustains the cell proliferation before differentiation, a crucial step in the GC (Willis & Nutt, 2019; Dominguez-Sola *et al.*, 2012). Almost absent in a large number of LZ_{GC}B cells at steady state, *MYC* expression increased early in the timeline dragging behind target genes such as *TP53* (Zindy *et al.*, 1998) and *CDK4* (Hermeking *et al.*, 2000) as well as *CDK6*. This burst was followed by a second group of genes (*MIK67*, *E2F1*, *CDC25A*, *CCNB1* and *CCNE1*) and finally, at the end of the differentiation the expression of these 9 genes decreased dramatically (Figure 7D).

The signal delivered by the IL-4 cytokine - which is present in our differentiation cocktail (Figure 6A) - can be assessed through the expression of *STAT6*, *IL4R*, *FCER2* and *CCL22* (Figure 7E). Despite a slight, transient but inoperant - insufficient to induce membrane CD23 expression - increase of *FCER2*, we detected however a clear *STAT6* response in the second quadrant, a maximum expression in the third and a deep decrease before extinction in PB. In parallel, *IL-4R* and mainly *CCL22*, two well-documented target of pSTAT6, followed *STAT6* expression with a slight noticeable delay for the peak in the third quadrant. This result confirms that B cells committed to differentiate into PB need a transient IL-4 signal with a defective response for *FCER2* (Pignarre *et al.*, 2020).

The minimal commitment signature encodes, besides PC identity elements, factors that inhibit cell proliferation

Module 2 contained *PRDM1*, the master plasma cell factor, as well as *XBP1s*, *ERN1* and *CREB3L2*, all three belong to unfolding protein response, crucial for plasma cell differentiation (Gass *et al.*, 2002; Iwakoshi *et al.*, 2003). Therefore, we proposed that this late wave of gene expressions represented a committal signature sealing the plasma cell generation. This

minimal signature included also *NLRP14*, *CDKN1B* and *DEC2*. *NLRP14* was expressed in few cells. This gene encodes a protein that belongs to the NALP family involved multiprotein complexes such as the inflammasome (Inohara *et al.*, 2003). Increased *CDKN1B* expression appeared when cells started to differentiate and reached the maximal levels in PB (Figure 8A). This gene encodes p27KIP1 protein that binds to and prevents the activation of the cell cycle. Associated to this factor we found also *DEC2* where the expression was well restricted to PB and confirmed on previous data (Figure 8B) (Holmes *et al.*, 2020). This transcription factor (also called BHLHE41), functions as a repressor and was found upregulated in murine B1 cells relative to follicular B cells, cells prompted to differentiate into PC (Kreslavsky *et al.*, 2017). At the molecular level, DEC2 was suspected to repress the cell cycle and to inhibit BCR signaling, while it allows pro-survival functions of cytokine signaling (Willis & Nutt, 2019).

Discussion (*in progress*)

Figure 1

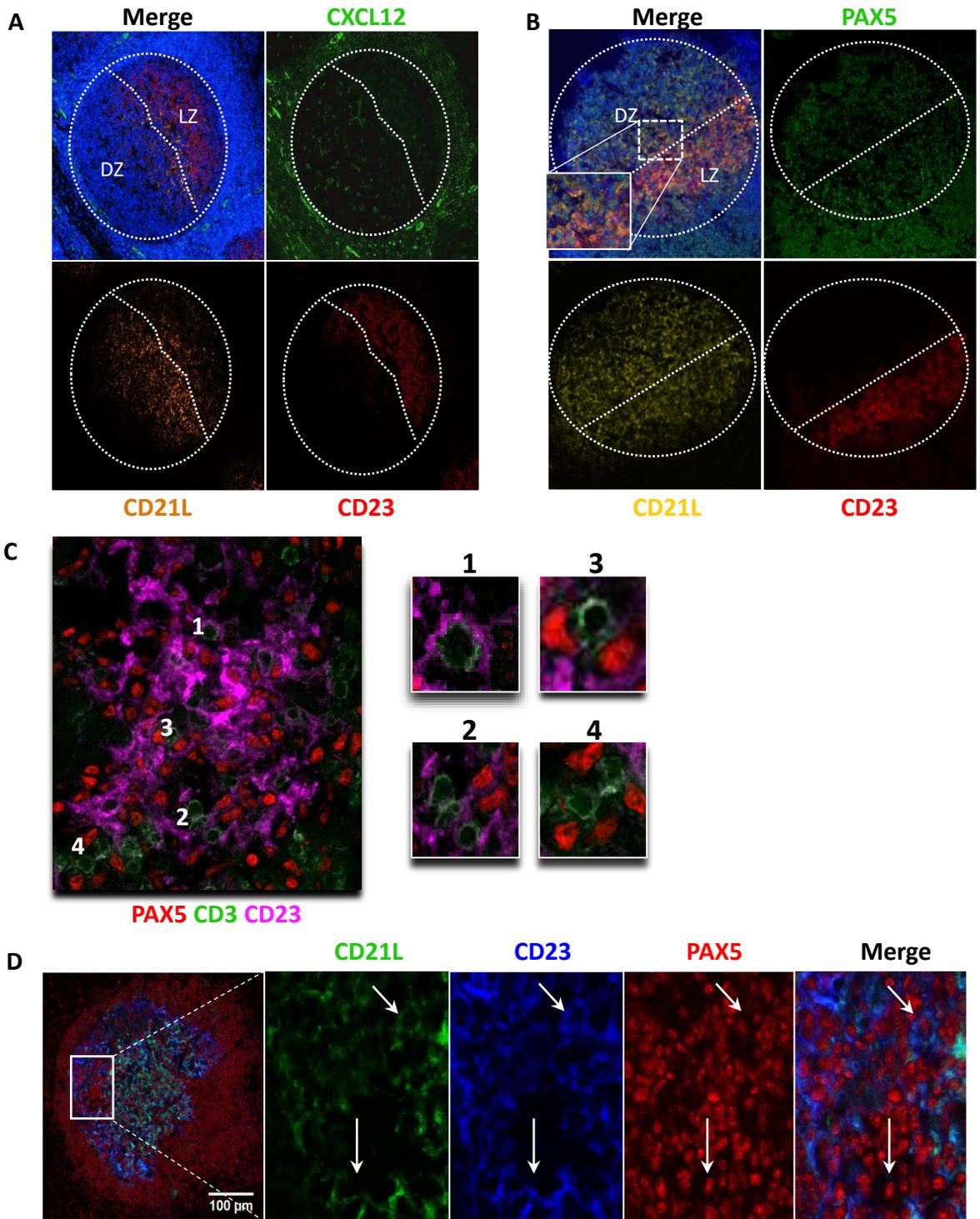


Figure 1 : In the germinal center, CD23⁺ cells are mainly light zone FDC. (A) Tonsil CXCL12 staining (green) allows to discriminate the dark zone (DZ) CXCL12⁺ and the light zone (LZ) CXCL12⁻. CD21L (orange) is used as a stromal cells marker. CD23 expression (red) is localized in the light zone. **(B)** CD23 expression seems to be restricted to LZ CD21L⁺ (yellow) FDC. We can not discriminate CD23⁺(red) PAX5⁺ (green) tonsil B cells. **(C)** Staining with CD3 (T cells, green), PAX5 (B cells, red) and CD23 (LZ FDC, pink) allows to characterize the LZ organization. (1) and (2) T cells interact with CD23⁺ FDC. (3) and (4) T cells in the vicinity of CD23⁻ B cells. **(D)** GC architecture in reactive lymph node with CD21L (green) CD23 (blue) and PAX5 (red) staining. The top white arrow shows a CD21L⁺CD23⁺ FDC that enfolds a PAX5⁺ B cell. The down arrow points a typical meshwork staining characteristic to FDC.

Figure 2

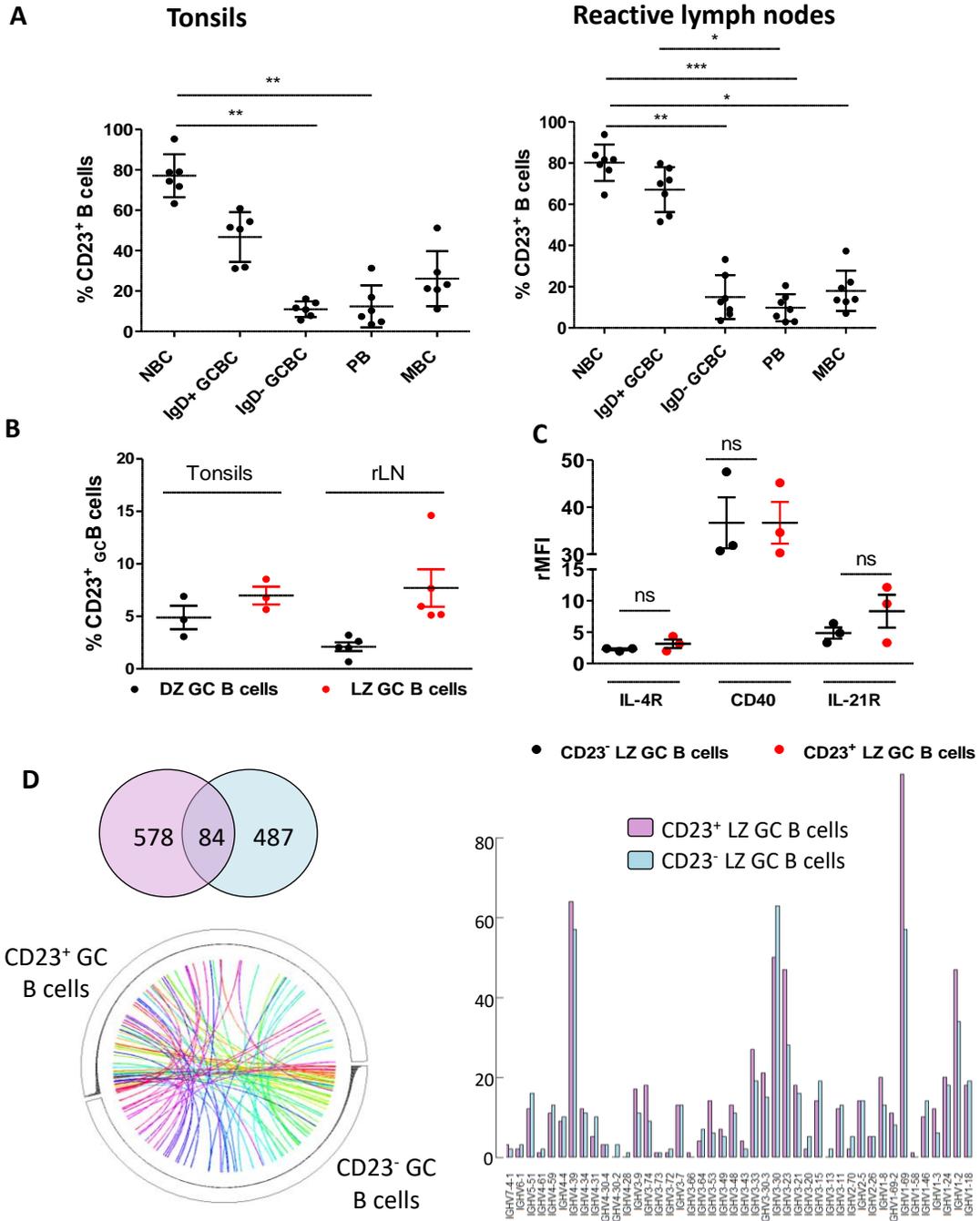
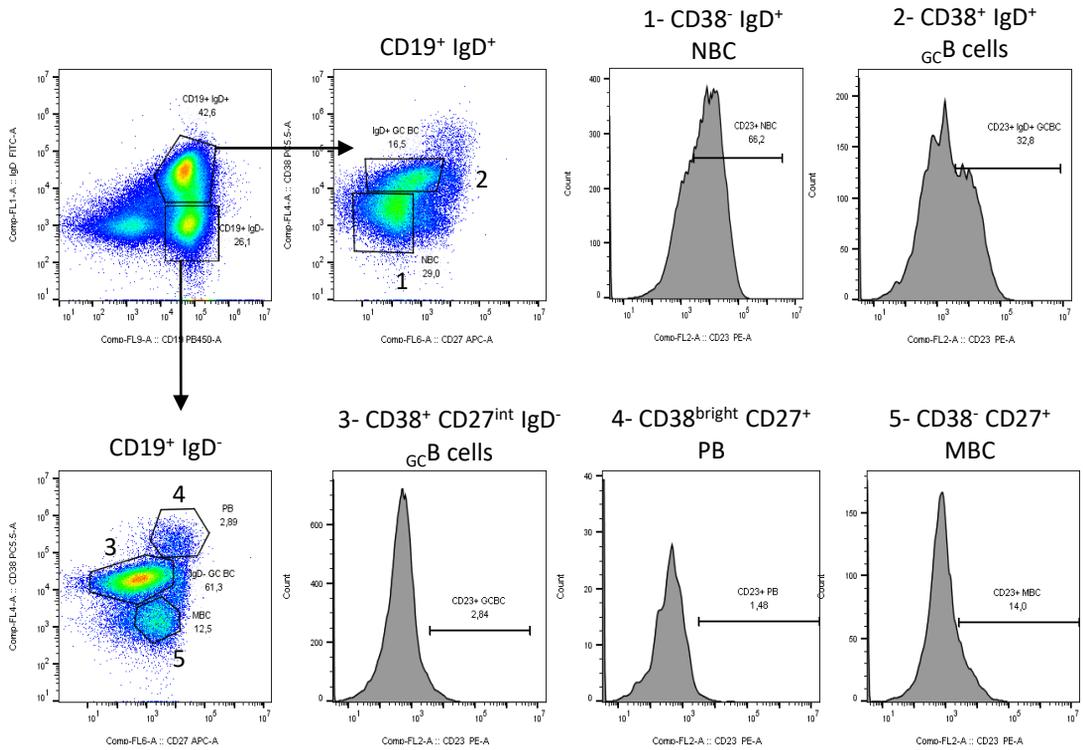


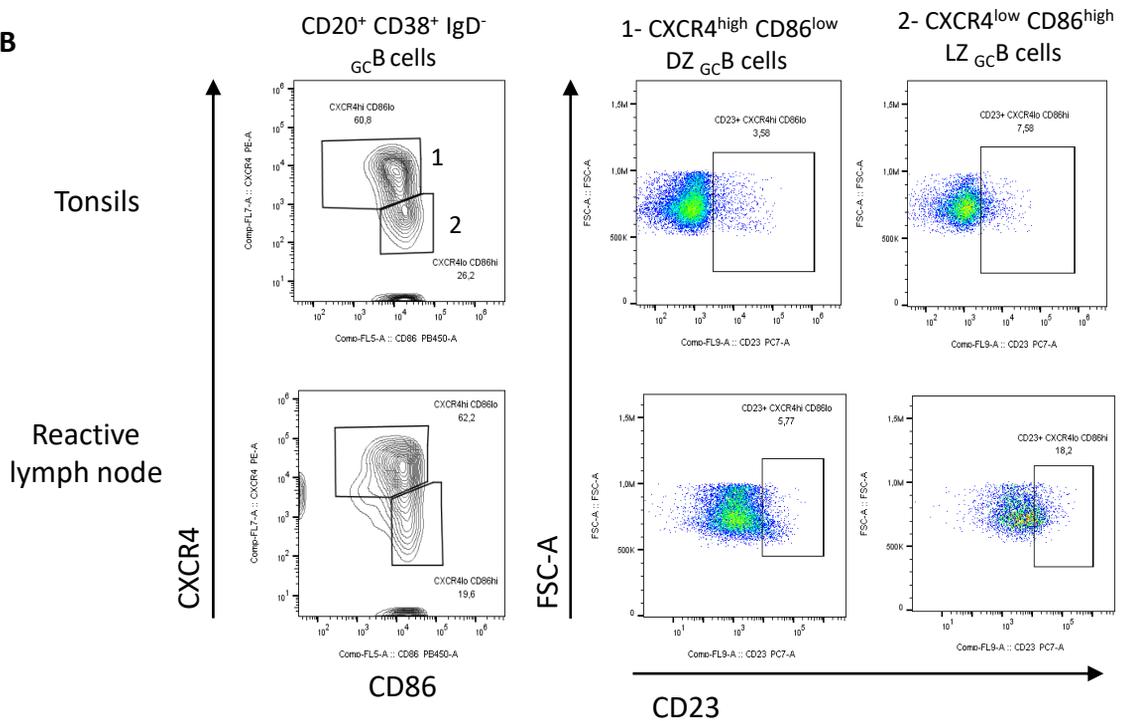
Figure 2 : IgD⁻ GC B cells are mainly CD23⁻ and share a common progenitor with the CD23⁺ counterpart. The percentage of CD23 expressing B cells has been determined by flow cytometry in different B cell subsets: **(A)** CD19⁺ CD38⁻ IgD⁺ naive B cells (NBC), CD19⁺ CD38⁺ IgD⁺ and IgD⁻ GC B cells, CD19⁺ CD38⁺⁺ IgD⁻ plasmablasts (PB) and CD19⁺ CD38⁻ IgD⁻ CD27⁺ memory B cells (MBC) and **(B)** CXCR4^{hi} CD86^{lo} DZ GC B cells and CXCR4^{lo} CD86^{hi} LZ GC B cells from tonsils and reactive lymph nodes (rLN). **(C)** The ratio of the median fluorescence intensity (rMFI) for IL-4R, CD40 and IL-21R in CD23⁺ and CD23⁻ LZ GC B cells from tonsils. **(D)** RACEPCR approach for CDR3 regions for IgM in CD23⁺ and CD23⁻ LZ GC B cells from rLN. Venn diagram of the clusters of amino acids sequences of CDR3 regions (CDR3 AA) for both populations. Circos representation of common CDR3 AA clusters with histograms of their frequency arranged by descending order. Histograms on the right shows the number of CDR3 AA clusters associated to each IG VH. * = p value < 0.05 ; ** = p value < 0.01

Supplemental Figure 2

A



B



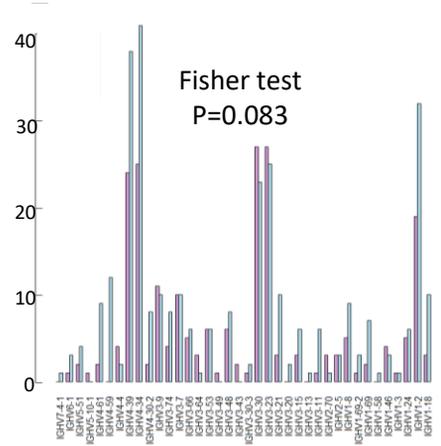
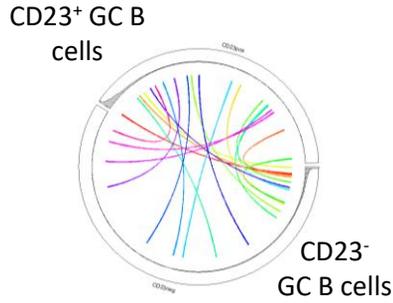
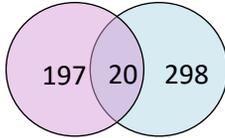
Supplemental figure 2. (A) Gating strategy of different B cells subsets analyzed for CD23 expression by flow cytometry. Cells are defined as: 1- CD19⁺ CD38⁻ IgD⁺ naïve B cells (NBC), 2- CD19⁺ CD38⁺ IgD⁺ and 3- IgD⁻ GC B cells, 4- CD19⁺ CD38⁺⁺ IgD⁻ plasmablasts (PB) and 5- CD19⁺ CD38⁻ IgD⁻ CD27⁺ memory B cells (MBC). **(B)** Gating strategy for CD23 expression of CXCR4^{hi} CD86^{lo} DZ GC B cells and CXCR4^{lo} CD86^{hi} LZ GC B cells in tonsils and reactive lymph node.

Supplemental Figure 2

■ CD23⁺ GC B cells
 ■ CD23⁻ GC B cells

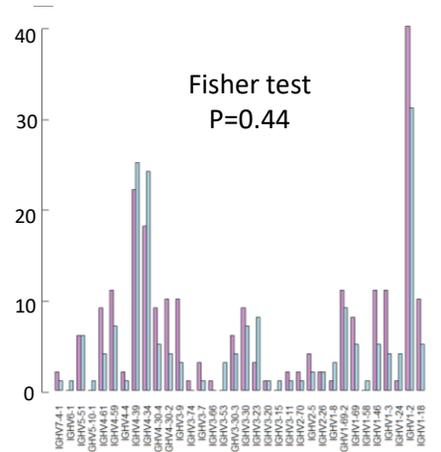
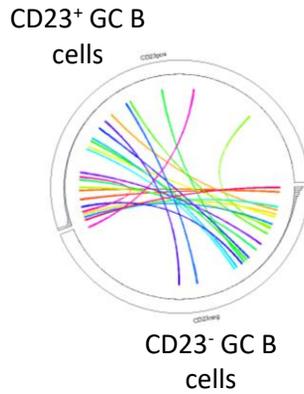
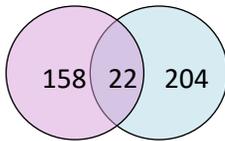
Subject # 3

IgM



Subject # 3

IgG



Supplemental figure 2. (D) RACE-PCR approach for CDR3 regions for IgM and IgG in CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells from rLN for three subjects. Venn diagrams (left) of the clusters of amino acids sequences of CDR3 regions (CDR3 AA). Circos representations (middle) of common CDR3 AA clusters with histograms of their frequency arranged by descending order. Histograms (right) of the number of CDR3 AA clusters associated to each IG VH.

Figure 3

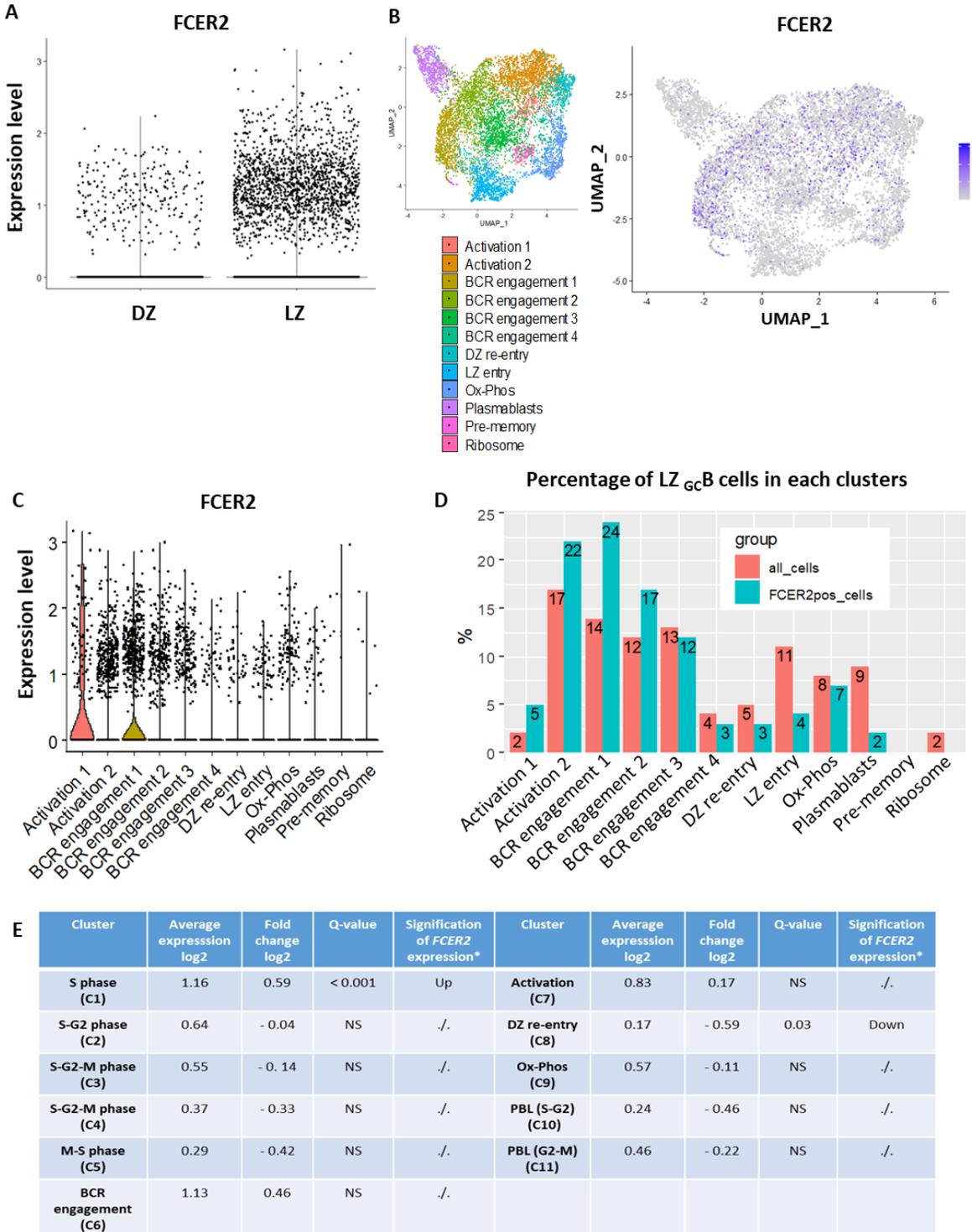
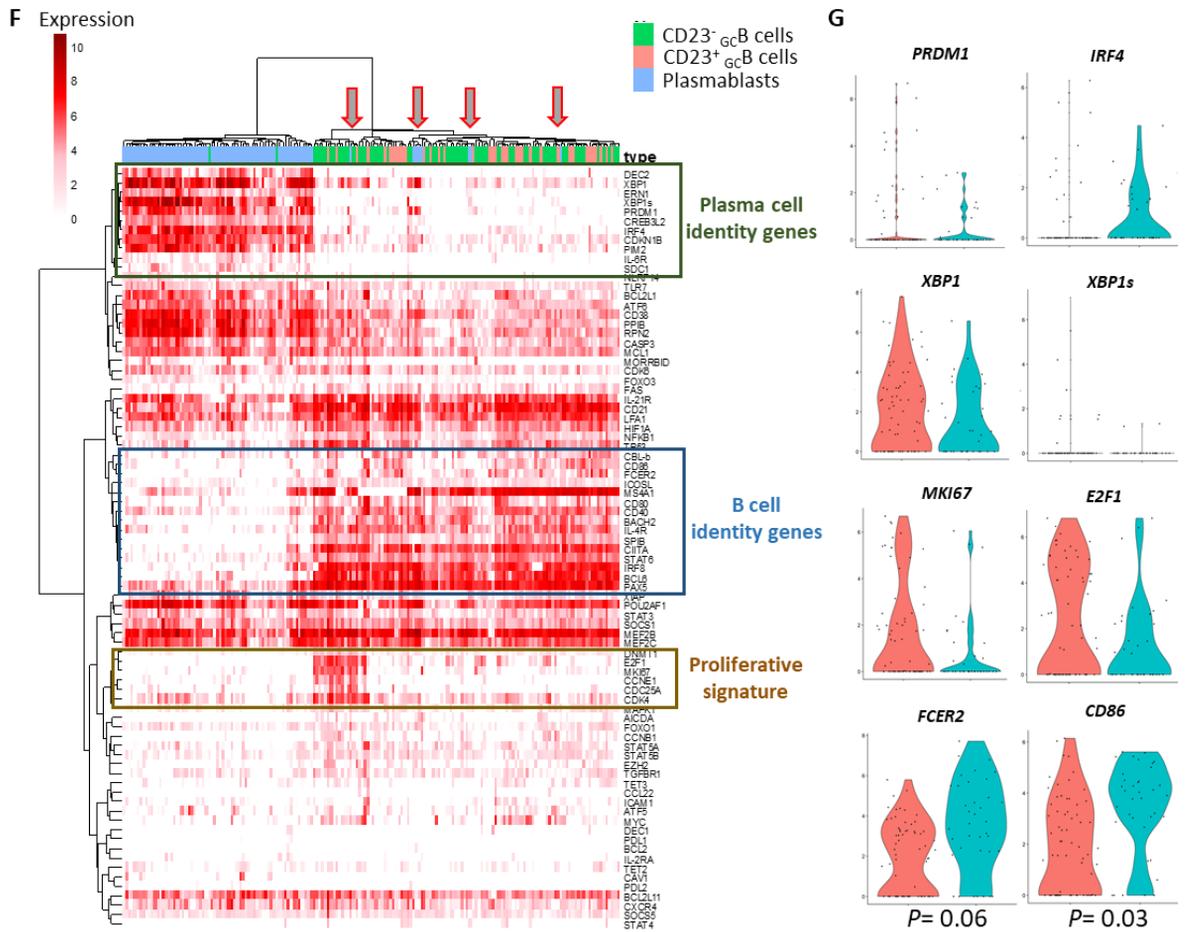


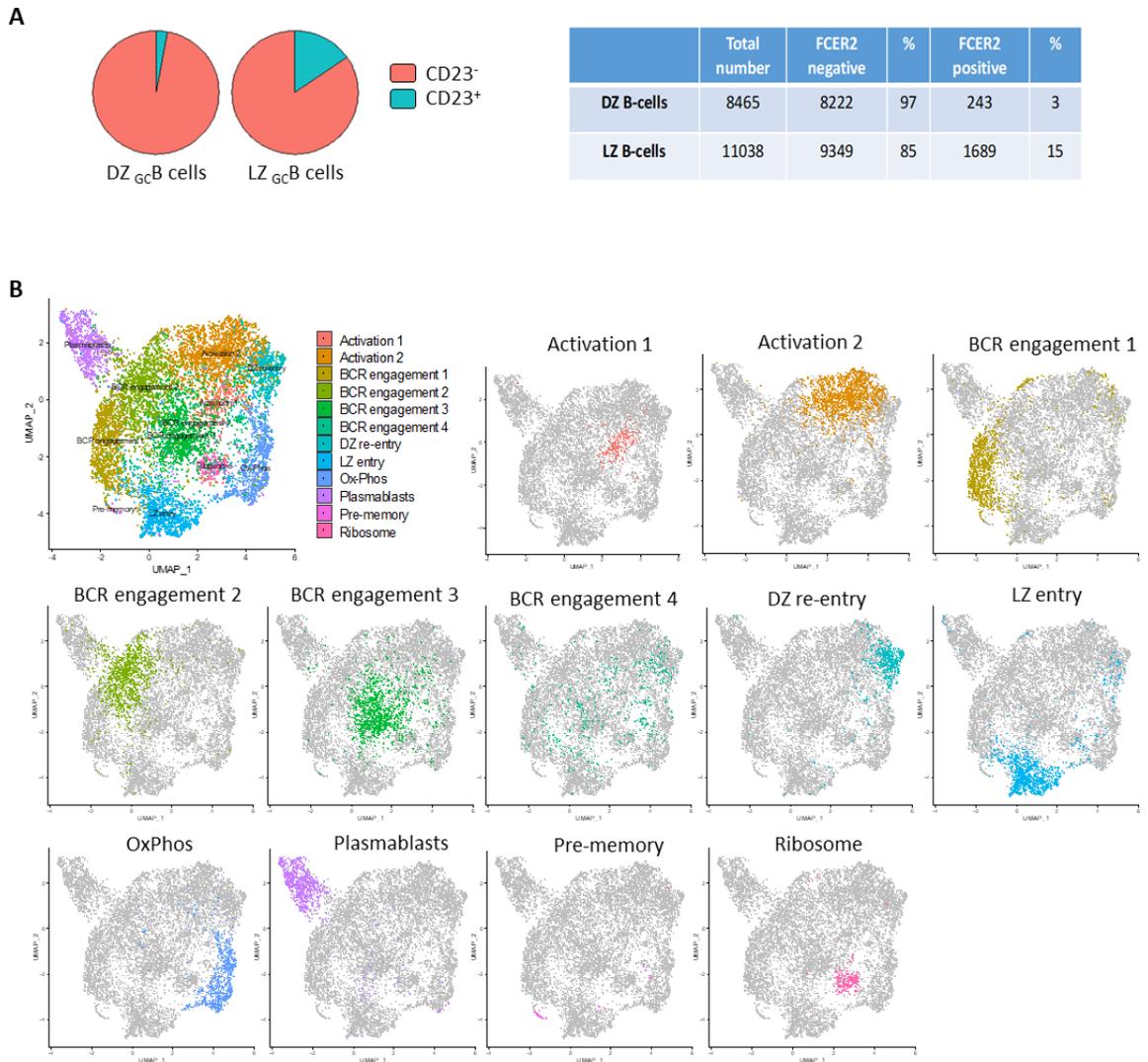
Figure 3: FCER2/CD23 expression delineates specific LZ_{GC}B cell subsets. (A-E) Single cell dataset of human tonsil derived B cells in G0-G1 phases of the cell cycle (non-proliferating), from Holmes *et al.* 2020. (A) FCER2 expression in CXCR4^{hi} CD83^{lo} DZ and CXCR4^{lo} CD83^{hi} LZ_{GC}B cells. (B) FCER2 expression in different B cells clusters defined by Holmes *et al.* in U-MAP representation. (C) Violin plots of FCER2 expression in the different B cells clusters. (D) Percentages of FCER2pos non-proliferating LZ_{GC}B cells in the different clusters (green) compared to all non-proliferating LZ_{GC}B cells (red). (E) Table of FCER2 expression in the clusters. * For cells which belong to the cluster.

Figure 3



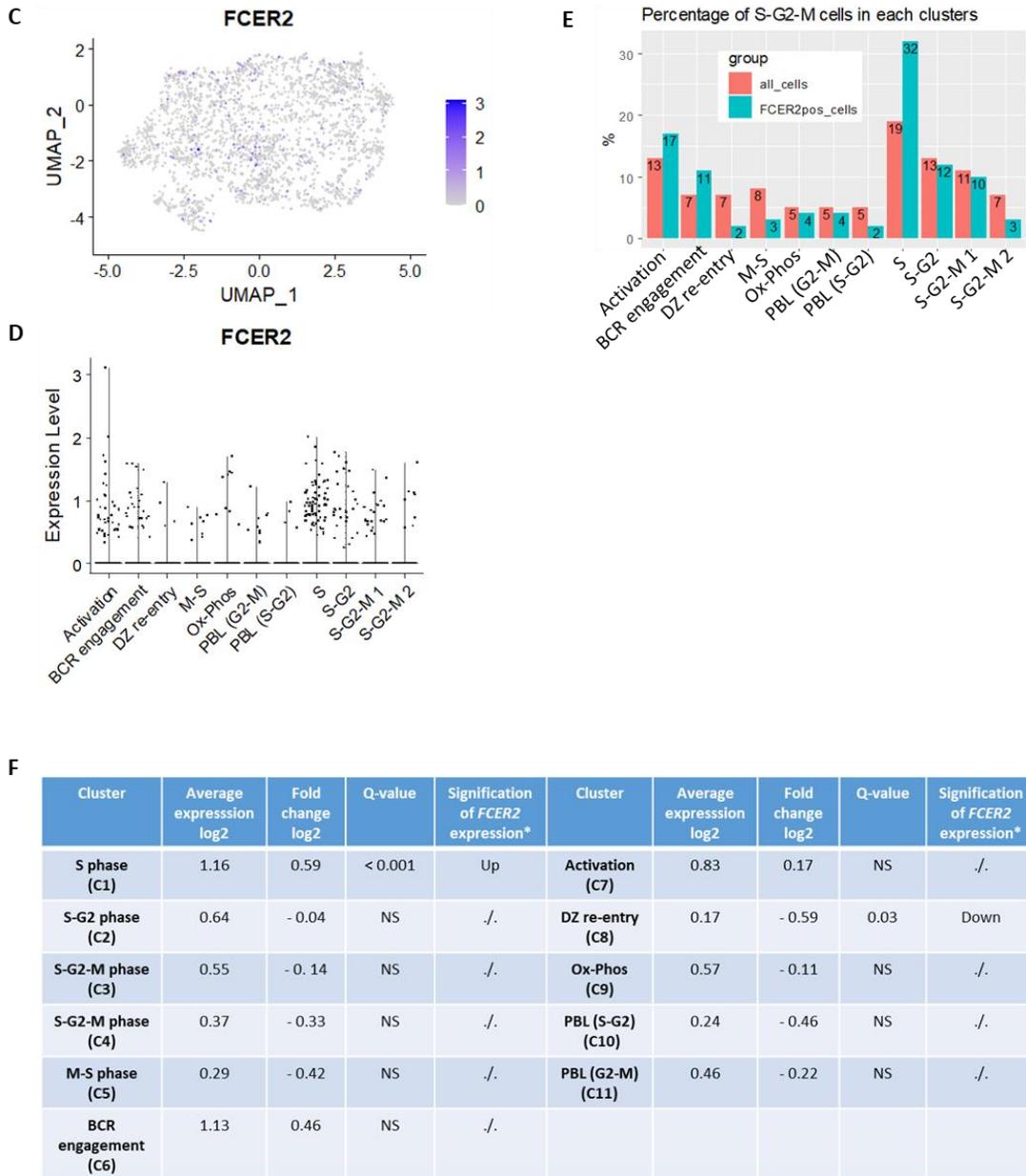
(F) Single cell qPCR approach with a panel of 89 genes selected from the RNA-seq comparison of CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GCB} cells defined as CD19⁺ IgD⁻ CD10⁺ CD38⁺ CXCR4^{lo} and plasmablasts CD19⁺ IgD⁻ CD38⁺⁺. **(G)** Violin plots of *PRDM1*, *IRF4*, *XBP1* and *XBP1s*, *MKI67*, *E2F1*, *FCER2* and *CD86* in CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GCB} cells.

Supplemental figure 3



Supplemental figure 3. Single cell dataset of human tonsil derived B cells from Holmes *et al.* 2020. **(A)** *FCER2* expression in *CXCR4*^{hi} *CD83*^{lo} DZ and *CXCR4*^{lo} *CD83*^{hi} LZ_{GCB} cells. **(B)** B cells clusters defined by Holmes *et al.* in U-MAP representation.

Supplemental figure 3



Supplemental figure 3. Single cell dataset of human tonsil derived B cells in G2-S-M phases of the cell cycle (proliferating cells), from Holmes *et al.* 2020. **(C)** *FCER2* expression in U-MAP representation. **(D)** Violin plots of *FCER2* expression in the different B cells clusters. **(E)** Percentages of *FCER2*pos proliferating LZ_{GC}B cells in the different clusters (green) compared to all proliferating LZ_{GC}B cells (red). **(F)** Table of *FCER2* expression in the clusters. * For cells which belong to the cluster.

Figure 4

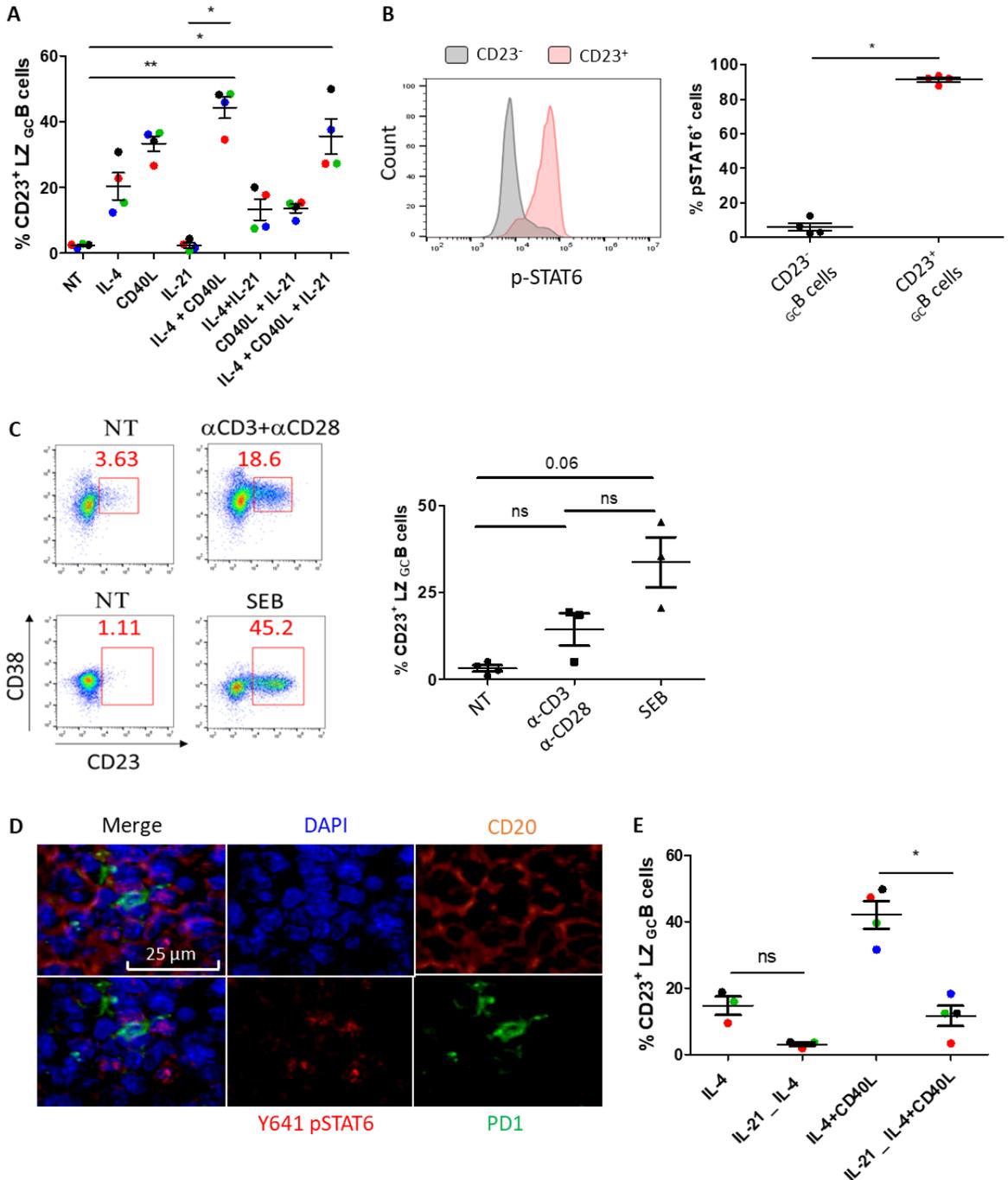
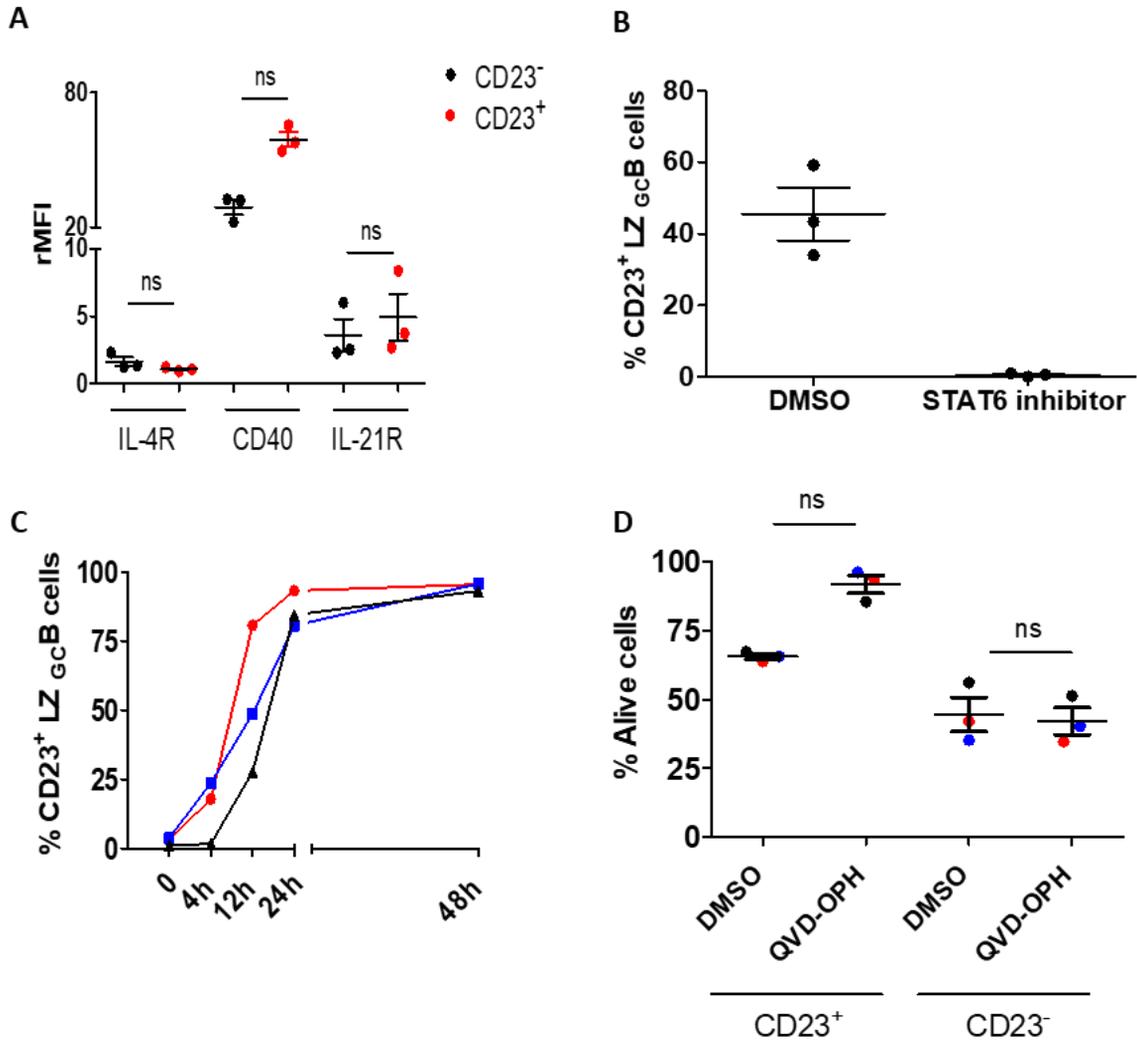


Figure 4 : Tfh-driven LZ_{GC}B cells stimulation leads to a CD23-dichotomized response. (A) Analysis by flow cytometry of the percentage of CD23⁺ LZ_{GC}B cells after 12h of culture with IL-4, CD40L, IL-21 alone or in combinations. **(B)** Flow cytometry analysis of pSTAT6 expression by CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells. **(C)** LZ_{GC}B cells and Tfh cells coculture (NT), with a-CD3/a-CD28 or SEB during 24h and analysis of CD23 expression by flow cytometry. **(D)** Immunohistostaining with DAPI (nucleus), CD20 (B cells), PD1 (Tfh cells) and pSTAT6. B:Tfh synapse in GC are highlighted by pSTAT6 expressing GC B in contact with Tfh cell. **(E)** Percentage of CD23⁺ LZ_{GC}B cells after 24h of culture with IL-4 or with a priming with IL-21 during 12h followed by 12h of IL-4 stimulation. Same analysis with CD40L added to IL-4 stimulation.

* = p value < 0.05 ; ** = p value < 0.01

Supplemental figure 4



Supplemental figure 4. (A) IL-4R, CD40 and IL-21R expression by CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells after 24h of culture with IL-4, CD40L and IL-21. (B) Percentage of CD23⁺ LZ_{GC}B cells after 24h of culture with a pSTAT6 inhibitor or DMSO in control. CD23 expression is blocked with the pSTAT6 inhibitor showing that its expression is pSTAT6-dependent. (C) CD23 expression kinetics during culture of tonsil derived LZ_{GC}B cells with IL-4, CD40L and IL-21. After 48h of culture, all cells are expressing CD23. (D) Percentage of alive cells after treatment with a pan-caspase inhibitor (QVD-OPH) or with DMSO in control. CD23⁺ LZ_{GC}B cells viability is rescued with the QVD-OPH treatment.

Figure 5

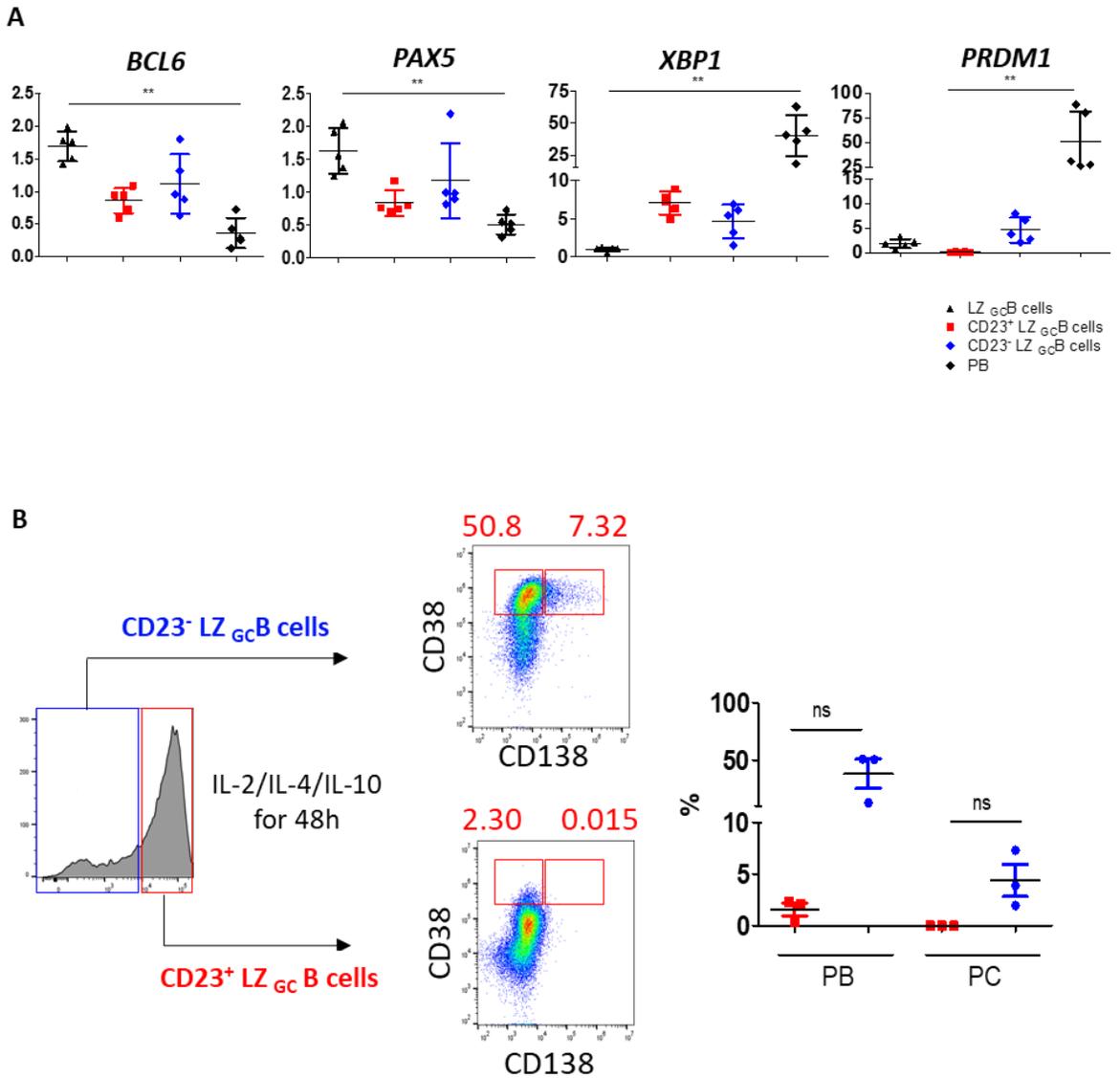


Figure 5: CD23⁻ LZ_{GC}B cells contain plasmablast precursors (A) *BCL6*, *PAX5*, *XBP1* and *PRDM1* expression by LZ_{GC}B cells, sorted CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B cells cultured with IL-4, CD40L and IL-21 12h and plasmablasts (PB). **(B)** Sorted 24 hours cultured CD23⁺ and CD23⁻ LZ_{GC}B were cultured 48h with IL-2, IL-4 and IL-10 and analysed by flow cytometry to highlight CD38⁺⁺ CD138⁻ PB and CD38⁺⁺ CD138⁺ plasma cells (PC). CD23⁻ LZ_{GC}B cells but not CD23⁺ LZ_{GC}B cells are able to differentiate in PB and PC. * = p value < 0.05 ; ** = p value < 0.01

Figure 6

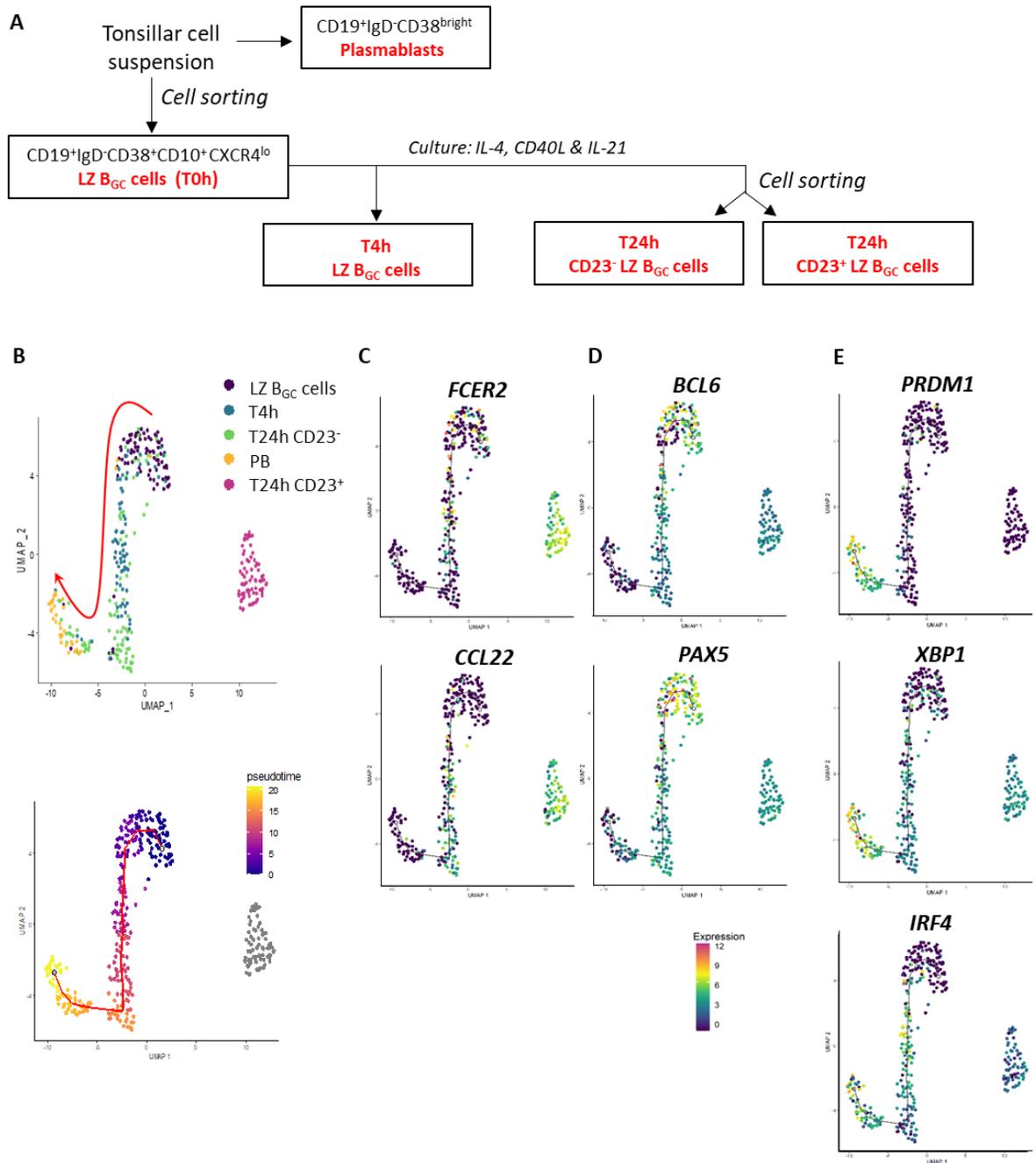


Figure 6: Cellular trajectories of human G_{C} B cells after Tfh-type stimulation. (A) Experiment design. qPCR analysis of sorted tonsillar LZ G_{C} B cells (T0h), plasmablasts, T4h, T24h CD23⁺ and T24h CD23⁻ cultured LZ G_{C} B cells with IL-4, CD40L and IL-21. **(B)** Trajectories of the different subsets of B cells. Ranking of cells in different clusters based on the pseudotime. **(C)** Expression of IL-4 pathway genes (*FCER2* and *CCL22*), **(D)** B cell identity genes (*BCL6*, *PAX5*) and plasma cell identity genes (*PRDM1*, *XBP1*, *IRF4*) in the different clusters.

Figure 7

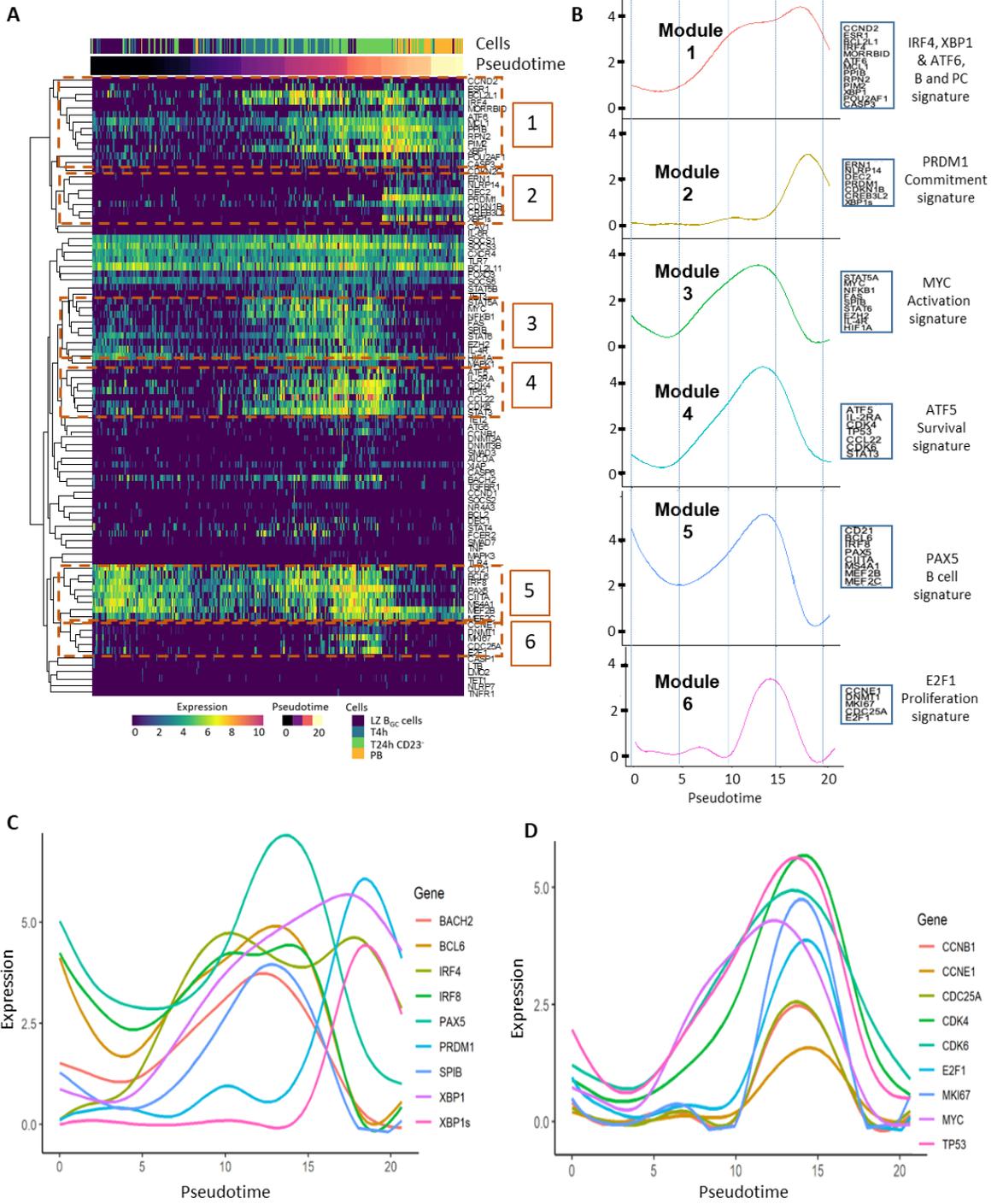


Figure 7

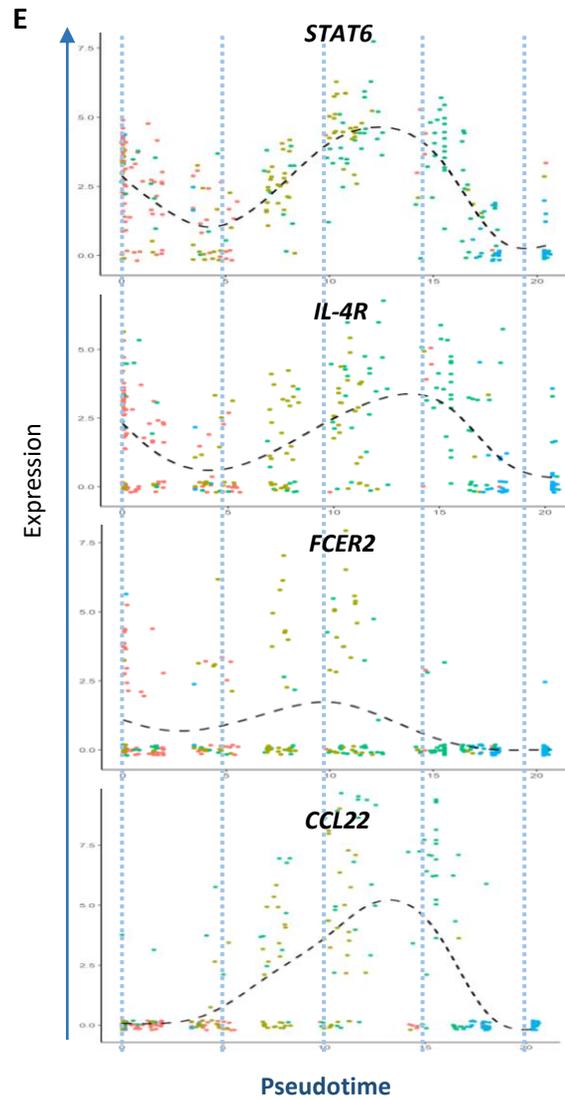


Figure 7: Insights in gene expression kinetics throughout the differentiation trajectory. (A) Unsupervised clustering analysis of LZ_{GC}B cells (T0h), plasmablasts, T4h, T24h CD23⁺ and T24h CD23⁻ cultured LZ_{GC}B cells. We identified 6 Modules of genes. **(B)** Expression of the different Module in pseudotime. **(C)** Expression of genes implicated in B cell differentiation to plasma cell or **(D)** in cell cycle or **(E)** in IL-4 pathway in the pseudotime.

Figure 8

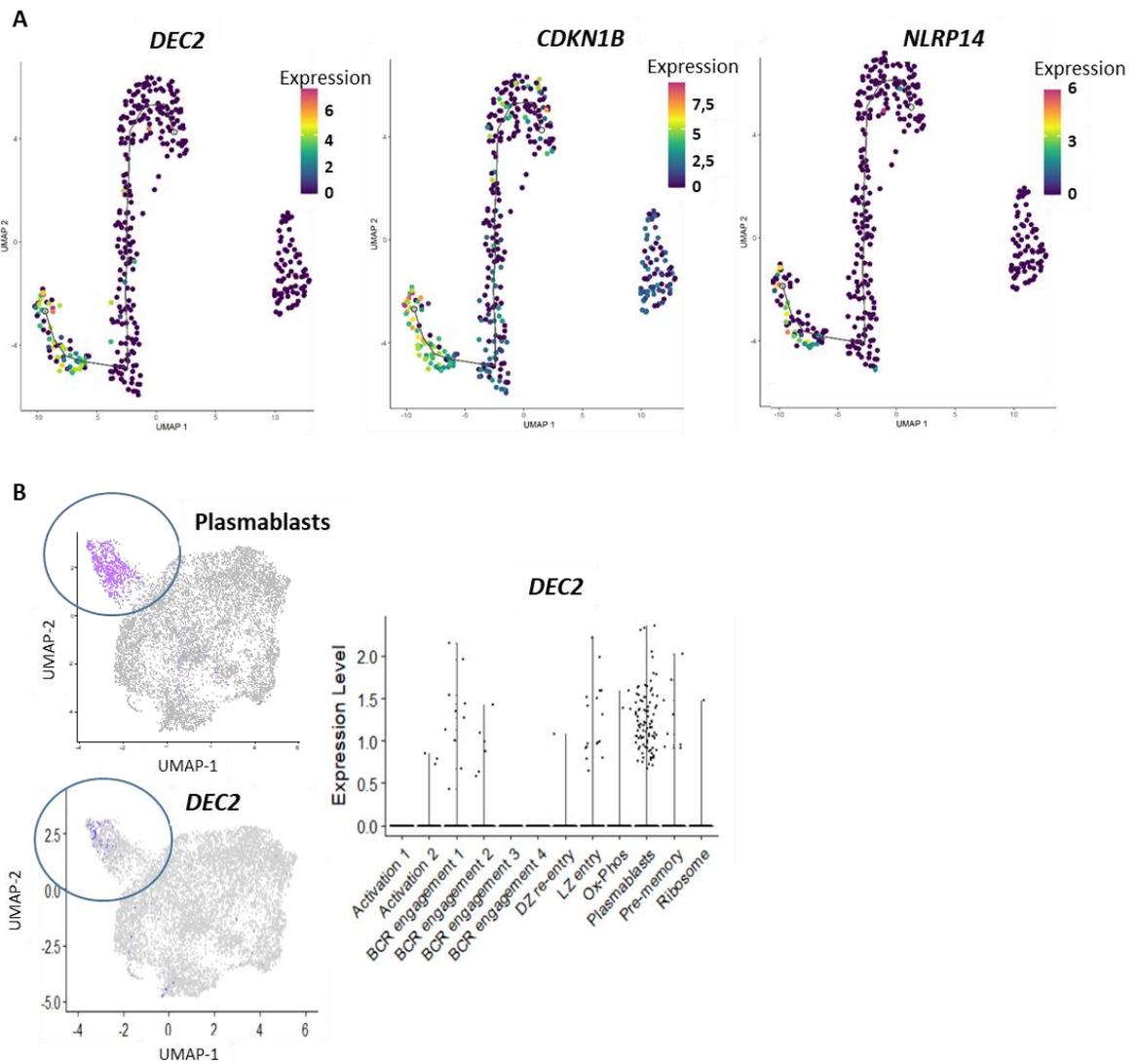


Figure 8: The minimal commitment signature encodes, besides PC identity elements, factors that inhibit cell proliferation. (A) Expression of *DEC2*, *CDKN1B* and *NLRP14* in pseudotime. (B) Expression of *DEC2* in proliferating LZ_{GC}B cells clusters identified by Holmes et al. 2020.

PROJET 2 :

Quelle place pour le facteur de transcription DEC2 dans la différenciation plasmocytaire ?

Introduction

Le modèle de différenciation *in vitro* développé par notre groupe a permis de mettre en évidence que lors de leur différenciation en PB, les NBC perdent peu à peu la capacité de réponse à l'IL-4, par perte progressive de l'expression du CD23 (Caron G *et al.*, Cell Rep, 2015 ; Pignarre A *et al.*, Blood, 2020). Le séquençage du transcriptome des populations CD23pos et CD23neg obtenues dans ce modèle a révélé des cibles intéressantes que nous avons choisi d'analyser dans des lymphocytes B issus d'organes lymphoïdes secondaires lors de leur dernière étape de maturation, c'est-à-dire lors de la transition des CC en PB. Ainsi, nous avons validé l'extinction de la voie STAT6/CD23 dans les CC précurseurs de PB provenant d'amygdales et mis en évidence l'expression d'une signature particulière par ces cellules. Parmi ces gènes, on trouve des gènes de l'identité plasmocytaire : *PRDM1* et *XBP1s*, des gènes impliqués dans la réponse aux protéines mal conformées (Unfolded Protein Response UPR) : *ERN1* (qui code pour IRE1) et *CREB3L2*, et un gène jusqu'alors jamais décrit dans la différenciation lymphocytaire B : *DEC2*.

Chez l'Homme, le facteur de transcription DEC2 a principalement été décrit pour son rôle dans le rythme circadien. De nombreuses études, souvent contradictoires, portent sur son implication dans la progression tumorale, notamment au travers d'un effet au niveau du cycle cellulaire (Wang C *et al.*, Canc Manag Res, 2019 ; Bragado P *et al.*, Nat Cell Biol, 2013 ; Sun Y *et al.*, Mol Cell Biochem, 2019 ; Wu Y S *et al.*, Int J Mol Med, 2015 ; Falvella FS *et al.*, Oncogene, 2008), dans la réponse à l'hypoxie (Hu T *et al.*, J Exp Clin Cancer Res, 2015 ; Montagner M *et al.*, Nature, 2012 ; Bigot P *et al.*, Nat Commun, 2016) ou dans la migration et la métastase cellulaire (Li P *et al.*, Am J Cancer Res, 2016 ; Montagner M *et al.*, Nature, 2012 ; Liao Y *et al.*, BMC Cancer, 2014). Enfin, dans les lymphocytes B, *DEC2* est décrit comme exclusivement exprimé au stade PC (De Vos J *et al.*, Immunol Rev, 2006) mais il est également exprimé dans les MBC. Chez la souris, BHLHE41/DEC2 participe à la différenciation des lymphocytes T en facilitant la polarisation Th2 par le biais de l'IL-2 et de STAT6. Dans les lymphocytes B, BHLHE41/DEC2 promeut le développement des lymphocytes B1 spléniques notamment en bloquant la prolifération cellulaire (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2017).

De plus, il est induit dans les lymphocytes B folliculaires lorsqu'ils sont cultivés avec du LPS, ou une combinaison d'IL-4, d'anti-CD40 et/ou d'anti-IgM, mais il n'est pas impliqué dans le développement de ces lymphocytes. Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si DEC2 avait un rôle dans la transition CC à PB chez l'Homme et s'il participait plus spécifiquement à une fonction dans le PC.

Matériels et Méthodes

Purification des lymphocytes B primaires

Les amygdales ont été obtenues lors d'amygdalectomies réalisées en routine à la clinique La Sagesse (Rennes, France). Les PB d'amygdales ont été purifiés par sélection négative avec le kit MojoSort Human Pan B cell Isolation de Biolegend en suivant les instructions du fournisseur, sur l'AutoMACS avec le programme depletes-sensitive (Miltenyi Biotec). Un anticorps anti-IgD-Biotine a été ajouté en même temps que le cocktail d'anticorps afin d'éliminer les NBC (#555777, BD Biosciences). Les PB CD19⁺ (#562440, BD Biosciences), IgD⁻ (#555778, BD Biosciences) CD38⁺⁺ (#303510, Biolegend) ont ensuite été triés avec le trieur de cellules FACS Aria (BD Biosciences).

La purification des PB générés *in vitro* a été réalisée comme décrit précédemment (Le Gallou S *et al.*, J Immunol, 2012 ; Caron G *et al.*, Cell Rep, 2015). Les lymphocytes B totaux ont été purifiés à partir de sang de donneurs sains provenant de l'Etablissement Français du Sang (Rennes, France). Après séparation sur gradient de Ficoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), les lymphocytes B totaux ont été purifiés à l'aide du kit B Cell Isolation II Human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur. La pureté des lymphocytes B était supérieure à 95 %.

Cultures cellulaires et analyses par cytométrie de flux

Toutes les cellules ont été cultivées dans un milieu complet constitué de RPMI1640 (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FCS, Biowest) et des antibiotiques (Invitrogen).

Les PB d'amygdales ont été cultivés à une concentration de 5×10^5 cellules/ml pendant deux jours avec 50 U/ml d'IL-2 (Proleukin, Novartis), 330 ng/ml d'IL-6 (Peprotech), 12,5 ng/ml d'IL-10 (R&D Systems) et 400 U/ml d'IFN Alpha 2 (PBL assay science).

Les lymphocytes B totaux de sang ont été marqués avec 1 μ M de Violet Prolifération Dye 450 (VPD450) (BD Biosciences) dans du PBS à 37°C pendant 15 minutes puis lavés en milieu

complet. Les cellules purifiées ont été cultivées à une concentration de $7,5 \times 10^5$ cellules/ml et stimulées pendant quatre jours avec la Stim 1 composée de 2,6 µg/ml de fragments de chèvre F(ab')₂ anti-IgM, IgA et IgE humains (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 100 ng/ml de CD40L soluble (NCI), 1 mg/ml d'oligodésoxynucléotide CpG 2006 (Miltenyi Biotec) et 50 U/ml d'IL-2. Les lymphocytes B ont ensuite été lavés dans du PBS et cultivés à une concentration de 5×10^5 cellules/ml avec la Stim 2 composée de 50 U/ml d'IL-2, 12,5 ng/ml d'IL-10 et 5 ng/ml d'IL-4 (R&D Systems) pendant deux jours. Le sixième jour, les PB obtenus *in vitro* (aussi appelés P1) ont été marqués avec du CD38-APC (#303510, Biolegend) et le kit CaspGLOW (eBioscience) selon les instructions fournies par le fabricant, pour éliminer les cellules engagées dans l'apoptose présentant une caspase-3 activée. Ces PB ont ensuite été cultivés comme les PB d'amygdales.

Pour les analyses de cytométrie de flux, les données ont été acquises sur un cytomètre CytoFLEX (Beckman Coulter) et analysées avec le logiciel FlowJo (BD Biosciences). Pour l'analyse de l'expression du CD138, les cellules de myélome multiple U266 ont été marquées avec l'anticorps CD138-PE (#A54190, Beckman Coulter).

Analyse du cycle cellulaire

Pour analyser le cycle cellulaire, les cellules ont été marquées avec le kit Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay (Thermo Scientific) selon les instructions données par le fournisseur. Après 24 heures de culture, les cellules U266 ont été marquées avec du DAPI, et le cycle cellulaire a été analysé à l'aide d'un CytoFLEX (Beckman Coulter) et du logiciel FlowJo (BD Biosciences).

Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Les ARN ont été extraits avec le kit NuclioSpin RNA XS Plus (Macherey-Nagel) pour les PB primaires et avec le kit NuclioSpin RNA Plus (Macherey-Nagel) pour les lignées cellulaires, en suivant les instructions fournies par le fabricant. Les ARN ont ensuite été rétro-transcrits en ADNc avec le kit utilisant la Superscript II (Invitrogen). Les RT-qPCR utilisant la stratégie SYBR-Green sur les ADNc ont été réalisées avec un couple d'amorces sélectionné pour cibler un gène

spécifique à partir du site Primer3Plus, puis synthétisé par la société Eurogentec. Une PCR *in silico* sur le site Genome Browser a permis de vérifier la spécificité des amorces. Les qPCR ont été réalisées sur le Step One Plus Real-time PCR System (Applied BioSystems). L'expression génique a été quantifiée par la méthode $2^{-\Delta Ct}$, en utilisant le gène *ABL1* comme contrôle endogène.

Des qPCR multiplexées ont été réalisées avec des sondes TaqMan et le TaqMan Gene Expression Master Mix dans une plaque IFC 48.48 Dynamic Array en utilisant le système Fluidigm BioMark MX. Les expressions géniques ont été converties en $2^{-\Delta Ct}$, en utilisant le gène *ABL1* comme contrôle endogène. La liste des sondes TaqMan utilisées est disponible dans le **Tableau 1**.

Gène cible	Référence	Gène cible	Référence
<i>AICDA</i>	HS 00221068_m1	<i>IL-21R</i>	HS 00222310_m1
<i>BACH2</i>	HS 00222364_m1	<i>IRF4</i>	HS 00180031_m1
<i>BCL6</i>	HS 00153368_m1	<i>IRF8</i>	HS 00175238_m1
<i>CAV1</i>	HS 00971716_m1	<i>NLRP14</i>	HS 00698226_m1
<i>CCL22</i>	HS 00171080_m1	<i>PAX5</i>	HS 00277134_m1
<i>CREB3L2</i>	HS 01592193_m1	<i>PIM2</i>	HS 00179139_m1
<i>DEC1</i>	HS 00186419_m1	<i>PRDM1</i>	HS 00153357_m1
<i>DEC2</i>	HS 00229146_m1	<i>SPIB</i>	HS 00162150_m1
<i>ERN1</i>	HS 00176385_m1	<i>STAT6</i>	HS 00598618_m1
<i>EZH2</i>	HS 00172783_m1	<i>XBP1</i>	HS 02856596_m1
<i>FCER2</i>	HS 00233627_m1	<i>XBP1s</i>	HS 03929085_g1
<i>HIF1α</i>	HS 00153153_m1		

Tableau 1 : Liste des sondes TaqMan utilisées

Inhibition d'expression de DEC2

Pour le siRNA, les PB d'amygdales, PB obtenus *in vitro* et les cellules U266 ont été transfectées avec le kit Amaxa Cell Line Nucleofector V (VCA-1003, Lonza). Pour cela, les cellules ont été diluées dans le tampon de transfection avec 20 pmoles de siRNA pour 100 000 cellules et

électroporées avec le programme O-17 de l'Amaza Nucleofector II (Lonza). Le siRNA contrôle (5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUU-3') et le siRNA ciblant *DEC2* (5'-CGAGACGACACCAAGGAUA-3') ont été obtenus à partir de Montagner M *et al.*, Nature, 2012. Les cellules ont été cultivées 24 ou 48 heures avec les siRNA.

Pour l'oligonucléotide anti-sens (ASO), la séquence ciblant *DEC2* (5'-TCGGGAAGCTTACACTTACCTTGGTG-3') a été élaborée en collaboration avec l'UMR 1262 CRIBL à Limoges (France) puis commandée sur le site GeneTools. Les cellules ont été cultivées 24 ou 48 heures avec 2µM d'ASO.

Vérification du saut d'exon

Après extraction des ARN et transcription inverse, les ADNc ont été amplifiés par PCR en utilisant la Phire Hot Start DNA Polymerase II (Thermo Scientific) avec des sondes (sens : 5'-CAGTTGAACATGGACGAAGGA-3' et anti-sens : 5'-TCTGATGCTGTTGCTCGGTT-3') mises à disposition par l'UMR 1262 CRIBL à Limoges (France). Le programme utilisé comprenait quatre phases : 1) 98°C pendant 5 minutes, 2) 40 cycles de 98°C pendant 5 secondes, 62°C pendant 5 secondes et 72°C pendant 20 secondes, 3) 72°C pendant 1 minute et 4) 12°C jusqu'à récupération des échantillons. Les produits de PCR ont été mélangés avec du tampon de charge (#R0611, Thermo Scientific) puis ont migrés sur un gel d'agarose 2% avec du SYBR Safe (Invitrogen) dans du tampon d'électrophorèse TAE (Thermo Scientific). Les gels ont été révélés dans le système d'imagerie G:BOX Chemi (Syngene).

Immunoblotting

Les protéines ont été extraites avec le tampon de lyse RIPA (Pierce) avec un cocktail contenant des inhibiteurs de protéases (#04693116001, Roche). Pour isoler les extraits nucléaires et cytoplasmiques, le kit d'extraction nucléaire (#ab113474, Abcam) a été utilisé en suivant les instructions fournies par le fabricant. La concentration protéique a été déterminée en utilisant la méthode de Bradford (Biorad). Les protéines ont ensuite été séparées par migration sur un gel NuPAGE 4-12% Bis Tris (Thermo Scientific) et transférées sur des membranes de nitrocellulose *via* le dispositif de transfert iBlot 2 (Invitrogen). Les membranes ont été saturées

avec du TBS 0,1% Tween (Sigma) contenant 5 % de sérum de veau fœtal (Sigma) pendant une heure à température ambiante, puis incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps ciblant DEC2 (#E-4:sc-373763, SantaCruz), l'anti- β -actine (#AC-15, Sigma) ou l'anti-histone H3 (#39763, Active Motif). Les membranes ont été révélées après incubation une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de Raifort (ou HRP) anti-lapin (Biolegend) et anti-souris (SantaCruz), et avec le kit Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) dans le système d'imagerie G:BOX Chemi (Syngene).

Séquençage de l'ARN (RNA-seq)

Après la culture, les cellules mortes ont été éliminées à l'aide de billes magnétiques en utilisant le kit Dead Cell Removal (Miltenyi Biotec) en suivant les instructions du fabricant. Après extraction des ARN et transcription inverse, comme indiquées ci-dessus, la fabrication des bibliothèques (librairies) d'ARN a été réalisée en vue d'un séquençage haut-débit avec le kit QIAseq Stranded Total RNA Lib (QIAGEN) en tandem avec le kit QIAseq FastSelect™ -rRNA HMR (QIAGEN), qui supprime les ARN ribosomiaux. Ce travail mis en place au laboratoire en collaboration avec la société Qiagen a conduit à la publication d'une note d'application (Desmots F, Santamaria K *et al.*, 2020, **Annexe**). Une étape préalable de fragmentation des échantillons a été réalisée et le nombre de cycles pour l'étape d'amplification a été établi en fonction de la concentration d'ADN utilisée pour la transcription inverse des échantillons d'ARN, soit 11 cycles pour 400ng. Les échantillons ont été séquencés en haut débit sur le séquenceur HiSeq4000 (Illumina-Société Integragen) en lecture "paired-end" de deux fois 75 nucléotides par échantillon. Pour l'analyse des données RNA-seq, un pipeline créé par l'équipe informatique de l'unité a été utilisé. Il intègre notamment l'outil STAR (Spliced Transcripts Alignment) pour l'alignement sur le génome de référence Hg38 et l'outil featureCounts pour estimer le nombre de lectures (reads) attribuées au génome. Le package RSeQC a été utilisé pour estimer la qualité et la distribution des reads sur le génome. DESeq2 a été utilisé pour estimer l'expression différentielle des gènes entre les échantillons. Les conditions ont été fixées pour extraire uniquement les gènes avec un changement d'expression (fold change) de 1,5 fois et avec une *P*-value de 0,05. En appliquant cette limite, nous avons extrait 1159 gènes différentiellement exprimés, qui ont été analysés à l'aide de packages R tels que d3heatmap, heatmaply, EMA et ggplot2. Pour les tracés de sashimi, l'interface IGV a été utilisée.

Résultats

1) Chez l'humain, DEC2 est exprimé par une proportion de B du GC, PB/PC et MBC

Pour mieux caractériser la phase terminale de la différenciation des lymphocytes B en PB, nous avons cultivé des CC d'amygdales (CD19⁺ CD38⁺ CD10⁺ IgD⁻ CXCR4^{faible}) avec un cocktail de cytokines (IL-4, IL-21 et CD40L) mimant l'interaction avec les lymphocytes Tfh, et décrit précédemment. Dans ces conditions, les CC répondent de manière hétérogène avec une population qui exprime le CD23 et une fraction variable de CC qui reste négative pour ce marqueur. Nous avons montré précédemment que cette dernière est celle qui contient les précurseurs des PB. Dans ce contexte, nous nous sommes demandés comment les gènes mis en évidence dans la population CD23neg issue du modèle de différenciation *in vitro* (Caron G *et al.*, Cell Rep, 2015) évoluaient dans les CC engagés dans la différenciation en PB. Ainsi, nous avons réalisé des qPCR sur des CB, CC et PB fraîchement isolés d'amygdales, des CC cultivés 12h et triés selon l'expression du CD23 (CD23pos_12h et CD23neg_12h) et des PC de moelle osseuse (**Figure 1A**), mais aussi des qPCR à l'échelle de la cellule-unique de CC, de CC cultivés 4 heures (CC_4h), de CC cultivés 24 heures pour des cellules qui demeurent CD23 négatives (CD23neg_24h) et de PB (**Figure 1B**). Nous avons ainsi mis en évidence que *DEC2* est spécifiquement exprimé dans les PB et que son expression est induite tardivement dans certains CC CD23neg (CD23neg_24h), précurseurs de PB.

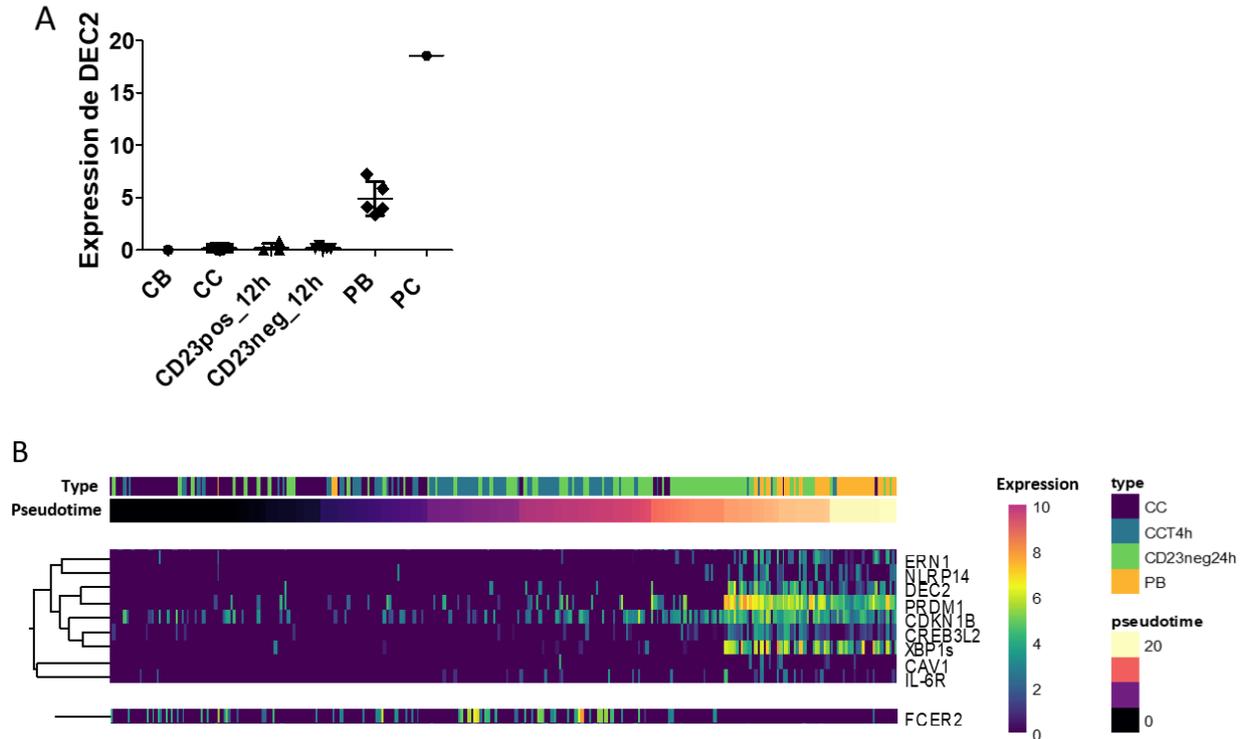


Figure 1 : DEC2 est exprimé par les PB et par certains de leurs précurseurs CD23neg. **A.** Expression de DEC2 dans les centroblastes (CB), centrocytes (CC), CC cultivés avec de l'IL-4, du CD40L et de l'IL21 pendant 12h et exprimant le CD23 (CD23pos_12h) ou ne l'exprimant pas (CD23neg_12h), les plasmablastes (PB) d'amygdales et les plasmocytes (PC) de moelle osseuse, déterminée par RT-qPCR. Le $2^{-\Delta Ct}$ a été utilisé pour calculer l'expression de l'ARNm de DEC2 en utilisant ABL1 comme gène de référence . **B.** Expression de la signature plasmablastique comprenant ERN1, NLRP14, DEC2, PRDM1, CDKN1B, CREB3L2, XBP1s, CAV1 et IL-6R, au niveau cellule unique et de FCER2 dans les CC, les CC cultivés 4h (CC_4h), les CC CD23neg cultivés 24h (CD23neg_24h) et les PB d'amygdales.

Nous avons également analysé *in silico* les données de transcriptome obtenues au niveau cellule unique pour des lymphocytes B d'amygdales et de rates humaines obtenues par le groupe du CIML de Marseille (Milpied P *et al.*, Nat Immunol, 2018). Cette analyse montre que DEC2 est exprimé dans quelques rares B du GC (CD20⁺ IgD⁻ CD38⁺ CD10⁺) et qu'il est principalement exprimé dans une sous-population de lymphocytes B CD20⁺ IgD⁻ non GC (BCL6⁻) considérée comme étant une population de MBC. (Figure 2).

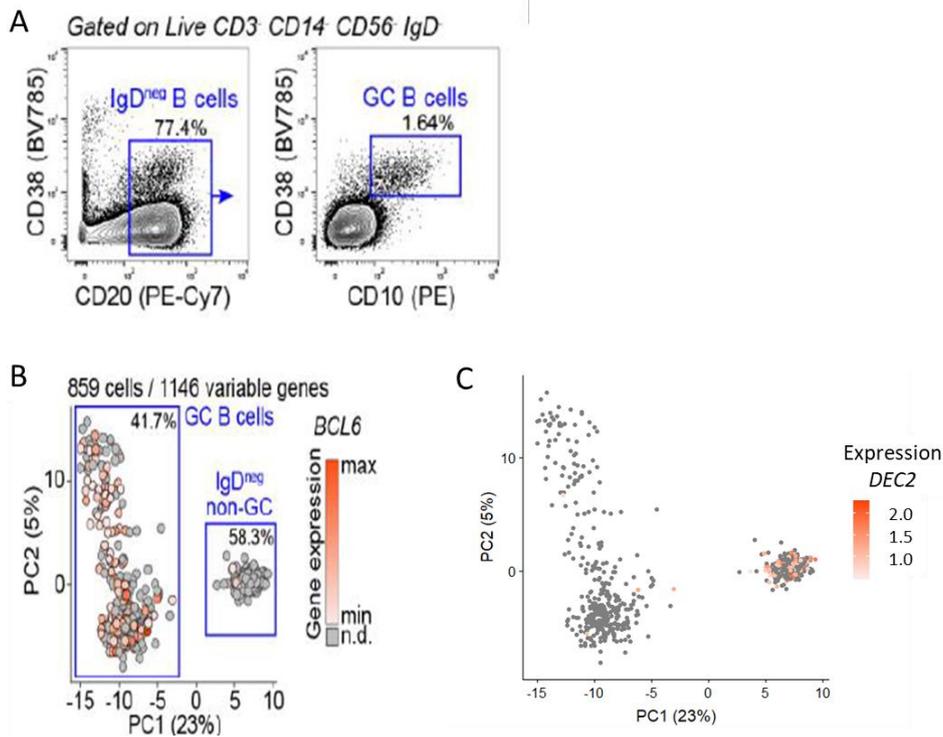


Figure 2 : Chez l'humain, *DEC2* est principalement exprimé dans les lymphocytes B non GC et dans quelques B du GC_ Analyse in silico. **A.** Stratégie de sélection des lymphocytes B du GC. Les B IgD^- ont été sélectionnés sur la base de l'expression du CD20 et les B du GC ont été sélectionnés sur la base de l'expression du CD20, du CD38 et du CD10. **B.** Analyse en composante principale qui valide la stratégie de sélection des lymphocytes B avec l'expression de *BCL6* spécifiquement dans les B du GC. **C.** Expression de *DEC2* dans les B du GC et les IgD^- non GC. Adapté des données obtenues en technique 10X Genomics de Milpied P et al., Nat Immunol, 2018.

Nous avons également analysé l'expression de *DEC2* dans les B du GC, MBC et PB/PC d'amygdales humaines dans d'autres données issues des travaux de la même équipe (**Figure 3**) (Attaf N et al., Front Immunol, 2020). Ici, les données ont été obtenues par séquençage de l'ARN au niveau cellule-unique, basé sur les extrémités 5' et sur le tri cellulaire (FACS-based-5'-end scRNAseq). Ainsi, *DEC2* semble peu exprimé, comme nous l'avons trouvé dans nos données, et il est exprimé dans quelques MBC et PB/PC.

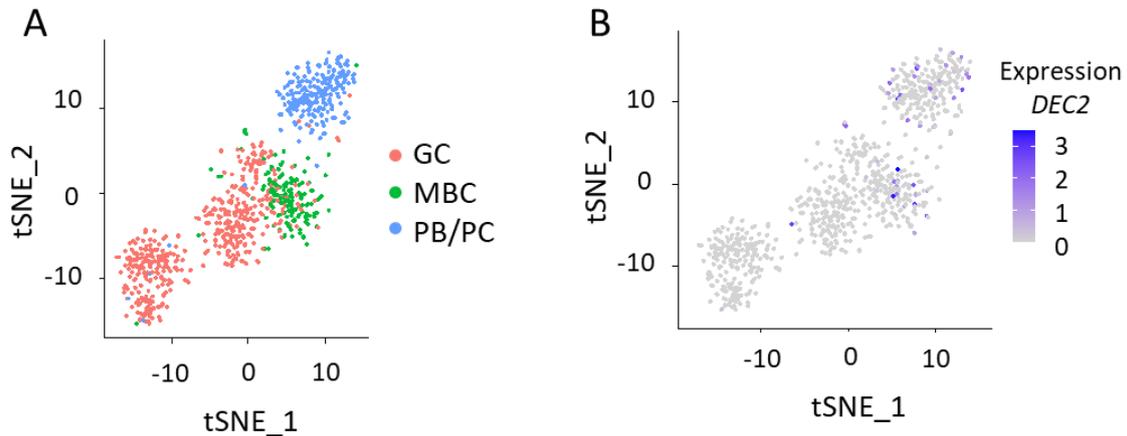


Figure 3: Expression de DEC2 dans les lymphocytes B du centre germinatif, mémoires et plasmablastes/plasmocytes humains. _ Analyse *in silico* A. tSNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) des lymphocytes B d'amygdale permettant de différencier les 3 populations : B du centre germinatif (GC), B mémoires (MBC) et plasmablastes/plasmocytes (PB/PC). B. L'expression de DEC2 est faiblement détectée et est mise en évidence dans quelques MBC et PB/PC. Adapté des données obtenues en technique FACS-based- 5'-end scRNAseq de Attaf N et al., 2020 Front Immunol.

Ces résultats invitent donc à s'interroger sur le rôle fonctionnel de DEC2 dans les lymphocytes B, et particulièrement dans les cellules totalement différenciées : les PB/PC.

2) Mise en place des outils techniques

a. Choix des cellules et système de culture des PB primaires d'amygdales et des PB obtenus par différenciation *in vitro*

Pour étudier le rôle de DEC2 dans la différenciation des PB humains, nous souhaitons utiliser des PB provenant d'amygdales humaines. Malheureusement, cela n'a été possible que dans de rares cas, puisque ces cellules sont difficiles à maintenir en vie lors de la culture et leur nombre est trop faible pour permettre des analyses fonctionnelles. Nous avons donc choisi d'utiliser des PB obtenus *in vitro* par le biais du modèle de différenciation des B totaux de sang développé dans l'équipe (Le Gallou S et al., J Immunol, 2012) et des lignées cellulaires

de myélome multiple (versant tumoral dérivant des PC) exprimant *DEC2* comme la U266 et la RPMI8226 (**Figure 4**).

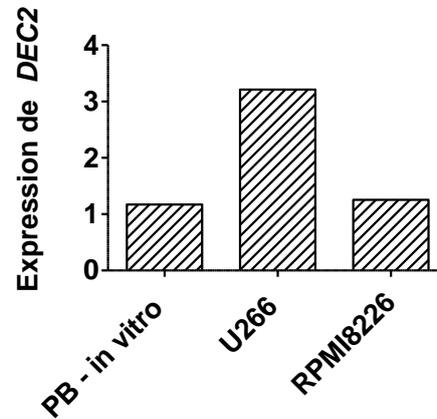


Figure 4 : Expression de *DEC2* dans les PB obtenus *in vitro* et dans les lignées de myélome multiple U266 et RPMI8226. L'expression de *DEC2* a été déterminée par RT qPCR en utilisant le $2^{-\Delta Ct}$ et *ABL1* comme gène de référence.

Puisque *DEC2* est exprimé à partir du stade PB, nous avons développé un cocktail de cytokines pour cultiver les PB primaires issus d'amygdales et les PB obtenus *in vitro* (VPD450^{faible} CD38^{fort}) deux jours supplémentaires. Nous avons choisi de conserver l'IL-2 et l'IL-10 de la Stim 2 et d'enlever l'IL-4 puisque les PB n'y répondent plus. Nous avons en plus ajouter l'IL-6 qui favorise la survie des PC (Jourdan M *et al.*, Leukemia, 2014) et l'IFN- α qui intervient dans la production des PC à courte durée de vie (Mathian A *et al.*, Eur J Immunol, 2011). Ainsi, les PB ont été cultivés avec de l'IL-2, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IFN- α pendant 2 jours (**Figure 5**).

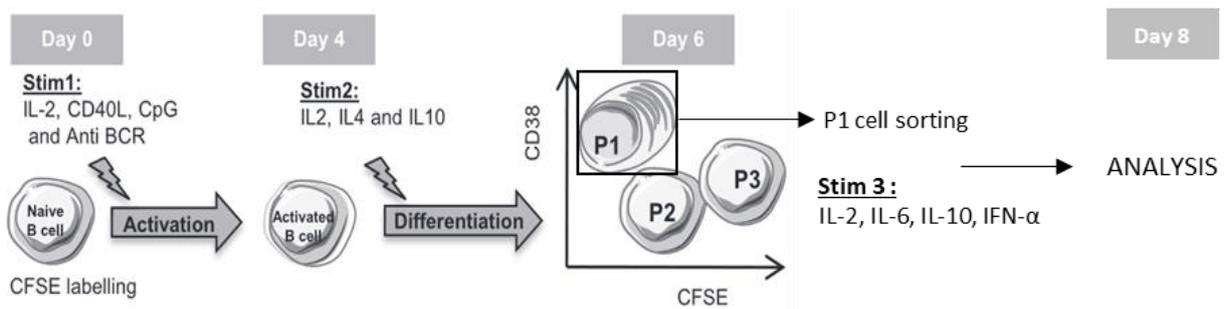


Figure 5 : Modèle de culture cellulaire des PB obtenus *in vitro* et utilisés pour étudier le rôle de DEC2. Les lymphocytes B naïfs et B mémoires de sang ont été cultivés tel que décrit précédemment (Le Gallou et al., *J Immunol*, 2012). Pendant 4 jours, les lymphocytes B ont été cultivés avec de l'IL-2, du CD40L, des CpG et de l'anti-BCR (Stim 1) pour les activer. Ils ont ensuite été cultivés avec de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-10 (Stim 2) pendant 2 jours pour les différencier. Au 6^{ème} jour de culture, les P1 ou « PB obtenus *in vitro* » ont été triés puis cultivés 2 jours supplémentaires avec de l'IL-2, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IFN- α (Stim 3). A l'issue du 8^{ème} jour, nous avons procédé à l'acquisition des données et à l'analyse des résultats.

b. Inhibition de DEC2

Après avoir validé l'expression de *DEC2* dans les lignées cellulaires et dans les PB obtenus *in vitro*, nous avons bloqué l'expression de *DEC2* par plusieurs méthodes afin d'étudier son rôle fonctionnel. Ainsi, nous avons cultivé les PB obtenus *in vitro* avec un siRNA (**Figure 6A**) (Montagner M *et al.*, *Nature*, 2012), mais l'électroporation induite pour permettre l'entrée du siRNA dans les cellules provoquait la mort de près de 20% d'entre elles (**Figure 6B**).

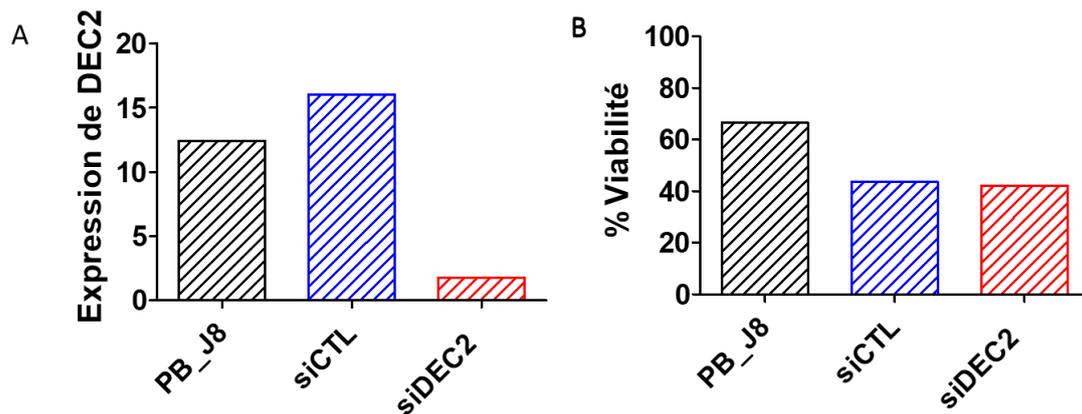


Figure 6 : Inhibition de l'expression de DEC2 avec un siRNA dans les PB obtenus in vitro. A. L'expression de DEC2 dans les lymphocytes B différenciés in vitro a été inhibée par un système de siRNA (Montagner M et al., Nature, 2012) siCTL = siRNA contrôle, siDEC2 = siRNA dirigé contre DEC2. L'expression de DEC2 a été déterminée par RT-qPCR en utilisant le $2^{-\Delta Ct}$ et ABL1 comme gène de référence. B. Analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie de flux des PB obtenus in vitro cultivés avec ou sans siRNA (% de viabilité = pourcentage de cellules dont la caspase 3a n'est pas active : CaspGlow).

Nous avons également utilisé un autre outil d'inhibition qui ne nécessite pas d'électroporation et qui passe à travers la membrane plasmique sans électroporation : un oligonucléotide morpholino anti-sens (ASO). Cet oligonucléotide se fixe sur l'ARN pré-messager de DEC2 dans le noyau des cellules et provoque un saut de l'exon 2 lors de la synthèse de l'ARN messager. Ce saut d'exon induit un décalage du cadre de lecture et la production d'un codon STOP, empêchant la synthèse d'une protéine fonctionnelle. Nous avons vérifié la délétion de l'exon 2 par PCR sur gel d'agarose : DEC2 complet est composé de 334 paires de bases (pb), avec le saut de l'exon 2, DEC2 ne fait plus que 270 pb (Figure 7A). En dépit du changement de technique et de l'absence d'électroporation, la viabilité cellulaire n'était pas meilleure dans ces conditions (Figure 7B). Néanmoins, nous avons conservé l'ASO pour sa facilité d'utilisation.

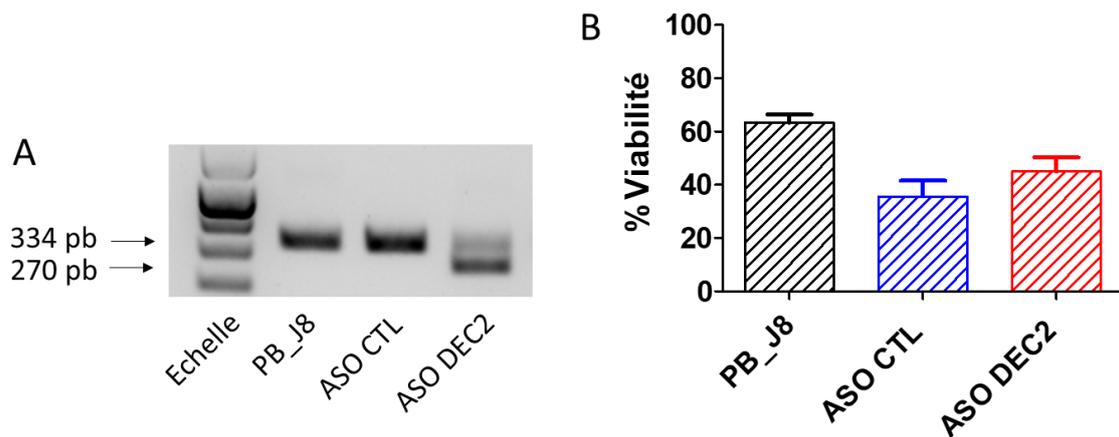


Figure 7 : Inhibition de l'expression de DEC2 dans les PB issus du modèle de différenciation in vitro. **A.** Détection du saut d'exon par PCR sur gel d'agarose, PB_J8 = plasmablastes (PB) obtenus par différenciation in vitro après 8 jours de culture, ASO CTL = PB cultivés avec l'oligonucléotide anti-sens contrôle, ASO DEC2 = PB cultivés avec l'ASO dirigé contre DEC2. **B.** Analyse de la viabilité des cellules cultivées avec ou sans ASO, par cytométrie de flux (% de viabilité = pourcentage de cellules dont la caspase 3a n'est pas active : CaspGlow).

Nous avons ensuite mis en évidence la perte d'expression protéique de DEC2 par western-blot (**Figure 8**), ce qui a été un défi technologique puisque : 1) les anticorps proposés dans le commerce ne sont pas totalement spécifiques de la protéine, et 2) DEC2 est un facteur de transcription faiblement exprimé dans les PB et donc difficile à mettre en évidence. Le western-blot ci-dessous a été réalisé sur la lignée U266 cultivée deux jours avec l'ASO contrôle (CTL) ou l'ASO dirigé contre DEC2 (DEC2) ou avec les siRNA. Afin de faciliter la détection de DEC2, nous avons extrait les protéines nucléaires (N) et les protéines cytoplasmiques (C), en attendant DEC2 à 50kDa, et majoritairement exprimé dans le noyau puisqu'il s'agit d'un facteur de transcription. La diminution d'expression de DEC2 a ainsi été validée pour le siRNA, et également pour l'ASO, mais plus faiblement. Curieusement, dans les extraits nucléaires, nous avons observé une bande supplémentaire supposant que DEC2 pourrait porter des modifications post-traductionnelles ou qu'il existerait sous forme de variants alternatifs. Cette double bande a d'ailleurs déjà été observée dans une autre étude (Makino Y *et al.*, Sci Rep, 2019).

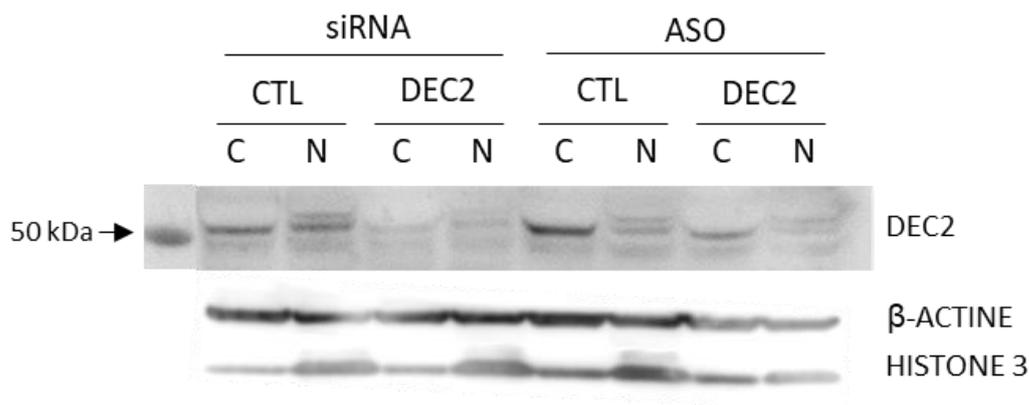


Figure 8 : Validation de la perte d'expression protéique de DEC2 dans la lignée U266 par western-blot. Le western-blot a été réalisé avec les extraits protéiques cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) des cellules U266 cultivées avec le siRNA contrôle (CTL) ou dirigé contre DEC2 (DEC2), ou avec l'ASO CTL ou contre DEC2 pendant deux jours. La β -actine a été utilisée comme témoin de charge et l'histone 3 pour valider l'enrichissement en protéines nucléaires.

3) Rôles de DEC2 dans les PB

Etant donné que *DEC2* est un gène impliqué dans la différenciation de nombreux types cellulaires tels que les chondrocytes (Sasamoto T *et al.*, Int J Mol Med, 2016), les lymphocytes Th2 murins (Liu Z *et al.*, J Immunol, 2009) et les lymphocytes B1 murins (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2018), nous avons cherché à savoir s'il était impliqué dans la différenciation des lymphocytes B activés en PB. Dans ce contexte, nous avons cultivé les lymphocytes B activés avec l'ASO afin d'inhiber *DEC2* au quatrième jour de culture, soit en même temps que le changement de stimulation qui permet la différenciation des lymphocytes B activés en PB. Nous avons analysé par cytométrie de flux les pourcentages de PB obtenus deux jours après. Le pourcentage de PB ne variait pas en absence d'expression de *DEC2* (41,1 % contre 41,9 % pour la condition contrôle en moyenne) (**Figure 9A**). Nous avons également analysé par qPCR l'expression de certains gènes dans ces cellules et dans des PB issus d'amygdales. La suppression de l'expression de *DEC2* n'avait pas non plus d'impact sur l'expression des gènes B (*PAX5*, *BCL6*, *SPIB*), PB (*PRDM1*, *XBP1*, *XBP1s*) et des gènes de la signature mise en évidence dans les précédents résultats (*CREB3L2*, *ERN1* et *NLRP14*) (**Figure 9B**). Il faut tout de même noter que lorsque les PB primaires d'amygdales sont cultivés avec l'ASO CTL, il y a une modification assez importante de l'expression des gènes étudiés.

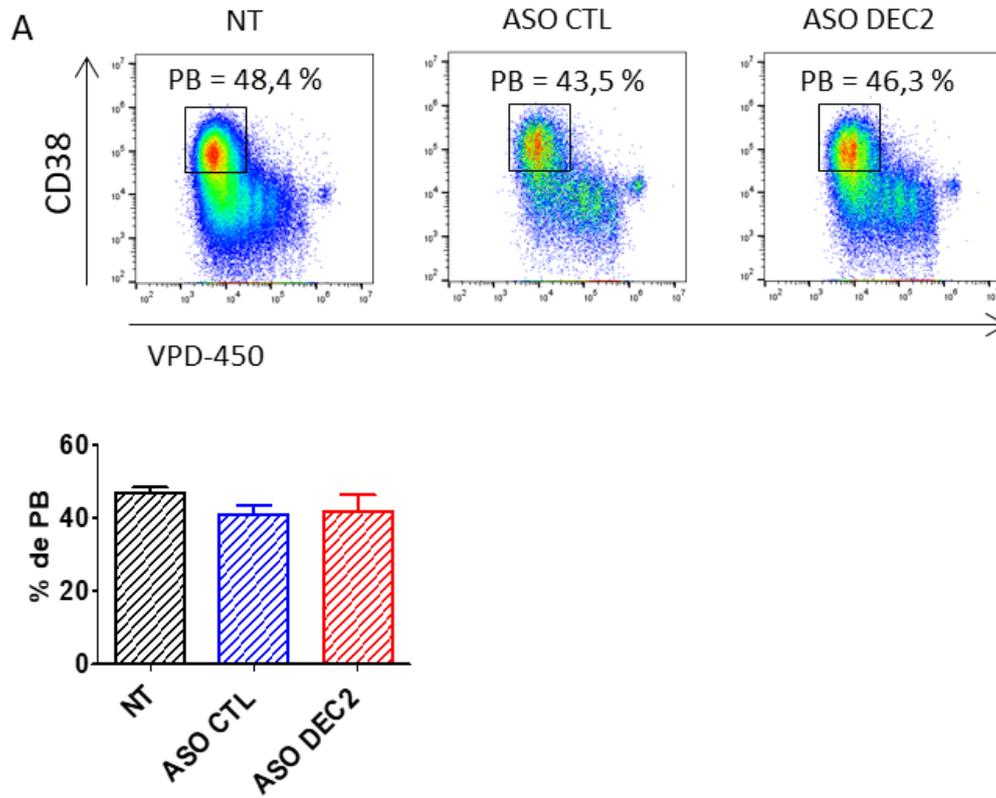
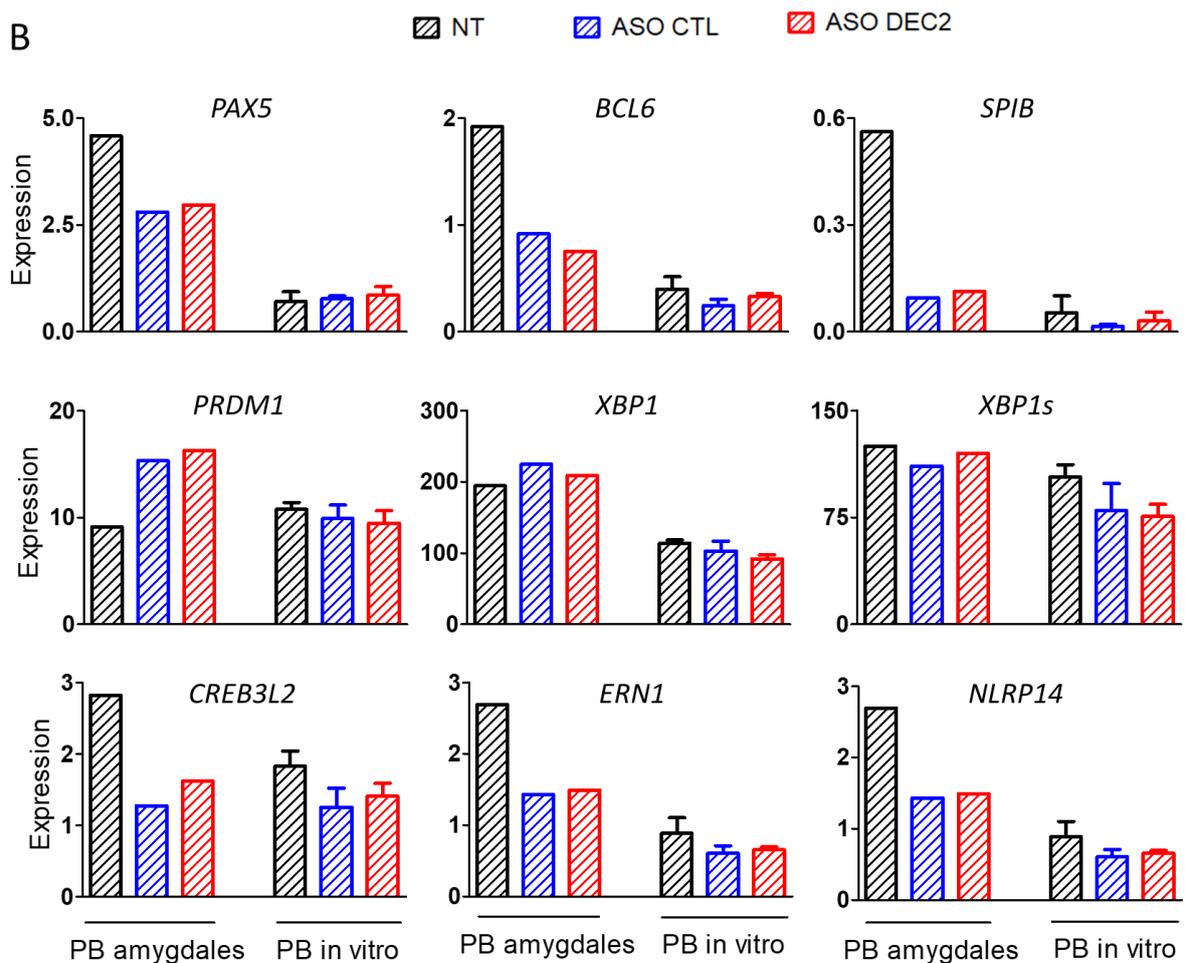


Figure 9 : DEC2 n'a pas d'impact sur la différenciation des lymphocytes B en PB. A. Analyse par cytométrie de flux du pourcentage de PB obtenus *in vitro* (VPD450^{faible} CD38⁺⁺) et cultivés deux jours sans ASO (NT pour non traitées), avec l'ASO contrôle (ASO CTL) ou avec l'ASO dirigé contre DEC2 (ASO DEC2).



B. Expression des gènes de l'identité B (*PAX5*, *BCL6*, *SPIB*), plasmocytaire (*PRDM1*, *XBP1*, *XBP1s*) et des gènes de la signature minimale plasmablastique (*CREB3L2*, *ERN1*, *NLRP14*) dans les PB d'amygdales et dans les PB issus du modèle de différenciation *in vitro*, cultivés deux jours sans ASO (NT pour non traitées), avec l'ASO contrôle (ASO CTL) ou avec l'ASO dirigé contre DEC2 (ASO DEC2). L'expression des ARNm a été déterminée par le $2^{-\Delta Ct}$ en utilisant *ABL1* comme gène de référence.

Ensuite, nous nous sommes intéressés au rôle de *DEC2* dans le cycle cellulaire puisqu'il a été décrit à la fois comme inducteur de la prolifération cellulaire (Wu Y *et al.*, *Int J Mol Med*, 2015) et comme inhibiteur du cycle (Kreslavsky T *et al.*, *Nat Immunol*, 2018 ; Sasamoto T *et al.*, *Int J Mol Med*, 2016), voire même impliqué dans la quiescence (Adam AP *et al.*, *Cancer Res*, 2009 ; McGrath J *et al.*, *Mol Cancer Res*, 2019 ; Yu-Lee LY *et al.*, *Sci Rep*, 2019). Nous avons donc suivi la dilution du VPD450, marqueur de la prolifération, dans des cellules issues du modèle de différenciation au cinquième jour de culture (J5) (apparition de PB précoces) et au sixième jour de culture (J6) (PB différenciés) exprimant ou non DEC2 (**Figure 10A**). Cette

expérience montre que la culture avec les siRNA ne semble pas impacter la prolifération des lymphocytes B. Nous avons également analysé les phases du cycle cellulaire. Pour se faire, nous avons cultivé les cellules U266 pendant 24 heures en inhibant *DEC2* avec l'ASO et nous avons analysé par cytométrie de flux les différentes phases du cycle cellulaire avec un marquage EdU/DAPI. Ainsi, les cellules doubles négatives sont en phase G0 ou G1, celles ayant incorporé le DAPI mais pas l'EdU sont en phase M et les cellules ayant incorporé l'EdU et de manière variable le DAPI sont en phase S (**Figure 10B**). *DEC2* ne semble pas impliqué dans la régulation des phases du cycle cellulaire dans les cellules U266 puisqu'avec l'ASO CTL ou celui dirigé contre *DEC2*, nous obtenons les mêmes pourcentages de cellule en phase G0/G1 (80,5 et 80,4% respectivement), en phase S (10,6 et 10,4%) et en phase M (5,20 et 4,43%).

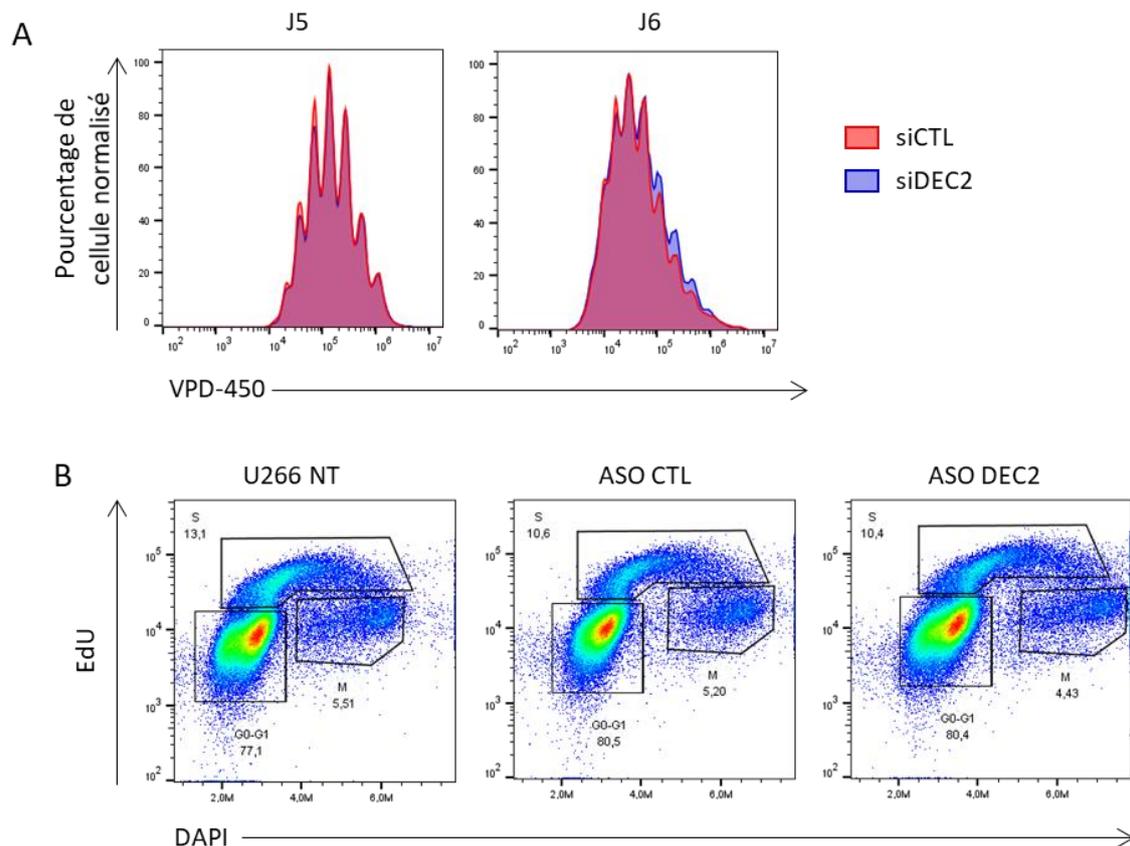


Figure 10 : *DEC2* ne semble pas avoir d'impact sur la prolifération et sur le cycle cellulaire des lymphocytes B activés et des cellules de myélome multiple U266. **A.** Les lymphocytes B obtenus *in vitro* au quatrième jour de culture ont été cultivés un jour (J5) ou deux (J6) avec le siRNA contrôle (siCTL) ou contre *DEC2* (siDEC2). La prolifération a été suivie par la dilution du VPD450 par cytométrie de flux. Les histogrammes ont été obtenus grâce à la fonction « Normalized to Mode » du logiciel FlowJo. **B.** Les trois principales phases du cycle cellulaire ont été déterminées en fonction de l'incorporation du DAPI et de l'EdU (G0/G1 : DAPI⁻ EdU⁻ ; S : DAPI^{int} EdU⁺ ; M : DAPI⁺ EdU⁻) pour les cellules U266 non traitées (NT), cultivées avec l'oligonucléotide anti-sens contrôle (ASO CTL) ou dirigé contre *DEC2* (ASO DEC2).

Ces résultats préliminaires semblent montrer une absence d'implication de DEC2 dans la prolifération et le cycle cellulaire.

Enfin, malgré sa description comme inducteur de la mort (Wu Y *et al.*, Biomed Res, 2012) ou comme répresseur de l'apoptose (Liu Q *et al.*, Int J Mol Med, 2016), nous n'avons pas montré d'impact de DEC2 sur la mort cellulaire des lymphocytes B (**Figures 6B** et **7B**).

Nos résultats préliminaires indiquent que DEC2 ne semble pas avoir d'impact sur la différenciation, la prolifération, le cycle cellulaire et la survie des PB primaires et sur une lignée de myélome multiple testée. Nous avons donc utilisé une nouvelle approche afin de déterminer le rôle de DEC2 dans les PB : le séquençage de l'ARN des PB issus du modèle de différenciation *in vitro* dans lesquels nous avons bloqué l'expression de DEC2.

4) Le séquençage de l'ARN des PB obtenus *in vitro* avec inhibition de l'expression de DEC2

Nous avons séquençé l'ARN de quatre populations issues d'un même donneur : 1) des PB obtenus *in vitro* au sixième jour de culture (PB_J6), 2) des PB obtenus *in vitro* au sixième jour de culture et cultivés avec l'IL-2, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IFN- α pendant 2 jours, comme décrit précédemment (PB_J8), 3) des PB obtenus de la même manière et cultivés en plus avec l'ASO CTL (ASO_CTL) et 4) cultivés avec l'ASO dirigé contre DEC2 (ASO_DEC2). Cette expérience nous a permis de vérifier que le système de culture que nous avons développé permet de maintenir le phénotype PB/PC et de valider une nouvelle fois le fonctionnement de l'ASO.

a. Validation du saut d'exon 2 de DEC2

Bien que nous ayons validé par PCR le saut d'exon 2 de DEC2, nous souhaitons également le valider avec le RNAseq. Nous avons donc réalisé un Sashimi Plot sur l'interface IGV qui permet de visualiser le nombre de reads alignés au niveau des jonctions exon-exon (**Figure 11**). Ainsi, les PB_J6, PB_J8 et ASO_CTL ont respectivement 31, 35 et 30 % de liaisons exon1-exon2 alors que l'échantillon ASO_DEC2 n'en a que 16 %. De plus, l'échantillon ASO_DEC2 a 23 % de liaisons entre l'exon 1 et l'exon 3, alors que les autres échantillons n'en ont aucune, validant ainsi le saut de l'exon 2.

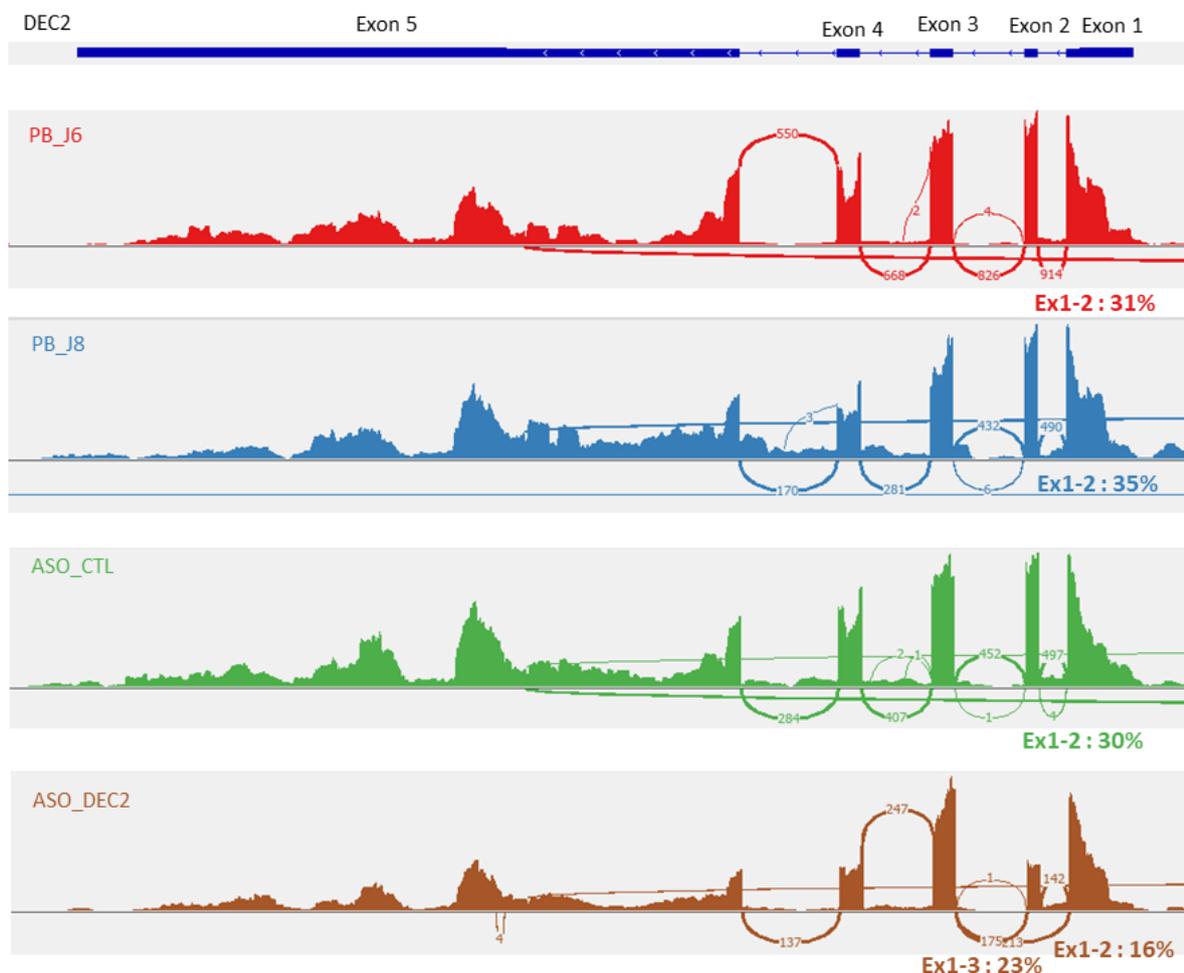


Figure 11 : Validation du saut d'exon 2 dans les plasmablastes obtenus *in vitro* et cultivés avec l'ASO DEC2. Sashimi plot représentant le nombre de reads alignés sur les jonctions exon-exon de DEC2 dans les plasmablastes (PB) obtenus *in vitro* au sixième jour de culture (PB_J6) et au 8^{ème} jour (PB_J8), cultivés avec l'ASO contrôle (ASO_CTL) ou avec l'ASO contre DEC2 (ASO_DEC2). Le pourcentage de liaisons entre les exons a été calculé en prenant en compte la totalité des liaisons exon-exon sur DEC2.

Afin de mettre en évidence les effets induits par DEC2, nous avons analysé les données sur R Studio avec le package DESeq2. Nous avons choisi de sélectionner les gènes avec un fold change (FC) de 1,5. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés (DEG) entre toutes les conditions comparées deux à deux (ASO_CTL vs PB_J8 par exemple). Pour effacer l'effet induit par l'ASO sur la culture et nous focaliser sur les cibles spécifiques de DEC2, nous avons d'abord sélectionné les DEG entre les PB ASO_CTL et les PB_J8 (**Figure 12**, jaune) et les DEG entre ASO_DEC2 et ASO_CTL (**Figure 12**, bleu), puis nous avons conservé uniquement les 1159 gènes spécifiquement différentiellement exprimés sous l'effet de la délétion du gène DEC2 (ASO_DEC2) par rapport à la condition contrôle (ASO_CTL). (**Figure 12**).



Figure 12 : Gènes différentiellement exprimés avec un fold change de 1,5, entre les PB exprimant DEC2 et ceux ne l'exprimant pas. Diagramme de Venn représentant les 10 256 gènes différentiellement exprimés (DEG) entre ASO_CTL et PB_J8 (jaune) et les 2 484 entre ASO_DEC2 et ASO_CTL (bleu). Seuls les 1159 DEG, non communs aux DEG entre ASO_CTL et PB_J8 ont été retenus pour l'analyse.

a. Effets de la culture des PB sur l'expression génique

Etant donné que *DEC2* est spécifiquement exprimé dans les PB, nous avons choisi d'inhiber son expression au sixième jour de culture dans des cellules différenciées. Nous avons donc développé un cocktail de cytokines adapté à la culture des PB. L'analyse en composante principale (ACP) des quatre populations séquencées révèle que plus de 95 % de la variabilité d'expression génique est expliquée par deux axes : le premier représente l'effet de DEC2 (Dim1), avec la plus grande variabilité. Ainsi, les échantillons contrôles (PB_J8 et ASO_CTL)

sont situés à une extrémité du graphe et l'échantillon avec inhibition de l'expression de *DEC2* est situé à l'autre extrémité (**Figure 13A**). L'axe 2 (Dim 2) représente l'effet de la culture avec les PB récupérés le sixième jour de culture en bas et ceux récupérés au huitième jour (PB_J8, ASO_CTL et ASO_DEC2) en haut. La carte d'expression des gènes (heatmap) effectuée avec les 1159 DEG permet de donner une vision globale des profils des quatre populations (**Figure 13B**). Ainsi, la heatmap montre que le transcriptome des cellules ASO_CTL est proche de celui des PB_J8, comme attendu. En revanche, le dendrogramme semble indiquer que les PB_J6 ont un transcriptome plus proche de ces deux populations que de la condition ASO_DEC2, qui a pourtant été réalisée sur des PB obtenus au même temps de culture.

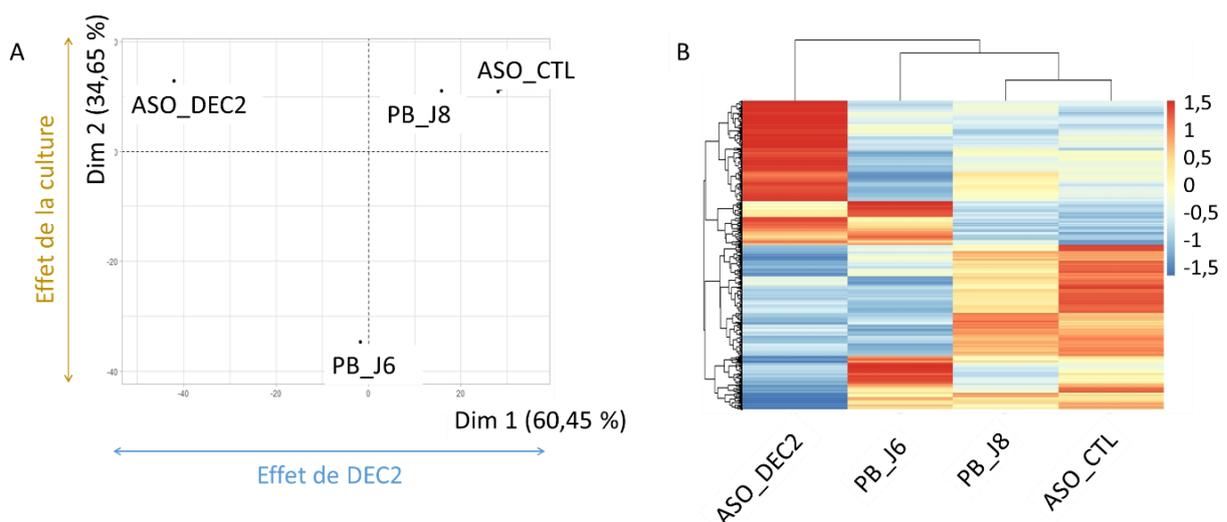


Figure 13 : Comparaison des PB_J6, PB_J8, ASO_CTL et ASO_DEC2. A. Analyse en composante principale des quatre populations séquencées : la Dim 1 représente l'effet de DEC2 et la Dim 2 représente l'effet de la culture. B. Heatmap de l'expression des 1159 gènes différentiellement exprimés entre les conditions ASO_CTL et ASO_DEC2, non communs à ceux différentiellement exprimés entre la situation PB_J8 et ASO_CTL.

Afin d'éviter les variations d'expression géniques induites par la culture, nous avons réduit notre analyse aux populations PB_J8, ASO_CTL et ASO_DEC2 obtenues aux mêmes temps et conditions de culture. Ainsi, les populations PB_J8 et ASO_CTL se retrouvent comme précédemment sur le même axe en ACP, et près de 92% de la variabilité d'expression génique est induite par la perte d'expression de DEC2 (Dim 1) (**Figure 14A**). La heatmap basée sur

l'expression des gènes les plus différenciellement exprimés entre ces populations (1159 gènes) montre également que les populations où l'expression de DEC2 n'est pas altérée, sont plus proches transcriptionnellement entre elles que de la population ASO_DEC2 (**Figure 14B**).

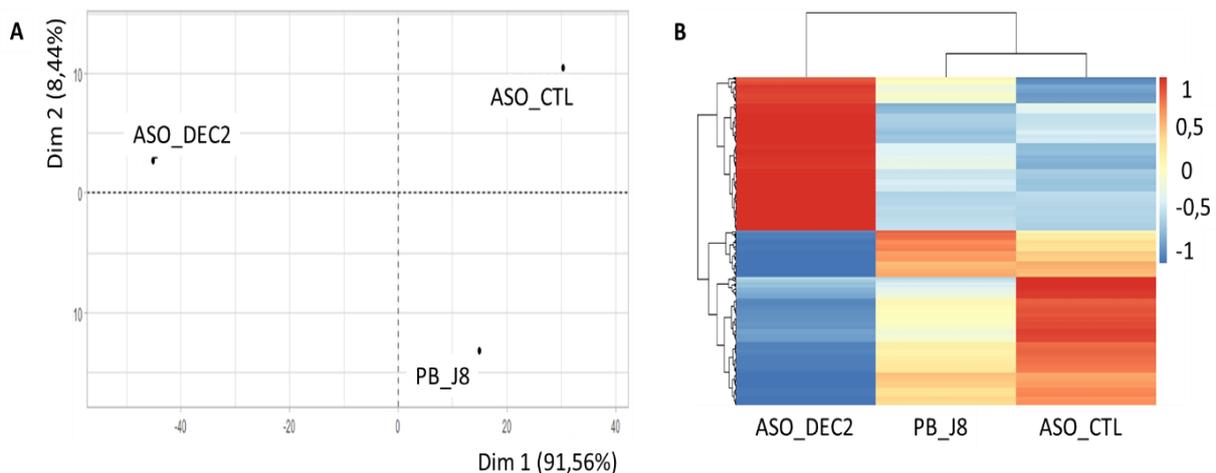


Figure 14 : Comparaison des PB_J8, ASO_CTL et ASO_DEC2. **A.** Analyse en composante principale (ACP) : la Dim 1 représente la plus grande variabilité d'expression génique et correspond à l'effet de DEC2. **B.** Heatmap de l'expression génique des 1159 gènes différenciellement exprimés entre les conditions ASO_CTL et ASO_DEC2, non communs à ceux différenciellement exprimés entre la situation PB_J8 et ASO_CTL.

b. Effets de DEC2

Les 1159 gènes ainsi mis en évidence sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires : le métabolisme des lipides (*PLA2G3*, *ENPP7*, *ARSH*, *PLA2G1B*, *NPC1L1*, *APOH*, *APOC3*) ; les interactions lymphocytes/non-lymphocytes (*SIGLEC9*, *SIGLEC7*, *CD300LB*, *CD300A*, *LAMTOR2*) et des gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dans l'interaction avec des protéoglycanes (*CTRB1*, *MMP9*, *MMP7*, *CTSK*, *ITGB3*, *LAMA5*). On trouve également des cytokines et des récepteurs de chimiokines (*CCL3L3*, *CCL17*, *CCR9*, *IL3*, *LIF*) (**Figure 15**).

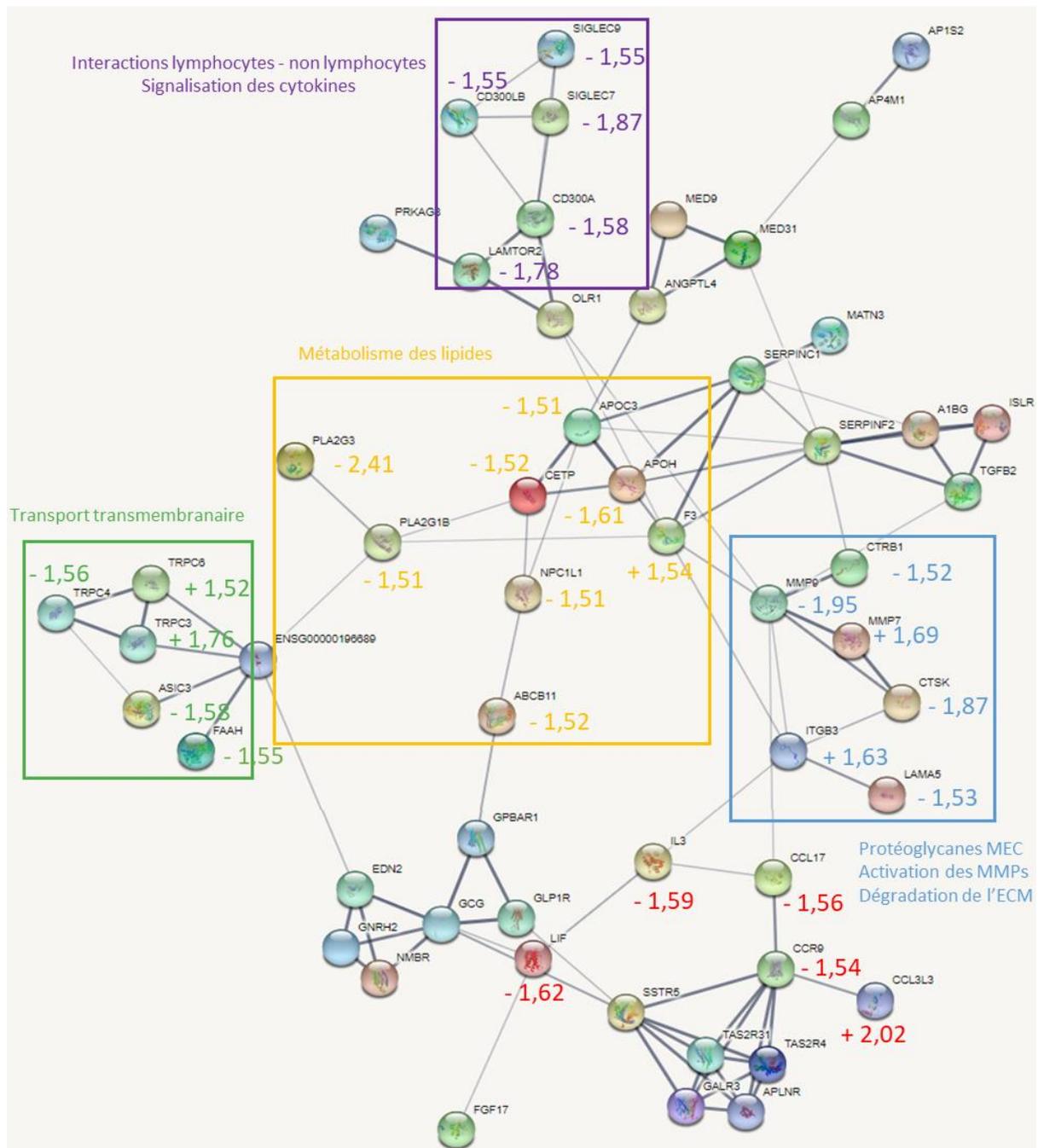


Figure 15 : Fonctions cellulaires et réseaux d'interactions protéiques régulés par DEC2. Analyse effectuée sur les 1159 DEG impactés par DEC2 (analyse sur la String Database et à l'aide d'EnrichR).

Plusieurs des gènes cités jouent également un rôle dans la migration cellulaire. D'après la littérature, le gène le plus différentiellement exprimé (FC = -2,4) : la phospholipase A2 du groupe III (*PLA2G3*) est une enzyme impliquée dans la conversion des phospholipides en acide arachidonique qui favorise la migration cellulaire (Murase R *et al.*, Sci Rep, 2017 ; Tunset HM *et al.*, Mol Sci, 2019), tout comme d'autres phospholipases A2 (Muñoz NM *et al.*, J Immunol,

2007). On trouve également des gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire comme le gène de la métalloprotéinase MMP7 (+1,69) et de la MMP9 (-1,95), également décrites comme pro-migratoires ; des gènes directement associés à la migration comme le facteur inhibant la migration des leucocytes : *LIF* (-1,62), *SIGLEC7* (-1,87) et *SIGLEC9* (-1,55) (Zheng V *et al.*, J Immunol Res, 2020), *LAMTOR2* (-1,78) qui promeut la migration des cellules dendritiques dans les ganglions chez la souris (Scheffler JM *et al.*, Nat Commun, 2014) et *CD300A* (-1,58) qui inhibe la migration trans-endothéliale (Ghavampour S *et al.*, PLoS One, 2013). On trouve également des protéines d'adhésion comme *CADM3* (-1,99), l'intégrine B3 : *ITGB3* (+1,62), une cadhérine (*CDH10* : +1,55), *CALML3* qui initie la migration (Yang B *et al.*, Nat commun, 2018). Ces protéines sont notamment impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuses.

A l'aide d'analyses d'enrichissement de gènes (GSEA), nous avons mis en évidence d'autres voies de signalisation impactées par DEC2 et également décrites dans la littérature. Toutefois, le faible nombre de gènes différentiellement exprimés ne permettait pas une analyse optimale, et nous avons donc choisi d'élargir cette analyse aux 2484 gènes (1325 + 1159, **Figure 12**) différentiellement exprimés entre les conditions ASO_DEC2 et ASO_CTL. Dans les deux cas, les mêmes voies de signalisation étaient impactées, mais le nombre de gènes impliqués variait. Ainsi, on trouve un enrichissement d'expression en absence du gène DEC2 (ASO_DEC2) des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie tels que *ANGPTL4*, *VEGFA*, *HK2* et *PGK1*, déjà décrits comme régulés par DEC2 (Hu T *et al.*, J Exp Clin Cancer Res, 2015) (**Figure 16**) ; dans l'apoptose via les gènes des caspases (*CASP1*, 2, 3, 4, 6, 7, 8 et 9) ; dans la transition épithélio-mésenchymateuse (*PLOD2*, *ITGB3*, *MATN3*, *MYL9*) et dans les phases du cycle cellulaire, et notamment G2/M (*CDC25A*, *CDK4*, *CDKN1B*, *CDKN2C*) et la voie E2F avec principalement les gènes *DEK* et *DONSON*, déjà décrits comme cibles de DEC2 grâce à un ChIP-Seq ciblant la protéine DEC2 dans les lymphocytes B1 murins (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2017).

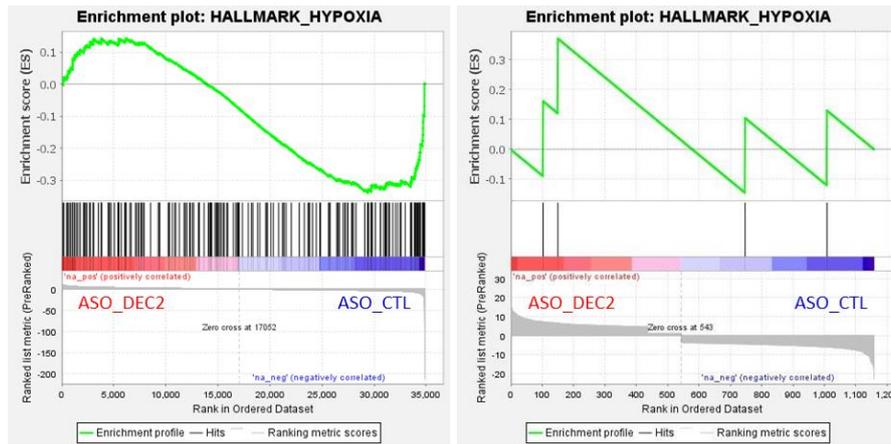


Figure 16 : Analyse de l'enrichissement des gènes (GSEA) impliqués dans la réponse à l'hypoxie dans la condition ASO_DEC2 versus ASO_CTL. Analyse de l'enrichissement des gènes réalisée soit sur la liste complète des 2284 DEG entre les deux conditions (à gauche), soit sur la liste réduite des 1159 DEG (à droite).

Discussion et perspectives :

1) Outils utilisés pour étudier le rôle de DEC2 dans les PB/PC et méthodes d'analyses

L'étude de *DEC2* est particulièrement difficile puisque peu d'outils fonctionnels sont à disposition ou spécifiques. En effet, du fait de sa similarité structurale avec *DEC1*, les outils utilisés ciblent souvent les deux facteurs de transcription. Dans cette étude, nous n'avons pas choisi de cibler les deux facteurs de transcription puisque, même s'il est exprimé dans les PC de moelle osseuse, *DEC1* n'est pas exprimé dans les PB d'amygdales.

Souvent, les équipes ayant travaillé sur *DEC2* ont elles-mêmes développé les sondes utilisées pour les qPCR, les outils d'inhibition (shRNA, siRNA), les constructions génétiques de manière à induire l'expression de *DEC2* taggué et à faciliter sa détection par un anticorps anti-tag (DEC2-HA, DEC2-Flag) (Makino Y *et al.*, Sci Rep, 2019). Certaines ont également créé des anticorps dirigés contre DEC2 (Montagner M *et al.*, Nature, 2012). Au laboratoire, pour l'inhibition de *DEC2*, nous avons validé deux méthodes : l'ASO et le siRNA publié par Montagner *et al.* Pour le RNAseq, nous avons choisi d'utiliser l'ASO puisqu'il est plus simple d'utilisation et ne nécessite pas d'électroporation pour entrer dans les cellules qui est très mortelle pour les lymphocytes B. Toutefois, cet outil induit une mortalité tout aussi importante que le siRNA (bien que ces deux outils soient tous les deux dilués de la même manière) et la validation de son efficacité a été assez laborieuse, contrairement à celle du siRNA. De plus, nous nous sommes demandés si malgré le saut de l'exon 2, l'ASO empêchait bien l'expression de *DEC2* et s'il n'y avait pas production d'une forme alternative de *DEC2*. Cependant, même si ce risque existe, aucun site d'initiation de la traduction (ATG) autre que le constitutif n'a été décrit jusqu'à présent. De plus, si un second site d'initiation de la traduction était utilisé, le cadre de lecture serait probablement décalé et le DEC2 obtenu serait donc bien différent de celui que l'on cible. Il faut noter qu'il n'existe qu'un codon ATG en position 790 de l'ARNm et situé dans l'intron, avant l'exon 3. Si la traduction protéique

démarrait à ce niveau, la protéine serait tronquée (de l'exon 1 et de l'exon 2) et comprendrait potentiellement une séquence supplémentaire provenant de l'intron en amont de l'exon 3, ce qui rendrait donc la protéine non-fonctionnelle. Dans ce cas, des simulations de repliements protéiques *in silico* permettraient d'y voir plus clair. Le deuxième risque lié à l'utilisation de l'ASO est l'épissage alternatif induit en dehors du saut d'exon, puisqu'il existe trois variants issus d'épissages alternatifs de *DEC2*, dont deux ne codant pas pour une protéine. Cependant, lors de l'optimisation de l'utilisation de l'ASO, le saut d'exon a été vérifié par PCR et par séquençage pour valider au nucléotide près le saut d'exon. Malgré tout, on peut imaginer que l'ASO induit le saut d'exons supplémentaires qui auraient été hors du champs détectable de la PCR. Dans ce cas, les protéines produites manqueraient d'un ou plusieurs domaines, ou en auraient des supplémentaires, et leur traduction conduirait à des formes non fonctionnelles. Cette hypothèse est peu probable, d'autant plus que 1) les bandes obtenues en PCR correspondent aux bandes attendues (*DEC2* complet = 334 pb et *DEC2* sans l'exon 2 = 270 pb) (**Figure 7**), 2) les bandes obtenues en western blot correspondent également à celles attendues (**Figure 8**) et 3) les Sashimi plot nous ont permis d'évaluer le pourcentage de liaisons exon-exon (**Figure 11**). Ces pourcentages varient peu entre les échantillons, qu'il y ait l'ASO ou non. On remarque seulement une diminution des liaisons entre les exons 1 et 2 et les exons 2 et 3 dans la condition ASO_ *DEC2*, et une augmentation des liaisons entre les exons 1 et 3, ce qui valide le saut de l'exon 2. Dans tous les cas, l'utilisation de l'ASO n'est peut-être pas la bonne solution puisque 10 256 gènes ont été retrouvés différentiellement exprimés entre le PB_J8 et l'ASO_CTL, alors qu'on n'en a retrouvé que 2 484 entre les conditions ASO_CTL et ASO_ *DEC2* (**Figure 12**), ce qui montre un effet puissant et non négligeable de l'outil ASO sur les cellules. Dans ces conditions, et puisque le siRNA est disponible, il serait probablement plus intéressant d'utiliser cet outil pour la suite des expérimentations.

En ce qui concerne les sondes fabriquées et utilisées pour la qPCR, nous avons élaboré différents couples qui ciblent principalement l'exon 1, car il est difficile d'élaborer des sondes en dehors de cette zone et qui soient spécifiques de *DEC2*. Ces sondes ont été fabriquées à partir de la séquence d'ADNc de *DEC2* et une PCR *in silico* a été effectuée sur le site Genome Browser afin de valider la cible. Il n'est donc pas possible de mesurer l'expression de *DEC2* par qPCR lorsque l'on utilise l'ASO. Nous avons donc validé le saut d'exon par PCR (couple de

sondes ciblant les exons 1 et 4) et par RNAseq à l'aide des Sashimi plot, en déterminant le pourcentage de liaison entre les exons 2 et 3, sans pour autant observer une diminution des reads alignés sur *DEC2*.

Pour les anticorps, nous n'avons pas pu obtenir ceux utilisés par Montagner M *et al.*, puisqu'il s'agissait d'anticorps non commercialisés. Nous avons donc testé plusieurs anticorps monoclonaux commerciaux et avons conservé celui qui donnait les meilleurs résultats. Etant donné que *DEC2* est un facteur de transcription faiblement exprimé, nous avons isolé les extraits cytoplasmiques et nucléaires pour détecter la protéine (**Figure 8**). Curieusement, nous avons détecté une bande supplémentaire dans les extraits nucléaires. Ce résultat a également été mis en évidence dans une précédente étude et les auteurs suggéraient qu'il s'agissait de modifications tissu-spécifiques (Makino Y *et al.*, Sci Rep, 2019). Afin de poursuivre les études sur *DEC2*, il paraît indispensable de développer un anticorps spécifique. Dans ce cadre et en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang (EFS), nous pourrions envisager de développer cet outil au laboratoire, ce qui permettrait de valider l'expression de *DEC2* au niveau protéique par western-blot ou par cytométrie de flux.

Enfin, concernant les analyses du RNAseq, notre but était d'évaluer l'impact de *DEC2* et d'éviter le biais dû à l'effet de l'outil ASO, c'est pourquoi nous avons choisi de sélectionner les 1159 DEG. Cet ensemble de gènes ne contient pas les DEG dont l'expression varie également entre la condition ASO_CTL vs PB_J8. Même si ce filtrage permet d'éliminer les cibles directement impactées par l'outil ASO, elles éliminent également des gènes impactés par *DEC2*. Les analyses issues de ce jeu de données sont donc restreintes et limitent le nombre de gènes impliqués dans des voies de signalisation, notamment en GSEA. Ainsi, les résultats obtenus après ce filtrage sont moins puissants que ceux obtenus sans, alors même que l'on retrouve les mêmes voies de signalisation (**Figure 16**), ce qui porte à réflexion sur la manière dont nous devons analyser ces données. Toutefois, ces analyses ont permis de valider des cibles de *DEC2* décrites dans la littérature. C'est par exemple le cas pour des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie, comme *ANGPTL4* et *VEGFA*. Nous n'avons cependant pas retrouvé les gènes *HIF*, décrits comme cibles de *DEC2* (Hu T *et al.*, J Exp Clin

Cancer Res, 2015), probablement parce qu'ils peuvent également être régulés par DEC2 au niveau protéique (Montagner M *et al.*, Nature, 2012).

2) Effet de la culture de J6 à J8

Etant donné l'expression tardive de DEC2 dans la différenciation terminale B, nous avons choisi de cultiver des PB obtenus *in vitro* et bien différenciés (jour 6) puis de les cultiver deux jours supplémentaires que précédemment décrit (Le Gallou S *et al.*, J Immunol, 2012). Nous avons choisi d'utiliser de l'IL-2, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IFN- α . Le RNA-seq (PB_J8 vs PB_J6) a permis de mettre en évidence que de nombreuses cibles (10 256) sont induites ou réprimées dans ces conditions, mais elles correspondent principalement à des ARN non codants, des pseudogènes et quelques miRNA. Par ailleurs, des gènes de réponses à l'IFN sont augmentés tels que *IFIT1* et *IFI44L*, probablement en réponse à l'IFN ajouté dans le milieu de culture. De nombreux gènes de l'identité B sont réprimés tels que *PAX5* (FC de -3,96), *BCL6* (-2,63) et *IRF8* (-2,33). Les gènes de l'identité PB, issus de la base de données Genomic Scape, sont diminués à J8 : *IGF1* (-2,2), *CRELD2* (-4,75), *SELPLG* (-3,72). Enfin, les gènes de l'identité plasmocytaire sont eux augmentés dans les PB à J8, tels que *CXCL12* (+2,03), *OASL* (+4,83), *PLA2G2D* (+2,35). Contrairement à nos attentes, *PRDM1* (-4,54) et *XBP1* (-3,23) sont plus faiblement exprimés à J8, même s'ils restent fortement exprimés (8 600 reads et 15 900 reads respectivement), ainsi que les gènes « Variable » des chaînes lourdes des Ig (*IGHV*). La culture deux jours supplémentaires semble donc favoriser la différenciation des PB vers un phénotype de type PC.

3) Rôles potentiels de DEC2 dans les PB/PC

DEC2 a principalement été décrit pour son rôle dans le rythme circadien, mais il intervient également dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la migration. A l'heure actuelle, une seule étude révèle le rôle de DEC2 et de son paralogue DEC1 dans les lymphocytes B et montre que DEC2, et dans une

moindre mesure DEC1, sont impliqués dans la différenciation des lymphocytes B1 spléniques et péritonéaux murins (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2017), mais aucune étude ne décrit le rôle de DEC2 dans les PB humains. Nos expériences fonctionnelles préliminaires semblent révéler que DEC2 n'est pas impliqué dans la différenciation, la prolifération et la survie des PB humains (**Figures 9, 10, 6 et 7**), mais nos analyses transcriptomiques semblent indiquer qu'il régulerait un grand nombre de cibles. L'ensemble des résultats obtenus, nous a donc permis d'établir plusieurs hypothèses sur le rôle de DEC2 dans les PB et les PC humains (**Figures 12-16**).

a. Hypothèses sur les rôles de DEC2 et du CD23 dans la différenciation terminale B et dans le FL

Nous avons montré que *DEC2* est exprimé au fur et à mesure de la différenciation (**Figures 1, 2 et 3**), alors que l'expression de *FCER2* (codant pour le CD23) est perdue. Nos analyses *in silico* montrent que *FCER2* contient une E-box « CACGTG » dans son promoteur, qui pourrait permettre la fixation de DEC2 et/ou de son paralogue DEC1, et donc sa régulation. Dans ce cadre, nous avons émis l'hypothèse que lors de la différenciation en PB, DEC2 inhiberait l'expression de *FCER2*, ce qui expliquerait pourquoi les PB perdent son expression. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en réalisant une CHIP-qPCR de DEC2, sachant que *FCER2* n'est pas retrouvé dans les cibles de DEC2 dans les données de CHIP-seq disponibles (Kreslavsky T *et al.*, Nat Immunol, 2017). De plus, l'expression de *FCER2* est perdue avant même l'entrée dans le GC et l'expression de *DEC2*, ce qui suppose que *DEC2* n'est probablement pas à l'origine de la répression de *FCER2*. En revanche, nos analyses *in silico* sur UCSC montrent qu'il existe un site de fixation de DEC1 (site identique à celui de DEC2) dans le promoteur de *STAT6*, en plus de celui présent dans *FCER2*, qui n'est ni retrouvé dans le promoteur d'*IL-4R*, ni dans celui du *CD40* (**Figure 17**). Ainsi, on peut imaginer que ce serait plutôt DEC1, exprimé plus précocement que DEC2, qui inhiberait l'expression de *FCER2* et ce soit de manière directe, soit de manière indirecte *via* sa fixation sur le promoteur de *STAT6*. Dans ce cas, il existerait une balance d'expression de ces deux facteurs, comme il existe déjà dans le GC pour les protéines IRF4 et IRF8 par exemple. Ainsi, DEC1 qui est exprimé avant

l'entrée dans le GC bloquerait l'expression de *DEC2*, et celle de *STAT6*. Au fur et à mesure de la différenciation, *DEC2* inhiberait à son tour *DEC1* pour induire ses fonctions dans les PC.

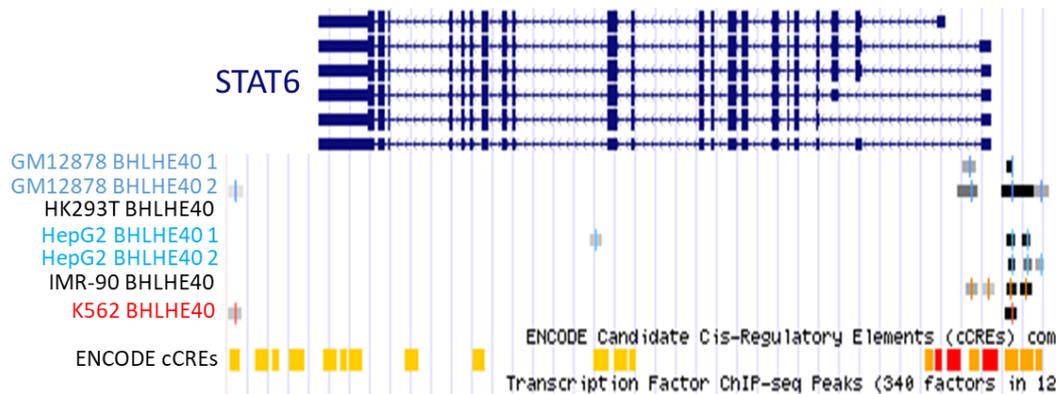


Figure 17 : Il existe un site de fixation pour *DEC1/DEC2* dans le promoteur de *STAT6*. Analyse *in silico* sur UCSC. Il existe un site prédictif de fixation de *DEC1* dans le promoteur de *STAT6* (ENCODE cCREs). Des données de ChIP-seq de *DEC1* ont montré dans plusieurs lignées cellulaires, sa fixation sur le promoteur de *STAT6*. BHLHE40 = *DEC1*. *DEC2* et *DEC2* ont les mêmes sites de fixation sur l'ADN (boîtes E).

Nous nous sommes également interrogés sur le rôle de *DEC2* et de *DEC1* dans le FL puisque les B tumoraux des patients présentent une hétérogénéité d'expression du CD23 et que ces gènes ont été décrits dans de nombreux cancers (Numata A *et al.*, Nat Commun, 2018 ; Montagner M *et al.*, Nature, 2012 ; Sethuraman A *et al.*, Breast Cancer Res, 2018). Nos données montrent que les cellules tumorales CD23pos et CD23neg de FL n'expriment pas *DEC2*, même après culture avec le cocktail mimant l'interaction Tfh (**Figure 18A**). *DEC2* n'est pas non plus exprimé dans les données de séquençage de transcriptome de FL disponibles dans la littérature (**Figures 18B**) (Milpied P *et al.*, Nat Immunol, 2018). *DEC2* n'étant pas exprimé, il n'aurait donc pas de rôle dans le développement du FL. En revanche, *DEC1* est exprimé dans les B tumoraux CD23pos et CD23neg, et est induit sous stimulation de type Tfh (**Figure 18A**). Il pourrait donc être associé au développement du FL. Toutefois, on ne le trouve pas dans les données de RNA-seq au niveau cellule unique (**Figure 18C**), probablement parce que la méthode utilisée est moins sensible que celle que nous avons utilisée au laboratoire.

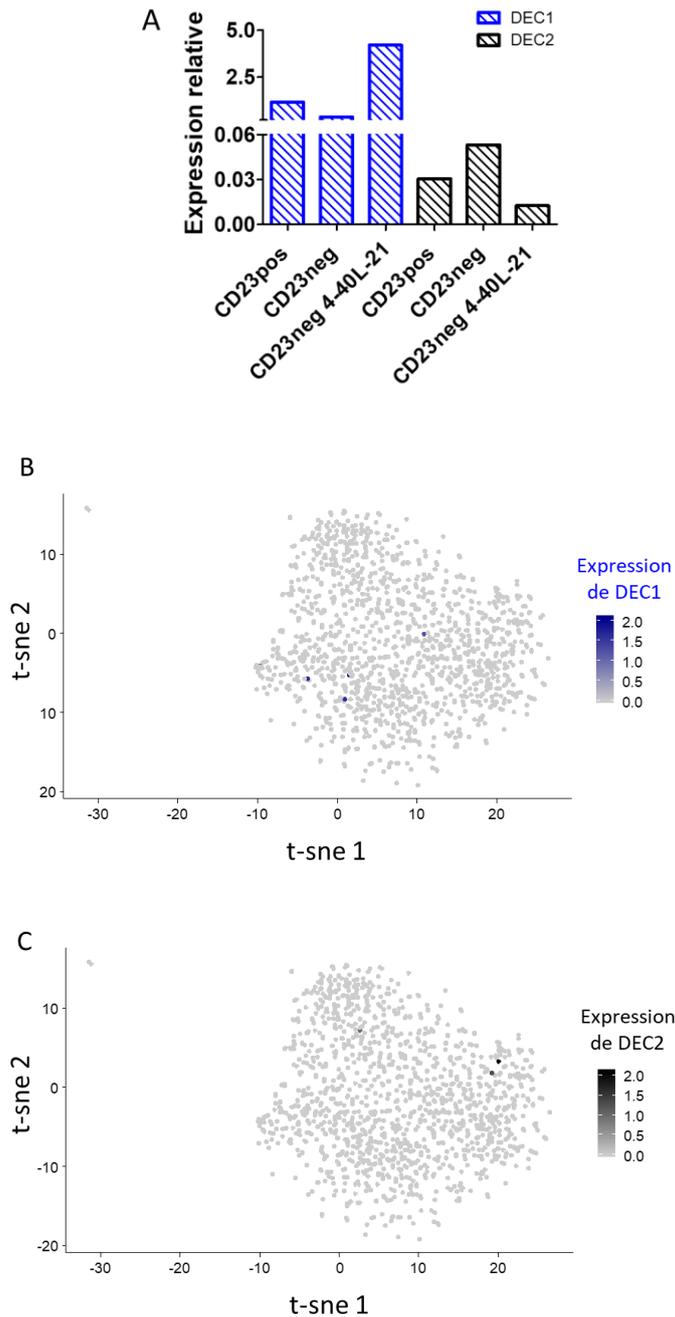


Figure 18 : Expression de DEC1 et DEC2 dans les lymphocytes B tumoraux de lymphome folliculaire. **A.** Analyse de l'expression de l'ARNm de DEC1 et de DEC2 par RT-qPCR. Les données sont exprimées en $2^{-\Delta Ct}$ en utilisant ABL1 comme gène de référence. Les lymphocytes B tumoraux de lymphome folliculaire (FL) CD23pos (CD23pos_FL), CD23neg (CD23neg_FL) et les B tumoraux CD23neg cultivés 24 heures avec du CD40, de l'IL-4 et de l'IL21 expriment DEC1, mais pas DEC2. **B.** t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) des lymphocytes B tumoraux de FL. DEC1 et DEC2 ne sont globalement pas exprimés dans les lymphocytes B tumoraux de FL. **B et C :** Adapté de Milpied P et al., Nat Immunol, 2018.

b. Hypothèses sur les rôles de DEC2 et d'ATX dans la sortie des PB du GC

Dans le cadre d'une étude sur le rôle de DEC2 dans le rythme circadien, les auteurs ont montré dans un modèle murin doublement déficient pour DEC1 et DEC2, une diminution d'expression d'*ENPP2* codant pour l'Autotaxine (ATX) (Baier PC *et al.*, Plos One, 2014). L'une des cibles d'ATX est *CREB3L2* qui intervient dans le transport d'ATX à la membrane plasmique à travers le RE et l'appareil de Golgi, *via* les protéines SEC (Lyu L *et al.*, J Biol Chem, 2017 ; Tomoishi S *et al.*, Sci Rep, 2017) et qui est retrouvé dans la signature plasmablastique que nous avons mis en évidence (**Figure 1**). L'ATX a aussi pour rôle de modifier certains lipides membranaires, comme d'hydrolyser le LPC en LPA (Knowlden S et Georas SN, J Immunol, 2014), et peut interagir avec les héparanes sulfates (Houben AJS *et al.*, J Biol Chem, 2013) comme le SDC4 (Leblanc R *et al.*, Oncotarget, 2018). Cette interaction protéique implique les intégrines (Kanda H *et al.*, Nat Immunol, 2009) et promeut la métastase (Willier S *et al.*, Biol Cell, 2013 ; Leblanc R *et al.*, Oncotarget, 2018).

De nombreuses études s'intéressent au rôle d'ATX dans la migration des lymphocytes. Ainsi, l'interaction entre le LPC (produit par ATX) et ICAM1 est nécessaire à la bonne localisation des lymphocytes B spléniques (Rieken S *et al.*, J Biol Chem 2006). Toutefois, en fonction du récepteur impliqué, le LPA peut soit bloquer la migration des lymphocytes T, soit la faciliter, notamment en induisant l'expression de MMP et la polymérisation de l'actine dans le cytoplasme. Cet effet est dose-dépendant et est plus important en présence de CXCL12 et de CCL21 (Zheng Y, *et al.*, J Immunol, 2001 ; Kanda H *et al.*, Nat Immunol, 2009). Par ailleurs, il a été montré que l'ATX est fortement exprimée dans les HEV et qu'elle est produite par les cellules endothéliales.

L'ensemble de ces éléments nous a amené à supposer que DEC2 pourrait réguler la migration des PB et/ou le maintien des PC dans leur niche médullaire, notamment *via* ATX et le CD138. En effet, notre RNAseq révèle que le gène *ENPP7* qui ressemble fortement à *ENPP2*,

est induit par *DEC2*. Ce gène est peu décrit dans la littérature, mais une étude le mentionne dans un contexte d'invasion ATX-dépendante des cellules tumorales de mélanome (Banerjee S *et al.*, J Med Chem, 2017). Ce gène serait induit par *DEC2*, au même titre que d'autres gènes impliqués dans les modifications des lipides membranaires et qui ont les variations d'expression les plus élevées (*PLA2G3*, *ARSH*). D'autres gènes décrits dans la migration cellulaire sont également réprimés en l'absence de *DEC2*, tels que *MMP9*, *SIGLEC7*, et *LAMTOR2* suggérant là encore un rôle de *DEC2* dans la migration, et particulièrement dans la sortie des PB des OLS *via* les HEV et leur migration dans la moelle osseuse.

Afin de confirmer ou d'infirmer le rôle de *DEC2* dans la migration des PB, nous pourrions envisager de réaliser des tests de migration des cellules de lignées de MM dans un premier temps, puis des PB d'amygdales ou obtenus *in vitro* dans un second temps et n'exprimant pas *DEC2*. Ces expériences pourraient être réalisées dans des chambres de Boyden avec du CXCL12 et de l'ATX dans le puits inférieur pour attirer les PB (Hargreaves DC *et al.*, J Exp Med, 2001). Si l'hypothèse était validée, nous devrions donc observer un blocage de la migration des PB en absence d'expression de *DEC2*.

c. Hypothèses sur les rôles de *DEC2* et du *CD138* dans le maintien des PC dans la niche médullaire et de leurs rôles dans le MM

Nous avons montré que *DEC2* commence à s'exprimer dans les précurseurs de PB dans le GC (**Figure 1**) et que son expression augmente jusqu'au stade PC. De plus, *DEC2* est exprimé dans certaines lignées de MM (**Figure 4**), ce qui suggère qu'il pourrait avoir un rôle dans le fonctionnement normal du PB et/ou dans sa pathologie. Nos analyses *in silico* des données de séquençage au niveau cellule unique de PC normaux et pathologiques (Ledergor G *et al.*, Nat Med, 2018) ne révèlent pourtant qu'une faible, voire une absence d'expression de *DEC2* dans les PC normaux, les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS), les myélomes multiples (MM) ou les amyloses à chaîne légère, probablement parce que la

technique utilisée n'est pas assez sensible pour détecter les gènes faiblement exprimés (**Figure 19**).

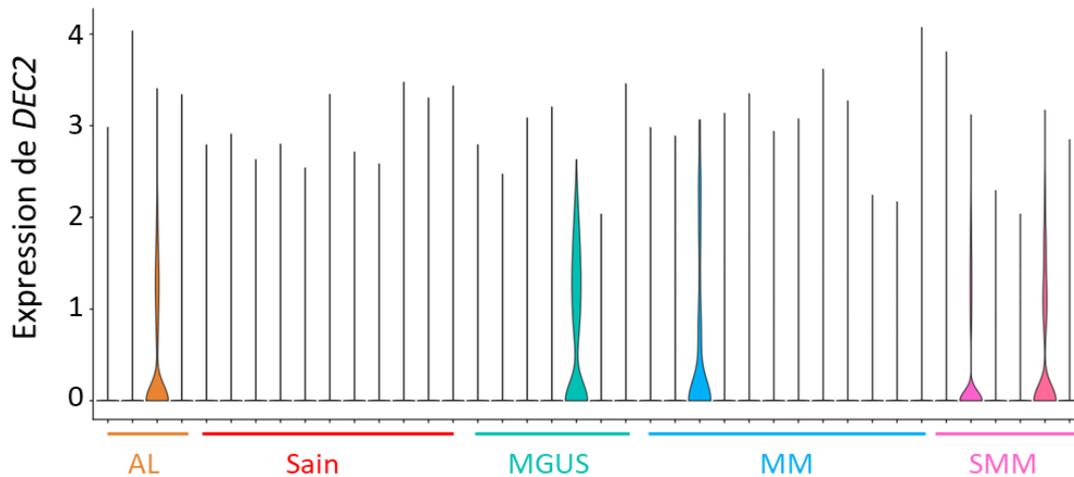


Figure 19 : Expression de DEC2 dans les plasmocytes de moelle osseuse issus de patients sains ou atteints de myélomes. Sain = donneurs sains, Individus asymptomatiques : MGUS = Gammopathie monoclonale de signification indéterminée, SMM = Myélome multiple indolent ; Individus symptomatiques : AL = Amylose à chaîne légère, MM = myélome multiple. Données obtenues par séquençage de l'ARN au niveau cellule-unique sur Illumina, issues de Ledergor G et al., Nat Med, 2018.

Le CD138 est un des principaux marqueurs des PC. Il est notamment impliqué dans la rétention des facteurs solubles permettant leur survie. Il a largement été décrit pour promouvoir la migration cellulaire (Péterfia B et al., Plos One, 2012 ; Pasqualon T et al., Mol Cell Res, 2016 ; Chute C et al., Breast Cancer Res, 2018) ou la bloquer, notamment en favorisant l'adhésion des cellules (Zong F et al., Plos One, 2011 ; Averbek M et al., Exp Dermatol, 2017 ; Wang S et al., BMC Cancer, 2019). Dans le MM, le CD138 peut être clivé lors de l'initiation de l'apoptose (Jourdan M et al., Br J Haematol, 1998), ce qui conduit à une augmentation du CD138 soluble, qui est associée à un mauvais pronostic (Seidel C et al., Blood, 2000). Les cellules tumorales exprimant fortement le CD138 sont plus prolifératives et survivent mieux que les cellules CD138neg, qui sont décrites comme étant plus mobiles (Akhmetzyanova I et al., Leukemia, 2020). Nos résultats préliminaires sur la lignée de MM U266 montrent qu'en absence de DEC2, les cellules semblent légèrement diminuer l'expression du CD138 (**Figure 20**). De plus, cet effet pourrait impliquer le gène *DEK*, qui semble être inhibé par DEC2, et qui a déjà été décrit comme inducteur de la migration

cellulaire, avec un léger mais significatif effet inhibiteur du CD138 (Lee KF *et al.*, Int J Mol Sci, 2019 ; Yu L *et al.*, Oncotarget, 2016). Dans ces conditions, on peut donc penser que DEC2 inhiberait DEK au fur et à mesure de la différenciation des PB en PC, qui lui-même inhiberait le CD138. Ainsi, DEC2 induirait l'expression du CD138 et promouvrait la rétention des PC dans la moelle osseuse, une fois totalement exprimé (**Figure 20**).

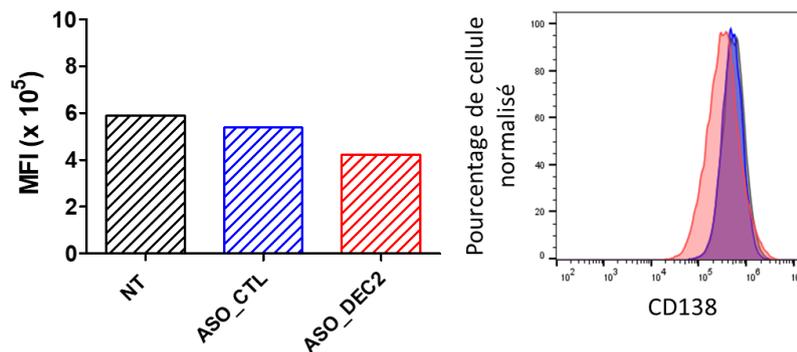


Figure 20 : L'inhibition de DEC2 induit une diminution d'expression du CD138. L'expression du CD138 a été analysée par cytométrie de flux des cellules U266 (NT), cultivées avec l'ASO_CTL ou avec l'ASO_DEC2. MFI = Moyenne d'intensité de fluorescence. Le pourcentage de cellule a été normalisé grâce à la fonction « Normalized to Mode » du logiciel FlowJo.

Il faut noter que *DEC2* n'est pas exprimé dans toutes les lignées cellulaires de myélome multiple, c'est par exemple le cas dans la lignée XG21. On peut émettre l'hypothèse que ces cellules de MM exprimeraient moins fortement le CD138, seraient plus mobiles et donc plus agressives que les lignées exprimant *DEC2*. Dans un autre cadre, et puisque cette lignée est dépendante de l'IL-6 contrairement aux deux autres utilisées, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existerait un lien entre *DEC2*, le CD138 et l'IL-6.

En conclusion, *DEC2* faiblement exprimé favoriserait d'abord la sortie des PB du GC et leur migration par les HEV jusqu'à la moelle osseuse. Une fois exprimé à son maximum, *DEC2* favoriserait ensuite le maintien des PC dans leur niche médullaire (**Figure 21**).

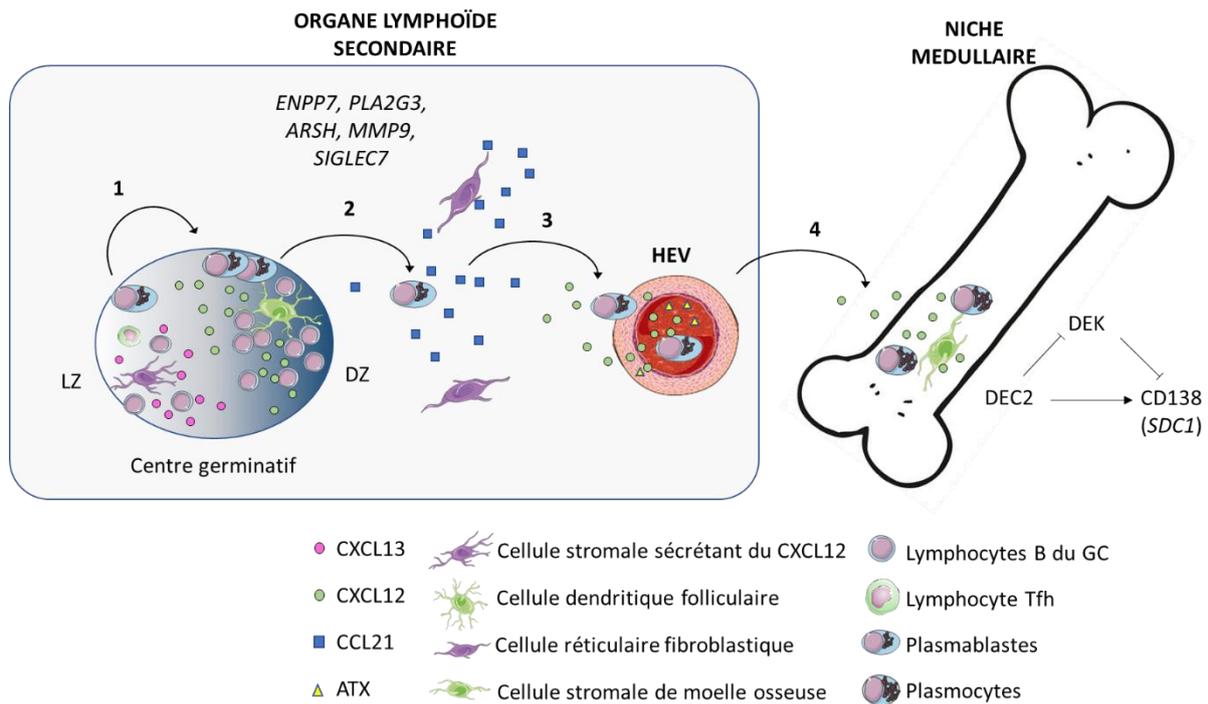


Figure 21 : Schéma illustrant les hypothèses établies sur le rôle DEC2 dans la migration des plasmablastes et le maintien des plasmocytes dans la niche médullaire. **1.** Les plasmablastes (PB) migrent de la zone claire (LZ) (CXCL13⁺) du centre germinatif (GC) jusqu'à la zone sombre (DZ) en suivant le gradient de CXCL12 (produit par les cellules stromales de la zone sombre) avant de quitter le GC. DEC2 est exprimé à ce niveau et induit l'expression d'ENPP7, de PLA2G3, ARSH, MMP9, SIGLEC7 qui facilitent la sortie des PB du GC. **2.** Les PB migrent dans la zone T en suivant le gradient de CCL21 produit par les cellules réticulaires fibroblastiques. **3.** Les PB rejoignent la circulation sanguine en suivant le gradient de CXCL12 et d'ATX, produits par les cellules endothéliales des veinules à endothélium épais (HEV). **4.** Les PB arrivent dans leur niche dans la moelle osseuse et deviennent plasmocytes (PC). Ils expriment encore plus fortement DEC2 qui induit l'expression de SDC1 (CD138) ce qui permet aux PC de retenir les facteurs solubles nécessaires à leur survie dans leur niche. DEC2 inhibe également DEK qui lui-même promeut la migration et bloque l'expression du CD138.

4) Perspectives

Pour augmenter la qualité de notre analyse et confirmer ces résultats, nous avons séquencé l'ARN de PB obtenus *in vitro* de 3 nouveaux donneurs, sans la condition PB_J6. Nous avons avant tout vérifié et validé le saut d'exon 2 dans la condition ASO_DEC2 (**Figure 22**). Ainsi, les PB_J8 et les PB cultivés avec l'ASO_CTL ont un nombre similaire de reads alignés sur les jonctions exon-exon, alors que les PB cultivés avec l'ASO_DEC2 ont moins de reads sur les jonctions 1-2 et 2-3, ils en ont entre les exons 1 et 3, et en ont plus entre les exons 3-4 et 4-5 en comparaison aux deux premières situations, ce qui valide le saut d'exon 2. Les données de séquençage sont actuellement en cours d'analyse.

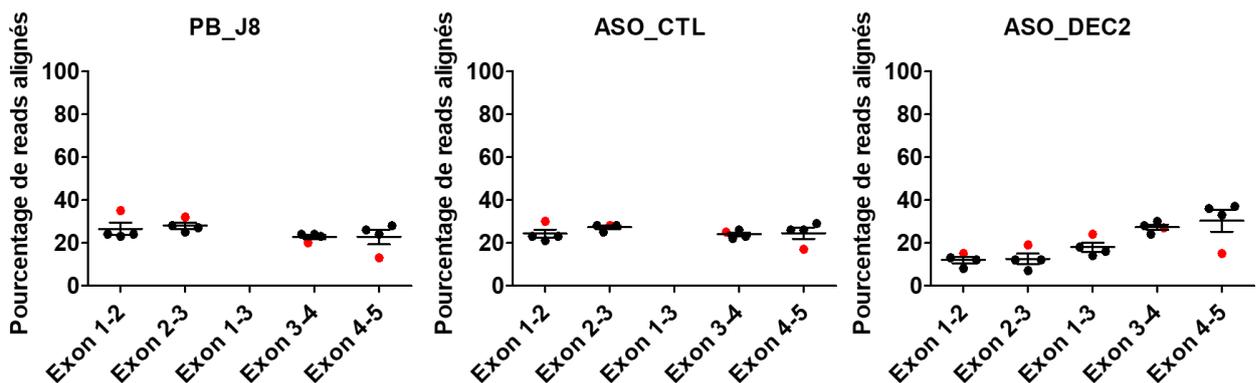


Figure 22 : Validation du saut d'exon 2 dans les plasmablastes obtenus *in vitro* et cultivés avec l'ASO DEC2. Les pourcentages de liaison entre les exons ont été calculés à partir des Sashimi plot obtenus sur IGV. Les 3 derniers donneurs séquencés sont en noir, le donneur séquencé précédemment est en rouge. Le pourcentage de liaisons entre les exons a été calculé en prenant en compte la totalité des liaisons exon-exon sur DEC2.

De plus, nous pourrions envisager des tests de migration et d'adhésion des PB primaires ou de cellules de MM pour répondre à nos questionnements sur le rôle de DEC2 dans la sortie des PB des OLS.

Enfin, même si nous n'avons pas mis en évidence des fonctions cellulaires induites ou réprimées par DEC2, nous avons tout de même montré que l'absence de DEC2 impacte l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions (hypoxie, cycle cellulaire ...), ce qui suggère un rôle de DEC2 dans ces voies. Afin de confirmer ou d'infirmer les précédentes hypothèses et de déterminer le(s) rôle(s) de DEC2 dans les PB/PC, nous pourrions coupler nos analyses du transcriptome avec un CHIP-seq de DEC2 dans les PB.

PROJET 3 :

Comparaison des populations
CD23pos et CD23neg tumorales de
lymphome folliculaire.

Introduction

Le FL est un cancer indolent dérivé des lymphocytes B du GC, dans les lymphocytes B tumoraux sont principalement caractérisés par la translocation $t(14:18)(q32;q21)$ qui provoque une surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL2 et donc une survie exacerbée (Rabkin CS *et al.*, JNCI Monographs, 2008 ; Roulland S *et al.*, Adv in Immunol, 2011). Cette translocation est accompagnée d'autres événements génétiques, dont souvent des mutations des gènes modifiant la chromatine (*KMT2D*, *CREBBP*, *EZH2*) (Green MR *et al.*, Blood, 2018). L'expression du CD23 par les B tumoraux est très hétérogène avec des patients totalement CD23neg et d'autres exprimant de manière variable le CD23 (Olteanu H *et al.*, Am J Clin Pathol, 2011). Nos précédents travaux ont révélé que l'extinction de la voie STAT6/CD23 était essentielle pour la différenciation des CC en PB. Nous avons donc émis l'hypothèse que les B tumoraux CD23neg avaient des capacités de différenciation en PC supérieures aux cellules exprimant le CD23, avec une voie STAT6/CD23 éteinte dans ces cellules. Nous avons également émis l'hypothèse que les B tumoraux CD23pos et CD23neg étaient issus de clones différents, ce qui pourrait également expliquer les différences en terme de différenciation.

Matériels et Méthodes

Echantillons de lymphome folliculaire et isolation des lymphocytes B tumoraux

Vingt suspensions cellulaires congelées de patients atteints de FL ont été analysées par cytométrie de flux. Parmi ces 20 suspensions, 17 provenaient de patients différents et 3 correspondaient à des rechutes de FL. Les lymphocytes B tumoraux ont été purifiés par sélection négative avec des billes magnétiques avec le B cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) selon les instructions fournies par le fabricant. Les cellules ont été isolées avec le programme « deplete sensitive » sur l'AutoMACS. Les lymphocytes B ont ensuite été triés avec le cytomètre trieur BD FACS Aria (BD Biosciences). Les anticorps utilisés pour le tri sont listés dans le **Tableau 1**. Les lymphocytes B tumoraux ont été définis comme : CD20⁺ CD10⁺ CD38⁺ IgD⁻ et triés selon la restriction de la chaîne légère.

Pour les analyse de cytométrie de flux, les données ont été acquises sur un cytomètre CytoFLEX (Beckman Coulter) et analysées avec le logiciel FlowJo.

Cible de l'anticorps	Fluorochrome	Clone	Fabricant	Référence
CD20	APC-A750	B9E9	Beckman Coulter	A66331
CD38	PE	T16	Beckman Coulter	IM1832U
CD10	PC7	HI10a	BD Biosciences	565282
IgD	Biotine	IA6-2	BD Biosciences	555777
IgD	FITC	IA6-2	BD Biosciences	555778
Ig λ Light Chain	PerCP-Vio700	IS7-24C7	Miltenyi Biotec	130-105-456
Ig κ Light Chain	PerCP-Vio700	IS11-24D5	Miltenyi Biotec	130-105-497
CD23	APC	M-L233	BD Biosciences	558690
CD138	BV421	MI15	BD Biosciences	562935

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie de flux

Culture des lymphocytes B tumoraux

Toutes les cultures ont été réalisées dans un milieu complet contenant du RPMI 1640 (Invitrogen) avec 10% de SVF (Biowest) et 1% d'antibiotiques (Invitrogen). Les lymphocytes B tumoraux ont été cultivés à 8×10^5 cellules/ml pendant 24 à 48 heures et stimulés avec 10

ng/ml d'IL-4 (R&D Systems), 200 ng/ml de CD40L humain recombinant soluble (NCI), 50 µg/mL d'IL-21 (Miltenyi Biotech), 50 U/ml d'IL-2 (Proleukin Novartis), et/ou 12,5 ng/ml d'IL-10 (R&D Systems).

Extraction d'ADN génomique et d'ARN et transcription inverse

L'ADN génomique a été extrait avec le AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen) selon les instructions fournies par le fabricant. L'ARN a été extrait avec le NuclioSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel) en suivant les instructions fournies par le fabricant. L'ARN a ensuite été rétro-transcrit en ADNc avec le reverse transcription master mix (Fluidigm, Sunnyvale, CA, USA). L'ADNc a été pré-amplifié avec le Fluidigm Preamp Master mix et des sondes TaqMan listées dans le **Tableau 2** (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

Gène cible	Référence								
AICDA	HS 00221068_m1	CCND1	HS 00765553_m1	MKI67	HS 01032443_m1	CDK4	HS 01565683_g1	FAS	HS 00163653_m1
CCND2	HS 00153380_m1	NFKB1	HS 00765730_m1	CDK6	HS 01026371_m1	STAT5B	HS 00560035_m1	FASLG	HS 00899442_m1
ATF5	HS 01119208_m1	CCNE1	HS 01026536_m1	NLRP14	HS 00698226_m1	CDKN1A	HS 00355782_m1	STAT6	HS 00598618_m1
ATF6	HS 00232586_m1	CD21	HS 00153398_m1	NLRP7	HS 00373683_m1	CDKN1B	HS 00153277_m1	TET1	HS 00286756_m1
ATG5	HS 00169468_m1	CDC25A	HS 00947994_m1	NR4A3	HS 00545009_g1	CDKN2B	HS 00793225_m1	TET2	HS 00325999_m1
BACH2	HS 00222364_m1	IGF1	HS 01547656_m1	PAX5	HS 00277134_m1	CDKN2C	HS 00176227_m1	TET3	HS 00379125_m1
BCL2	HS 00236808_s1	IL-2 RA	HS 00907779_m1	PIM2	HS 00179139_m1	CIITA	HS 00172106_m1	TGFBR1	HS 00610320_m1
BCL2L1	HS 00236329_m1	IL-21R	HS 00222310_m1	POU2AF1	HS 01573371_m1	MYC	HS 00153408_m1	TLR4	HS 00152939_m1
BCL2L11	HS 00708019_s1	IL-4 R	HS00166237_m1	PPIB	HS 00168719_m1	CREB3L2	HS 01592193_m1	TLR7	HS 01933259_s1
BCL6	HS 00153368_m1	IL-6 R	HS 01075666_m1	PRDM1	HS 00153357_m1	CXCR4	HS 00607978_s1	TNF	HS 00174128_m1
DEC1	HS 00186419_m1	IRF4	HS 00180031_m1	RPN2	HS 00955802_m1	DICER1	HS 00229023_m1	TNFR1	HS 01042313_m1
DEC2	HS 00229146_m1	IRF8	HS 00175238_m1	SDC1	HS 00896423_m1	DNMT1	HS 00945875_m1	TP53	HS 01034249_m1
CASP1	HS00354836_m1	LMO2	HS 00153473_m1	SMAD3	HS 00969210_m1	DNMT3a	HS 01027166_m1	XBP1	HS 02856596_m1
CASP3	HS 00234387_m1	LTB	HS 00242737_m1	SMAD7	HS 00998193_m1	DNMT3b	HS 00171876_m1	XBP1s	HS 03929085_g1
CASP6	HS 00154250_m1	MAPK1	HS 01046830_m1	SOCS1	HS 00705164_s1	E2F1	HS 00153451_m1	XIAP	HS 00236913_m1
CAV1	HS 00971716_m1	MAPK3	HS 00385075_m1	SOCS2	HS 00919620_m1	ERN1	HS 00176385_m1	SOCS5	HS 00751962_s1
CCL22	HS 00171080_m1	MCL1	HS 00172036_m1	SOCS3	HS 02330328_s1	ESR1	HS 00174860_m1	SPIB	HS 00162150_m1
CCNB1	HS 00259126_m1	MEF2B	HS 01021285_m1	FCER2	HS 00233627_m1	EZH2	HS 00172783_m1	STAT3	HS 00234174_m1
CCNB2	HS 01084593_g1	MEF2C	HS 00231149_m1	FOXO3	HS 00818121_m1	HIF1a	HS 00153153_m1	STAT4	HS 01028017_m1
STAT5A	HS 00559643_m1								

Tableau 2 : Liste des sondes TaqMan utilisées pour les qPCR

Analyses par qPCR cellule-unique et BULK

Les qPCR au niveau cellule-unique ont été réalisées conformément aux recommandations du fabricant en utilisant le système C1 Single-Cell dans des plaques microfluidiques 96.96 à petites cellules (5-10 μm) (Fluidigm). Le nombre de cellules par puits a été déterminé par microscopie pour éliminer les doublets et les puits vides. Après lyse cellulaire, transcription inverse et pré-amplification, des qPCR multiplexées ont été réalisées avec des sondes TaqMan (**Tableau 2**) et le TaqMan Gene Expression Master Mix dans des plaques IFC 96.96 Dynamic Array en utilisant le système Fluidigm BioMark HX. Les valeurs aberrantes ont été supprimées à l'aide du package R FluidigmSC (Fluidigm SINGuLAR Analysis Toolset, R package version 3.6.2). Les expressions géniques ont été converties sous la forme : $\text{expression} = 24 - \text{Ct}$.

Les qPCR BULK ont été réalisées de la même manière que les qPCR cellule-unique dans des plaques IFC 48.48 Dynamic Array en utilisant le système Fluidigm BioMark MX. Les expressions géniques ont été converties en $2^{-\Delta\text{Ct}}$ en utilisant le gène *ABL1* comme référence.

Analyse du réarrangement des gènes des immunoglobulines

Les régions FR1, FR2 et FR3 des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGVH) ont été amplifiées en utilisant la stratégie BIOMED-2 (Leukemia (2003) 17:2257-2317) avec les amorces FR1, FR2 et FR3. L'amorce reverse consensus (JH) a été couplée avec un fluorochrome FAM. Les produits de PCR dénaturés ont ensuite migré sur le séquenceur à capillaires AbiPrism 3130xl (Applied Biosystems). Les échantillons ont ensuite été analysés sur le logiciel GeneMapper (Applied Biosystems).

Analyse des mutations somatiques par séquençage capture nouvelle génération

La stratégie capture ciblée SureSelect (Agilent) a été réalisée sur un panel de 43 gènes décrits précédemment (Bohers E *et al*, Haematologica, 2015 ; **Tableau 3**). Les échantillons ont été séquencés sur une plateforme Illumina HiSeq 1500 (Illumina) en paired-end. Le logiciel SureCall (Agilent) a été utilisé pour la détection de variants d'expression. Les bibliothèques ont été réalisées conformément aux protocoles du fabricant pour SureSelectXT Target Enrichment System pour Illumina Paired-End Sequencing library, Version 1.6, 2013, d'Agilent. 200 à 500

ng d'ADN génomique ont été fragmentés sur un ultrasonateur M220 Instrument Covaris pour atteindre un pic cible de 150 à 200 pb (réglages : facteur d'utilisation, 35% ; pic Puissance incidente, 57; cycles par rafale, 200; Temps de traitement de l'ADN, 240 secondes; bain d'eau température, 4 ° C) (Covaris, Woburn, MA). La librairie d'ADN marquée par l'adaptateur a été purifiée et amplifiée, puis 500 à 750 ng de chaque librairie ont été hybridés en utilisant la capture SureSelectXT pendant 18 heures à 65°C. Les librairies résultantes ont été récupérées en utilisant des billes de Streptavidine magnétiques et une amplification PCR post-capture (10 cycles) a été réalisée. Les librairies finales ont été quantifiées et la qualité a été évaluée sur le Bioanalyzer High (Agilent). Les librairies ont été regroupées à une concentration finale de 2 nM. Le séquençage des librairies a été réalisée sur un instrument MiSeq (plateforme Illumina, Biogenouest Genomics / Human & Centre de Génomique Environnementale de Rennes (Biosit / OSUR)) selon le protocole du fabricant. Après avoir dénaturé les librairies en utilisant du NaOH à 0,2 N, les librairies ont été diluées à 20 pM dans le tampon d'hybridation d'Illumina. La concentration finale utilisée des librairies allant de 8 à 10 pM a été utilisée pour effectuer la génération de cluster et le séquençage sur une Flow Cell standard et un réactif MiSeq Kit v3 150 cycles (2 × 75 cycles). Tous les runs étaient de haute qualité avec une moyenne de plus de 89% des bases séquencées avec un score Phred Q> = 30. Le logiciel Agilent SureCall-v3.5 a été utilisé pour le traitement des données. Les lectures de séquençage brutes étaient cartographiées sur le génome humain hg19 (GRCh37). L'étape d'alignement avec SureCall a été limitée uniquement aux régions des gènes ciblés et est réalisé avec GeneAligner v3.0 en utilisant BWA-Outils MEM et BWA et la variante d'appel avec l'appelant SNPP SNP développé en interne (<http://www.agilent.com/genomics/surecall>). Le filtrage SNP entier du workflow SureCall, la classification et les annotations des mutations et toutes les données ont été publiées précédemment (Desmots *et al*, Clin Cancer Res, 2019).

Gène	Région	Référence Ref Seq
B2M	Tous les Exons	NM_004048
BRAF	Exon 15	NM_004333.4
CARD11	Exon 4 à 9	NM_032415.4
CD79A	Exon 4 et 5	NM_001783
CD79B	Exon 5 et 6	NM_000626
CDKN2A	Tous les Exons + régions UTR	NM_000077 ; NM_058195 ; NM_058197
CDKN2B	Tous les Exons + régions UTR	NM_004936
CIITA	Tous les Exons	NM_000246
CREBBP	Tous les Exons	NM_004380
EP300	Tous les Exons	NM_001429.3
EZH2	Exon 16	NM_152998
FOXO1	Exons 1 et 2	NM_002015
GNA13	Tous les Exons	NM_006572
ID3	Tous les Exons	NM_002167
MEF2B	Tous les Exons	NM_001145785
MLL2 (KMT2D)	Tous les Exons	NM_003482
MYC	Tous les Exons + régions UTR	NM_002467
MYD88	Exons 2 à 5	NM_001172567
NOTCH1	Exons 26 à 28 + Exon 34	NM_017617
NOTCH2	Exons 26 à 28 + Exon 34	NM_024408
TCF3	Exons 17 et 18	NM_001136139
TNFAIP3	Tous les exons	NM_006290
TNFRSF14	Tous les exons	NM_003820
TP53	Tous les exons sauf l'exon 1	NM_000546
BCL2	Exon 2	NM_000633
CD58	Exon 3	NM_001779
IPTKB	Exon 2	NM_002221
IRF4	Exons 2 et 3	NM_001195286
MFHAS1	Exon 1	NM_004225
PIM1	Tous les exons	NM_001243186
PRDM1	Tous les exons	NM_001198
SOCS1	Exon 2	NM_003745
STAT6	Exons 8 à 14	NM_001178081
XPO1	Exon 15	NM_003400
BTK	Tous les exons	NM_000061,2
DUSP2	Exon 2 à 4	NM_004418
HIST1H1C	Exon 1	NM_005319
IGLL5	Exon 1	NM_001178126
SASH1	Exons 15 et 18	NM_015278
SLC22A16	Tous les exons	NM_033122
DNMT3A	Exons 22 à 23	NM-022552
DNMT3B	Exons 22 à 23	NM-006892
PLCG2	Exons 32 à 33	NM-002661

Tableau 3 : Liste des gènes analysés par séquençage capture nouvelle génération. Il s'agit des gènes les plus fréquemment mutés dans le lymphome folliculaire. Cette liste a fait l'objet du développement d'un panel dédié à la recherche des mutations somatiques dans les lymphoproliférations au laboratoire d'hématologie du CHU de Rennes, Fabienne Desmots-Loyer.

Résultats

D'abord, nous avons sélectionné différents patients atteints de FL en fonction de l'expression du CD23 (**Tableau 4**) et trié les B tumoraux CD23pos et/ou CD23neg (CD20⁺ CD38⁺ IgD⁻ IgLk⁺ ou IgL_λ⁺). Puis, nous avons analysé les mutations des gènes les plus fréquemment mutés dans les FL, par la technologie de capture, suivi de séquençage haut-débit (sélection d'un panel de 43 gènes, **Tableau 3**), dans la population CD23pos et la population CD23neg pour l'un d'entre eux (**Figure 1**). Ce patient porte des mutations sur deux gènes sur les 43 étudiés, et ce dans les deux populations CD23neg et pos. D'abord, on observe des mutations dans le gène *CREBBP*, ce qui est intéressant puisque les mutations perte de fonction de ce gène sont connues pour promouvoir l'expansion des cellules tumorales hors du GC, notamment par le biais du CD40 (Hashwah H *et al*, PNAS, 2017). Etant donné que le CD40 promeut l'expression du CD23 (Résultats, projet 1), on aurait pu s'attendre à un pourcentage de cellules CD23pos élevé. Pourtant, le patient ne présente qu'un faible pourcentage de B tumoraux CD23pos (4,2%, **Tableau 4**), ce qui suggère l'intervention d'autres mécanismes de régulation. Ensuite, ce patient porte une mutation du gène *TNFRSF14*, plus prononcée dans les cellules CD23neg. Les mutations perte de fonction de ce gène améliorent l'intégration des signaux provenant des lymphocytes Tfh (Mintz MA *et al*, Immunity, 2019 ; Turqueti-Neves A *et al*, Eur J Immunol, 2014), ce qui va dans le sens de notre hypothèse de départ, avec des B tumoraux CD23neg qui auraient la possibilité de se différencier plus facilement en PC que les CD23pos.

Patient	Genre	Age	Statut	Grade	FLIPI	% CD23+
Patient #1	F	57	Diagnostic	1-2	0	4,2
Patient #2	F	69	Diagnostic	1-2	-	49,3
Patient #2		73	Progression	1-2	3	12,9
Patient #3	M	50	Progression	1-2	2	44,5
Patient #4	M	63	Diagnostic	1-2	2	20,2
Patient #4		73	Progression	3a	2	7,67
Patient #5	F	49	Progression	1-2	1	0
Patient #6	M	56	Progression	1-2	-	13,1
Patient #7	F	55	Diagnostic	-	-	0
Patient #8	M	56	Diagnostic	1-2	1	0
Patient #9	M	50	Diagnostic	1-2	1	2,3
Patient #10	M	60	Rechute	3a	1	0
Patient #11	M	41	Diagnostic	1-2	2	0
Patient #12	M	55	Progression	1-2	0	20,3
Patient #13	F	70	Diagnostic	1-2	1	24,1
Patient #14	M	50	Rechute	1-2	2	0
Patient #15	F	60	Diagnostic	3a	0	9,86
Patient #16	M	50	Progression	1-2	1	4,98
Patient #17	F	42	Progression	3a	1	0
Patient #17		43	Rechute	1-2	1	0

Tableau 4 : Caractéristiques des patients dont les B tumoraux ont été utilisés pour les analyses. Les patients soulignés en rose sont ceux qui ont été sélectionnés pour l'analyse de la clonalité, les analyses de transcriptome et la culture cellulaire. FLIPI = Index pronostique international du lymphome folliculaire.

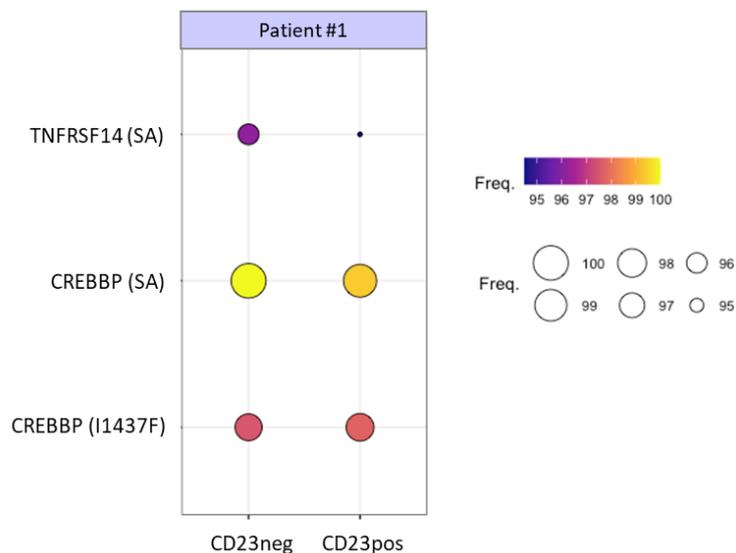


Figure 2 : Profil mutationnel du Patient #1. Données obtenues par séquençage capture nouvelle génération sur les populations CD23neg et pos du Patient #1 atteint de lymphome folliculaire.

Ensuite, nous avons analysé l'expression de 47 gènes impliqués dans la différenciation plasmocytaire et dans la survie par RT-qPCR multiplexes (**Figure 2**) pour un nouveau patient (Patient #2). Globalement, les gènes de l'identité B sont légèrement plus exprimés dans les cellules CD23neg que dans les CD23pos (**Figure 2A**), et les gènes de l'identité PC sont très faiblement exprimés, et ce, de manière similaire dans les 2 populations (**Figure 2B**). De plus, les cellules CD23pos et CD23neg expriment de manière équivalente les gènes impliqués dans la mort, tels que la *CASP3* et *TP53*. Toutefois, la population CD23pos semble plus prône à mourir que la CD23neg, qui surexprime *BCL2* (**Figure 2C**).

Concernant la voie IL-4, nous montrons que les gènes de la voie de signalisation STAT6 (*IL-4R* et *STAT6*) sont exprimés à la fois dans les B tumoraux CD23pos et CD23neg, par contre, seules les CD23pos surexpriment *FCER2* (codant pour le CD23), comme attendu. Ces cellules surexpriment également le gène *CCL22*, dont la protéine est une chimiokine induite par l'IL-4 et le CD40L, et est également connue pour être augmentée dans le FL (Rawal S *et al*, J Immunol, 2013) (**Figure 2D**).

Enfin, nos résultats montrent une expression plus importante du récepteur au CXCL12 : le CXCR4 par les B tumoraux CD23neg, ce qui permet aux PB de quitter le GC en condition normale. Ce résultat pourrait traduire là aussi, d'une progression plus importante dans la différenciation plasmocytaire des CD23neg comparés aux cellules CD23pos (**Figure 2E**).

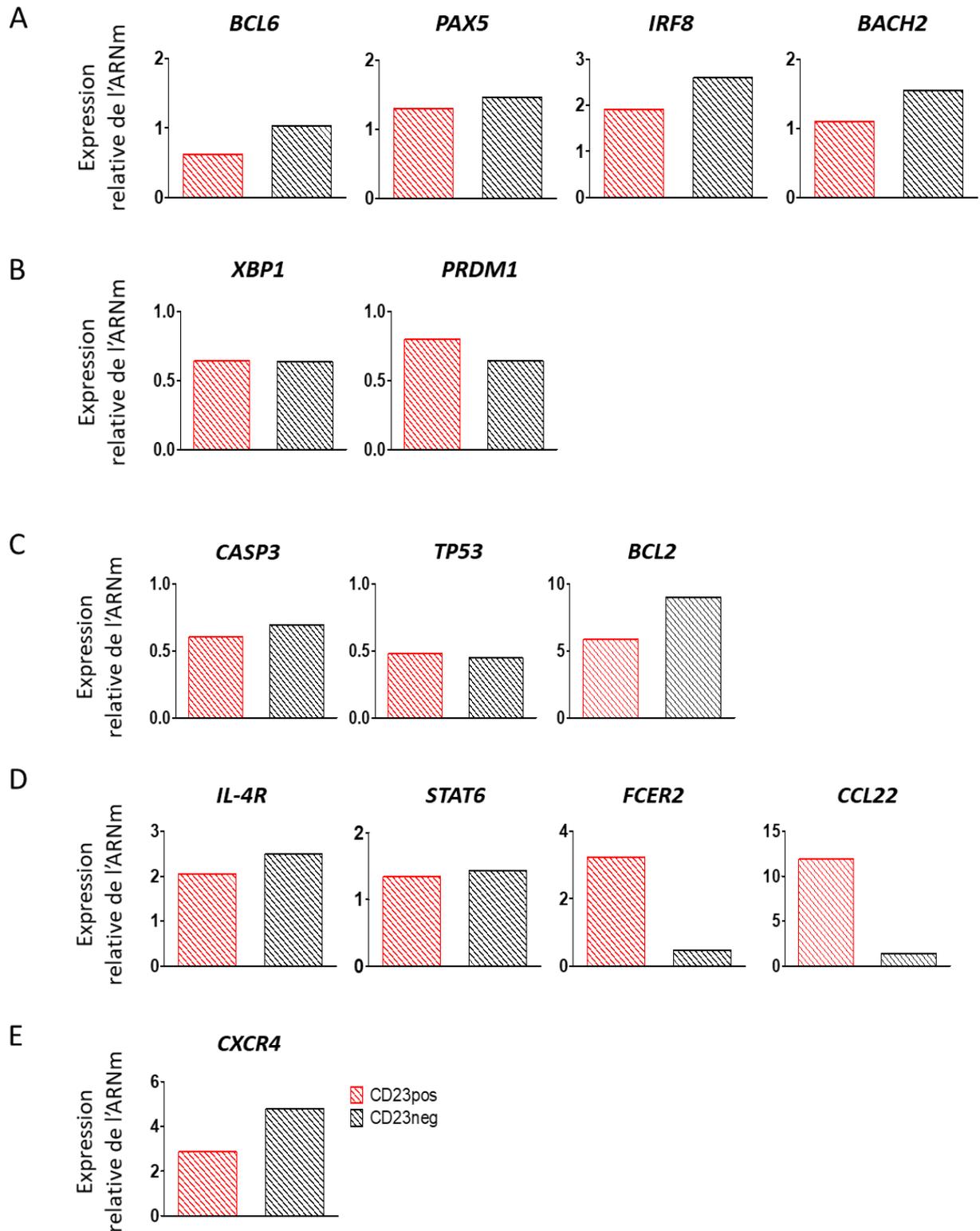


Figure 3: Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation plasmocytaire, dans les B tumoraux de FL CD23pos et CD23neg. **A.** Analyse de l'expression des gènes de l'identité B, **B.** de l'identité plasmocytaire, **C.** impliqués dans la viabilité cellulaire, **D.** la voie IL-4 (*IL-4R*, *STAT6*, *FCER2*), **D.** l'expression de *CXCR4*. Données exprimées en expression relative de l'ARNm en utilisant le $2^{-\Delta Ct}$ et *ABL-1* comme gène de référence.

L'analyse de l'expression de 93 gènes au niveau cellule-unique pour ce même patient, révèle d'autres gènes différemment exprimés entre les B tumoraux CD23pos et CD23neg : *FCER2*, *CIITA*, *MS4A1*, *IL-21R*, *MEF2C*, *LMO2*, *STAT6* et *CASP3* (**Figure 3**). Ainsi, *STAT6* et *FCER2* sont plus exprimés dans la population CD23pos, mais pas *IL-4R* ce qui valide les résultats obtenus en BULK, et reflète la capacité de réponse des cellules CD23pos à l'*IL-4* qui est augmenté dans le microenvironnement tumoral (Pangault C *et al*, Leukemia, 2010). D'autres gènes déjà identifiés dans la littérature comme jouant un rôle dans le FL sont également trouvés différemment exprimés entre les deux populations : *CIITA* ; *CASP3* (même si non identifié en BULK) ; *MS4A1* codant pour le CD20, *LMO2* (Natkunam Y *et al*, Blood, 2007), *MEF2C*, connu pour interagir avec *EP300* (Carbone A *et al*, Nat Rev Dis Primers, 2019) et *IL21R* (De Toter D *et al*, Exp Hematol, 2010).

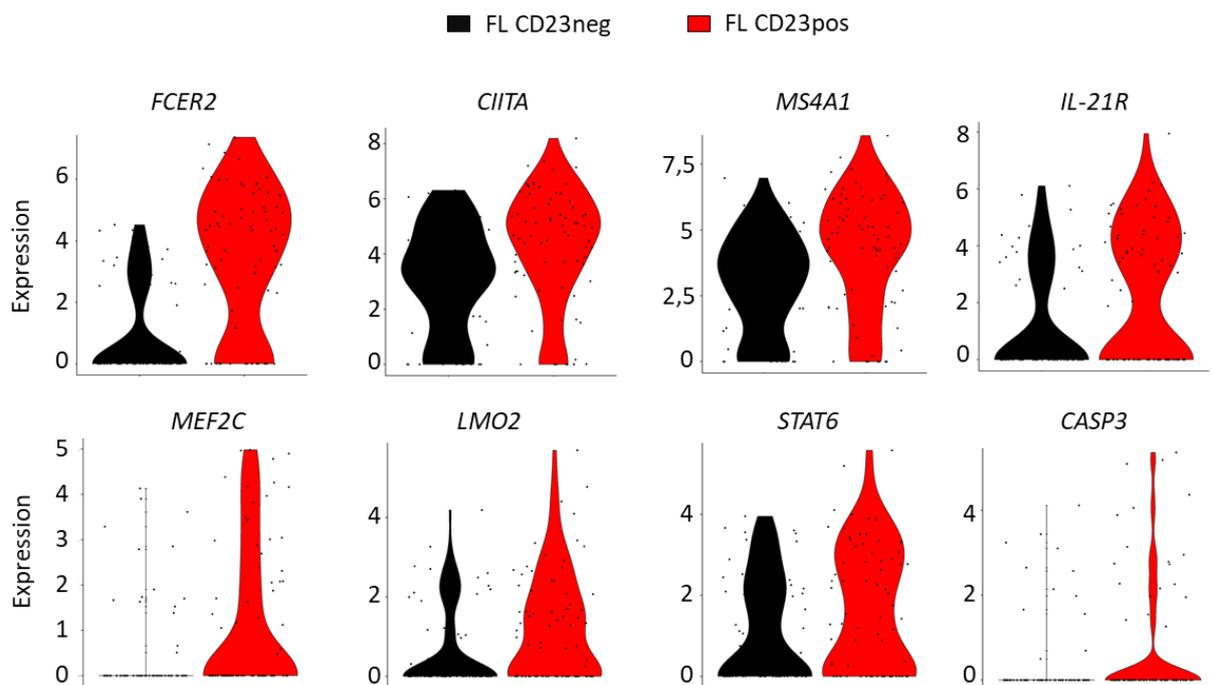


Figure 3: Gènes différemment exprimés entre les B tumoraux de lymphome folliculaire CD23pos et CD23neg. Violin plots de l'expression des gènes différemment exprimés entre les deux populations, déterminés par qPCR au niveau cellule-unique.

Nos résultats préliminaires de qPCR au niveau cellule unique mettent également en évidence l'hétérogénéité qui existe au sein même des B tumoraux. Comme attendu, le gène clé de la différenciation plasmocytaire *PRDM1* ne s'exprime dans aucune cellule. En revanche, les B tumoraux expriment différemment des gènes impliqués dans la différenciation (*BCL6*, *IRF8*, *IRF4*, *XBP1s*) ; dans la prolifération (*MYC*, les cyclines (*CCNE1*, *CCNB1*, *CCND1*), les CDK (*CDK4*, *CDK6*), les MAPK (*MAPK1*, *MAPK3*)) et dans la survie ou la mort (*BCL2*, *TP53*, *NFKB1*, *FAS*) suggérant que les cellules B de FL ne sont pas toutes bloquées au même stade de leur progression vers la différenciation, contrairement à ce qui a été précédemment décrit dans la littérature (Basso K et Dalla-Favera R, Nat Rev Immunol, 2015 ; Victora GD *et al*, Blood, 2012) (**Figure 4**).

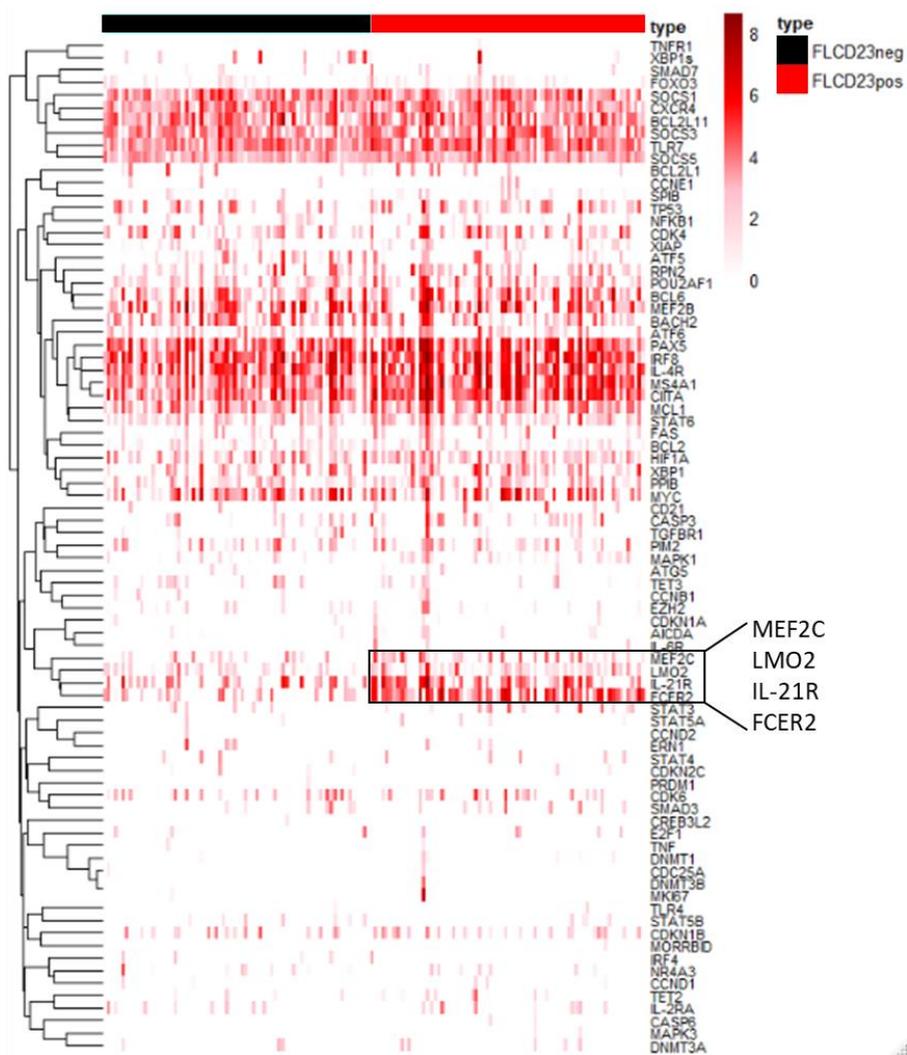


Figure 4 : Les B tumoraux CD23pos et CD23neg de FL expriment de manière hétérogène certains gènes impliqués dans la différenciation en PC. Analyse au niveau cellule unique de l'expression de 93 gènes par qPCR dans des B tumoraux CD23pos et CD23neg.

Nous nous sommes ensuite demandés si les lymphocytes B tumoraux CD23pos et CD23neg étaient issus de clones différents. Le séquençage des régions FR1, FR2 et FR3 des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (Patient #2) (**Figure 5**) ne révèle pas de différence entre les deux populations, suggérant qu'elles dériveraient du même clone.

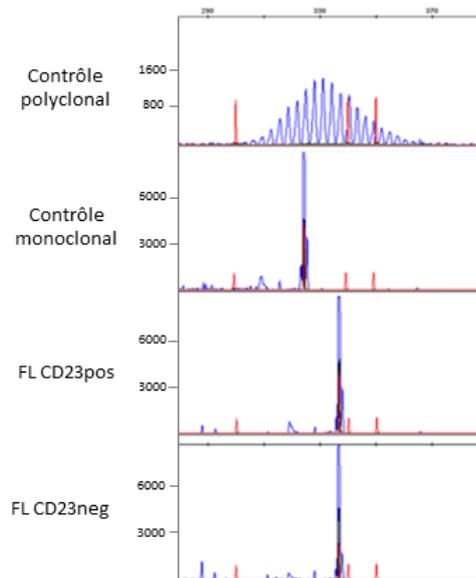


Figure 5 : Les lymphocytes B tumoraux CD23neg et CD23pos ont les mêmes réarrangements des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines. Analyse de la clonalité des populations CD23pos et CD23neg de FL par séquençage des régions FR1, FR2 et FR3 du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines.

Enfin, nous nous sommes interrogés sur l'évolution des cellules tumorales CD23pos et CD23neg en culture. Nos précédents résultats sur les CC d'amygdales nous ont amenés à supposer que les B tumoraux CD23neg devaient avoir de meilleures capacités de différenciation en PC que les CD23pos. Nous avons donc cultivé les B tumoraux CD23neg avec de l'IL-4, du CD40L et de l'IL-21 pour mimer la synapse avec les lymphocytes Tfh (Patient #1). Ce cocktail permet aux B tumoraux CD23neg d'exprimer le CD23, mais de manière beaucoup plus faible que les CC d'amygdales (**Figure 6A**). Ainsi, même si les B tumoraux évoluent dans un micro-environnement riche en IL-4 (Pangault C *et al*, Leukemia, 2010), ces cellules n'y répondent que faiblement. Dans ces conditions, les B tumoraux perdent l'expression des gènes B : *BCL6* et *PAX5* et augmentent celle des gènes PC : *XBP1* et *IRF4* comme les CC d'amygdales, mais n'expriment pas pour autant *PRDM1* (Patient #2) (**Figure 6B**).

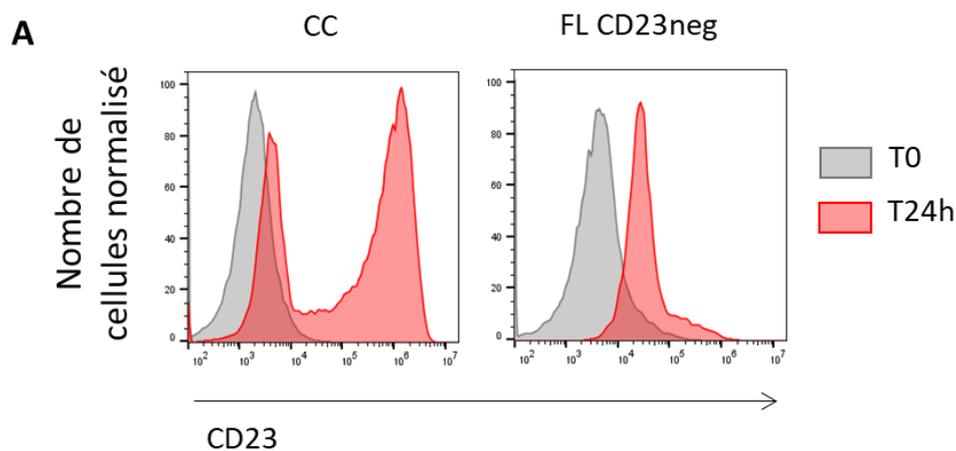
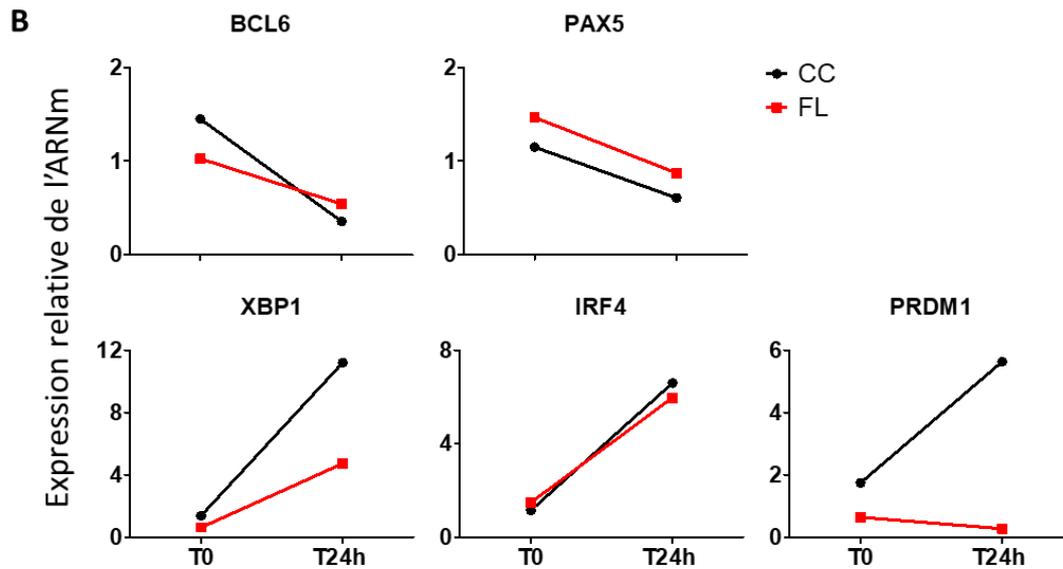


Figure 6 : Les B tumoraux de FL répondent à la stimulation IL-4, CD40L, IL-21 mais semblent bloqués dans leur processus de différenciation en PC. **A.** Analyse par cytométrie de flux de l'expression du CD23 par les B tumoraux initialement CD23neg, après culture pendant 24 heures avec de l'IL-4, du CD40L et de l'IL-21.



B. Analyse de l'expression des gènes B (*PAX5*, *BCL6*) et des gènes plasmocytaires (*XBP1*, *IRF4*, *PRDM1*) par RT-qPCR dans les B tumoraux initialement *CD23neg* après culture 24 heures avec de l'*IL-4*, du *CD40L* et de l'*IL-21*. L'expression relative de l'ARNm a été calculée sous la forme $2^{-\Delta Ct}$.

A l'échelle de la cellule unique, on constate que la stimulation par l'*IL-4*, le *CD40L* et l'*IL-21* permet bien une expression de *XBP1* et d'*IRF4* par les B tumoraux *CD23neg*, comme les CC *CD23neg* d'amygdales (Patient #2) (**Figure 7**). Toutefois, les rares cellules mises en évidence dans l'amygdale exprimant *PRDM1*, *CREB3L2* et *DEC2* (*BHLHE41*) et précurseurs de PB, ne sont pas retrouvées dans le FL. De plus, les B tumoraux semblent répondre plus fortement à la stimulation que les CC d'amygdales, avec une expression plus importante du gène de l'*IL-4R* et de *FCER2* ; du gène de l'*IL-21R*, et de *NFKB1* probablement *via* la stimulation au *CD40L*. Les B tumoraux semblent également exprimer plus fortement certains gènes B comme *IRF8* et *CIITA*. Ces cellules semblent ne plus cycloser, avec une diminution de l'expression de *CDC25A*, des *CDK* (*CDK4*, *CDK6*) et des cyclines (*CCNB1*, *CCNE1*). Ces éléments confirment donc le non-engagement des B tumoraux dans la différenciation plasmocytaire.

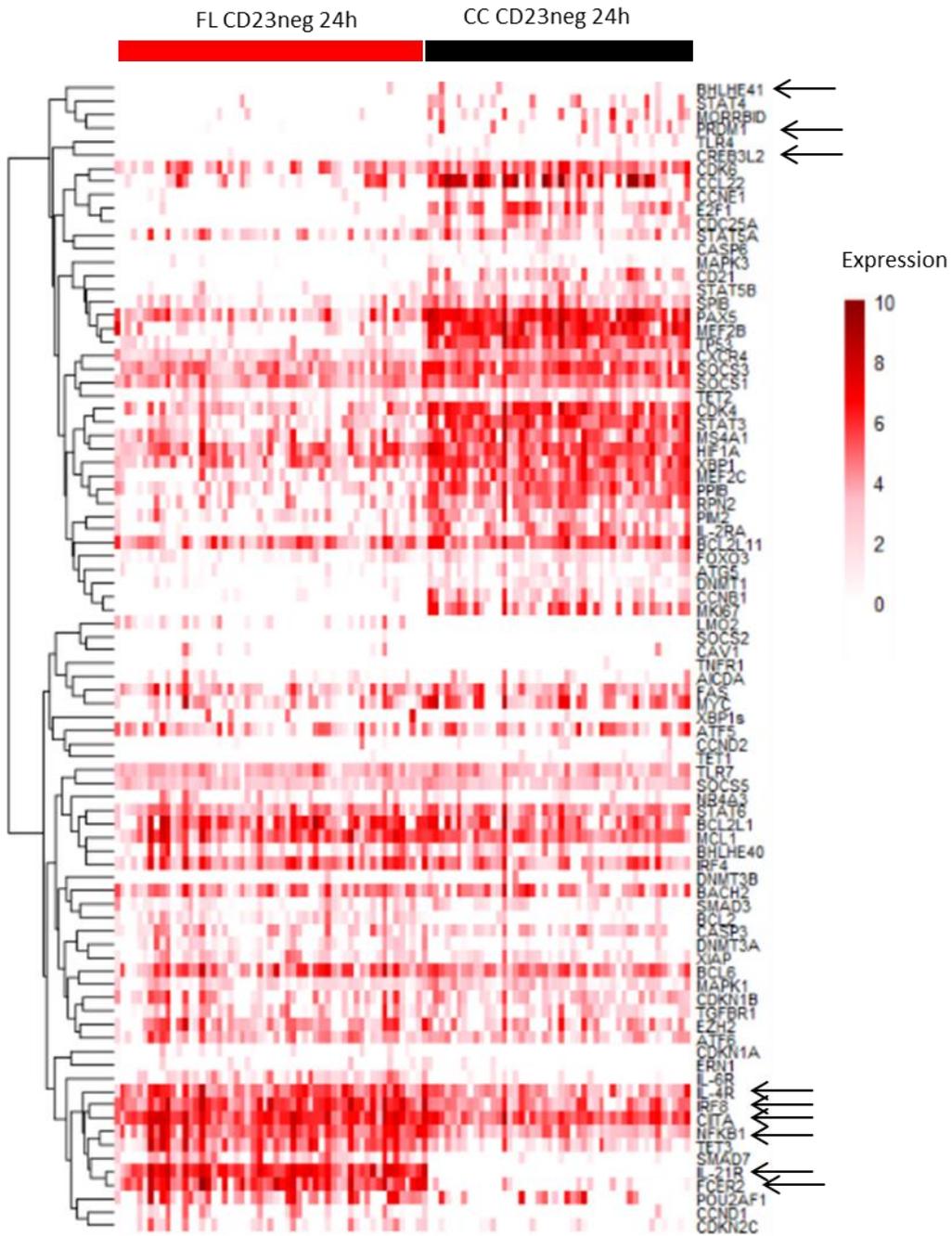


Figure 7 : Les B tumoraux de FL semblent bloqués dans la différenciation en PC. Analyse au niveau cellule unique de l'expression de 93 gènes par qPCR dans des B tumoraux CD23neg et des CC d'amygdales après 24 heures de culture avec de l'IL-4, du CD40L et de l'IL-21.

La culture des B tumoraux avec de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-10 ou de l'IL-21 pendant 48 heures, ne permet pas aux B tumoraux CD23neg de se différencier en PB (CD38⁺⁺ CD138⁻) ou en PC (CD38⁺⁺ CD138⁺) (Patient #1) (**Figure 8A**). En revanche, nous avons mis en évidence que la stimulation avec l'IL-21 induit l'expression transcriptomique de *PRDM1*, du *CD138* et de *DEC2* par les B tumoraux CD23neg, mais pas par les CD23pos (Patient #3) (**Figure 8B**).

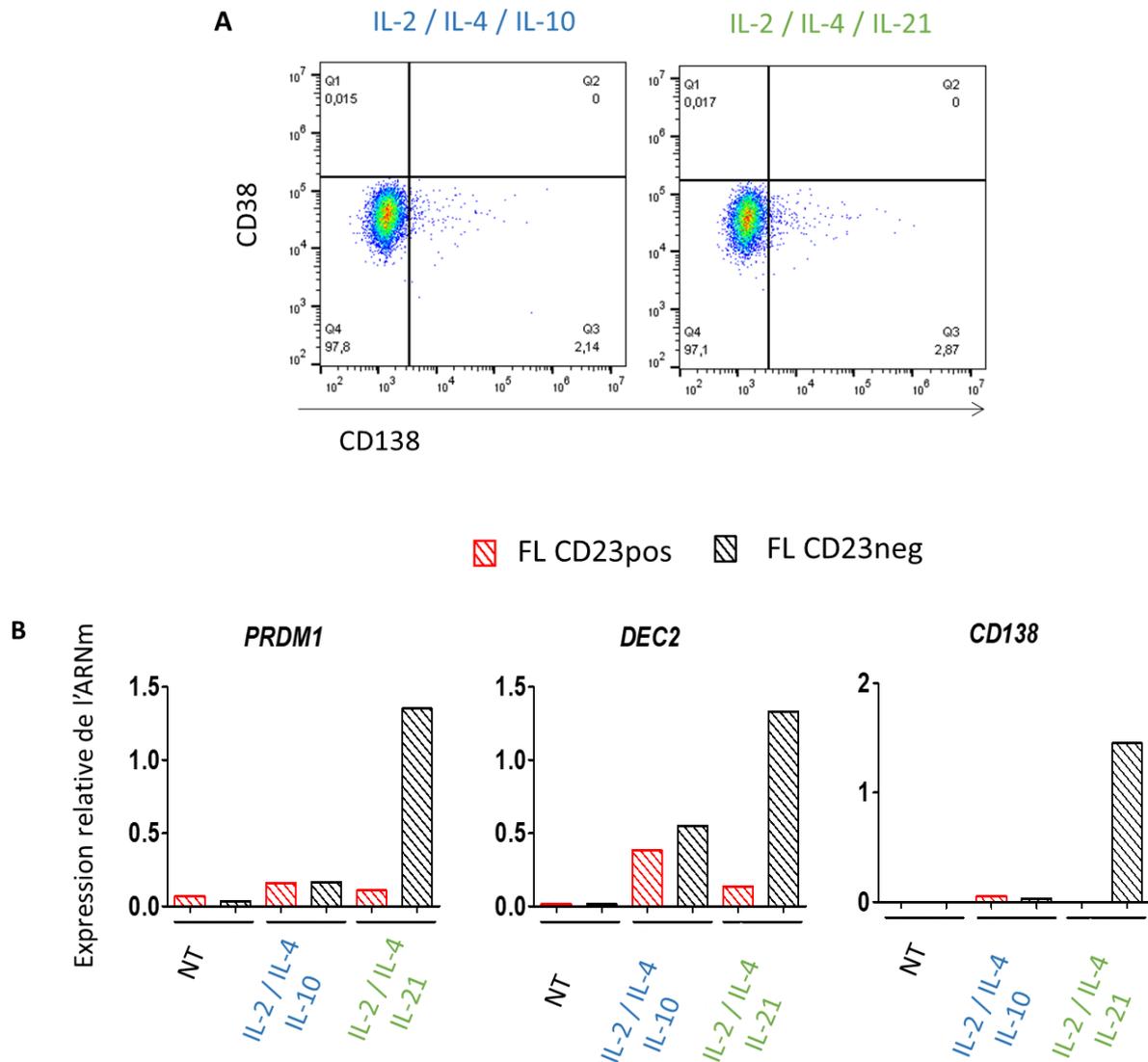


Figure 8 : Les B tumoraux de FL semblent bloqués dans la différenciation en PB et PC mais l'IL-21 semble promouvoir l'expression de gènes PC. **A.** Analyse par cytométrie de flux de la différenciation des B tumoraux CD23neg après 48 heures de culture avec de l'IL-2, de l'IL-4 et/ou de l'IL-10 ou de l'IL-21 en plasmablastes (CD38⁺⁺ CD138⁻) et en plasmocytes (CD38⁺⁺ CD138⁺). **B.** Expression relative de l'ARNm obtenue par la méthode 2^{-ΔCt} de *PRDM1*, *DEC2* et *CD138* par rapport à *ABL1* par les B tumoraux CD23pos et CD23neg après tri (NT) et après 48 heures de culture avec les cocktails précédemment cités.

Discussion et perspectives

1) L'expression du CD23 par les B tumoraux est potentiellement dûe à une sur-activation de STAT6

Ces résultats préliminaires révèlent que même si les B tumoraux CD23neg et CD23pos semblent dériver du même clone initial (**Figure 5**), ces cellules ont des capacités de différenciation différentes, qui pourraient notamment passer par le biais de STAT6 (**Figure 3**). Ainsi, les B tumoraux CD23pos ont une activation de STAT6 plus importante que les CD23neg, ce qui valide des travaux déjà publiés. En effet, 11% des patients atteints de FL présentent une mutation activatrice de STAT6 (Yildiz M *et al*, Blood, 2015) et ce chiffre atteint 82% pour les patients dont les B tumoraux expriment le CD23 (Siddiqi IN *et al*, Modern Pathol, 2016). L'expression de STAT6 pourrait donc en partie expliquer pourquoi les B tumoraux CD23pos ne se différencient pas en PB. De plus, après culture, les cellules CD23neg diminuent l'expression des gènes B et augmentent l'expression des gènes PC (**Figures 6 et 8**) ce qui semble indiquer que ces cellules ont progressé plus loin dans la différenciation en PC, alors que les CD23pos semblent plus proches d'un état de B activés, susceptibles de répondre à l'IL-4. De plus, nous montrons également grâce à notre analyse à l'échelle de la cellule-unique, et en accord avec d'autres groupes (Milpied *et al*, Nat Immunol, 2018) que les B tumoraux de FL ne sont pas synchronisés dans leur blocage, et qu'il est tout à fait possible de relancer la différenciation en PC *in vitro* (**Figures 4 et 8**).

2) Les B tumoraux CD23neg semblent être sélectionnés au détriment des B tumoraux CD23pos

Par ailleurs, l'expression différentielle de certains gènes semble indiquer que les B tumoraux CD23neg sont sélectionnés au détriment des B tumoraux CD23pos, sur la base de l'expression ou la perte d'expression de certains gènes. En effet, les B tumoraux CD23neg expriment plus fortement le gène *BCL2* que la contrepartie CD23pos (**Figure 2**). Ce point est intéressant à souligner car on sait que 90% des patients atteints de FL présentent une translocation t(14:18)(q32;q21) qui conduit au contrôle de l'expression du gène *BCL2* sous l'effet du promoteur du gène *IGH* et se traduit par une augmentation d'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2 (Rabkin CS *et al*, JNCI Monographs, 2008). Si une telle différence d'expression de *BCL2* entre la fraction CD23pos et CD23neg des cellules de FL se confirmait, cela irait dans le sens d'une sélection des cellules CD23neg parmi les cellules de FL, avec la plus forte expression de *BCL2*.

Le gène *CIITA* est exprimé plus faiblement dans la population CD23neg (**Figure 3**). On sait que la mutation perte de fonction de *CIITA* supprime l'expression du CMH II permettant aux cellules tumorales de ne plus être reconnues par le système immunitaire anti-tumoral (Steidl C *et al*, Nature, 2011). On peut donc penser que la perte d'expression de *CIITA* peut être due à la présence de mutations dans son gène pour les cellules CD23neg (dans le cas où les B tumoraux CD23pos et CD23neg dériveraient d'un clone différent), ou que ces cellules sont sélectionnées sur la base de leur faible expression de *CIITA*, en plus d'exprimer plus fortement *BCL2*, ce qui favoriserait la sélection de cellules plus résistantes et donc plus agressives.

Le gène de l'IL21R est lui aussi plus fortement exprimé dans les B tumoraux CD23pos (**Figure 3**), ce qui suppose que les B tumoraux CD23pos seraient plus sujets à la mort induite par l'IL-21, en plus de leur plus faible expression de *BCL2* en comparaison à la population CD23neg (De Totero D *et al*, Exp Hematol, 2010). Nous avons aussi montré que la stimulation des B tumoraux CD23neg avec un cocktail comprenant de l'IL-21 semble promouvoir leur

différenciation (**Figure 8**). Ces résultats mettent en évidence une variabilité de réponse en fonction des patients, et que les B tumoraux CD23neg semblent pouvoir s'engager dans la différenciation plasmocytaire en présence d'IL-21. Ces résultats sont en accord avec un article récemment publié par notre équipe (Desmots F *et al*, Clin Canc Res, 2019) où les B tumoraux ayant une mutation perte de fonction de *CREBBP*, perdent la capacité d'expression de *PRDM1* en réponse à l'IL-21. Dans ces conditions, le traitement des B tumoraux avec un inhibiteur pan-histone désacétylases (pan-HDACi) couplé à la stimulation avec l'IL-21 semble restaurer une certaine capacité de différenciation en PC des B tumoraux. Ce résultat semble également être visible sur les patients traités avec de l'abexinostat, un pan-HDACi (Desmots F *et al*; en préparation). Ces résultats montrent donc l'importance de l'IL-21 pour sélectionner les B tumoraux et ainsi favoriser la progression des B tumoraux CD23neg et la mortalité des CD23pos.

Le gène de la *CASP3* est lui aussi plus exprimé dans la population CD23pos, suggérant là aussi une mortalité plus importante que la contrepartie CD23neg (**Figure 3**).

CXCR4 est plus exprimé dans les B tumoraux CD23neg (**Figure 2**), un point intéressant puisqu'une forte expression de *CXCR4* est associée à un mauvais pronostic dans de nombreuses pathologies lymphomateuses (Chen Y *et al*, J Clin Invest, 2013 Jun ; Brault L *et al*, Leukemia, 2014) dont des lymphomes non-Hodgkiniens (Kim YR et Eom KS, Immune Netw, 2014), puisqu'elle engendre une métastase vers les organes exprimant fortement le *CXCL12* comme les ganglions ou la moelle osseuse (Cojoc M *et al*. Onco Targets Ther, 2013).

Par ailleurs, le pourcentage de B tumoraux CD23pos lors la progression de la pathologie diminue (de 49,3% à 12,9% pour le Patient #2 et de 20,2% à 7,67% pour le Patient #4) (**Tableau 4**), ce qui appuie l'idée que les B tumoraux CD23neg seraient sélectionnés et que ces patients auraient un moins bon pronostic que ceux dont les B tumoraux expriment le CD23. Dans ce cadre, on peut donc imaginer que les B tumoraux CD23neg de FL seraient plus prônes à se transformer en lymphome agressif, hypothèse confortée par les données publiées indiquant l'expression du CD23 comme facteur de bon pronostic (Olteanu H *et al*, Am J Clin Pathol, 2011).

3) Perspectives

En conclusion et comme le suggèrent nos résultats, les B tumoraux CD23pos et CD23neg présenteraient un profil mutationnel identique car issus d'une même cellule d'origine, mais auraient un profil transcriptionnel légèrement différent et des capacités d'intégration des signaux du microenvironnement différents. Pour mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la régulation transcriptionnelle des deux populations, il serait intéressant de séquencer l'ARN de ces deux populations et de coupler cette analyse à de l'ATAC-seq pour plusieurs patients. Ces résultats pourraient ainsi mettre en évidence des éléments régulateurs inactivés ou au contraire hyper-activés et responsables de l'expression des gènes propres à chaque cellule. De plus, cette analyse fine mettra également en évidence les points de blocage de la différenciation, notamment des cellules CD23neg et ce par l'utilisation de drogues épigénétiques par exemple. Enfin, bien qu'à priori issue d'une même cellule d'origine, il se peut qu'une évolution clonale sélective de l'une ou l'autre population s'exerce au cours de la pathologie et c'est pourquoi une recherche des mutations chez les patients pour lesquels un point de suivi est disponible serait intéressant.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'expression du CD23 dans le centre germinatif

Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence que les CC issus d'OLS devaient éteindre la voie de signalisation IL-4/CD23 pour se différencier en PB. Toutefois, un nombre restreint de CC exprimaient le CD23, et ce nombre était augmenté après stimulation Tfh, alors même que ce sont les cellules CD23⁻ qui se différenciaient en PB. Ces résultats suggèrent donc que les CC CD23⁺ ne perdurent pas dans le GC et meurent rapidement ou bien qu'elles vont suivre une autre voie de différenciation, comme la voie des MBC par exemple. Il serait ainsi intéressant d'effectuer des analyses plus poussées sur ces cellules CD23⁺ et par exemple d'explorer l'expression de marqueurs de MBC récemment décrits comme le CCR6 ou l'Ephrine B1 (Suan D *et al.*, *Immunity*, 2017 ; Laidlaw BJ *et al.*, *J Exp Med*, 2017).

Par ailleurs, lors de l'exploration de l'expression du CD23 dans le GC avec des immunohistomarquages, nous avons remarqué que les FDC CD21L⁺ n'exprimaient pas toutes de la même manière le CD23, pourtant décrit comme un marqueur des FDC de la LZ (Allen CDC et Cyster JG, *Semin Immunol*, 2009). La source principale d'IL-4 dans le GC provient des lymphocytes Tfh lors de leur synapse avec les CC. Ces trois types cellulaires étant étroitement liés dans la LZ du GC, il est donc possible que l'expression du CD23 par les FDC soit le reflet d'une réponse à l'IL-4, comme pour les CC. Toutefois, la stimulation avec de l'IL-4 n'engendre pas systématiquement l'expression du CD23. C'est par exemple le cas des cellules stromales dérivées du tissu adipeux (ASC) et des FRC (resto) qui expriment STAT6 phosphorylé quand elles sont stimulées avec de l'IL-4 mais qui n'expriment pas pour autant le CD23 (analyses en cytométrie de flux non montrées). Une étude fonctionnelle similaire sur les FDC n'est pas évidente à réaliser puisque ce sont des cellules difficiles à isoler et qui meurent ou changent de phénotypes en culture. Toutefois, une équipe a mis en évidence chez la souris que les FDC et les lymphocytes B n'intégraient pas les signaux du microenvironnement de la même manière. En effet, ils ont montré que couplé à un anti-CD40, l'IL-4 induisait l'expression du CD23 par les lymphocytes B, alors que ce n'était pas le cas pour les FDC. Ces dernières exprimaient plutôt le CD23 en réponse à l'IFN- γ (Sukumar S *et al.*, *J Immunol*, 2006). Ces résultats montrent donc que l'expression du CD23 par les FDC ne semble pas être le reflet

d'une réponse à l'IL-4 d'autant plus que lors des synapse B-T, les signaux sont concentrés dans un espace restreint et non diffus dans le microenvironnement. L'expression du CD23 par les FDC pourrait être en lien direct avec leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes, comme cela a été suggéré dans les lymphocytes B. En effet, les lymphocytes B exprimant le CD23 captent les complexes IgE/antigène *via* le CD23, les internalisent et les présentent ensuite sur le CMH II aux lymphocytes T CD4⁺ (Hjelm F *et al.*, *Scand J Immunol*, 2006). On peut donc imaginer un rôle similaire dans les FDC, pour présenter les antigènes aux CC, d'autant plus que l'expression du CD23 par ces cellules semble être localisée dans une région de la LZ (Steiniger B *et al.*, *Histochem and Cell Biol*, 2011). Ainsi, l'expression du CD23 par les FDC serait le reflet de leur activation et le CD23 aurait un rôle dans la capture et la présentation des antigènes aux CC, au même titre que le CD32. Il serait intéressant de vérifier ces éléments, notamment à travers des analyses transcriptomiques puisque les analyses fonctionnelles sur ce type cellulaire semblent compliquées.

L'identification de DEC2 dans les PB/PC humains

Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence que la différenciation terminale des lymphocytes B s'accompagnait de l'expression d'un facteur de transcription jamais décrit dans les PB/PC : DEC2. Nos études fonctionnelles sur des cellules primaires et des cellules de lignées cellulaires n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle spécifique de DEC2 dans ces cellules. Toutefois, les analyses transcriptomiques ont permis de valider certaines cibles de DEC2 précédemment décrites (Kreslavsky T *et al.*, *Nat Immunol*, 2017) et semblent montrer qu'il aurait un rôle dans plusieurs voies de signalisation. L'analyse des données de RNAseq obtenues sur trois nouveaux donneurs nous permettra de mieux comprendre la fonction de DEC2 dans les PB humains.

Le rôle du CD23 dans le lymphome folliculaire

L'expression du CD23 par les lymphocytes B tumoraux de FL est très hétérogène et cette expression semble être le reflet d'un meilleur pronostic (Olteanu H *et al.*, Am J Clin Pathol, 2011). Nous avons montré que même si les cellules CD23⁺ et CD23⁻ semblaient dériver du même clone initial, ces cellules présentaient toute de même de légères différences transcriptomiques et en terme de différenciation. En effet, les cellules n'exprimant pas le CD23 semblaient, au même titre que les CC d'amygdales, avoir des capacités de différenciation supérieures à celles des cellules CD23⁺. Ces cellules CD23⁻ semblaient d'ailleurs être sélectionnées préférentiellement au détriment des cellules CD23⁺ et liées à un phénotype plus agressif. Par ailleurs, nous avons montré dans les CC d'amygdales que l'expression du CD23 passait obligatoirement par l'expression de STAT6. Le gène codant STAT6 étant fréquemment muté dans les FL, et encore plus dans les FL CD23⁺, il est fortement probable que l'expression du CD23 par les B tumoraux soit le reflet d'une mutation activatrice de STAT6. Ainsi, la caractérisation des populations CD23⁺ et CD23⁻ pourrait aider à la compréhension du développement des FL et ouvrir des pistes pour des thérapies ciblées en fonction de l'expression du CD23.

Le choix des molécules utilisées pour la culture des centrocytes

La différenciation terminale des lymphocytes B est un processus finement contrôlé qui permet d'éviter la production de PC auto-réactifs. Ainsi, dans la LZ du GC, les lymphocytes B ayant un BCR muté fonctionnel et non auto-réactif sont sélectionnés pour se différencier en PB puis en PC, en MBC, ou retourner dans la DZ pour subir un nouveau cycle de maturation. Cette étape nécessite l'interaction du lymphocyte B avec la FDC d'une part, à travers la signalisation BCR et avec le lymphocyte Tfh d'autre part, *via* l'IL-4, l'IL-21 et le CD40L, entre autre (Shekhar S et Yang X, Cellular & Molecular Immunology, 2012). D'autres cellules peuvent

également intervenir comme les lymphocytes Tfr par exemple, qui produisent de l'IL-10 (Sage PT *et al.*, Trends Immunol, 2015). Afin de mimer la synapse avec le lymphocyte Tfh, nous avons donc choisi de cultiver les CC avec de l'IL-4, du CD40L et de l'IL-21. Toutefois, les quantités utilisées *in vitro* étaient bien plus importantes que celles qui sont réellement produites *in vivo* et le temps de culture (12-24 heures) était lui aussi bien plus important que le temps réel d'une synapse (quelques minutes). D'ailleurs, *in fine*, tous les CC exprimaient le CD23 après 48 heures de culture, alors que peu de B du GC IgD⁻ ne l'expriment *in vivo*. De plus, notre modèle ne permettait pas la différenciation directe des CC en PB. Cette différenciation n'était possible que lorsque l'on cultivait les CC avec un second cocktail de cytokines contenant de l'IL-2, IL-4 et IL-10.

A l'heure actuelle, la cinétique de production de ces cytokines par les lymphocytes Tfh dans le GC, et la manière dont sont intégrés ces signaux par les B du GC ne sont pas complètement comprises. Une étude chez la souris a montré que les B du GC étaient d'abord exposés à l'IL-21 et ensuite à l'IL-4 dans le GC (Weinstein JS *et al.*, Nat Immunol, 2016). Chez l'humain, il est difficile de mettre en place une telle étude. A travers une collaboration avec le groupe de Milpied du CIML, nous avons pu déterminer les signatures géniques spécifiquement induites par l'IL-4, l'IL-21, le CD40L et l'anti-BCR. Ainsi, nous avons isolé des lymphocytes B du GC (Dapi⁻ CD3⁻ IgD⁻ CD38⁺ CD10⁺) d'amygdales de 3 donneurs différents et nous les avons cultivés à une concentration de 500 cellules/puits (mini-BULK), sous 31 conditions différentes, incluant la stimulation par l'IL-4, l'IL-21, l'IL-10, le CD40L et l'anti-BCR seuls ou en combinaisons, pendant 6 heures. Les ARN des mini-BULK ont ensuite été séquencés en utilisant la méthode de séquençage de l'ARN au niveau cellule-unique, basé sur les extrémités 5' et sur le tri cellulaire (FACS-based- 5'-end scRNAseq) (Attaf N *et al.*, Front Immunol, 2020). L'analyse de ces données a permis de mettre en évidence les gènes différenciellement exprimés en réponse à chacune des cytokines (**Figure 1**). La stimulation par l'IL-10 n'a pas été retenue dans les analyses puisqu'elle n'induit pas d'effet particulier sur l'expression génique. La culture des B du GC avec ces cytokines en combinaison n'induit pas l'expression de nouveaux gènes, mais montre l'effet additif et synergique de ces cytokines.

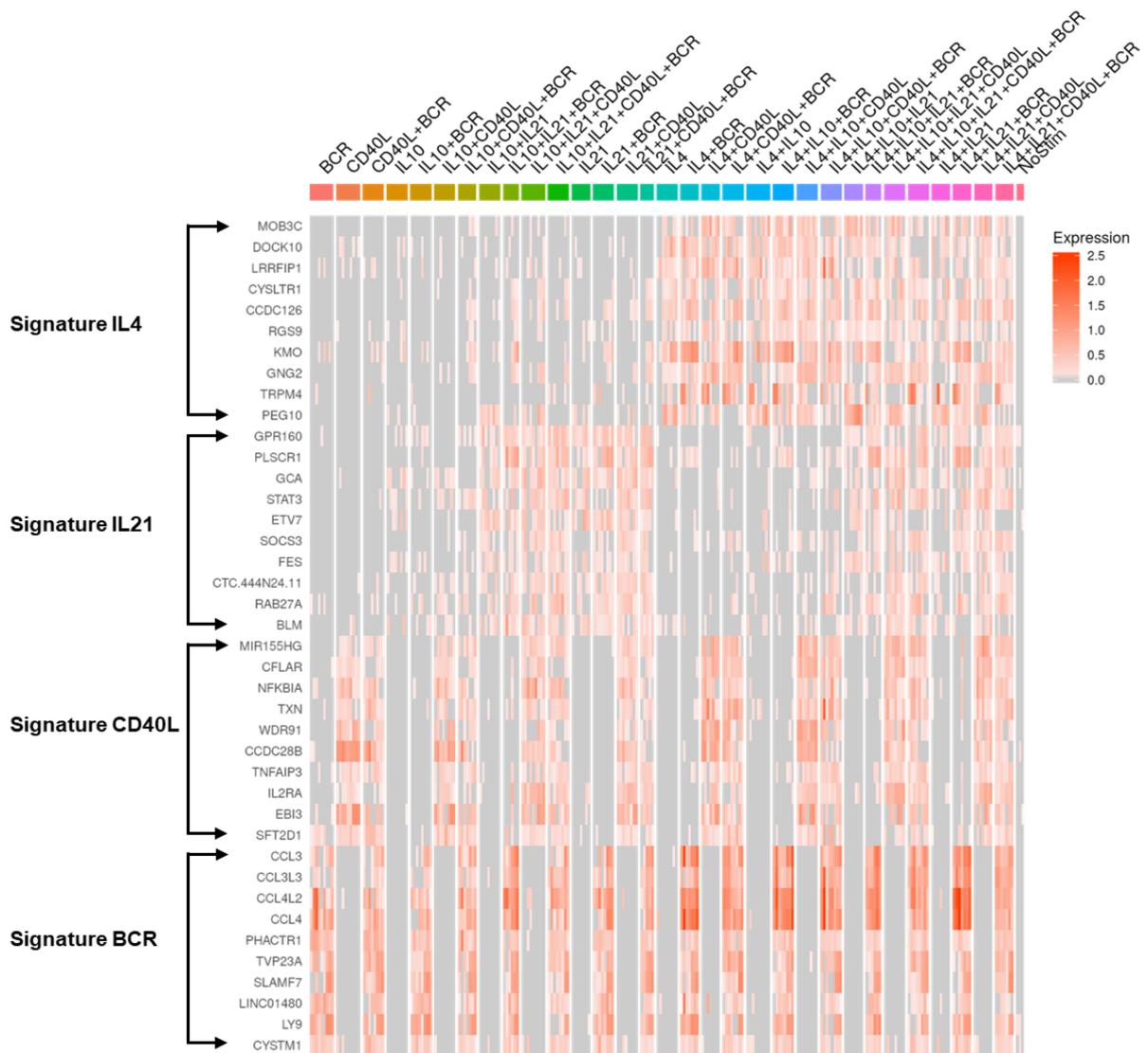


Figure 1: Carte d'expression génique des gènes induits par l'IL-4, l'IL-21, le CD40L et l'anti-BCR dans les lymphocytes B du GC d'amygdales humaines.

L'analyse de l'expression de ces signatures dans les B du GC a permis de bien distinguer les cellules ayant reçu les différents signaux (**Figure 2**).

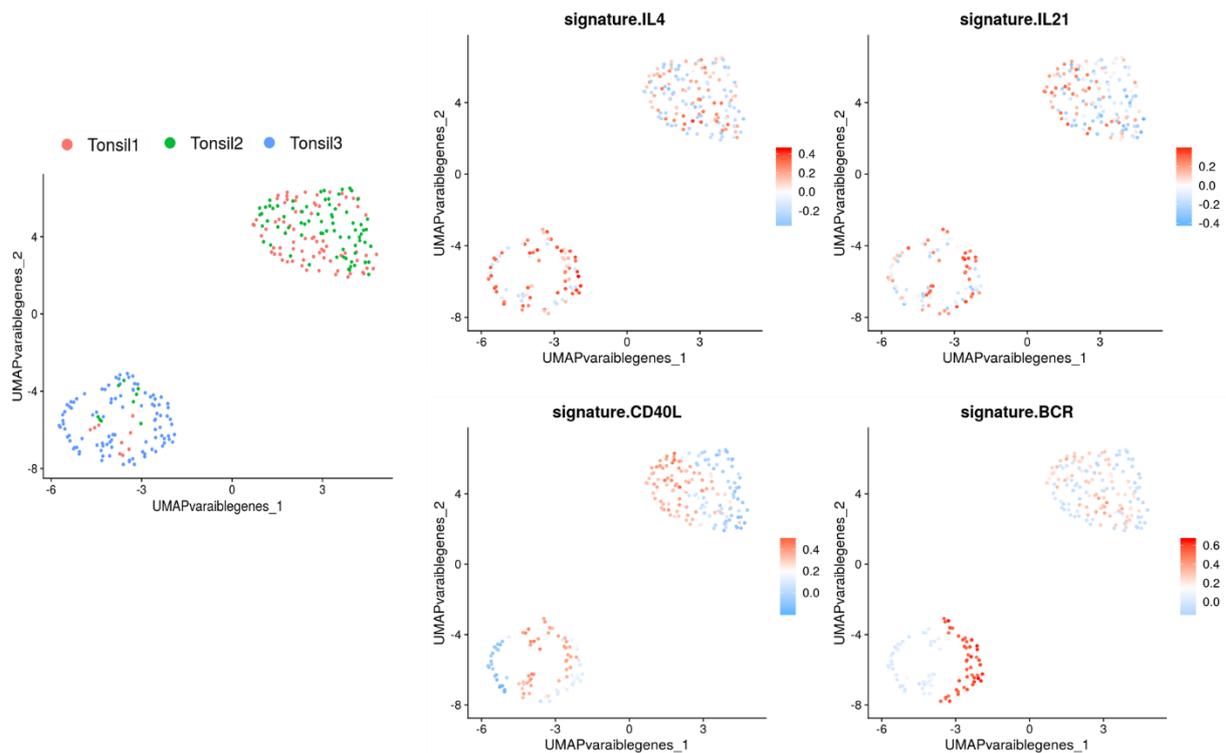


Figure 2 : Les signatures géniques spécifiquement induites par l'IL-4, l'IL-21, le CD40L et l'anti-BCR permettent d'identifier les signaux reçus par les B du GC *in vivo*. UMAP = Uniform Manifold Approximation and Projection

Ces données pourront être utilisées pour reconstituer les dynamiques chronologiques qui ont lieu dans le GC et prédire l'état de différenciation des lymphocytes B au niveau cellulaire. Elles pourront aussi permettre d'identifier les cellules ayant été exposées aux différents stimuli *in vivo* et donc de mieux comprendre comment les B du GC intègrent les différents stimuli pour progresser dans leur maturation. Enfin, des analyses approfondies de ces signatures dans de nouveaux jeux de données permettraient également d'identifier des sous-populations B à l'origine du développement des lymphomes par exemple.

CONCLUSION

Ma thèse a permis de mieux comprendre comment s'effectue la différenciation terminale des lymphocytes B, un sujet déjà très bien documenté dans la littérature et pourtant pas totalement caractérisé. Ainsi, nous avons montré que la répression de la voie IL-4, et donc la perte d'expression du CD23, est un élément indispensable pour permettre la différenciation des CC en PB. De plus, grâce à des analyses du transcriptome par qPCR au niveau cellule unique, nous avons établi une cinétique d'expression de gènes clés impliqués dans la différenciation terminale des lymphocytes B en PB. Dans ce cadre, nous avons également mis en évidence que les précurseurs des PB, les PB eux-mêmes et les cellules totalement différenciées : les PC, expriment un gène jusqu'alors jamais décrit dans ce contexte : le facteur de transcription DEC2. Les analyses de nos nouveaux jeux de données permettront de mieux caractériser ce facteur de transcription et son rôle dans les PB/PC humains. Enfin, nous avons analysé les populations CD23pos et CD23neg de patients atteints de FL et mis en évidence de légères différences entre les deux populations, suggérant une sélection préférentielle des cellules CD23neg lors du développement de la pathologie. Ces résultats sont tout de même préliminaires et des analyses plus poussées sont nécessaires.

REFERENCES

- Adam, A. P., George, A., Schewe, D., Bragado, P., Iglesias, B. V., Ranganathan, A. C., Kourtidis, A., Conklin, D. S., Aguirre-Ghiso, J. A. (2009). Computational identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. *Cancer research*, 69(14), 5664–5672. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3820>
- Aguzzi, A., Krautler, N. J. (2010). Characterizing follicular dendritic cells: A progress report. *European Journal of Immunology*. 40, 2134–2138. <https://doi.org/10.1002/eji.201040765>
- Akkaya, M., Traba, J., Roesler, A. S., Miozzo, P., Akkaya, B., Theall, B. P., Sohn, H., Pena, M., Smelkinson, M., Kabat, J., Dahlstrom, E., Dorward, D. W., Skinner, J., Sack, M. N., Pierce, S. K. (2018). Second signals rescue B cells from activation-induced mitochondrial dysfunction and death. *Nature immunology*, 19(8), 871–884. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0156-5>
- Akhmetzyanova, I., McCarron, M. J., Parekh, S., Chesi, M., Bergsagel, P. L., Fooksman, D. R. (2020). Dynamic CD138 surface expression regulates switch between myeloma growth and dissemination. *Leukemia*, 34(1), 245–256. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0519-4>.
- Allen, C. D. C., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature immunology* 5, 943–952. <https://doi.org/10.1038/ni1100>
- Allen, C. D. C., Cyster, J. G. (2008). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function. *Seminars in Immunology* 20, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.12.001>
- Allen, C. D. C., Okada, T., Tang, H. L., Cyster, J. G. (2007). Imaging of Germinal Center Selection Events During Affinity Maturation. *Science* 315, 5. <https://doi.org/10.1126/science.113673>
- Alouche, N., Bonaud, A., Rondeau, V., Nguyen, J., Cricks, E., Setterblad, N., Mahevas, M., Balabanian, K., Espéli, M. Cxcr4 desensitization is an essential regulatory mechanism controlling the extra-follicular B cell response. *bioRxiv* 537761. <https://doi.org/10.1101/537761>
- Anderson, S. M., Khalil, A., Uduman, M., Hershberg, U., Louzoun, Y., Haberman, A. M., Kleinstein, S. H., Shlomchik, M. J. (2009). Taking Advantage: High-Affinity B Cells in the Germinal Center Have Lower Death Rates, but Similar Rates of Division, Compared to Low-Affinity Cells. *Journal of Immunology* 183, 7314–7325. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902452>
- Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Förster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309–314. <https://doi.org/10.1038/35018581>
- Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L., Cyster, J. G. (2013). Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* 493, 684–688. <https://doi.org/10.1038/nature11738>
- Arpin, C., Déchanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Brière, F., Banchereau, J., Liu, Y. J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268(5211), 720–722. <https://doi.org/10.1126/science.7537388>.
- Asanoma, K., Liu, G., Yamane, T., Miyanari, Y., Takao, T., Yagi, H., Ohgami, T., Ichinoe, A., Sonoda, K., Wake, N., Kato, K. (2015). Regulation of the Mechanism of TWIST1 Transcription by BHLHE40 and BHLHE41 in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* 35, 4096–4109.

<https://doi.org/10.1128/MCB.00678-15>

- Atchley, W. R., Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 5172–5176. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5172>
- Attaf, N., Cervera-Marzal, I., Dong, C., Gil, L., Renand, A., Spinelli, L., Milpied, P. (2020). FB5P-seq: FACS-Based 5-Prime End Single-Cell RNA-seq for Integrative Analysis of Transcriptome and Antigen Receptor Repertoire in B and T Cells. *Frontiers in immunology* 11, 216. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00216>
- Attridge, K., Kenefeck, R., Wardzinski, L., Qureshi, O. S., Wang, C. J., Manzotti, C., Okkenhaug, K., Walker, L. S. (2014). IL-21 promotes CD4 T cell responses by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent upregulation of CD86 on B cells. *Journal of immunology* 192(5), 2195–2201. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302082>
- Auderset, F., Schuster, S., Fasnacht, N., Coutaz, M., Charmoy, M., Koch, U., Favre, S., Wilson, A., Trottein, F., Alexander, J., Luther, S. A., MacDonald, H. R., Radtke, F., Tacchini-Cottier, F. (2013). Notch Signaling Regulates Follicular Helper T Cell Differentiation. *Journal of immunology* 2344–2350. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300643>
- Auner, H. W., Beham-Schmid, C., Dillon, N., Sabbattini, P. (2010). The life span of short-lived plasma cells is partly determined by a block on activation of apoptotic caspases acting in combination with endoplasmic reticulum stress. *Blood* 116(18), 3445–3455. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-250423>.
- Averbeck, M., Kuhn, S., Bühligen, J., Götte, M., Simon, J. C., Polte, T. (2017). Syndecan-1 regulates dendritic cell migration in cutaneous hypersensitivity to haptens. *Experimental dermatology* 26(11), 1060–1067. <https://doi.org/10.1111/exd.13374>
- Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., de Waal Malefyt, R., Tangye, S. G. (2008). IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4 *Journal of immunology* 181, 1767–1779. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1767>
- Avery, D. T., Deenick, E. K., Ma, C. S., Suryani, S., Simpson, N., Chew, G. Y., Chan, T. D., Palendira, U., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Choo, S., Bleasel, K. E., Peake, J., King, C., French, M. A., Engelhard, D., Al-Hajjar, S., Al-Muhsen, S., Magdorf, K., Roesler, J., Arkwright, P. D., Hissaria, P., Riminton, D. S., Wong, M., Brink, R., Fulcher, D. A., Casanova, J. L., Cook, M. C., Tangye, S. G. (2010). B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *Journal of Experimental Medicine* 207, 155–171. <https://doi.org/10.1084/jem.20091706>
- Azmi, S., Sun, H., Ozog, A., Taneja, R. (2003). mSharp-1/DEC2, a Basic Helix-Loop-Helix Protein Functions as a Transcriptional Repressor of E Box Activity and Stra13 Expression. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20098–20109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210427200>
- Bajénoff, M., Egen, J., Koo, L. Y., Laugier, J. P., Brau, F., Germain, R. N. (2006). Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. *Immunity* 6, 989–1001. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.011>
- Baier, P. C., Brzózka, M. M., Shahmoradi, A., Reinecke, L., Kroos, C., Wichert, S. P., Oster, H., Wehr, M. C., Taneja, R., Hirrlinger, J., Rossner, M. J. (2014). Mice lacking the circadian modulators

- SHARP1 and SHARP2 display altered sleep and mixed state endophenotypes of psychiatric disorders. *PLoS one* 9(10), e110310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110310>
- Banerjee, S., Norman, D. D., Lee, S. C., Parrill, A. L., Pham, T. C., Baker, D. L., Tigyi, G. J., Miller, D. D. (2017). Highly Potent Non-Carboxylic Acid Autotaxin Inhibitors Reduce Melanoma Metastasis and Chemotherapeutic Resistance of Breast Cancer Stem Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 60(4), 1309–1324. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01270>
- Bannard, O., Horton, R. M., Allen, C. D. C., An, J., Nagasawa, T., Cyster, J. G., 2013. Germinal Center Centroblasts Transition to a Centrocyte Phenotype According to a Timed Program and Depend on the Dark Zone for Effective Selection. *Immunity* 39, 912–924. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.038>
- Barrington, R. A., Pozdnyakova, O., Zafari, M. R., Benjamin, C. D., Carroll, M. C. (2002). B Lymphocyte Memory: Role of Stromal Cell Complement and Fc gamma RIIb Receptors. *Journal of Experimental Medicine* 196, 1189–1200. <https://doi.org/10.1084/jem.20021110>
- Basso, K., Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 172–184. <https://doi.org/10.1038/nri3814>.
- Bhattacharya, D., Cheah, M. T., Franco, C. B., Hosen, N., Pin, C. L., Sha, W. C., Weissman, I. L. (2007). Transcriptional profiling of antigen-dependent murine B cell differentiation and memory formation. *Journal of Immunology* 179(10), 6808–6819. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6808>.
- Bhawal, U. K., Sato, F., Arakawa, Y., Fujimoto, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Ito, Y., Sasahira, T., Sakurai, T., Kobayashi, M., Kashima, I., Kijima, H., Kuniyasu, H., Abiko, Y., Kato, Y., Sato, S. (2011). Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates cyclin D1. *The Journal of Pathology* 224(3), 420–429. <https://doi.org/10.1002/path.2878>
- Baumgarth N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature reviews Immunology* 11(1), 34–46. <https://doi.org/10.1038/nri2901>.
- Bélanger, S., Crotty, S. (2016). Dances with cytokines, featuring TFH cells, IL-21, IL-4 and B cells. *Nature Immunology* 17, 1135–1136. <https://doi.org/10.1038/ni.3561>
- Belnoue, E., Pihlgren, M., McGaha, T. L., Tougne, C., Rochat, A. F., Bossen, C., Schneider, P., Huard, B., Lambert, P. H., Siegrist, C. A. (2008). APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 111(5), 2755–2764. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110858>.
- Benhamron, S., Pattanayak, S. P., Berger, M., Tirosh, B. (2015). mTOR Activation Promotes Plasma Cell Differentiation and Bypasses XBP-1 for Immunoglobulin Secretion. *Molecular and Cellular Biology* 35, 153–166. <https://doi.org/10.1128/MCB.01187-14>
- Benson, R. A., MacLeod, M. K., Hale, B. G., Patakas, A., Garside, P., Brewer, J. M. (2015). Antigen presentation kinetics control T cell/dendritic cell interactions and follicular helper T cell generation in vivo. *eLife* 16. <https://doi.org/10.7554/eLife.06994.001>
- Bernasconi N. L., Onai N., Lanzavecchia A. (2003) A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 1;101(11):4500-4. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3569>.

- Bi, H., Li, S., Qu, X., Wang, M., Bai, X., Xu, Z., Ao, X., Jia, Z., Jiang, X., Yang, Y., Wu, H. (2015). DEC1 regulates breast cancer cell proliferation by stabilizing cyclin E protein and delays the progression of cell cycle S phase. *Cell Death and Disease* 6, e1891–e1891. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.247>
- Bigot, P., Colli, L. M., Machiela, M. J., Jessop, L., Myers, T. A., Carrouget, J., Wagner, S., Roberson, D., Eymerit, C., Henrion, D., Chanock, S. J. (2016). Functional characterization of the 12p12.1 renal cancer-susceptibility locus implicates BHLHE41. *Nature communications* 7, 12098. <https://doi.org/10.1038/ncomms12098>
- Biram, A., Davidzohn, N., Shulman, Z. (2019). T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. *Immunological Reviews* 288, 37–48. <https://doi.org/10.1111/imr.12737>
- Bohers, E., Vially, P. J., Dubois, S., Bertrand, P., Maingonnat, C., Mareschal, S., Ruminy, P., Picquenot, J. M., Bastard, C., Desmots, F., Fest, T., Leroy, K., Tilly, H., Jardin, F. (2015). Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica* 100(7), e280–e284. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.123612>
- Bojarczuk, K., Bobrowicz, M., Dwojak, M., Miazek, N., Zapala, P., Bunes, A., Siernicka, M., Rozanska, M., Winiarska, M. (2015). B-cell receptor signaling in the pathogenesis of lymphoid malignancies. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.06.016>
- Bolduc, A., Long, E., Stapler, D., Cascalho, M., Tsubata, T., Koni, P. A., Shimoda, M. (2010). Constitutive CD40L Expression on B Cells Prematurely Terminates Germinal Center Response and Leads to Augmented Plasma Cell Production in T Cell Areas. *Journal of Immunology* 185, 220–230. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901689>
- Botta, D., Fuller, M. J., Marquez-Lago, T. T., Bachus, H., Bradley, J. E., Weinmann, A. S., Zajac, A. J., Randall, T. D., Lund, F. E., León, B., Ballesteros-Tato, A. (2017). Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection. *Nature Immunology* 18, 1249–1260. <https://doi.org/10.1038/ni.3837>
- Bösl, M., Osterode, E. W., Bararia, D., Pastore, A., Staiger, A. M., Ott, G., Szczepanowski, M., Klapper, W., Rosenwald, A., Hiddemann, W., Weigert, O. (2015). STAT6 Is Recurrently and Significantly Mutated in Follicular Lymphoma and Enhances the IL-4 Induced Expression of Membrane-Bound and Soluble CD23. *Blood* 126 (23): 3923. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.3923.3923>
- Bragado, P., Estrada, Y., Parikh, F., Krause, S., Capobianco, C., Farina, H. G., Schewe, D. M., Aguirre-Ghiso, J. A. (2013). TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. *Nature Cell Biology* 15, 1351–1361. <https://doi.org/10.1038/ncb2861>
- Brandtzaeg, P. (1996). The B-cell Development in Tonsillar Lymphoid Follicles. *Acta Otorrinolaringológica* 55–59.
- Brandtzaeg, P. (2003). Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 21, 3382–3388. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00338-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00338-4)

- Brault, L., Rovó, A., Decker, S., Dierks, C., Tzankov, A., Schwaller, J. (2014). CXCR4-SERINE339 regulates cellular adhesion, retention and mobilization, and is a marker for poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 28(3), 566–576. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.201>
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., Förster, R. (2000). Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1545–1552. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1545>
- Brink, R. (2014). The imperfect control of self-reactive germinal center B cells. *Current Opinion in Immunology* 28, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.03.001>
- Bryant, V. L., Ma, C. S., Avery, D. T., Good, K. L., Corcoran, L. M., Malefyt, R. de W., Tangye, S. G. (2007). Cytokine-Mediated Regulation of Human B Cell Differentiation into Ig-Secreting Cells: Predominant Role of IL-21 Produced by CXCR5 + T Follicular Helper Cells. *Journal of Immunology* 179, 8180–8186. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8180>
- Burger, J. A., Wiestner, A. (2018). Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nature Reviews Cancer* 18, 148–167. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.121>
- Camponeschi, A., Todi, L., Cristofolletti, C., Lazzeri, C., Carbonari, M., Mitrevski, M., Marrapodi, R., Del Padre, M., Fiorilli, M., Casato, M., Visentini, M. (2018). DEC1/STRA13 is a key negative regulator of activation-induced proliferation of human B cells highly expressed in anergic cells. *Immunology Letters* 198, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.014>
- Cao J, Spielmann M, Qiu X, Huang X, Ibrahim DM, Hill AJ, Zhang F, Mundlos S, Christiansen L, Steemers FJ, Trapnell C, Shendure J. (2019). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* 566, 496–502 <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0969-x>
- Carbone, A., Roulland, S., Gloghini, A., Younes, A., von Keudell, G., López-Guillermo, A., Fitzgibbon, J. (2019). Follicular lymphoma. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 83. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0132-x>.
- Caron, G., Hussein, M., Kulis, M., Delaloy, C., Chatonnet, F., Pignarre, A., Avner, S., Lemarié, M., Mahé, E. A., Verdaguer-Dot, N., Queirós, A. C., Tarte, K., Martín-Subero, J. I., Salbert, G., Fest, T. (2015). Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Reports* 13, 1059–1071. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.051>
- Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Fest, T. (2009). CXCR4 Expression Functionally Discriminates Centroblasts versus Centrocytes within Human Germinal Center B Cells. *Journal of Immunology* 183, 8427–8434. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.080427>
- Carotta, S., Willis, S. N., Hasbold, J., Inouye, M., Pang, S. H. M., Emslie, D., Light, A., Chopin, M., Shi, W., Wang, H., Morse, H. C., Tarlinton, D. M., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., Nutt, S. L. (2014). The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* 211, 2169–2181. <https://doi.org/10.1084/jem.20140425>
- Casamayor-Palleja, M., Khan, M., MacLennan, I. C. (1995). A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *Journal of Experimental Medicine* 181, 1293–

1301. <https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1293>

- Cattoretti, G., Büttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., Niedobitek, G. (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107(10), 3967–3975. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4170>.
- Cerutti, A., Cols, M., Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 13, 118–132. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Challa, A., Pound, J. D., Armitage, R. J., Gordon, J. (1999). Epitope-dependent synergism and antagonism between CD40 antibodies and soluble CD40 ligand for the regulation of CD23 expression and IgE synthesis in human B cells. *Allergy* 54(6), 576–583. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.1999.00092.x>.
- Chan, M. A., Gigliotti, N. M., Matangkasombut, P., Gauld, S. B., Cambier, J. C., Rosenwasser, L. J. (2010). CD23-mediated cell signaling in human B cells differs from signaling in cells of the monocytic lineage. *Clinical Immunology* 137(3), 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.08.005>.
- Chan, T. D., Gatto, D., Wood, K., Basten, A., Brink, R. (2009). Antigen Affinity Controls Rapid T-Dependent Antibody Production by Driving the Expansion Rather than the Differentiation or Extrafollicular Migration of Early Plasmablasts. *Journal of Immunology* 3139–3149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901690>
- Chan, T. D., Wood, K., Hermes, J. R., Butt, D., Jolly, C. J., Basten, A., Brink, R. (2012). Elimination of Germinal-Center-Derived Self-Reactive B Cells Is Governed by the Location and Concentration of Self-Antigen. *Immunity* 37, 893–904. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.017>
- Chang, H. D., Tokoyoda, K., Radbruch, A. (2018). Immunological memories of the bone marrow. *Immunological Reviews* 283, 86–98. <https://doi.org/10.1111/imr.12656>
- Chang, J. E., Turley, S. J. (2015). Stromal infrastructure of the lymph node and coordination of immunity. *Trends in Immunology* 36, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.11.003>
- Chen, Y., Jacamo, R., Konopleva, M., Garzon, R., Croce, C., Andreeff, M. (2013). CXCR4 downregulation of let-7a drives chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Investigation* 123(6), 2395–2407. <https://doi.org/10.1172/JCI66553>
- Chen, Z., Koralov, S. B., Gendelman, M., Carroll, M. C., Kelsoe, G. (2000). Humoral immune responses in Cr2^{-/-} mice: enhanced affinity maturation but impaired antibody persistence. *Journal of Immunology* 1;164(9):4522-32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4522>.
- Cheng, L. E., Wang, Z. E., Locksley, R. M. (2010). Murine B cells regulate serum IgE levels in a CD23-dependent manner. *Journal of immunology* 185(9), 5040–5047. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001900>.
- Chevrier, S., Emslie, D., Shi, W., Kratina, T., Wellard, C., Karnowski, A., Erikci, E., Smyth, G. K., Chowdhury, K., Tarlinton, D., Corcoran, L. M. (2014). The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity. *Journal of Experimental Medicine* 211, 827–840. <https://doi.org/10.1084/jem.20131831>
- Chevrier, S., Kratina, T., Emslie, D., Tarlinton, D. M., Corcoran, L. M. (2017). IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. *Immunology and*

- Chiu, Y. K., Lin, I. Y., Su, S. T., Wang, K. H., Yang, S. Y., Tsai, D. Y., Hsieh, Y. T., Lin, K. I. (2014). Transcription factor ABF-1 suppresses plasma cell differentiation but facilitates memory B cell formation. *Journal of Immunology* 193(5):2207-17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400411>.
- Choi, Y. S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T. C., Monticelli, L., Lao, C., Crotty, S. (2011). Bcl6 dependent T follicular helper cell differentiation diverges from effector cell differentiation during priming and depends on the gene Icos. *Immunity* 932–946. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.023>
- Chute, C., Yang, X., Meyer, K., Yang, N., O'Neil, K., Kasza, I., Eliceiri, K., Alexander, C., Friedl, A. (2018). Syndecan-1 induction in lung microenvironment supports the establishment of breast tumor metastases. *Breast cancer research* 20(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0995-x>
- Cimmino, L., Martins, G. A., Liao, J., Magnusdottir, E., Grunig, G., Perez, R. K., Calame, K. L. (2008). Blimp-1 Attenuates Th1 Differentiation by Repression of ifng, tbx21, and bcl6 Gene Expression. *Journal of Immunology* 181, 2338–2347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2338>
- Clair, T., Aoki, J., Koh, E., Bandle, R. W., Nam, S. W., Ptaszynska, M. M., Mills, G. B., Schiffmann, E., Liotta, L. A., Stracke, M. L. (2003). Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Research* 1;63(17):5446-53.
- Cocco, M., Stephenson, S., Care, M. A., Newton, D., Barnes, N. A., Davison, A., Rawstron, A., Westhead, D. R., Doody, G. M., Tooze, R. M. (2012). In vitro generation of long-lived human plasma cells. *Journal of immunology* 189(12), 5773–5785. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103720>.
- Cojoc, M., Peitzsch, C., Trautmann, F., Polishchuk, L., Telegeev, G. D., Dubrovskaya, A. (2013). Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets and therapy* 6, 1347–1361. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36109>
- Cooper, A. M., Hobson, P. S., Jutton, M. R., Kao, M. W., Drung, B., Schmidt, B., Fear, D. J., Bevil, A. J., McDonnell, J. M., Sutton, B. J., Gould, H. J. (2012). Soluble CD23 controls IgE synthesis and homeostasis in human B cells. *Journal of immunology* 188(7), 3199–3207. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102689>.
- Cortes-Selva, D., Ready, A., Gibbs, L., Rajwa, B., Fairfax, K.C. (2019). IL-4 promotes stromal cell expansion and is critical for development of a type-2, but not a type 1 immune response. *European Journal of Immunology* 49(3):428-442. <https://doi.org/10.1002/eji.201847789>.
- Corthay, A. (2009). How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology* 70, 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>
- Cosgrove, J., Novkovic, M., Albrecht, S., Pikor, N. B., Zhou, Z., Onder, L., Mörbe, U., Cupovic, J., Miller, H., Alden, K., Thuery, A., O'Toole, P., Pinter, R., Jarrett, S., Taylor, E., Venetz, D., Heller, M., Ugucioni, M., Legler, D. F., Lacey, C. J., Coatesworth, A., Polak, W. G., Cupedo, T., Manoury, B., Thelen, M., Stein, J. V., Wolf, M., Leake, M. C., Timmis, J., Ludewig, B., Coles, M. C. (2020). B cell zone reticular cell microenvironments shape CXCL13 gradient formation. *Nature Communications* 22;11(1):3677. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17135-2>
- Croote, D., Darmanis, S., Nadeau, K. C., Quake, S. R. (2018). High-affinity allergen-specific human

- antibodies cloned from single IgE B cell transcriptomes. *Science* 362(6420), 1306–1309. <https://doi.org/10.1126/science.aau2599>.
- Crotty S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50(5), 1132–1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>
- Cunningham, A. F., Serre, K., Toellner, K. M., Khan, M., Alexander, J., Brombacher, F., MacLennan, I. C. M. (2004). Pinpointing IL-4-independent acquisition and IL-4-influenced maintenance of Th2 activity by CD4 T cells. *European Journal of Immunology* 34, 686–694. <https://doi.org/10.1002/eji.200324510>
- Currie, M. J., Hanrahan, V., Gunningham, S. P., Morrin, H. R., Frampton, C., Han, C., Robinson, B. A., Fox, S. B. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *Journal of Clinical Pathology* 57(8), 829–834. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015644>
- Cyster, J. G., Allen, C. D. C. (2019). B cell responses – Cell interaction dynamics and decisions. *Cell* 524–540. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>
- D’Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., Sinigaglia, F. (1998). Cutting Edge: Selective Up-Regulation of Chemokine Receptors CCR4 and CCR8 upon Activation of Polarized Human Type 2 Th Cells. *Journal of Immunology* 5111–5115.
- Dasoveanu, D. C., Park, H. J., Ly, C. L., Shipman, W. D., Chyou, S., Kumar, V., Tarlinton, D., Ludewig, B., Mehrara, B. J., Lu, T. T. (2020). Lymph node stromal CCL2 limits antibody responses. *Science Immunology* 5, eaaw0693. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw0693>
- De Toter, D., Capaia, M., Fabbi, M., Croce, M., Meazza, R., Cutrona, G., Zupo, S., Loiacono, F., Truini, M., Ferrarini, M., Ferrini, S. (2010). Heterogeneous expression and function of IL-21R and susceptibility to IL-21-mediated apoptosis in follicular lymphoma cells. *Experimental hematology* 38(5), 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.02.008>
- De Vos, J., Hose, D., Reme, T., Tarte, K., Moreaux, J., Mahtouk, K., Jourdan, M., Goldschmidt, H., Rossi, J. F., Cremer, F. W., Klein, B. (2006). Microarray-based understanding of normal and malignant plasma cells. *Immunological Reviews* 210, 86–104. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00362.x>
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., Staudt, L. M. (1997). Control of Inflammation, Cytokine Expression, and Germinal Center Formation by BCL-6. *Science* 276, 589–592. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.589>
- Dermadi, D., Bscheider, M., Bjegovic, K., Lazarus, N. H., Szade, A., Hadeiba, H., Butcher, E. C. (2020). Exploration of Cell Development Pathways through High-Dimensional Single Cell Analysis in Trajectory Space. *iScience* 23(2), 100842. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100842>
- Desmots, F., Roussel, M., Pangault, C., Llamas-Gutierrez, F., Pastoret, C., Guiheneuf, E., Le Priol, J., Camara-Clayette, V., Caron, G., Henry, C., Belaud-Rotureau, M. A., Godmer, P., Lamy, T., Jardin, F., Tarte, K., Ribrag, V., Fest, T. (2019). Pan-HDAC Inhibitors Restore PRDM1 Response to IL21 in CREBBP-Mutated Follicular Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 25(2), 735–746. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1153>

- Di Niro, R., Lee, S. J., Vander Heiden, J. A., Elsner, R. A., Trivedi, N., Bannock, J. M., Gupta, N. T., Kleinstein, S. H., Vigneault, F., Gilbert, T. J., Meffre, E., McSorley, S. J., Shlomchik, M. J. (2015). Salmonella Infection Drives Promiscuous B Cell Activation Followed by Extrafollicular Affinity Maturation. *Immunity*, 43(1), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.013>.
- Diehl, S. A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., van Haren, S. D., Kwakkenbos, M. J., Yasuda, E., Beaumont, T., Scheeren, F. A., Spits, H. (2008). STAT3-Mediated Up-Regulation of BLIMP1 Is Coordinated with BCL6 Down-Regulation to Control Human Plasma Cell Differentiation. *Journal of Immunology* 180, 4805–4815. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4805>
- Ding, B. B., Bi, E., Chen, H., Yu, J. J., Ye, B. H. (2013). IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *Journal of Immunology* 190, 1827–1836. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201678>
- DiToro, D., Winstead, C. J., Pham, D., Witte, S., Andargachew, R., Singer, J. R., Wilson, C. G., Zindl, C. L., Luther, R. J., Silberger, D. J., Weaver, B. T., Kolawole, E. M., Martinez, R. J., Turner, H., Hatton, R. D., Moon, J. J., Way, S. S., Evavold, B. D., Weaver, C. T. (2018). Differential IL-2 expression defines developmental fates of follicular versus nonfollicular helper T cells. *Science* 14;361(6407):eaao2933. <https://doi.org/10.1126/science.aao2933>.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C. A., Weill, J. C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology* 10(12), 1292–1299. <https://doi.org/10.1038/ni.1814>.
- Dominguez-Sola, D., Vitorica, G. D., Ying, C. Y., Phan, R. T., Saito, M., Nussenzweig, M. C., Dalla-Favera, R. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nature Immunology* 13, 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/ni.2428>
- Dono, M., Zupo, S., Colombo, M., Massara, R., Gaidano, G., Taborelli, G., Ceppia, P., Burgio, V. L., Chiorazzi, N., Ferrarini, M. (2003). The human marginal zone B cell. *Annals of the New York Academy of Sciences* 987:117-24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb06039>
- Ehata, S., Hanyu, A., Hayashi, M., Aburatani, H., Kato, Y., Fujime, M., Saitoh, M., Miyazawa, K., Imamura, T., Miyazono, K. (2007). Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer research*, 67(20), 9694–9703. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1522>
- Elgueta, R., Marks, E., Nowak, E., Menezes, S., Benson, M., Raman, V. S., Ortiz, C., O'Connell, S., Hess, H., Lord, G. M., Noelle, R. (2015). CCR6-dependent positioning of memory B cells is essential for their ability to mount a recall response to antigen. *Journal of immunology* 194(2), 505–513. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401553>.
- Elsner, R. A., Shlomchik, M. J. (2019). IL-12 Blocks Tfh Cell Differentiation during Salmonella Infection, thereby Contributing to Germinal Center Suppression. *Cell Reports* 29, 2796-2809.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.069>
- Emslie, D., D'Costa, K., Hasbold, J., Metcalf, D., Takatsu, K., Hodgkin, P. O., Corcoran, L. M. (2008). Oct2 enhances antibody-secreting cell differentiation through regulation of IL-5 receptor alpha chain expression on activated B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 205(2), 409–421. <https://doi.org/10.1084/jem.20072049>
- Engeroff, P., Caviezel, F., Mueller, D., Thoms, F., Bachmann, M. F., Vogel, M. (2020). CD23 provides a

- noninflammatory pathway for IgE-allergen complexes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145(1), 301–311.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.045>.
- Erickson, L. D., Durell, B. G., Vogel, L. A., O'Connor, B. P., Cascalho, M., Yasui, T., Kikutani, H., Noelle, R. J. (2002). Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40. *Journal of Clinical Investigation* 109, 613–620. <https://doi.org/10.1172/JCI0214110>
- Ewart, M. A., Ozanne, B. W., Cushley, W. (2002). The CD23a and CD23b proximal promoters display different sensitivities to exogenous stimuli in B lymphocytes. *Genes and Immunity* 3(3), 158–164. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363848>.
- Fagarasan, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Ikuta, K., Honjo, T. (2001). In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413, 639–643. <https://doi.org/10.1038/35098100>
- Falvella, F. S., Colombo, F., Spinola, M., Campiglio, M., Pastorino, U., Dragani, T. A. (2008). BHLHB3: a candidate tumor suppressor in lung cancer. *Oncogene* 27, 3761–3764. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1211038>
- Fazilleau, N., Eisenbraun, M. D., Malherbe, L., Ebright, J. N., Pogue-Caley, R. R., McHeyzer-Williams, L. J., McHeyzer-Williams, M. G. (2007). Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nature Immunology* 8, 753–761. <https://doi.org/10.1038/ni1472>
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L. J., Rosen, H., McHeyzer, M. G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nature Immunology* 375–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1704>
- Fellmann, M., Buschor, P., Röthlisberger, S., Zellweger, F., Vogel, M. (2015). High affinity targeting of CD23 inhibits IgE synthesis in human B cells. *Immunity, Inflammation and Disease* 3(4), 339–349. <https://doi.org/10.1002/iid3.72>.
- Ferlin, W. G., Severinson, E., Ström, L., Heath, A. W., Coffman, R. L., Ferrick, D. A., Howard, M. C. (1996). CD40 signaling induces interleukin-4-independent IgE switching in vivo. *European Journal of Immunology* 26(12):2911-5. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261216>.
- Finkin, S., Hartweger, H., Oliveira, T. Y., Kara, E. E., Nussenzweig, M. C. (2019). Protein Amounts of the MYC Transcription Factor Determine Germinal Center B Cell Division Capacity. *Immunity* 51, 324-336.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.013>
- Fonseca, V. R., Agua-Doce, A., Maceiras, A. R., Pierson, W., Ribeiro, F., Romão, V. C., Pires, A. R., da Silva, S. L., Fonseca, J. E., Sousa, A. E., Linterman, M. A., Graca, L. (2017). Human blood Tfr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Science Immunology* 2, eaan1487. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan1487>
- Fooksman D. R., Schwickert T. A., Victora G. D., Dustin M. L., Nussenzweig M. C., Skokos D. (2010) Development and migration of plasma cells in the mouse lymph node. *Immunity* 23;33(1):118-27. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.06.015>.
- Fooksman D. R., Mazumder A., McCarron M. (2015). CD138 Regulates Myeloma Cell Survival, Proliferation, BM Engraftment and Tumor Organization. *Blood* 126 (23): 2974. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.2974.2974>

- Förster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M. (1996). A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell* 87, 1037–1047. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81798-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81798-5)
- Fu, W., Liu, X., Lin, X., Feng, H., Sun, L., Li, S., Chen, H., Tang, H., Lu, L., Jin, W., Dong, C. (2018). Deficiency in T follicular regulatory cells promotes autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 215, 815–825. <https://doi.org/10.1084/jem.20170901>
- Fujimoto, K., Hamaguchi, H., Hashiba, T., Nakamura, T., Kawamoto, T., Sato, F., Noshiro, M., Bhawal, U., Suardita, K., Kato, Y. (2007). Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: Multiple mechanisms through E-box elements. *International Journal of Molecular Medicine* <https://doi.org/10.3892/ijmm.19.6.925>
- Fujimoto, K., Shen, M., Noshiro, M., Matsubara, K., Shingu, S., Honda, K., Yoshida, E., Suardita, K., Matsuda, Y., Kato, Y. (2001). Molecular Cloning and Characterization of DEC2, a New Member of Basic Helix-Loop-Helix Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 164–171. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4133>
- Gallo, C., Fragiasso, V., Donati, B., Torricelli, F., Tameni, A., Piana, S., Ciarrocchi, A. (2018). The bHLH transcription factor DEC1 promotes thyroid cancer aggressiveness by the interplay with NOTCH1. *Cell Death and Disease* 9, 871. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0933-y>
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira S., Underhill D. M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *Journal of Experimental Medicine* 197(9):1107-17. <https://doi.org/10.1084/jem.20021787>.
- Garriga-Canut, M., Roopra, A., Buckley, N. J. (2001). The basic helix-loop-helix protein, sharp-1, represses transcription by a histone deacetylase-dependent and histone deacetylase-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 276(18), 14821–14828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011619200>
- Gascan, H., Gauchat, J. F., Aversa, G., Vlasselaer, P. V., De Vries, J. (1991). Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *Journal of Immunology* 147, 7.
- Geißler, K., Markwart, R., Requardt, R. P., Weigel, C., Schubert, K., Scherag, A., Rubio, I., Guntinas-Lichius, O. (2017). Functional characterization of T-cells from palatine tonsils in patients with chronic tonsillitis. *PLoS One* 12, e0183214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183214>
- Ghavampour, S., Lange, C., Bottino, C., Gerke, V. (2013). Transcriptional profiling of human monocytes identifies the inhibitory receptor CD300a as regulator of transendothelial migration. *PLoS one* 8(9), e73981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073981>
- Ghia, P., Strola, G., Granziero, L., Geuna, M., Sallusto, F., Ruffing, N., Montagna, L., Piccoli, P., Caligaris-Cappio, F. (2002). Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *European Journal of Immunology* 1403–1413. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200205\)32:5<1403::AID-IMMU1403>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200205)32:5<1403::AID-IMMU1403>3.0.CO;2-Y).
- Girard, J.P., Moussion, C, Förster, R. 2012. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature Reviews Immunology* 12, 762–773. <https://doi.org/10.1038/nri3298>

- Gitlin, A.D., Shulman, Z., Nussenzweig, M.C., 2014. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509, 637–640. <https://doi.org/10.1038/nature13300>
- Gohda, M., Kunisawa, J., Miura, F., Kagiya, Y., Kurashima, Y., Higuchi, M., Ishikawa, I., Ogahara, I., Kiyono, H. (2008). Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *Journal of Immunology* 15;180(8):5335-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5335>.
- Gonzalez, D. G., Cote, C. M., Patel, J. R., Smith, C. B., Zhang, Y., Nickerson, K. M., Zhang, T., Kerfoot, S. M., Haberman, A. M. (2018). Nonredundant Roles of IL-21 and IL-4 in the Phased Initiation of Germinal Center B Cells and Subsequent Self-Renewal Transitions. *Journal of Immunology* 201, 3569–3579. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500497>
- Good, K. L., Avery, D. T., Tangye, S. G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *Journal of immunology* 182(2), 890–901. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.890>
- Good-Jacobson, K. L., Szumilas, C. G., Chen, L., Sharpe, A. H., Tomayko, M. M., Shlomchik, M. J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature Immunology* 11, 535–542. <https://doi.org/10.1038/ni.1877>
- Good-Jacobson, K. L., Shlomchik, M. J. (2010). Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *Journal of immunology*, 185(6), 3117–3125. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001155>.
- Good-Jacobson, K. L., O'Donnell, K., Belz, G. T., Nutt, S. L., Tarlinton, D. M. (2015). c-Myb is required for plasma cell migration to bone marrow after immunization or infection. *Journal of experimental Medicine* 212(7), 1001–1009. <https://doi.org/10.1084/jem.20150191>.
- Gorelik, L., Gilbride, K., Dobles, M., Kalled, S. L., Zandman, D., Scott, M. L. (2003). Normal B Cell Homeostasis Requires B Cell Activation Factor Production by Radiation-resistant Cells. *Journal of Experimental Medicine* 198, 937–945. <https://doi.org/10.1084/jem.20030789>
- Graf, R., Seagal, J., Otipoby, K. L., Lam, K. P., Ayoub, S., Zhang, B., Sander, S., Chu, V. T., Rajewsky, K. (2019). BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. *Science* 363, 748–753. <https://doi.org/10.1126/science.aau8475>
- Grawunder, U., Rolink, G., Melchers, F., Winkler, H. (1995). Down-Regulation of RAG1 and RAG2 Gene Expression in PreB Cells after Functional Immunoglobulin Heavy Chain Rearrangement. *Immunity* 3, 601–608. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90131-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90131-0)
- Green M. R. (2018). Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. *Blood* 131(6), 595–604. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-737361>.
- Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A., Tedder, T. F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23(1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.011>.
- Haas, K. M., Poe, J. C., Tedder, T. F. (2009). CD21/35 promotes protective immunity to *Streptococcus pneumoniae* through a complement-independent but CD19-dependent pathway that regulates PD-1 expression. *Journal of immunology* 183(6), 3661–3671. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901218>.

- Hafeez, A., Khan, M. Y., Minhas, L. A. (2008). The Relative Distribution of High Endothelial Venules in the Subepithelial Lymphoid Compartments of Human Palatine Tonsil. *Annals of Pakistan Institute of Medical Sciences* 4, 223–226.
- Halliley, J. L., Tipton, C. M., Liesveld, J., Rosenberg, A. F., Darce, J., Gregoret, I. V., Popova, L., Kaminiski, D., Fucile, C. F., Albizua, I., Kyu, S., Chiang, K. Y., Bradley, K. T., Burack, R., Slifka, M., Hammarlund, E., Wu, H., Zhao, L., Walsh, E. E., Falsey, A. R., Randall, T. D., Cheung, W. C., Sanz, I., Lee, F. E. H. (2015). Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19–CD38^{hi}CD138⁺ Subset in Human Bone Marrow. *Immunity* 43, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.016>
- Hallisey, C. M., Heyderman, R. S., Williams, N. A. (2014). Human Tonsil-derived Dendritic Cells are Poor Inducers of T cell Immunity to Mucosally Encountered Pathogens. *Journal of Infectious Disease* 209, 1847–1856. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit819>
- Hannum, L. G., Haberman, A. M., Anderson, S. M., Shlomchik, M. J. (2000). Germinal Center Initiation, Variable Gene Region Hypermutation, and Mutant B Cell Selection without Detectable Immune Complexes on Follicular Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* 192, 931–942. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.931>
- Hardianti, M. S., Tatsumi, E., Syampurnawati, M., Furuta, K., Saigo, K., Nakamachi, Y., Kumagai, S., Ohno, H., Tanabe, S., Uchida, M., Yasuda, N. (2004). Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular lymphoma: association between AID expression and ongoing mutation in FL. *Leukemia* 18(4), 826–831. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403323>.
- Hardy, R. R., Condie, E. C., Shinton, S. A., Kemp, J. D., Hayakawa, K. (1991). Resolution and Characterization of Pro-B and Pre-Pro-B Cell Stages in Normal Mouse Bone Marrow. *Journal of Experimental Medicine* 173, 1213–1225. <https://doi.org/10.1084/jem.173.5.1213>
- Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., Lu, T. T., Ngo, V. N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y. R., Littman, D. R., Cyster, J. G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *Journal of Experimental Medicine*, 194(1), 45–56. <https://doi.org/10.1084/jem.194.1.45>
- Hasbold, J., Corcoran, L. M., Tarlinton, D. M., Tangye, S. G., Hodgkin, P. D. (2004). Evidence from the generation of immunoglobulin G-secreting cells that stochastic mechanisms regulate lymphocyte differentiation. *Nature Immunology* 5, 55–63. <https://doi.org/10.1038/ni1016>
- Hashwah, H., Schmid, C. A., Kasser, S., Bertram, K., Stelling, A., Manz, M. G., Müller, A. (2017). Inactivation of CREBBP expands the germinal center B cell compartment, down-regulates MHCII expression and promotes DLBCL growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(36), 9701–9706. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619555114>
- Hauser, A. E., Junt, T., Mempel, T. R., Sneddon, M. W., Kleinstein, S. H., Henrickson, S. E., von Andrian, U. H., Shlomchik, M. J., Haberman, A. M. (2007a). Definition of Germinal-Center B Cell Migration In Vivo Reveals Predominant Intrazonal Circulation Patterns. *Immunity* 26, 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.008>
- Hauser, A. E., Shlomchik, M. J., Haberman, A. M. (2007b). In vivo imaging studies shed light on germinal-centre development. *Nature Reviews Immunology* 7, 499–504. <https://doi.org/10.1038/nri2120>

- Haynes, N. M., Allen, C. D. C., Lesley, R., Ansel, K. M., Killeen, N., Cyster, J. G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1High Germinal Center-Associated Subpopulation. *Journal of Immunology* 5099–5108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5099>
- He, J. S., Subramaniam, S., Narang, V., Srinivasan, K., Saunders, S. P., Carbajo, D., Wen-Shan, T., Hidayah Hamadee, N., Lum, J., Lee, A., Chen, J., Poidinger, M., Zolezzi, F., Lafaille, J. J., Curotto de Lafaille, M. A. (2017). IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nature Communications* 8(1):641. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00723-0>.
- Heinzel, S., Binh Giang, T., Kan, A., Marchingo, J. M., Lye, B. K., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D. (2017). A Myc-dependent division timer complements a cell-death timer to regulate T cell and B cell responses. *Nature Immunology* 18, 96–103. <https://doi.org/10.1038/ni.3598>
- Hennino, A., Bérard, M., Krammer, P.H., Defrance, T. (2001). Flice-Inhibitory Protein Is a Key Regulator of Germinal Center B Cell Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 193, 447–458. <https://doi.org/10.1084/jem.193.4.447>
- Hercor, M., Anciaux, M., Denanglaire, S., Debuissou, D., Leo, O., Andris, F. (2017). Antigen-presenting cell-derived IL-6 restricts the expression of GATA3 and IL-4 by follicular helper T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 101, 10. <https://doi.org/10.1189/jlb.1HI1115-511R>
- Herviou, L., Jourdan, M., Martinez, A. M., Cavalli, G., Moreaux, J. (2019). EZH2 is overexpressed in transitional preplasmablasts and is involved in human plasma cell differentiation. *Leukemia* 33, 2047–2060. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0392-1>
- Hjelm, F., Carlsson, F., Getahun, A., Heyman, B. (2006). Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scandinavian Journal of Immunology* 64(3), 177–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01818.x>
- Hipp, N., Symington, H., Pastoret, C., Caron, G., Monvoisin, C., Tarte, K., Fest, T., Delaloy, C. (2017). IL-2 imprints human naive B cell fate towards plasma cell through ERK/ELK1-mediated BACH2 repression. *Nature Communications* 8, 1443. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01475-7>
- Holmes, A. B., Corinaldesi, C., Shen, Q., Kumar, R., Compagno, N., Wang, Z., Nitzan, M., Grunstein, E., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., Basso, K. (2020). Single-cell analysis of germinal-center B cells informs on lymphoma cell of origin and outcome. *Journal of Experimental Medicine* 5;217(10):e20200483. <https://doi.org/10.1084/jem.20200483>.
- Hong, S., Zhang, Zhimin, Liu, H., Tian, M., Zhu, X., Zhang, Zhuqiang, Wang, W., Zhou, X., Zhang, F., Ge, Q., Zhu, B., Tang, H., Hua, Z., Hou, B. (2018). B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4+ T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity* 695–708. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.012>
- Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y., Honma, K. (2002). Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419(6909), 841–844. <https://doi.org/10.1038/nature01123>
- Horcher, M., Souabni, A., Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP Maintains the Identity of B Cells in Late B Lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779–790. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00153-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00153-4)

- Houben, A. J., van Wijk, X. M., van Meeteren, L. A., van Zeijl, L., van de Westerlo, E. M., Hausmann, J., Fish, A., Perrakis, A., van Kuppevelt, T. H., Moolenaar, W. H. (2013). The polybasic insertion in autotaxin α confers specific binding to heparin and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry* 288(1), 510–519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.358416>
- Hu, G., Chen, J. (2013). A genome-wide regulatory network identifies key transcription factors for memory CD8⁺ T-cell development. *Nature communications* 4, 2830. <https://doi.org/10.1038/ncomms3830>
- Hu, T., He, N., Yang, Y., Yin, C., Sang, N., Yang, Q. (2015). DEC2 expression is positively correlated with HIF-1 activation and the invasiveness of human osteosarcomas. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* 34(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0135-8>
- Hua, Z., Hou, B. (2012). TLR signaling in B-cell development and activation. *Cellular and Molecular Immunology* 103–106. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.61>;
- Huynh, J. P., Lin, C. C., Kimmey, J. M., Jarjour, N. N., Schwarzkopf, E. A., Bradstreet, T. R., Shchukina, I., Shpynov, O., Weaver, C. T., Taneja, R., Artyomov, M. N., Edelson, B. T., Stallings, C. L. (2018). Bhlhe40 is an essential repressor of IL-10 during Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Experimental Medicine* 215, 1823–1838. <https://doi.org/10.1084/jem.20171704>
- Inoue, T., Shinnakasu, R., Ise, W., Kawai, C., Egawa, T., Kurosaki, T. (2017). The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help. *Journal of Experimental Medicine* 214, 1181–1198. <https://doi.org/10.1084/jem.20161263>
- Ise, W., Fujii, K., Shiroguchi, K., Ito, A., Kometani, K., Takeda, K., Kawakami, E., Yamashita, K., Suzuki, K., Okada, T., Kurosaki, T. (2018). T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. *Immunity* 48, 702–715.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.027>
- Ivanova, A. V., Ivanov, S. V., Zhang, X., Ivanov, V. N., Timofeeva, O. A., Lerman, M. I. (2004). STRA13 Interacts with STAT3 and Modulates Transcription of STAT3-dependent Targets. *Journal of Molecular Biology* 340, 641–653. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.025>
- Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Glimcher, L. H. (2003). The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunological Reviews* 194, 29–38. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00057.x>
- Iwata, T., Kawamoto, T., Sasabe, E., Miyazaki, K., Fujimoto, K., Noshiro, M., Kurihara, H., Kato, Y. (2006). Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *European Journal of Cell Biology* 85(5), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.12.007>
- Jacob, J., Kassir, R., Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *Journal of Experimental Medicine* 173(5), 1165–1175. <https://doi.org/10.1084/jem.173.5.1165>.
- Jarjour, N. N., Bradstreet, T. R., Schwarzkopf, E. A., Cook, M. E., Lai, C. W., Huang, S. C. C., Taneja, R., Stappenbeck, T. S., Van Dyken, S. J., Urban, J. F., Edelson, B. T. (2020). BHLHE40 Promotes TH2 Cell-Mediated Antihelminth Immunity and Reveals Cooperative CSF2RB Family Cytokines. *Journal of Immunology* 204, 923–932. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900978>

- Jia, Y., Hu, R., Li, P., Zheng, Y., Wang, Y., Ma, X. (2018). DEC1 is required for anti-apoptotic activity of gastric cancer cells under hypoxia by promoting Survivin expression. *Gastric Cancer* 21, 632–642. <https://doi.org/10.1007/s10120-017-0780-z>
- Johanson, T. M., Lun, A. T. L., Coughlan, H. D., Tan, T., Smyth, G. K., Nutt, S. L., Allan, R. S. (2018). Transcription-factor-mediated supervision of global genome architecture maintains B cell identity. *Nature Immunology* 19, 1257–1264. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0234-8>
- Jones S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology* 5(6), 226. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-226>
- Jones, D. D., Wilmore, J. R., Allman, D. (2015). Cellular Dynamics of Memory B Cell Populations: IgM+ and IgG+ Memory B Cells Persist Indefinitely as Quiescent Cells. *Journal of immunology* 195(10), 4753–4759. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501365>.
- Jourdan, M., Ferlin, M., Legouffe, E., Horvathova, M., Liautard, J., Rossi, J. F., Wijdenes, J., Brochier, J., Klein, B. (1998). The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *British Journal of Haematology* 100(4), 637–646. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00623.x>
- Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., Bret, C., Duperray, C., Hose, D., Klein, B. (2009). An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 114(25), 5173–5181. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235960>.
- Jourdan, M., Caraux, A., Caron, G., Robert, N., Fiol, G., Rème, T., Bolloré, K., Vendrell, J.-P., Le Gallou, S., Mourcin, F., De Vos, J., Kassambara, A., Duperray, C., Hose, D., Fest, T., Tarte, K., Klein, B. (2011). Characterization of a Transitional Preplasmablast Population in the Process of Human B Cell to Plasma Cell Differentiation. *Journal of Immunology* 187, 3931–3941. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101230>
- Jourdan, M., Cren, M., Robert, N., Bolloré, K., Fest, T., Duperray, C., Guilloton, F., Hose, D., Tarte, K., Klein, B. (2014). IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors. *Leukemia* 28(8), 1647–1656. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.61>
- Jovic, M., Avramovi, V., Vlahovi, P., Savi, V., Veli, A., Petrovi, V. (2015). Ultrastructure of the human palatine tonsil and its functional significance. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 56, 371–377.
- Jung, O., Trapp-Stamborski, V., Purushothaman, A., Jin, H., Wang, H., Sanderson, R. D., Rapraeger, A. C. (2016). Heparanase-induced shedding of syndecan-1/CD138 in myeloma and endothelial cells activates VEGFR2 and an invasive phenotype: prevention by novel synstatins. *Oncogenesis* 5(2), e202. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.5>.
- Kabashima, K., Haynes, N. M., Xu, Y., Nutt, S. L., Allende, M. L., Proia, R. L., Cyster, J. G. (2006). Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *Journal of experimental medicine* 203(12), 2683–2690. <https://doi.org/10.1084/jem.20061289>.
- Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D. M., Dietrich, W., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., Nutt, S. L. (2004).

- Plasma Cell Ontogeny Defined by Quantitative Changes in Blimp-1 Expression. *Journal of Experimental Medicine* 200, 967–977. <https://doi.org/10.1084/jem.20040973>
- Kaminski, D. A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A. F., Sanz, I. (2012). Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. *Frontiers in Immunology* 3, 302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00302>
- Kanda, H., Newton, R., Klein, R., Morita, Y., Rosen, S.D. (2009). Autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing ectoenzyme, promotes lymphocyte entry into secondary lymphoid organs. *Nature Immunology* 4, 415–423. <https://doi.org/10.1038/ni1573>
- Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Kinashi, T., Shimizu, A. (2008). Organizer-Like Reticular Stromal Cell Layer Common to Adult Secondary Lymphoid Organs. *Journal of Immunology* 181, 6189–6200. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6189>
- Kato, Y., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M. (2014). DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 Coordinate Physiological Processes, Including Circadian Rhythms in Response to Environmental Stimuli. *Current Topics in Developmental Biology* 339–372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405943-6.00010-5>
- Kennedy D. E., Okoreeh M. K., Maienschein-Cline M., Ai J., Veselits M., McLean K. C., Dhungana Y., Wang H., Peng J., Chi H., Mandal M., Clark M. R. (2020) Novel specialized cell state and spatial compartments within the germinal center. *Nature Immunology* 21(6):660-670. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0660-2>.
- Kepler, T. B., Perelson, A. S. (1993). Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunology Today* 14, 412–415. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90145-B](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90145-B)
- Kerr, W. G., Cooper, M. D., Feng, L., Burrows, P. D., Hendershot, L. M. (1989). Mu heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (Λ^L) in human pre-B cell lines. *International Immunology* 1, 355–361. <https://doi.org/10.1093/intimm/1.4.355>
- Khalil, A. M., Cambier, J. C., Shlomchik, M. J. (2012). B Cell Receptor Signal Transduction in the GC Is Short-Circuited by High Phosphatase Activity. *Science* 336, 1178–1181. <https://doi.org/10.1126/science.1213368>
- Khotskaya, Y. B., Dai, Y., Ritchie, J. P., MacLeod, V., Yang, Y., Zinn, K., Sanderson, R. D. (2009). Syndecan-1 is required for robust growth, vascularization, and metastasis of myeloma tumors in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 284(38), 26085–26095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018473>.
- Kim, C. H., Hashimoto-Hill, S., Kang, S. G. (2015). Human Tfh and Tfr Cells: Identification and Assessment of Their Migration Potential. *Methods in Molecular Biology* 175–186. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2498-1_15
- Kim, Y. R., Eom, K. S. (2014). Simultaneous Inhibition of CXCR4 and VLA-4 Exhibits Combinatorial Effect in Overcoming Stroma-Mediated Chemotherapy Resistance in Mantle Cell Lymphoma Cells. *Immune Network* 14(6), 296–306. <https://doi.org/10.4110/in.2014.14.6.296>
- Kishi, Y., Aiba, Y., Higuchi, T., Furukawa, K., Tokuhisa, T., Takemori, T., Tsubata, T. (2010). Augmented Antibody Response with Premature Germinal Center Regression in CD40L Transgenic Mice. *Journal of*

- Immunology* 185, 211–219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901694>
- Kiss, Z., Mudryj, M., Ghosh, P. M. (2020). Non-circadian aspects of BHLHE40 cellular function in cancer. *Genes Cancer*, 11(1-2), 1–19. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.201>
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., Okada, T. (2011). Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity* 34, 961–972. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.025>
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature Immunology* 7, 773–782. <https://doi.org/10.1038/ni1357>
- Knowlden, S., Georas, S. N. (2014). The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *Journal of immunology* 192(3), 851–857. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302831>
- Koike, T., Harada, K., Horiuchi, S., Kitamura, D. (2019). The quantity of CD40 signaling determines the differentiation of B cells into functionally distinct memory cell subsets. *eLife* 25 <https://doi.org/10.7554/eLife.44245.001>
- Kolar, G. R., Mehta, D., Pelayo, R., Capra, J. D. (2007). A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood* 109(6), 2545–2552. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-037150>.
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>
- Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., Kurosaki, T. (2013). Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* 39(1), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.011>.
- Kometani, K., Kurosaki, T. (2015). Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells. *Current Opinion in Immunology* 33, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.017>
- Kondo, M., Weissman, I. L., Akashi, K. (1997). Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* 91, 661–672. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80453-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80453-5)
- Koning, J. J., Mebius, R. E. (2012). Interdependence of stromal and immune cells for lymph node function. *Trends in Immunology* 33, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.10.006>
- Kräutler, N. J., Suan, D., Butt, D., Bourne, K., Hermes, J. R., Chan, T. D., Sundling, C., Kaplan, W., Schofield, P., Jackson, J., Basten, A., Christ, D., Brink, R. (2017). Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *Journal of Experimental Medicine* 214, 1259–1267. <https://doi.org/10.1084/jem.20161533>
- Kreslavsky, T., Vilagos, B., Tagoh, H., Poliakova, D. K., Schwickert, T. A., Wöhner, M., Jaritz, M., Weiss, S., Taneja, R., Rossner, M. J., Busslinger, M. (2017). Essential role for the transcription factor Bhlhe41 in regulating the development, self-renewal and BCR repertoire of B-1a cells. *Nature Immunology* 18, 442–455. <https://doi.org/10.1038/ni.3694>

- Kroenke, M. A., Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E. K., Crotty, S. (2012) Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *Journal of Immunology* 15;188(8):3734-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103246>.
- Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254, 707–710. <https://doi.org/10.1126/science.1948049>
- Kumar Krishnaswamy, J., Alsén, S., Yrlid, U., Eisenbarth, S. C., Williams, A. (2018). Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology* 9, 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02169>
- Kupfer, H., Monks, C. R., Kupfer, A. (1994). Small Splenic B Cells That Bind to Antigen-specific T Helper (Th) Cells and Face the Site of Cytokine Production in the Th Cells Selectively Proliferate: Immunofluorescence Microscopic Studies of Th-B Antigen-presenting Cell Interactions. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1507–1515. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1507>
- Laidlaw, B. J., Lu, Y., Amezcua, R. A., Weinstein, J. S., Vander Heiden, J. A., Gupta, N. T., Kleinstein, S. H., Kaech, S. M., Craft, J. (2017). Interleukin-10 from CD4+ follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Science Immunology* 2, eaan4767. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan4767>
- Laidlaw, B. J., Schmidt, T. H., Green, J. A., Allen, C. D., Okada, T., Cyster, J. G. (2017). The Eph-related tyrosine kinase ligand Ephrin-B1 marks germinal center and memory precursor B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 214(3), 639–649. <https://doi.org/10.1084/jem.20161461>.
- Lam, W. Y., Bhattacharya, D. (2018). Metabolic Links between Plasma Cell Survival, Secretion, and Stress. *Trends in Immunology* 39, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.007>
- Lamaison, C., Tarte, K. (2019). Impact of B cell/lymphoid stromal cell crosstalk in B-cell physiology and malignancy. *Immunology Letters* 215, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.02.005>
- Lau, A. W., Brink, R. (2020). Selection in the germinal center. *Current Opinion in Immunology* 63, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.001>
- Lazarevic, V., Glimcher, L. H., Lord, G. M. (2013). T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 13, 777–789. <https://doi.org/10.1038/nri3536>
- Le, Q., Maizels, N. (2019). Activation-induced deaminase (AID) localizes to the nucleus in brief pulses. *PLoS Genetics* 15, e1007968. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007968>
- Leblanc, R., Sahay, D., Houssin, A., Machuca-Gayet, I., Peyruchaud, O. (2018). Autotaxin- β interaction with the cell surface via syndecan-4 impacts on cancer cell proliferation and metastasis. *Oncotarget* 9(69), 33170–33185. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26039>
- Lechouane, F., Bonaud, A., Delpy, L., Casola, S., Oruc, Z., Chemin, G., Cogné, M., Sirac, C. (2013) B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation. *European Journal of Immunology* 43(3):619-28. <https://doi.org/10.1002/eji.201242912>
- Ledent, V., Paquet, O., Vervoort, M. (2002). Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 18. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-6-research0030>

- Ledergor, G., Weiner, A., Zada, M., Wang, S. Y., Cohen, Y. C., Gatt, M. E., Snir, N., Magen, H., Koren-Michowitz, M., Herzog-Tzarfati, K., Keren-Shaul, H., Bornstein, C., Rotkopf, R., Yofe, I., David, E., Yellapantula, V., Kay, S., Salai, M., Ben Yehuda, D., Nagler, A., ... Amit, I. (2018). Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nature medicine* 24(12), 1867–1876. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0269-2>
- Lee, B. O., Moyron-Quiroz, J., Rangel-Moreno, J., Kusser, K. L., Hartson, L., Sprague, F., Lund, F. E., Randall, T. D. (2003). CD40, but Not CD154, Expression on B Cells Is Necessary for Optimal Primary B Cell Responses. *The Journal of Immunology* 5707–5717. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5707>
- Lee, K. F., Tsai, M. M., Tsai, C. Y., Huang, C. G., Ou, Y. H., Hsieh, C. C., Hsieh, H. L., Wang, C. S. et Lin, K. H. (2019). Le DEK est un biomarqueur potentiel associé au phénotype malin dans les tissus et le plasma du cancer gastrique. *Revue internationale des sciences moléculaires* 20 (22), 5689. <https://doi.org/10.3390/ijms20225689>
- Le Gallou, S., Caron, G., Delaloy, C., Rossille, D., Tarte, K., Fest, T. (2012). IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *Journal of immunology* 189(1), 161–173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200301>
- Li, C., Zhu, B., Son, Y. M., Wang, Z., Jiang, L., Xiang, M., Ye, Z., Beckermann, K. E., Wu, Y., Jenkins, J. W., Siska, P. J., Vincent, B. G., Prakash, Y. S., Peikert, T., Edelson, B. T., Taneja, R., Kaplan, M. H., Rathmell, J. C., Dong, H., Hitosugi, T., ... Sun, J. (2019). The Transcription Factor Bhlhe40 Programs Mitochondrial Regulation of Resident CD8+ T Cell Fitness and Functionality. *Immunity*, 51(3), 491–507.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.013>
- Li, J., Lu, E., Yi, T., Cyster, J. G. (2016). EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2- quenching dendritic cells. *Nature*, 533(7601), 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature17947>
- Li, P., Jia, Y. F., Ma, X. L., Zheng, Y., Kong, Y., Zhang, Y., Zong, S., Chen, Z. T., Wang, Y. S. (2016). DEC2 suppresses tumor proliferation and metastasis by regulating ERK/NF-κB pathway in gastric cancer. *American Journal of Cancer Research* 6(8), 1741–1757.
- Li, S., Lefranc, M. P., Miles, J. J., Alamyar, E., Giudicelli, V., Duroux, P., Freeman, J. D., Corbin, V. D., Scheerlinck, J. P., Frohman, M. A., Cameron, P. U., Plebanski, M., Loveland, B., Burrows, S. R., Papenfuss, A. T., Gowans, E. J. (2013). IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nature communications* 4, 2333. <https://doi.org/10.1038/ncomms3333>
- Li, S., Peng, D., Yin, Z., Zhu, W., Hu, X., Liu, C. (2020). Effect of DEC1 on the proliferation, adhesion, invasion and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8459>
- Li, X., Gadzinsky, A., Gong, L., Tong, H., Calderon, V., Li, Y., Kitamura, D., Klein, U., Langdon, W. Y., Hou, F., Zou, Y. R., Gu, H. (2018). Cbl Ubiquitin Ligases Control B Cell Exit from the Germinal-Center Reaction. *Immunity* 48, 530-541.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.006>
- Li, Y., Xie, M., Song, X., Gragen, S., Sachdeva, K., Wan, Y., Yan, B. (2003). DEC1 negatively regulates the expression of DEC2 through binding to the E-box in the proximal promoter. *Journal of biological chemistry* 278(19), 16899–16907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300596200>

- Liang, L., Porter, E. M., Sha, W. C. (2002). Constitutive Expression of the B7h Ligand for Inducible Costimulator on Naive B Cells Is Extinguished after Activation by Distinct B Cell Receptor and Interleukin 4 Receptor-mediated Pathways and Can Be Rescued by CD40 Signaling. *Journal of Experimental Medicine* 196, 97–108. <https://doi.org/10.1084/jem.20020298>
- Lighaam, L.C., Unger, P.-P.A., Vredevoogd, D.W., Verhoeven, D., Vermeulen, E., Turksma, A.W., ten Brinke, A., Rispens, T., van Ham, S.M., 2018. In vitro-Induced Human IL-10+ B Cells Do Not Show a Subset-Defining Marker Signature and Plastically Co-express IL-10 With Pro-Inflammatory Cytokines. *Frontiers in Immunology* 9, 1913. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01913>
- Liao, Y., Lu, W., Che, Q., Yang, T., Qiu, H., Zhang, H., He, X., Wang, J., Qiu, M., Zou, Y., Gu, W., Wan, X. (2014). SHARP1 suppresses angiogenesis of endometrial cancer by decreasing hypoxia-inducible factor-1 α level. *PLoS one*, 9(6), e99907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099907>
- Liao, Y., He, X., Qiu, H., Che, Q., Wang, F., Lu, W., Chen, Z., Qiu, M., Wang, J., Wang, H., Wan, X. (2014). Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by SHARP1 is linked to the NOTCH1 signaling pathway in metastasis of endometrial cancer. *BMC cancer* 14, 487. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-487>
- Lightman, S. M., Utley, A., Lee, K. P. (2019). Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Frontiers in Immunology* 10, 965. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00965>
- Lin, C. C., Bradstreet, T. R., Schwarzkopf, E. A., Sim, J., Carrero, J. A., Chou, C., Cook, L. E., Egawa, T., Taneja, R., Murphy, T. L., Russell, J. H., Edelson, B. T. (2014). Bhlhe40 controls cytokine production by T cells and is essential for pathogenicity in autoimmune neuroinflammation. *Nature Communications* 5, 3551. <https://doi.org/10.1038/ncomms4551>
- Lin, J. X., Leonard, W. J. (2018). The Common Cytokine Receptor γ Chain Family of Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a028449. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028449>
- Lin, K. I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., Calame, K. (2002). Blimp-1-Dependent Repression of Pax-5 Is Required for Differentiation of B Cells to Immunoglobulin M-Secreting Plasma Cells. *Molecular and Cellular Biology* 22, 4771–4780. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.13.4771-4780.2002>
- Linderoth, J., Jerkeman, M., Cavallin-Ståhl, E., Kvaløy, S., Torlakovic, E. (2003). Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group Study. *Clinical Cancer Research* 9(2), 722–728.
- Lindquist, R. L., Niesner, R. A., Hauser, A. E. (2019). In the Right Place, at the Right Time: Spatiotemporal Conditions Determining Plasma Cell Survival and Function. *Frontiers in Immunology* 10, 788. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00788>
- Lino, A. C., Dang, V. D., Lampropoulou, V., Welle, A., Joedicke, J., Pohar, J., Simon, Q., Thalmensi, J., Baures, A., Flühler, V., Sakwa, I., Stervbo, U., Ries, S., Jouneau, L., Boudinot, P., Tsubata, T., Adachi, T., Hutloff, A., Dörner, T., Zimmer-Strobl, U., de Vos, A. F., Dahlke, K., Loh, G., Korniotis, S., Goosmann, C., Weill, J. C., Reynaud, C. A., Kaufmann, S. H. E., Walter, J., Fillatreau, S. (2018). LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity* 49, 120-133.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.007>
- Linterman, M. A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R. R., Srivastava, M., Hogan, J. J., Verma, N. K., Smyth,

- M. J., Rigby, R. J., Vinuesa, C. G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *Journal of Experimental Medicine* 207, 353–363. <https://doi.org/10.1084/jem.20091738>
- Linterman, M. A., Denton, A. E., Divekar, D. P., Zvetkova, I., Kane, L., Ferreira, C., Veldhoen, M., Clare, S., Dougan, G., Espéli, M., Smith, K. G. (2014). CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* 21. <https://doi.org/10.7554/eLife.03180>
- Linterman, M. A., Pierson, W., Lee, S. K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T. F., Srivastava, M., Divekar, D. P., Beaton, L., Hogan, J. J., Fagarasan, S., Liston, A., Smith, K. G. C., Vinuesa, C. G. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature Medicine* 17, 975–982. <https://doi.org/10.1038/nm.2425>
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517, 17. <https://doi.org/10.1038/nature13803>
- Liu, Q., Wu, Y., Seino, H., Haga, T., Yoshizawa, T., Morohashi, S., Kijima, H. (2018). Correlation between DEC1/DEC2 and epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer PC-3 cells. *Molecular Medicine Report* <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9367>
- Liu, Q., Wu, Y., Yoshizawa, T., Yan, X., Morohashi, S., Seino, H., Kato, Y., Kijima, H. (2016). Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 functions as an anti-apoptotic factor during paclitaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine* 38, 1727–1733. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2798>
- Liu, Y., Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Morohashi, S., Akasaka, H., Kondo, J., Wu, Y., Noshiro, M., Kato, Y., Kijima, H., 2010. Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. *Genes to Cells* 15, 315–325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01381.x>
- Liu, Z., Li, Z., Mao, K., Zou, J., Wang, Y., Tao, Z., Lin, G., Tian, L., Ji, Y., Wu, X., Zhu, X., Sun, S., Chen, W., Xiang, C., Sun, B. (2009). Dec2 Promotes Th2 Cell Differentiation by Enhancing IL-2R Signaling. *Journal of Immunology* 183, 6320–6329. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900975>
- Luo, W., Weisel, F., Shlomchik, M.J. (2018). B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells. *Immunity* 48, 313-326.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.008>
- Lyu, L., Wang, B., Xiong, C., Zhang, X., Zhang, X., Zhang, J. (2017). Selective export of autotaxin from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 292(17), 7011–7022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774356>
- Ma, C. S., Suryani, S., Avery, D. T., Chan, A., Nanan, R., Santner-Nanan, B., Deenick, E. K., Tangye, S. G. (2009). Early commitment of naïve human CD4+ T cells to the T follicular helper (TFH) cell lineage is induced by IL-12. *Immunology and Cell Biology* 590–600. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.64>
- Ma, W., Shi, X., Lu, S., Wu, L., Wang, Y. (2013). Hypoxia-induced overexpression of DEC1 is regulated by HIF-1 α in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 30(6), 2957–2962. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2774>

- Mabbott, N. A., Kenneth Baillie, J., Kobayashi, A., Donaldson, D. S., Ohmori, H., Yoon, S. O., Freedman, A. S., Freeman, T. C., Summers, K. M. (2011). Expression of mesenchyme-specific gene signatures by follicular dendritic cells: insights from the meta-analysis of microarray data from multiple mouse cell populations: FDC express mesenchyme-specific gene signatures. *Immunology* 133, 482–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03461.x>
- Mackay, F., Schneider, P. (2008). TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 19(3-4), 263–276. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.04.006>.
- MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zúñiga, E., Cook, M. C., Vinuesa, C. G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews* 194, 8–18. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00058.x>.
- Maeda, K., Burton, G. F., Padgett, D. A., Conrad, D. H., Huff, T. F., Szakal, A. K., Tew, J. G. (1992). Murine follicular dendritic cells and low affinity Fc receptors for IgE (Fc epsilon RII). *Journal of Immunology* 148, 2340–2347.
- Makino, Y., Jensen, N. H., Yokota, N., Rossner, M. J., Akiyama, H., Shirahige, K., Okada, Y. (2019). Single cell RNA-sequencing identified Dec2 as a suppressive factor for spermatogonial differentiation by inhibiting Sohlh1 expression. *Scientific Reports* 9(1), 6063. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42578-z>
- Mandel, T. E., Phipps, R. P., Abbot, A., Tew, J. (1981). Long-term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immunized mice. *Immunology* 353–362.
- Marshall, J. L., Zhang, Y., Pallan, L., Hsu, M. C., Khan, M., Cunningham, A. F., MacLennan, I. C. M., Toellner, K. M. (2011). Early B blasts acquire a capacity for Ig class switch recombination that is lost as they become plasmablasts. *European Journal Immunology* 41, 3506–3512. <https://doi.org/10.1002/eji.201141762>
- Martínez-Llordella, M., Esensten, J. H., Bailey-Bucktrout, S. L., Lipsky, R. H., Marini, A., Chen, J., Mughal, M., Mattson, M. P., Taub, D. D., Bluestone, J. A. (2013). CD28-inducible transcription factor DEC1 is required for efficient autoreactive CD4+ T cell response. *Journal of Experimental Medicine* 210, 1603–1619. <https://doi.org/10.1084/jem.20122387>
- Martinez-Pomares, L., Gordon, S. (2007). Antigen Presentation the Macrophage Way. *Cell* 131, 641–643. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.046>
- Mathian, A., Gallegos, M., Pascual, V., Banchereau, J., Koutouzov, S. (2011). Interferon- α induces unabated production of short-lived plasma cells in pre-autoimmune lupus-prone (NZB \times NZW)F1 mice but not in BALB/c mice. *European Journal of Immunology* 41(3), 863–872. <https://doi.org/10.1002/eji.201040649>
- Matsumoto, M., Lo, S. F., Carruthers, C. J., Min, J., Mariathasan, S., Huang, G., Plas, D. R., Martin, S. M., Geha, R. S., Nahm, M. H., Chaplin, D. D. (1996). Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-a-deficient mice. *Nature* 382, 462–466.
- Matthes, T., Dunand-Sauthier, I., Santiago-Raber, M. L., Krause, K. H., Donze, O., Passweg, J., McKee, T., Huard, B. (2011). Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood* 118(7), 1838–

1844. [https://doi.org/ 10.1182/blood-2011-01-332940](https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332940).
- Mauri, C., Bosma, A. Immune regulatory function of B cells. (2012) *Annual Review in Immunology* 30:221-41. [https://doi.org/ 10.1146/annurev-immunol-020711-074934](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934).
- Mayer., C. T., Gazumyan, A., Kara, E. E., Gitlin, A. D., Golijanin, J., Viant, C., Pai, J., Oliveira, T. Y., Wang, Q., Escolano, A., Medina-Ramirez, M., Sanders, R. W., Nussenzweig, M. C. (2017). The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center. *Science* 358, eaao2602. <https://doi.org/10.1126/science.aao2602>
- Mayer, C. T., Nieke, J. P., Gazumyan, A., Cipolla, M., Wang, Q., Oliveira, T. Y., Ramos, V., Monette, S., Li, Q. Z., Gershwin, M. E., Kashkar, H., Nussenzweig, M. C. (2020). An apoptosis-dependent checkpoint for autoimmunity in memory B and plasma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(40), 24957–24963. [https://doi.org/ 10.1073/pnas.2015372117](https://doi.org/10.1073/pnas.2015372117).
- McCarron, M. J., Park, P. W., Fooksman, D. R. (2017). CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood* 129(20), 2749–2759. [https://doi.org/ 10.1182/blood-2017-01-761643](https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-761643).
- McGrath, J., Panzica, L., Ransom, R., Withers, H. G., Gelman, I. H. (2019). Identification of Genes Regulating Breast Cancer Dormancy in 3D Bone Endosteal Niche Cultures. *Molecular cancer research* 17(4), 860–869. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0956>
- McHeyzer-Williams, M. G., McLean, M. J., Lalor, P. A., Nossal, G. J. (1993). Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 178(1), 295–307. [https://doi.org/ 10.1084/jem.178.1.295](https://doi.org/10.1084/jem.178.1.295).
- Meffre, E., O'Connor, K. C. (2019). Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies. *Immunological Reviews* 292, 90–101. <https://doi.org/10.1111/imr.12821>
- Mehta, D. S., Wurster, A. L., Whitters, M. J., Young, D. A., Collins, M., Grusby, M. J. (2003). IL-21 Induces the Apoptosis of Resting and Activated Primary B Cells. *Journal of Immunology* 170, 4111–4118. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4111>
- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H., Ghia, P., Andersson, J. (1995). Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Current Opinion in Immunology* 7, 214–227. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80006-9](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80006-9)
- Meng, W., Zhang, B., Schwartz, G. W., Rosenfeld, A. M., Ren, D., Thome, J. J. C., Carpenter, D. J., Matsuoka, N., Lerner, H., Friedman, A. L., Granot, T., Farber, D. L., Shlomchik, M. J., Hershberg, U., Luning Prak, E. T. (2017). An atlas of B-cell clonal distribution in the human body. *Nature Biotechnology* 35, 879–884. <https://doi.org/10.1038/nbt.3942>
- Mesin, L., Ersching, J., Victora, G. D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* 45, 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001>
- Mesin, L., Schiepers, A., Ersching, J., Barbulescu, A., Cavazzoni, C. B., Angelini, A., Okada, T., Kurosaki, T., Victora, G. D. (2020). Restricted Clonality and Limited Germinal Center Reentry Characterize Memory B Cell Reactivation by Boosting. *Cell* 180(1), 92–106.e11. [https://doi.org/ 10.1016/j.cell.2019.11.032](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.032)

- Methot, S. P., Di Noia, J. M. (2017). Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination, *Advances in Immunology* 37–87. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.002>
- Meyer-Hermann, M., Mohr, E., Pelletier, N., Zhang, Y., Victora, G. D., Toellner, K. M. (2012). A theory of germinal center B cell selection, division, and exit. *Cell reports* 2(1), 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.010>.
- Milpied, P., Cervera-Marzal, I., Mollichella, M. L., Tesson, B., Brisou, G., Traverse-Glehen, A., Salles, G., Spinelli, L., Nadel, B. (2018). Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nature immunology* 19(9), 1013–1024. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0181-4>
- Minnich, M., Tagoh, H., Bönel, P., Axelsson, E., Fischer, M., Cebolla, B., Tarakhovsky, A., Nutt, S.L., Jaritz, M., Busslinger, M. (2016). Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nature Immunology* 17, 331–343. <https://doi.org/10.1038/ni.3349>
- Mintz, M. A., Felce, J. H., Chou, M. Y., Mayya, V., Xu, Y., Shui, J. W., An, J., Li, Z., Marson, A., Okada, T., Ware, C. F., Kronenberg, M., Dustin, M. L., Cyster, J. G. (2019). The HVEM-BTLA Axis Restrains T Cell Help to Germinal Center B Cells and Functions as a Cell-Extrinsic Suppressor in Lymphomagenesis. *Immunity* 51(2), 310–323.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.022>
- Miyazaki, K., Miyazaki, M., Guo, Y., Yamasaki, N., Kanno, M., Honda, Z., Oda, H., Kawamoto, H., Honda, H. (2010). The Role of the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Dec1 in the Regulatory T Cells. *Journal of Immunology* 185, 7330–7339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001381>
- Moens, L., Tangye, S.G. (2014). Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Frontiers in Immunology* 5 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00065>
- Montagner, M., Enzo, E., Forcato, M., Zanconato, F., Parenti, A., Rampazzo, E., Basso, G., Leo, G., Rosato, A., Biciato, S., Cordenonsi, M., Piccolo, S. (2012). SHARP1 suppresses breast cancer metastasis by promoting degradation of hypoxia-inducible factors. *Nature* 487, 380–384. <https://doi.org/10.1038/nature11207>
- Mueller, S.N., Ahmed, R. (2008). Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunological Reviews* 224, 284–294. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00657.x>
- Muñoz, N. M., Meliton, A. Y., Arm, J. P., Bonventre, J. V., Cho, W., Leff, A. R. (2007). Deletion of secretory group V phospholipase A2 attenuates cell migration and airway hyperresponsiveness in immunosensitized mice. *Journal of immunology* 179(7), 4800–4807. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4800>
- Murakami, K., Wu, Y., Imaizumi, T., Aoki, Y., Liu, Q., Yan, X., Seino, H., Yoshizawa, T., Morohashi, S., Kato, Y., Kijima, H. (2017). DEC1 promotes hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human hepatocellular carcinoma cells. *Biomedical Research* 38, 221–227. <https://doi.org/10.2220/biomedres.38.221>
- Murase, R., Taketomi, Y., Miki, Y., Nishito, Y., Saito, M., Fukami, K., Yamamoto, K., Murakami, M. (2017). Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer. *Scientific Reports* 7(1), 12261. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12434-z>

- Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Matthews, J. R., Quong, M. W., Rivera, R. R., Stuiver, M. H. (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1218, 129–135. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)90001-9)
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., Weintraub, H., Baltimore, D. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537–544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90434-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90434-0)
- Murre C. (2005). Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nature immunology* 6(11), 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/ni1260>
- Muto, A, Tashiro, S, Nakajima, O, Hoshino, H, Takahashi, S, Sakoda, E, Ikebe, D, Yamamoto, M, Igarashi, K. (2004) The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 3;429(6991):566-71. <https://doi.org/10.1038/nature02596>.
- Mykytiv, V., Alwaheed, A., Mohd Hashim, N. A. (2019). Double CD38-/CD138- negative multiple myeloma. *Hematology/oncology and Stem Cell Therapy* 12(1), 64–66. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2017.08.003>.
- Natkunam, Y., Zhao, S., Mason, D. Y., Chen, J., Taidi, B., Jones, M., Hammer, A. S., Hamilton Dutoit, S., Lossos, I. S., Levy, R. (2007). The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood* 109(4), 1636–1642. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-039024>
- Nguyen, D. C., Garimalla, S., Xiao, H., Kyu, S., Albizua, I., Galipeau, J., Chiang, K. Y., Waller, E. K., Wu, R., Gibson, G., Roberson, J., Lund, F. E., Randall, T. D., Sanz, I., Lee, F. E. (2018). Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion. *Nature communications* 9(1), 3698. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05853-7>.
- Nguyen, D. C., Joyner, C. J., Sanz, I., Lee, F. E. (2019). Factors Affecting Early Antibody Secreting Cell Maturation Into Long-Lived Plasma Cells. *Frontiers in immunology* 10, 2138. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02138>.
- Noshiro, M., Furukawa, M., Honma, S., Kawamoto, T., Hamada, T., Honma, K., Kato, Y. (2005). Tissue-Specific Disruption of Rhythmic Expression of Dec1 and Dec2 in Clock Mutant Mice. *Journal of Biological Rhythms* 20, 404–418. <https://doi.org/10.1177/0748730405280195>
- Nowosad, C. R., Spillane, K. M., Tolar, P. (2016). Germinal center B cells recognize antigen through a specialized immune synapse architecture. *Nature Immunology* 17, 870–877. <https://doi.org/10.1038/ni.3458>
- Numata, A., Kwok, H. S., Kawasaki, A., Li, J., Zhou, Q. L., Kerry, J., Benoukraf, T., Bararia, D., Li, F., Ballabio, E., Tapia, M., Deshpande, A. J., Welner, R. S., Delwel, R., Yang, H., Milne, T. A., Taneja, R., Tenen, D. G. (2018). The basic helix-loop-helix transcription factor SHARP1 is an oncogenic driver in MLL-AF6 acute myelogenous leukemia. *Nature communications* 9(1), 1622. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03854-0>
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y. H., Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* 13. <https://doi.org/10.1126/science.1176676>

- Nutt, S. L., Fairfax, K. A., Kallies, A. (2007). BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nature Reviews Immunology* 7, 923–927. <https://doi.org/10.1038/nri2204>
- Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology* 15, 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A. S., Klein, U., Dinner, A. R., Singh, H., Sciammas, R. (2013). Transcriptional Regulation of Germinal Center B and Plasma Cell Fates by Dynamical Control of IRF4. *Immunity* 38, 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.009>
- Odegard, J. M., Marks, B. R., DiPlacido, L. D., Poholek, A. C., Kono, D. H., Dong, C., Flavell, R. A., Craft, J. (2008). ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 205(12), 2873–2886. <https://doi.org/10.1084/jem.20080840>.
- Okada, T., Ngo, V. N., Ekland, E. H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D. R., Cyster, J. G. (2002). Chemokine Requirements for B Cell Entry to Lymph Nodes and Peyer's Patches. *Journal of Experimental Medicine* 196, 65–75. <https://doi.org/10.1084/jem.20020201>
- Olteanu, H., Fenske, T. S., Harrington, A. M., Szabo, A., He, P., Kroft, S. H. (2011). CD23 expression in follicular lymphoma: clinicopathologic correlations. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(1), 46–53. <https://doi.org/10.1309/AJCP27YWLIQRAJPW>.
- Oprea, M., Perelson, A. S. (1997). Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *Journal of Immunology* 158, 5155–5162.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H. P., Wang, G., Qi, C. F., Hwu, P., Shaffer, D. J., Akillesh, S., Roopenian, D. C., Morse, H. C., Lipsky, P. E., Leonard, W. J. (2004). Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *Journal of Immunology* 173, 5361–5371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5361>
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse III, H. C., Liu, C., Schwartzberg, P. L., Leonard, W. J. (2002). A Critical Role for IL-21 in Regulating Immunoglobulin Production. *Science* 298, 1630–1634. <https://doi.org/10.1126/science.1077002>
- Pabst, O., Peters, T., Czeloth, N., Bernhardt, G., Scharffetter-Kochanek, K., Förster, R. (2005). Cutting edge: egress of newly generated plasma cells from peripheral lymph nodes depends on beta 2 integrin. *Journal of Immunology* 174(12), 7492–7495. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.7492>.
- Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Wei, C., Looney, R. J., Sanz, I., Anolik, J. H. (2009). Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy. *Journal of Immunology* 182, 5982–5993. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801859>
- Pangault, C., Amé-Thomas, P., Ruminy, P., Rossille, D., Caron, G., Baia, M., De Vos, J., Roussel, M., Monvoisin, C., Lamy, T., Tilly, H., Gaulard, P., Tarte, K., Fest, T. (2010). Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia* 24(12), 2080–2089. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.223>
- Pape, K. A., Kouskoff, V., Nemazee, D., Tang, H. L., Cyster, J. G., Tze, L. E., Hippen, K. L., Behrens, T. W.,

- Jenkins, M. K. (2003). Visualization of the Genesis and Fate of Isotype-switched B Cells during a Primary Immune Response. *Journal of Experimental Medicine* 197, 1677–1687. <https://doi.org/10.1084/jem.20012065>
- Park, C., Hwang, I. Y., Sinha, R. K., Kamenyeva, O., Davis, M. D., Kehrl, J. H. (2012). Lymph node B lymphocyte trafficking is constrained by anatomy and highly dependent upon chemoattractant desensitization. *Blood* 119, 12. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-364273>
- Pasqualon, T., Lue, H., Groening, S., Pruessmeyer, J., Jahr, H., Denecke, B., Bernhagen, J., Ludwig, A. (2016). Cell surface syndecan-1 contributes to binding and function of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on epithelial tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863(4), 717–726. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.003>
- Pathak, S., Ma, S., Shukla, V., Lu, R. (2013). A Role for IRF8 in B Cell Anergy. *Journal of Immunology* 6222–6230. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301169>
- Peperzak, V., Vikström, I., Walker, J., Glaser, S. P., LePage, M., Coquery, C. M., Erickson, L. D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S. L., Tarlinton, D. M. (2013). Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nature immunology* 14(3), 290–297. <https://doi.org/10.1038/ni.2527>
- Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y., Cyster, J. G. (2009) EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* 27;460(7259):1122-6. <https://doi.org/10.1038/nature08226>.
- Pellat-Deceunynck, C., Defrance, T. (2015). The origin of the plasma-cell heterogeneity. *Frontiers in Immunology* 6, 2. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00005>
- Pène, J., Gauchat, J. F., Lécart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J. C., Yssel, H. (2004). Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG1 and IgG3 by Human B Cells. *Journal of Immunology* 172, 5154–5157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5154>
- Peng, S. L., Szabo, S. J., Glimcher, L. H. (2002). T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 5545–5550. <https://doi.org/10.1073/pnas.082114899>
- Peng, Y., Liu, W., Xiong, J., Gui, H. Y., Feng, X. M., Chen, R. N., Hu, G., Yang, J. (2012). Down regulation of differentiated embryonic chondrocytes 1 (DEC1) is involved in 8-methoxypsoralen-induced apoptosis in HepG2 cells. *Toxicology* 301(1-3), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.022>
- Perry, M., Whyte, A. (1998). Immunology of the tonsils. *Immunology Today* 19, 414–421. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(98\)01307-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(98)01307-3)
- Péterfia, B., Füle, T., Baghy, K., Szabadkai, K., Fullár, A., Dobos, K., Zong, F., Dobra, K., Hollósi, P., Jeney, A., Paku, S., Kovalszky, I. (2012). Syndecan-1 enhances proliferation, migration and metastasis of HT-1080 cells in cooperation with syndecan-2. *PloS one* 7(6), e39474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039474>
- Petersone, L., Edner, N. M., Ovcinnikovs, V., Heuts, F., Ross, E. M., Ntavli, E., Wang, C. J., Walker, L. S. K. (2018) T Cell/B Cell Collaboration and Autoimmunity: An Intimate Relationship. *Frontiers in Immunology* 27;9:1941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01941>.

- Phan, T. G., Green, J. A., Gray, E. E., Xu, Y., Cyster, J. G. (2009). Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nature Immunology* 10, 786–793. <https://doi.org/10.1038/ni.1745>
- Phan, T. G., Grigorova, I., Okada, T., Cyster, J. G. (2007). Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nature Immunology* 8, 992–1000. <https://doi.org/10.1038/ni1494>
- Pikor, N. B., Mörbe, U., Lütge, M., Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Novkovic, M., Cheng, H. W., Nombela-Arrieta, C., Nagasawa, T., Linterman, M. A., Onder, L., Ludewig, B. (2020). Remodeling of light and dark zone follicular dendritic cells governs germinal center responses. *Nature immunology* 21(6), 649–659. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0672-y>
- Pridans, C., Holmes, M. L., Polli, M., Wettenhall, J. M., Dakic, A., Corcoran, L. M., Smyth, G. K., Nutt, S. L. (2008). Identification of Pax5 Target Genes in Early B Cell Differentiation. *Journal of Immunology* 180, 1719–1728. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1719>
- Qi, H. (2016). T follicular helper cells in space-time. *Nature Reviews Immunology* 16, 612–625. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.94>
- Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L., Germain, R. N. (2008). SAP-controlled T–B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769. <https://doi.org/10.1038/nature07345>
- Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y. C., Germain, R. N. (2006). Extrafollicular Activation of Lymph Node B Cells by Antigen-Bearing Dendritic Cells. *Science* 312, 1672–1676. <https://doi.org/10.1126/science.1125703>
- Rabkin, C. S., Janz, S. (2008). Overview of mechanisms and consequences of chromosomal translocation. *Journal of the National Cancer Institute* (39), 1. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgn021>.
- Radtke, D., Bannard, O. (2019). Expression of the Plasma Cell Transcriptional Regulator Blimp-1 by Dark Zone Germinal Center B Cells During Periods of Proliferation. *Frontiers in Immunology* 9, 3106. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03106>
- Rafei, M., Hsieh, J., Fortier, S., Li, M., Yuan, S., Birman, E., Forner, K., Boivin, M. N., Doody, K., Tremblay, M., Annabi, B., Galipeau, J. (2008). Mesenchymal stromal cell–derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 112, 4991–4998. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-166892>
- Ramadani, F., Bowen, H., Upton, N., Hobson, P. S., Chan, Y. C., Chen, J. B., Chang, T. W., McDonnell, J. M., Sutton, B. J., Fear, D. J., Gould, H. J. (2017). Ontogeny of human IgE-expressing B cells and plasma cells. *Allergy* 72(1), 66–76. <https://doi.org/10.1111/all.12911>.
- Rankin, A. L., MacLeod, H., Keegan, S., Andreyeva, T., Lowe, L., Bloom, L., Collins, M., Nickerson-Nutter, C., Young, D., Guay, H. (2011). IL-21 Receptor Is Critical for the Development of Memory B Cell Responses. *Journal of Immunology* 186, 667–674. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903207>
- Rauschmeier, R., Gustafsson, C., Reinhardt, A., A-Gonzalez, N., Tortola, L., Cansever, D., Subramanian, S., Taneja, R., Rossner, M.J., Sieweke, M. H., Greter, M., Mansson, R., Busslinger, M., Kreslavsky, T. (2019). Bhlhe40 and Bhlhe41 transcription factors regulate alveolar macrophage

self-renewal and identity. *European Molecular Biology Organization Journal*
<https://doi.org/10.15252/embj.2018101233>

- Ravetch, J. V., Nussenzweig, M. (2007). Killing some to make way for others. *Nature Immunology* 8, 337–339. <https://doi.org/10.1038/ni0407-337>
- Rawal, S., Chu, F., Zhang, M., Park, H. J., Nattamai, D., Kannan, S., Sharma, R., Delgado, D., Chou, T., Lin, H. Y., Baladandayuthapani, V., Luong, A., Vega, F., Fowler, N., Dong, C., Davis, R. E., Neelapu, S. S. (2013). Cross talk between follicular Th cells and tumor cells in human follicular lymphoma promotes immune evasion in the tumor microenvironment. *Journal of immunology* 190(12), 6681–6693. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201363>
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416, 94–99.
- Reijmers, R. M., Groen, R. W., Kuil, A., Weijer, K., Kimberley, F. C., Medema, J. P., van Kuppevelt, T. H., Li, J. P., Spaargaren, M., Pals, S. T. (2011). Disruption of heparan sulfate proteoglycan conformation perturbs B-cell maturation and APRIL-mediated plasma cell survival. *Blood* 117(23), 6162–6171. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-325522>.
- Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F., Glimcher, L. H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300–307. <https://doi.org/10.1038/35085509>
- Reimold, A. M., Ponath, P. D., Li, Y. S., Hardy, R. R., David, C. S., Strominger, J. L., Glimcher, L. H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *Journal of Experimental Medicine* 183, 393–401. <https://doi.org/10.1084/jem.183.2.393>
- Ridley, R. C., Xiao, H., Hata, H., Woodliff, J., Epstein, J., Sanderson, R. D. (1993). Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 81(3), 767–774.
- Rieken, S., Herroeder, S., Sassmann, A., Wallenwein, B., Moers, A., Offermanns, S., Wettschreck, N. (2006). Lysophospholipids control integrin-dependent adhesion in splenic B cells through G(i) and G(12)/G(13) family G-proteins but not through G(q)/G(11). *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36985–36992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605287200>
- Ritvo, P. G. G., Churlaud, G., Quiniou, V., Florez, L., Brimaud, F., Fourcade, G., Mariotti-Ferrandiz, E., Klatzmann, D. (2017). Tfr cells lack IL-2Ra but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the IL-1-dependent activation of Tfh cells. *Science Immunology* 12. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan0368>.
- Roberts, A. W., Lee, B. L., Deguine, J., John, S., Shlomchik, M. J., Barton, G. M. (2017). Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity* 47, 913–927.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.006>
- Robinson, M. J., Pitt, C., Brodie, E. J., Valk, A. M., O'Donnell, K., Nitschke, L., Jones, S., Tarlinton, D. M. (2019). BAFF, IL-4 and IL-21 separably program germinal center-like phenotype acquisition, BCL6 expression, proliferation and survival of CD40L-activated B cells in vitro. *Immunology and Cellular Biology* 826–839. <https://doi.org/10.1111/imcb.12283>
- Roco, J. A., Mesin, L., Binder, S. C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P. F., Ellyard, J., Shen, Q.,

- Robert, P. A., Cappello, J., Vohra, H., Zhang, Y., Nowosad, C. R., Schiepers, A., Corcoran, L. M., Toellner, K. M., Polo, J. M., Meyer-Hermann, M., Victora, G. D., Vinuesa, C. G. (2019). Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* 51, 337-350.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001>
- Rodda, L. B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T., Cyster, J. G. (2015). Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. *Journal of Immunology* 195, 4781–4791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501191>
- Rodda, L. B., Lu, E., Bennett, M. L., Sokol, C. L., Wang, X., Luther, S. A., Barres, B. A., Luster, A. D., Ye, C. J., Cyster, J. G. (2018). Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* 48, 1014-1028.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.006>
- Rodrigues, P. F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G. E., Ivanek, R., Tussiwand, R. (2018). Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Immunology* 19, 711–722. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0136-9>
- Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Hermann F, Reich B, Mack M. Basophils support the survival of plasma cells in mice. *Journal of Immunology*. (2010) 185(12):7180-5. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002319>.
- Rolink, A. G., Andersson, J., Melchers, F. (1998). Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *European Journal of Immunology* 11, 3738–3748. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199811\)28:11<3738::AID-IMMU3738>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3738::AID-IMMU3738>3.0.CO;2-Q)
- Rossner, M. J., Dörr, J., Gass, P., Schwab, M. H., Nave, K. A. (1997). SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation. *Molecular and Cellular Neurosciences* 10(3-4), 460–475.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., Denizot, Y. (2013). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *Journal of Experimental Medicine* 210, 1501–1507. <https://doi.org/10.1084/jem.20130072>
- Roulland, S., Faroudi, M., Mamessier, E., Sungalee, S., Salles, G., Nadel, B. (2011). Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Advances in Immunology* 111, 1–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00001-5>.
- Ruiz-Lafuente, N., Muro, M., Minguela, A., Parrado, A. (2018). The transcriptional response of mouse spleen B cells to IL-4: Comparison to the response of human peripheral blood B cells. *Biochemistry and Biophysics Reports* 16, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.09.007>
- Sacquin, A., Gador, M., Fazilleau, N. (2017). The strength of BCR signaling shapes terminal development of follicular helper T cells in mice. *European Journal of Immunology* 1295–1304. <https://doi.org/10.1002/eji.201746952>
- Sage, P. T., Alvarez, D., Godec, J., von Andrian, U. H., Sharpe, A. H. (2014). Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *Journal of Clinical Investigation* 124, 5191–5204. <https://doi.org/10.1172/JCI76861>

- Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B., Sharpe, A. H. (2014). The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity* 41, 1026–1039. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.005>
- Sage, P. T., Ron-Harel, N., Juneja, V. R., Sen, D. R., Maleri, S., Sungnak, W., Kuchroo, V. K., Haining, W. N., Chevrier, N., Haigis, M., Sharpe, A. H. (2016). Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nature Immunology* 17, 1436–1446. <https://doi.org/10.1038/ni.3578>
- Sage, P. T., Sharpe, A. H. (2015). T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends in Immunology* 36, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.05.005>
- Sasamoto, T., Fujimoto, K., Kanawa, M., Kimura, J., Takeuchi, J., Harada, N., Goto, N., Kawamoto, T., Noshiro, M., Suardita, K., Tanne, K., Kato, Y. (2016). DEC2 is a negative regulator for the proliferation and differentiation of chondrocyte lineage-committed mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine* 38(3), 876–884. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2660>
- Sato, F., Bhawal, U. K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Imaizumi, T., Imanaka, T., Kondo, J., Koyanagi, S., Noshiro, M., Yoshida, H., Kusumi, T., Kato, Y., Kijima, H. (2008). Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression: DEC2 regulates the expression of VEGF. *Genes to Cells* 13, 131–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01153.x>
- Sato, F., Bhawal, U. K., Yoshimura, T., Muragaki, Y. (2016). DEC1 and DEC2 Crosstalk between Circadian Rhythm and Tumor Progression. *Journal of Cancer* 7, 153–159. <https://doi.org/10.7150/jca.13748>
- Sato, F., Kawamura, H., Wu, Y., Sato, H., Jin, D., Bhawal, U. K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Kato, Y., Kijima, H. (2012). The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- β -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. *International Journal of Molecular Medicine* 30, 495–501. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1037>
- Sato, H., Wu, Y., Kato, Y., Liu, Q., Hirai, H., Yoshizawa, T., Morohashi, S., Watanabe, J., Kijima, H. (2017). DEC2 expression antagonizes cisplatin-induced apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports* 16, 43–48. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6571>
- Sato, K., Honda, S., Shibuya, A. (2018). Cutting Edge: Identification of Marginal Reticular Cells as Phagocytes of Apoptotic B Cells in Germinal Centers. *Journal of Immunology* 11, 3691–3696. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701293>
- Sayin, I., Radtke, A. J., Vella, L. A., Jin, W., Wherry, E. J., Buggert, M., Betts, M. R., Herati, R. S., Germain, R. N., Canaday, D. H. (2018). Spatial distribution and function of T follicular regulatory cells in human lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine* 215, 1531–1542. <https://doi.org/10.1084/jem.20171940>
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., Moser, B. (2000). Cxc Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1553–1562. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1553>
- Scharer, C. D., Patterson, D. G., Mi, T., Price, M. J., Hicks, S. L., Boss, J. M. (2020). Antibody-secreting

- cell destiny emerges during the initial stages of B-cell activation. *Nature communications* 11(1), 3989. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17798-x>
- Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G. A., Busslinger, M. (2007). Transcription Factor Pax5 Activates the Chromatin of Key Genes Involved in B Cell Signaling, Adhesion, Migration, and Immune Function. *Immunity* 27, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.019>
- Scheffler, J. M., Sparber, F., Tripp, C. H., Herrmann, C., Humenberger, A., Blitz, J., Romani, N., Stoitzner, P., Huber, L. A. (2014). LAMTOR2 regulates dendritic cell homeostasis through FLT3-dependent mTOR signalling. *Nature communications* 5, 5138. <https://doi.org/10.1038/ncomms6138>
- Sethuraman, A., Brown, M., Krutilina, R., Wu, Z. H., Seagroves, T. N., Pfeffer, L. M., Fan, M. (2018). BHLHE40 confers a pro-survival and pro-metastatic phenotype to breast cancer cells by modulating HBEGF secretion. *Breast Cancer Research* 20(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1046-3>
- Shen, M., Yoshida, E., Yan, W., Kawamoto, T., Suardita, K., Koyano, Y., Fujimoto, K., Noshiro, M., Kato, Y. (2002). Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *Journal of Biological Chemistry* 277(51), 50112–50120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206771200>
- Sheng, Z., Li, L., Zhu, L. J., Smith, T. W., Demers, A., Ross, A. H., Moser, R. P., Green, M. R. (2010). A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications. *Nature Medicine* 16(6), 671–677. <https://doi.org/10.1038/nm.2158>
- Shen, Z., Zhu, L., Zhang, C., Cui, X., Lu, J. (2019). Overexpression of BHLHE41, correlated with DNA hypomethylation in 3'UTR region, promotes the growth of human clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Reports*, 41(4), 2137–2147. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7004>
- Schubart, D. B., Rolink, A., Kosco-Vilboist, M. H., Botteri, F. (1996). B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* 383, 538–542.
- Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., Cyster, J. G. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309(5741), 1735–1739. <https://doi.org/10.1126/science.1113640>
- Schwickert, T. A., Lindquist, R. L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M. H., Dustin, M. L., Nussenzweig, M. C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446, 83–87. <https://doi.org/10.1038/nature05573>
- Seidel, C., Børset, M., Hjertner, O., Cao, D., Abildgaard, N., Hjorth-Hansen, H., Sanderson, R. D., Waage, A., Sundan, A. (2000). High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood* 96(9), 3139–3146.
- Seimiya, M., Bahar, R., Wang, Y., Kawamura, K., Tada, Y., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Saisho, H., Watanabe, T., Tagawa, M., O-Wang, J. (2002). Clast5/Stra13 Is a Negative Regulator of B Lymphocyte Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292, 121–127. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6605>

- Seimiya, M., Wada, A., Kawamura, K., Sakamoto, A., Ohkubo, Y., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Watanabe, T., Saisho, H., Tagawa, M., O-Wang, J. (2004). Impaired lymphocyte development and function in Clast5/Stra13/DEC1-transgenic mice. *European Journal of Immunology*, 34(5), 1322–1332. <https://doi.org/10.1002/eji.200324700>
- Seino, H., Wu, Y., Morohashi, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., Takai, Y., Kijima, H. (2015). Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 regulates the cisplatin-induced apoptotic pathway of human esophageal cancer cells. *Biomedical Research* 36, 89–96. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.89>
- Selb, R., Eckl-Dorna, J., Neunkirchner, A., Schmetterer, K., Marth, K., Gamper, J., Jahn-Schmid, B., Pickl, W. F., Valenta, R., Niederberger, V. (2017). CD23 surface density on B cells is associated with IgE levels and determines IgE-facilitated allergen uptake, as well as activation of allergen-specific T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139(1), 290–299.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.042>.
- Setiadi, A. F., Sheikine, Y. (2019). CD138-negative plasma cell myeloma: a diagnostic challenge and a unique entity. *BMJ Case Reports* 12(11), e232233. <https://doi.org/10.1136/bcr-2019-232233>.
- Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., Staudt, L. M. (2002). Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity* 17, 51–62. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00335-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00335-7)
- Shaffer, A. L., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Giltane, J. M., Lam, L. T., Pickeral, O. K., Staudt, L. M. (2001). Signatures of the Immune Response. *Immunity* 15, 375–385. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00194-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00194-7)
- Shaffer, A. L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Qian, S. B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B. K., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J. W., Calame, K., Glimcher, L. H., Staudt, L. M. (2004). XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. *Immunity* 21, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.010>
- Shekhar, S., Yang, X. (2012). The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency. *Cellular and Molecular Immunology* 9, 380–385. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.26>
- Shi, J., Hou, S., Fang, Q., Liu, X., Liu, Xiaolong, Qi, H. (2018). PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity* 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.012>
- Shi, W., Liao, Y., Willis, S. N., Taubenheim, N., Inouye, M., Tarlinton, D. M., Smyth, G. K., Hodgkin, P. D., Nutt, S. L., Corcoran, L. M. (2015). Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nature Immunology* 16, 663–673. <https://doi.org/10.1038/ni.3154>
- Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., Kurosaki, T. (2016). Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nature immunology* 17(7), 861–869. <https://doi.org/10.1038/ni.3460>
- Shinall, S. M., Gonzalez-Fernandez, M., Noelle, R. J., Waldschmidt, T. J. (2000). Identification of murine germinal center B cell subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation

- antigens. *Journal of immunology* 164(11), 5729–5738.
[https://doi.org/ 10.4049/jimmunol.164.11.5729](https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5729).
- Shulman, Z., Gitlin, A. D., Weinstein, J. S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R. A., Craft, J. E., Nussenzweig, M. C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* 345, 1058–1062. <https://doi.org/10.1126/science.1257861>
- Siddiqi, I. N., Friedman, J., Barry-Holson, K. Q., Ma, C., Thodima, V., Kang, I., Padmanabhan, R., Dias, L. M., Kelly, K. R., Brynes, R. K., Kamalakaran, S., Houldsworth, J. (2016). Characterization of a variant of t(14;18) negative nodal diffuse follicular lymphoma with CD23 expression, 1p36/TNFRSF14 abnormalities, and STAT6 mutations. *Modern Pathology* 29(6), 570–581.
[https://doi.org/ 10.1038/modpathol.2016.51](https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.51).
- Sintes, J., Gentile, M., Zhang, S., Garcia-Carmona, Y., Magri, G., Cassis, L., Segura-Garzón, D., Ciociola, A., Grasset, E. K., Bascones, S., Comerma, L., Pybus, M., Lligé, D., Puga, I., Gutzeit, C., He, B., DuBois, W., Crespo, M., Pascual, J., Mensa, A., ... Cerutti, A. (2017). mTOR intersects antibody-inducing signals from TACI in marginal zone B cells. *Nature communications* 8(1), 1462.
[https://doi.org/ 10.1038/s41467-017-01602-4](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01602-4).
- Smith, K. G., Light, A., Nossal, G. J., Tarlinton, D. M. (1997). The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 16(11), 2996–3006.
[https://doi.org/ 10.1093/emboj/16.11.2996](https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.2996)
- Stavnezer, J., Schrader, C. E. (2014). IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *Journal of Immunology* 193, 5370–5378. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401849>
- Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., Graca, L. (2018). Regulation of the Germinal Center Response. *Frontiers in Immunology* 9, 13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- Steidl, C., Shah, S. P., Woolcock, B. W., Rui, L., Kawahara, M., Farinha, P., Johnson, N. A., Zhao, Y., Telenius, A., Neriah, S. B., McPherson, A., Meissner, B., Okoye, U. C., Diepstra, A., van den Berg, A., Sun, M., Leung, G., Jones, S. J., Connors, J. M., Huntsman, D. G., ... Gascoyne, R. D. (2011). MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 471(7338), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature09754>
- Steiniger, B., Trabandt, M., Barth, P. J. (2011). The follicular dendritic cell network in secondary follicles of human palatine tonsils and spleens. *Histochemistry and Cell Biology* 135(4):327-36.
[https://doi.org/ 10.1007/s00418-011-0799-x](https://doi.org/10.1007/s00418-011-0799-x).
- Steiniger, B. S., Raimer, L., Ecke, A., Stuck, B. A., Cetin, Y. (2020) Plasma cells, plasmablasts, and AID+/CD30+ B lymphoblasts inside and outside germinal centres: details of the basal light zone and the outer zone in human palatine tonsils. *Histochemistry and Cell Biology* 154(1):55-75.
[https://doi.org/ 10.1007/s00418-020-01861-1](https://doi.org/10.1007/s00418-020-01861-1)
- Stewart, I., Radtke, D., Phillips, B., McGowan, S. J., Bannard, O. (2018). Germinal Center B Cells Replace Their Antigen Receptors in Dark Zones and Fail Light Zone Entry when Immunoglobulin Gene Mutations are Damaging. *Immunity* 49, 477-489.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.025>
- Stone, S. L., Peel, J. N., Scharer, C. D., Riskey, C. A., Chisolm, D. A., Schultz, M. D., Yu, B., Ballesteros-

- Tato, A., Wojciechowski, W., Mousseau, B., Misra, R. S., Hanidu, A., Jiang, H., Qi, Z., Boss, J. M., Randall, T. D., Brodeur, S. R., Goldrath, A. W., Weinmann, A. S., Rosenberg, A. F., Lund, F. E. (2019). T-bet Transcription Factor Promotes Antibody-Secreting Cell Differentiation by Limiting the Inflammatory Effects of IFN- γ on B Cells. *Immunity* 50, 1172-1187.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.004>
- Su, G. H., Chen, H. M., Muthusamy, N., Garrett-Sinha, L. A., Baunoch, D., Tenen, D. G., Simon, M. C. (1997). Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *European Molecular Biology Organization Journal*, 16, 7118–7129. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.7118>
- Suan, D., Kräutler, N. J., Maag, J., Butt, D., Bourne, K., Hermes, J. R., Avery, D. T., Young, C., Statham, A., Elliott, M., Dinger, M. E., Basten, A., Tangye, S. G., Brink, R. (2017). CCR6 Defines Memory B Cell Precursors in Mouse and Human Germinal Centers, Revealing Light-Zone Location and Predominant Low Antigen Affinity. *Immunity* 47(6), 1142–1153.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.022>.
- Sukumar, S., Conrad, D. H., Szakal, A. K., Tew, J. G. (2006). Differential T cell-mediated regulation of CD23 (Fc epsilonRII) in B cells and follicular dendritic cells. *Journal of immunology* 176(8), 4811–4817. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4811>.
- Summers, K. L., Hock, B. D., McKenzie, J. L., Hart, D. N. J. (2001). Phenotypic Characterization of Five Dendritic Cell Subsets in Human Tonsils. *American Journal of Pathology* 159, 285–295. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61694-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61694-X)
- Sun, G., Wang, D. (2017). fluidigmSC: Fluidigm Singular Analysis Toolset. R package version 3.6.2.
- Sun, H., Lu, B., Li, R. Q., Flavell, R. A., Taneja, R. (2001). Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice. *Nature Immunology* 2, 1040–1047. <https://doi.org/10.1038/ni721>
- Sun, H., Taneja, R. (2000). Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4058–4063. <https://doi.org/10.1073/pnas.070526297>
- Sun, Y., Zhang, H., Wang, L., Li, J., Jin, H., Wang, Z., Tian, S., Qi, L., Liu, X. (2019). Loss of the basic helix-loop-helix transcription factor Bhlhe41 induces cell death and impairs neurite outgrowth in Neuro2a cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 450, 167–174. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3383-z>
- Sutton, B. J., Davies, A. M. (2015). Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: Fc ϵ RI and CD23/Fc ϵ RII. *Immunological Reviews*, 268(1), 222–235. <https://doi.org/10.1111/imr.12340>.
- Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, W. W., Fagarasan, S. (2010). The Sensing of Environmental Stimuli by Follicular Dendritic Cells Promotes Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity* 33, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.003>
- Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W. M., 3rd, Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P., Satija, R. (2019). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*, 177(7), 1888–1902.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031>

- Sze, D. M. Y., Toellner, K. M., de Vinuesa, C. G., Taylor, D. R., MacLennan, I. C. M. (2000). Intrinsic Constraint on Plasmablast Growth and Extrinsic Limits of Plasma Cell Survival. *Journal of Experimental Medicine* 192, 813–822. <https://doi.org/10.1084/jem.192.6.813>
- Tabe, H., Kawabata, I., Koba, R., Homma, T. (1996). Cell Dynamics in the Germinal Center of the Human Tonsil. *Acta Otorrinolaringológica* 523, 64–67.
- Takemura, M., Nakahara, T., Hashimoto-Hachiya, A., Furue, M., Tsuji, G. (2018). Glyteer, Soybean Tar, Impairs IL-4/Stat6 Signaling in Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells: The Basis of Its Therapeutic Effect on Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4), 1169. <https://doi.org/10.3390/ijms19041169>
- Taubenheim, N., Tarlinton, D. M., Crawford, S., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., Nutt, S. L. (2012). High Rate of Antibody Secretion Is not Integral to Plasma Cell Differentiation as Revealed by XBP-1 Deficiency. *Journal of Immunology* 189, 3328–3338. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201042>
- Tellier, J., Shi, W., Minnich, M., Liao, Y., Crawford, S., Smyth, G. K., Kallies, A., Busslinger, M., Nutt, S. L., 2016. Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nature Immunology* 17, 323–330. <https://doi.org/10.1038/ni.3348>
- Teng, Y., Takahashi, Y., Yamada, M., Kurosu, T., Koyama, T., Miura, O., Miki, T. (2007). IRF4 negatively regulates proliferation of germinal center B cell-derived Burkitt's lymphoma cell lines and induces differentiation toward plasma cells. *European Journal of Cellular Biology* 86, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.05.006>
- Thibult, M. L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B., Olive, D. (2013) PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *International Immunology* 25(2):129-37. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs098>.
- Toellner, K. M., Sze, D. M. Y., Zhang, Y. (2018). What Are the Primary Limitations in B-Cell Affinity Maturation, and How Much Affinity Maturation Can We Drive with Vaccination?: A Role for Antibody Feedback. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10, a028795. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028795>
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 14;302(5909):575-81. PMID: 6300689. <https://doi.org/10.1038/302575a0>
- Tomoishi, S., Fukushima, S., Shinohara, K., Katada, T., Saito, K. (2017). CREB3L2-mediated expression of Sec23A/Sec24D is involved in hepatic stellate cell activation through ER-Golgi transport. *Scientific Reports* 7(1), 7992. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08703-6>
- Tomura, M., Yoshida, N., Tanaka, J., Karasawa, S., Miwa, Y., Miyawaki, A., Kanagawa, O. (2008). Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein “Kaede” transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10871–10876.
- Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y., Tokuhisa, T. (2002). Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 17(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00387-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00387-4).
- Tsubata, T., Reth, M. (1990). The Products of Pre-B Cell-specific Genes (X5 and Vp,.B) and the

- Immunoglobulin μ Chain Form a Complex That Is Transported onto the Cell Surface. *Journal of Experimental Medicine* 172, 973–976. <https://doi.org/10.1084/jem.172.3.973>
- Tunset, H. M., Feuerherm, A. J., Selvik, L. M., Johansen, B., Moestue, S. A. (2019). Cytosolic Phospholipase A2 Alpha Regulates TLR Signaling and Migration in Metastatic 4T1 Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20(19), 4800. <https://doi.org/10.3390/ijms20194800>
- Tunyaplin, C., Shaffer, A. L., Angelin-Duclos, C. D., Yu, X., Staudt, L. M., Calame, K. L. (2004). Direct Repression of *prdm1* by Bcl-6 Inhibits Plasmacytic Differentiation. *Journal of Immunology* 173, 1158–1165. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1158>
- Turner, J. S., Ke, F., Grigorova, I. L. (2018). B Cell Receptor Crosslinking Augments Germinal Center B Cell Selection when T Cell Help Is Limiting. *Cell Reports* 25, 1395-1403.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.042>
- Turner, M. L., Hawkins, E. D., Hodgkin, P. D. (2008). Quantitative Regulation of B Cell Division Destiny by Signal Strength. *Journal of Immunology* 181, 374–382. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.374>
- Turqueti-Neves, A., Otte, M., Hopken, U. E., Lipp, M., Buch, T., Voehringer, D. (2014). B-cell-intrinsic STAT6 signaling controls germinal center formation. *European Journal of Immunology* 2130–2138. <https://doi.org/10.1002/eji.201344203>
- Tuscano, J. M., Druey, K. M., Riva, A., Pena, J., Thompson, C. B., Kehrl, J. H. (1996). Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center. *Blood* 88, 1359–1364. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.4.1359.bloodjournal8841359>
- Van der Poel, C. E., Bajic, G., Macaulay, C. W., van den Broek, T., Ellson, C. D., Bouma, G., Victora, G. D., Degn, S. E., Carroll, M. C. (2019) Follicular Dendritic Cells Modulate Germinal Center B Cell Diversity through Fc γ RIIB. *Cell Reports* 26;29(9):2745-2755.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.086>
- Vangeti, S., Gertow, J., Yu, M., Liu, S., Baharom, F., Scholz, S., Friberg, D., Starkhammar, M., Ahlberg, A., Smed-Sörensen, A. (2019). Human Blood and Tonsil Plasmacytoid Dendritic Cells Display Similar Gene Expression Profiles but Exhibit Differential Type I IFN Responses to Influenza A Virus Infection. *Journal of Immunology* 202, 2069–2081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801191>
- Victora, G. D., Schwickert, T. A., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M. L., Nussenzweig, M. C. (2010). Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell* 143, 592–605. [doi.org:10.1016/j.cell.2010.10.032](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032)
- Victora, G. D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A. B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., Nussenzweig, M. C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 120(11), 2240–2248. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415380>
- Victoratos, P., Lagnel, J., Tzima, S., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, K., Pasparakis, M., Kollias, G. (2006). FDC-Specific Functions of p55TNFR and IKK2 in the Development of FDC Networks and of Antibody Responses. *Immunity* 24, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.013>

- Visan, I., Goller, M., Berberich, I., Kneitz, C., Tony, H. P. (2003). Pax-5 is a key regulator of the B cell-restricted expression of the CD23a isoform. *European Journal of Immunology* 33(5), 1163–1173. <https://doi.org/10.1002/eji.200323747>.
- Walker, L. S. K., Gulbranson-Judge, A., Flynn, S., Brocker, T., Raykundalia, C., Goodall, M., Förster, R., Lipp, M., Lane, P. (1999). Compromised OX40 Function in CD28-deficient Mice Is Linked with Failure to Develop CXC Chemokine Receptor 5–positive CD4 Cells and Germinal Centers. *Journal of Experimental Medicine* 190, 1115–1122.
- Wang, C., Zhao, N., Zheng, Q., Zhang, D., Liu, Y. (2019). BHLHE41 promotes U87 and U251 cell proliferation via ERK/cyclinD1 signaling pathway. *Cancer Management and Research* 11, 7657–7672. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S214697>
- Wang, C. J., Heuts, F., Ovcinnikovs, V., Wardzinski, L., Bowers, C., Schmidt, E. M., Kogimtzis, A., Kenefeck, R., Sansom, D. M., Walker, L. S. K. (2015). CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 524–529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414576112>
- Wang, H., Gonzalez-Garcia, I., Traba, J., Jain, S., Conteh, S., Shin, D. M., Qi, C., Gao, Y., Sun, J., Kang, S., Abbasi, S., Naghashfar, Z., Yoon, J., DuBois, W., Kovalchuk, A. L., Sack, M. N., Duffy, P., Morse, H. C., 3rd (2017). ATP-degrading ENPP1 is required for survival (or persistence) of long-lived plasma cells. *Scientific Reports* 7(1), 17867. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18028-z>.
- Wang, S., Zhang, X., Wang, G., Cao, B., Yang, H., Jin, L., Cui, M., Mao, Y. (2019). Syndecan-1 suppresses cell growth and migration via blocking JAK1/STAT3 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways in human colorectal carcinoma cells. *BMC cancer* 19(1), 1160. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6381-y>
- Wang, X., Cho, B., Suzuki, K., Xu, Y., Green, J. A., An, J., Cyster, J. G. (2011). Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *Journal of Experimental Medicine* 208, 2497–2510. <https://doi.org/10.1084/jem.20111449>
- Wang, Y., Shi, J., Yan, J., Xiao, Z., Hou, X., Lu, P., Hou, S., Mao, T., Liu, W., Ma, Y., Zhang, L., Yang, X., Qi, H. (2017). Germinal-center development of memory B cells driven by IL-9 from follicular helper T cells. *Nature immunology* 18(8), 921–930. <https://doi.org/10.1038/ni.3788>.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* 301, 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/science.1086907>
- Weinstein, J. S., Herman, E. I., Lainez, B., Licona-Limón, P., Esplugues, E., Flavell, R., Craft, J. (2016). TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nature Immunology* 17, 1197–1205. <https://doi.org/10.1038/ni.3554>
- Weisel, F. J., Zuccarino-Catania, G. V., Chikina, M., Shlomchik, M. J. (2016). A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* 44(1), 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.004>
- Wendland, M., Willenzon, S., Kocks, J., Davalos-Miszlitz, A. C., Hammerschmidt, S.I., Schumann, K., Kremmer, E., Sixt, M., Hoffmeyer, A., Pabst, O., Forster, R. (2011). Lymph Node T Cell Homeostasis Relies on Steady State Homing of Dendritic Cells. *Immunity* 35, 945–957.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.017>

- Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag New York*, 2016.
- Wilke, G., Steinhauser, G., Grün, J., Berek, C. (2010). In silico subtraction approach reveals a close lineage relationship between follicular dendritic cells and BP3hi stromal cells isolated from SCID mice. *European Journal of Immunology* 40, 2165–2173. <https://doi.org/10.1002/eji.200940202>
- Wilker, P. R., Kohyama, M., Sandau, M. M., Albring, J. C., Nakagawa, O., Schwarz, J. J., Murphy, K. M. (2008) Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. *Nature Immunology* 9(6):603-12. <https://doi.org/10.1038/ni.1609>.
- William, J., Euler, C., Christensen, S., Shlomchik, M. J. (2002). Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297(5589), 2066–2070. <https://doi.org/10.1126/science.1073924>.
- Willier, S., Butt, E., Grunewald, T. G. (2013). Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biology of the Cell* 105(8), 317–333. <https://doi.org/10.1111/boc.201300011>
- Willis, S. N., Tellier, J., Liao, Y., Trezise, S., Light, A., O'Donnell, K., Garrett-Sinha, L. A., Shi, W., Tarlinton, D. M., Nutt, S. L. (2017). Environmental sensing by mature B cells is controlled by the transcription factors PU.1 and SpiB. *Nature Communications* 8, 1426. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01605-1>
- Willis, S. N., Nutt, S. L. (2019). New players in the gene regulatory network controlling late B cell differentiation. *Current Opinion in Immunology* 58, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.04.007>
- Wing, J. B., Ise, W., Kurosaki, T., Sakaguchi, S. (2014). Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. *Immunity* 41, 1013–1025. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.006>
- Wing, J. B., Kitagawa, Y., Locci, M., Hume, H., Tay, C., Morita, T., Kidani, Y., Matsuda, K., Inoue, T., Kurosaki, T., Crotty, S., Coban, C., Ohkura, N., Sakaguchi, S. (2017). A distinct subpopulation of CD25⁺ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E6400–E6409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705551114>
- Wing, J. B., Tekgüç, M., Sakaguchi, S. (2018). Control of Germinal Center Responses by T-Follicular Regulatory Cells. *Frontiers in Immunology* 9, 1910. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01910>
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3⁺ Regulatory T Cell Function. *Science* 322, 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>
- Winter, O., Moser, K., Mohr, E., Zotos, D., Kaminski, H., Szyska, M., Roth, K., Wong, D. M., Dame, C., Tarlinton, D. M., Schulze, H., MacLennan, I. C., Manzi, R. A. (2010). Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* 116(11), 1867–1875. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-259457>.

- Wittenbrink, N., Klein, A., Weiser, A.A., Schuchhardt, J., Or-Guil, M. (2011). Is There a Typical Germinal Center? A Large-Scale Immunohistological Study on the Cellular Composition of Germinal Centers during the Hapten-Carrier-Driven Primary Immune Response in Mice. *Journal of Immunology* 187, 6185–6196. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101440>
- Wöhner, M., Tagoh, H., Bilic, I., Jaritz, M., Poliakova, D.K., Fischer, M., Busslinger, M. (2016). Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B cell and plasma cell development. *Journal of Experimental Medicine* 213, 1201–1221. <https://doi.org/10.1084/jem.20152002>
- Wu, H., Chen, Y., Liu, H., Xu, L. L., Teuscher, P., Wang, S., Lu, S., Dent, A. L. (2016). Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. *European Journal of Immunology* 46, 1152–1161. <https://doi.org/10.1002/eji.201546094>
- Wu, J., Qin, D., Burton, G.F., Szakal, A.K., Tew, J.G. (1996) Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses in vitro. *Journal of Immunology* 157(8):3404-11
- Wu, Y., El Shikh, M. E. M., El Sayed, R. M., Best, A. M., Szakal, A. K., Tew, J. G. (2009). IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *International Immunology* 21, 745–756. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp041>
- Wu, Y., Sato, H., Suzuki, T., Yoshizawa, T., Morohashi, S., Seino, H., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Kato, Y., Kijima, H. (2015). Involvement of c-Myc in the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells induced by bHLH transcription factor DEC2. *International Journal of Molecular Medicine* 35, 815–820. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.2042>
- Wu, Y. C., Kipling, D., Dunn-Walters, D. K. (2011). The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Frontiers in Immunology* 2, 81. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00081>.
- Wu, Y. H., Yang, C. Y., Chien, W. L., Lin, K. I., Lai, M. Z. (2012). Removal of Syndecan-1 Promotes TRAIL-Induced Apoptosis in Myeloma Cells. *Journal of Immunology* 188, 2914–2921. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102065>
- Xin, A., Masson, F., Liao, Y., Preston, S., Guan, T., Gloury, R., Olshansky, M., Lin, J. X., Li, P., Speed, T. P., Smyth, G. K., Ernst, M., Leonard, W. J., Pellegrini, M., Kaech, S. M., Nutt, S. L., Shi, W., Belz, G. T., Kallies, A. (2016). A molecular threshold for effector CD8+ T cell differentiation controlled by transcription factors Blimp-1 and T-bet. *Nature Immunology* 17, 422–432. <https://doi.org/10.1038/ni.3410>
- Xu, H., Chaudhri, V. K., Wu, Z., Biliouris, K., Dienger-Stambaugh, K., Rochman, Y., Singh, H. (2015). Regulation of bifurcating B cell trajectories by mutual antagonism between transcription factors IRF4 and IRF8. *Nature Immunology* 16, 1274–1281. <https://doi.org/10.1038/ni.3287>
- Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., Zhang, L., Qi, H. (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 496, 523–527. <https://doi.org/10.1038/nature12058>

- Xu, X., Deobagkar-Lele, M., Bull, K. R., Crockford, T. L., Mead, A. J., Cribbs, A. P., Sims, D., Anzilotti, C., Cornall, R. J. (2020). An ontogenetic switch drives the positive and negative selection of B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), 3718–3727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915247117>
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D. M., Santini, P. A., Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nature Immunology*, 8(3), 294–303. <https://doi.org/10.1038/ni1434>.
- Yamashita, Y., Oritani, K., Miyoshi, E. K., Wall, R., Bernfield, M., Kincade, P. W. (1999). Syndecan-4 is expressed by B lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic processes. *Journal of immunology* 162(10), 5940–5948.
- Yang, B., Li, M., Tang, W., Liu, W., Zhang, S., Chen, L., Xia, J. (2018). Dynamic network biomarker indicates pulmonary metastasis at the tipping point of hepatocellular carcinoma. *Nature communications* 9(1), 678. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03024-2>
- Yang, X. O., Angkasekwinai, P., Zhu, J., Peng, J., Liu, Z., Nurieva, R., Liu, X., Chung, Y., Chang, S.H., Sun, B., Dong, C. (2009). Requirement for the basic helix-loop-helix transcription factor Dec2 in initial TH2 lineage commitment. *Nature Immunology* 10, 1260–1266. <https://doi.org/10.1038/ni.1821>
- Yang, Z., Robinson, M. J., Allen, C. D. (2014). Regulatory constraints in the generation and differentiation of IgE-expressing B cells. *Current Opinion in Immunology*, 28, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.02.001>.
- Yau, I. W., Cato, M. H., Jellusova, J., Hurtado de Mendoza, T., Brink, R., Rickert, R. C. (2013). Censoring of Self-Reactive B Cells by Follicular Dendritic Cell–Displayed Self-Antigen. *Journal of Immunology* 191, 1082–1090. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201569>
- Yokoyama, T., Tanahashi, M., Kobayashi, Y., Yamakawa, Y., Maeda, M., Inaba, T., Kiriyama, M., Fukai, I., Fujii, Y. (2002). The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. *Immunology Letters* 81, 107–113. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00003-2)
- Yoon, S. O., Zhang, X., Berner, P., Choi, Y. S. (2009). IL-21 and IL-10 have redundant roles but differential capacities at different stages of plasma cell generation from human germinal center B cells. *Journal of Leukocyte Biology* 86, 1311–1318. <https://doi.org/10.1189/jlb.0409268>
- Yabuuchi, S., Nakamura, T., Kloetzer, W. S., Reff, M. E. (2002). Anti-CD23 monoclonal antibody inhibits germline Cepsilon transcription in B cells. *International Immunopharmacology* 2(4), 453–461. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00187-4](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00187-4).
- Yang, Y., Yaccoby, S., Liu, W., Langford, J. K., Pumphrey, C. Y., Theus, A., Epstein, J., Sanderson, R. D. (2002). Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood* 100(2), 610–617. <https://doi.org/10.1182/blood.v100.2.610>.
- Yildiz, M., Li, H., Bernard, D., Amin, N. A., Ouillette, P., Jones, S., Saiya-Cork, K., Parkin, B., Jacobi, K., Shedden, K., Wang, S., Chang, A. E., Kaminski, M. S., Malek, S. N. (2015). Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood* 125(4), 668–679. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-582650>

- Yokota, A., Kikutani, H., Tanaka, T., Sato, R., Barsumian, E. L., Suemura, M., Kishimoto, T. (1988). Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell* 55(4), 611–618. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90219-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90219-x).
- Yu, F., Sharma, S., Jankovic, D., Gurram, R.K., Su, P., Hu, G., Li, R., Rieder, S., Zhao, K., Sun, B., Zhu, J. (2018). The transcription factor Bhlhe40 is a switch of inflammatory versus antiinflammatory Th1 cell fate determination. *Journal of Experimental Medicine* 215, 1813–1821. <https://doi.org/10.1084/jem.20170155>
- Yu, L., Huang, X., Zhang, W., Zhao, H., Wu, G., Lv, F., Shi, L., Teng, Y. (2016). Critical role of DEK and its regulation in tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7(18), 26844–26855. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8565>
- Yu-Lee, L. Y., Lee, Y. C., Pan, J., Lin, S. C., Pan, T., Yu, G., Hawke, D. H., Pan, B. F., Lin, S. H. (2019). Bone secreted factors induce cellular quiescence in prostate cancer cells. *Scientific Reports* 9(1), 18635. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54566-4>
- Zaretsky, I., Atrakchi, O., Mazor, R.D., Stoler-Barak, L., Biram, A., Feigelson, S.W., Gitlin, A.D., Engelhardt, B., Shulman, Z. (2017). ICAMs support B cell interactions with T follicular helper cells and promote clonal selection. *Journal of Experimental Medicine* 214, 3435–3448. <https://doi.org/10.1084/jem.20171129>
- Zawel, L., Yu, J., Torrance, C. J., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Zhou, S. (2002). DEC1 is a downstream target of TGF-beta with sequence-specific transcriptional repressor activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(5), 2848–2853. <https://doi.org/10.1073/pnas.261714999>
- Zehentmeier, S., Roth, K., Cseresnyes, Z., Sercan, Ö., Horn, K., Niesner, R. A., Chang, H. D., Radbruch, A., Hauser, A. E. (2014). Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *European Journal of Immunology* 44(8), 2306–2317. <https://doi.org/10.1002/eji.201344313>.
- Zhang, J., MacLennan, I. C. M., Liu, Y. J., Lane, P. J. L. (1988). Is rapid proliferation in B centroblasts linked to somatic mutation in memory B cell clones? *Immunology Letters* 18, 297–299. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(88\)90178-2](https://doi.org/10.1016/0165-2478(88)90178-2)
- Zhang, Y., Tech, L., George, L. A., Acs, A., Durrett, R. E., Hess, H., Walker, L. S. K., Tarlinton, D. M., Fletcher, A. L., Hauser, A. E., Toellner, K. M. (2018). Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. *Journal of Experimental Medicine* 215, 1227–1243. <https://doi.org/10.1084/jem.20160832>
- Zhao, Y., Uduman, M., Siu, J. H. Y., Tull, T. J., Sanderson, J. D., Wu, Y. C. B., Zhou, J. Q., Petrov, N., Ellis, R., Todd, K., Chavele, K. M., Guesdon, W., Vossenkamper, A., Jassem, W., D’Cruz, D. P., Fear, D. J., John, S., Scheel-Toellner, D., Hopkins, C., Moreno, E., Woodman, N. L., Ciccarelli, F., Heck, S., Kleinstein, S.H., Bemark, M., Spencer, J. (2018). Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nature Communications* 9, 3857. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06089-1>
- Zheng, Y., Kong, Y., Goetzl, E. J. (2001). Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *Journal of Immunology* 166(4),

2317–2322. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2317>

Zheng, Y., Shi, X., Wang, M., Jia, Y., Li, B., Zhang, Y., Liu, Q., Wang, Y. (2012). The increased expression of DEC1 gene is related to HIF-1 α protein in gastric cancer cell lines. *Molecular Biology Reports* 39, 4229–4236. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1209-0>

Zheng Y., Ma X., Su D., Zhang Y., Yu L., Jiang F., Zhou X., Feng Y., Ma F. (2020) The Roles of Siglec7 and Siglec9 on Natural Killer Cells in Virus Infection and Tumour Progression. *Journal of Immunology Research* <https://doi.org/10.1155/2020/6243819>.

Zhou, Z. H., Wang, B., Cheng, X. B., Zhang, X. E., Tang, J., Tang, W. J., Gu, L. (2016). Roles of SHARP1 in thyroid cancer. *Molecular medicine reports* 13(6), 5365–5371. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5185>

Zhu, J. (2015). T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* 75, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.010>

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Development* 12(15), 2424–2433. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2424>

Zong, F., Fthenou, E., Mundt, F., Szatmári, T., Kovalszky, I., Szilák, L., Brodin, D., Tzanakakis, G., Hjerpe, A., Dobra, K. (2011). Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PloS One* 6(6), e14816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014816>

ANNEXE

Rescue of low RIN RNA from FFPE samples and improved RNA sequencing using QIAseq[®] RNA-seq solutions

Desmots Fabienne^{1,2}, Santamaria Kathleen¹, Chettouh Hamza³ and Fest Thierry^{1,2}

¹INSERM, UMR1236, Université de Rennes 1, 2 avenue du Pr. Léon Bernard, Rennes, F-35065, France, ²Laboratoire d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2, rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 9, France; ³QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

Introduction

RNA sequencing (RNA-seq) has become a central tool in transcriptome analysis. In studies comparing healthy individuals and follicular lymphoma (FL) patients, RNA-seq can differentiate between modifications of transcriptomic signatures and compare patient responses to new epigenetic therapeutic approaches. Most of these studies are based on FFPE samples from large retrospective patient cohorts. However, the quality of FFPE samples is generally poor and depends on several parameters, such as fixation or sample storage conditions [1]. Despite typically poor RNA integrity and low yields, FFPE samples are a critical source of molecular gene expression data for retrospective studies.

In this study, we successfully performed RNA-seq using novel QIAGEN[®] RNA-seq technologies on FFPE tumor samples from FL patients, either at diagnosis or after receiving an HDACi treatment. These FFPE samples were rejected by two NGS service providers for library preparation and sequencing. We also performed identical RNA-seq on other challenging samples of B-cell origin, such as a very small number of sorted cultured cells from tonsils and lymph nodes.

Collectively, QIAseq RNA-seq technology for rRNA removal and stranded RNA library preparation enables the discovery of expected B-cell signatures and other interesting signatures in the context of epigenetic treatment.

Materials and methods

Samples

FL tumor samples were obtained from patients recruited for a phase I/II study involving an oral pan-HDACi drug [2]. The samples (FFPE-treated) were obtained via surgical biopsy either at diagnosis (non-treated) or after HDACi treatment at the time of their refractory/relapsed FL (treated). Primary B cells were isolated from human blood samples from healthy volunteers using B Cell Isolation Kit II, human (Miltenyi Biotec) and purified using BD FACSAria[™] II system (BD Biosciences). For the Burkitt-derived L3055 cell line, 200,000 cells/ml were seeded in 24-well plates in RPMI1640 plus 3% fetal calf serum (FCS). All patients were recruited under institutional review board approval and informed consent process according to the Declaration of Helsinki.

RNA extraction and sequencing

For RNA extraction from primary B-cells and the cell line, the NucleoSpin® RNA XS (Macherey-Nagel) and the AllPrep® DNA/RNA Mini Kit from QIAGEN were used, respectively. For FFPE samples, we used the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific; All multi-sample RNA/DNA workflow; 2 to 5 tissue sections per sample).

To prepare stranded RNA-seq libraries, we used the QIAseq Stranded Total RNA Lib Kit (QIAGEN) in tandem with the QIAseq FastSelect™-rRNA HMR Kit (QIAGEN), which removes rRNA. Sample fragmentation was not performed for the FFPE samples, and the number of cycles (for the amplification step) was set up according to the DNA concentration (11 cycles for 100 ng and 16 cycles for 1000 ng). Samples were sequenced on the Illumina® NextSeq™ 500 using a paired-end dual indexing mid-output flowcell (2 x 150 bp).

RNA-seq analysis

For RNA-seq data analysis, an in-house pipeline from the investigator's lab was used. It notably integrates the Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) tool [3] for alignment to the Hg38 genome reference and the feature Counts tool [4] to estimate the number of reads that are assigned to the genome. The RSeQC package was used to estimate the quality, the genome distribution of reads and the alignment to ribosomal gene coordinates. DESeq2 was used to estimate the differential expression between samples. Conditions were set to extract only those genes with a 1.5-fold change in expression and with a p-value of 0.05. Upon applying this limit, we extracted 9558 differentially expressed genes. For data visualization, 800 most differentially expressed genes were selected and analyzed using R packages such as d3heatmap, heatmaply, EMA and ggplot2. For sashimi plots, IGV interface was used.

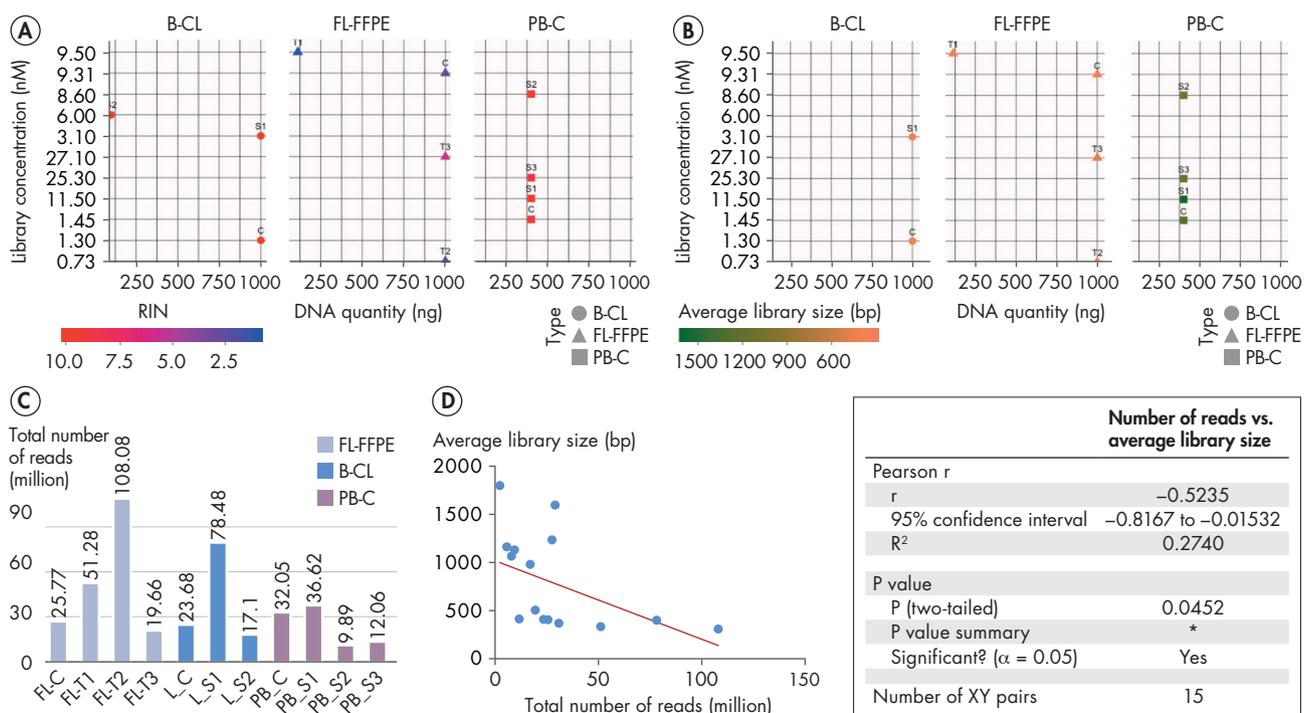


Figure 1. Quality parameters of QIAseq RNA libraries prepared from cultured B cell-line (B-CL), primary B-cell (PB-C) or FFPE follicular lymphoma FFPE samples (FL-FFPE). [A] RIN score and [B] average library size after fragmentation in base pairs (bp) relative to final library concentration; [C] Total number of reads sequenced per samples; FL-FFPE samples at diagnosis and after treatment are noted FL_C and FL_T1, T2 or T3; 3 different patients respectively, B cell-line samples control or in stimulated conditions are noted L_C and L_S1 or S2 (2 samples) respectively, primary B-cell control or in stimulated conditions are noted PB_C and PB_S1, S2 or S3 (3 samples), respectively [D] correlation with average library size in bp.

Results and discussion

Improved RNA-seq from poor-quality and low-yield samples

Initially, we approached two commercial NGS service providers to isolate RNA and prepare RNA libraries from the FFPE patient samples. However, both commercial providers, rejected these samples for library preparation, due to low amounts of material and low RIN numbers. We then attempted RNA library construction using the QIAseq FastSelect -rRNA HMR Kit for removal of ribosomal RNA followed by RNA-seq library construction with the QIAseq RNA Stranded Library Kit. RNA-seq performed using QIAseq solutions were suitable for samples of poor quality and low concentrations: (1) B-cell-origin samples such as cultured B cell-line (B-CL) or primary B cell (PB-C) in basal (C) or stimulated (S) conditions with various cytokines and (2) FFPE samples from FL patients (FL-FFPE) collected at diagnosis (C) or after receiving HDACi treatment (T). In each case, we evaluated how the quality of samples influenced the final library concentration (Figure 1A). In the case of FFPE samples, sample T1 – with poor RNA integrity and low yield – gave the highest library concentration compared to all other samples. Starting with higher RNA concentration for FFPE samples (1000 ng of FFPE-RNA) did not always lead to higher library concentrations. Likewise, for PB-C and other samples, similar starting quantities of RNA and higher RIN scores gave variable library concentrations. We, therefore, asked whether fragmentation size could influence the library preparation (Figure 1B). The FFPE samples showed an average size of 600 bp with no fragmentation. We observed that fragment size is inversely proportional to library yield, particularly for PB-C samples. Hence, fragmentation optimization is an important step in the preparation of the libraries using the QIAseq procedure. After sequencing, the number of reads per sample was heterogeneous among samples (Figure 1C) and correlated to the fragmentation size of samples ($P=0.0452$) (Figure 1D).

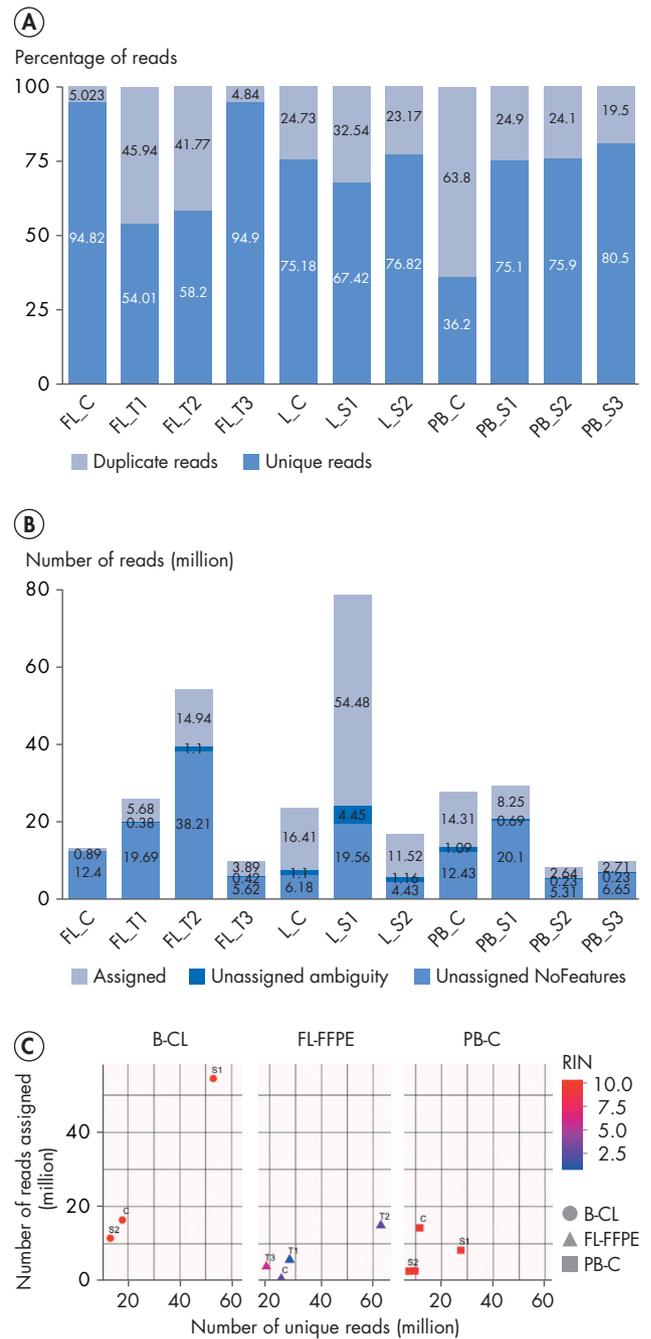


Figure 2. Sequenced read quality of libraries prepared from cultured B cell-line (B-CL), primary B cell (PB-C) or FFPE follicular lymphoma FFPE samples (FL-FFPE). [A] Proportion of unique and duplicate reads per samples; [B] STAR alignment results; [C] Number of reads assigned in unique reads relative to RIN scores. FL-FFPE samples at diagnosis (FL_C) and after treatment (FL_T1, FL_T2 or FL_T3 from 3 different patients); B cell-line samples control (L_C) or in stimulated conditions (L_S1 or L_S2; 2 samples); primary B-cell control (PB_C) or in stimulated conditions (PB_S1, PB_S2 or PB_S3; 3 samples).

High library complexity and complete rRNA removal
 STAR alignment scores indicate that a high library complexity – 54–95% of reads uniquely mapped to the genome – can be obtained with FFPE samples (Figure 2A). However, the reads assigned to a gene from the annotation GRCh38-Ensembl 94 were highly heterogeneous between samples, when duplicate reads were removed using a custom pipeline. For FFPE samples, only 1–15 million reads could be assigned to known genes (Figure 2B). Better results were obtained with the cell line samples; they had lesser duplicate reads and 4–55 million reads could be assigned to known genes. Therefore, for FFPE samples, only very few

reads were assigned, likely due to the poor quality of the RNA (Figure 2C).

To further assess the quality of data generated from FFPE samples, we compared the read distribution between samples. Sashimi plot of read density for three different samples along exons of the *XBPI* gene showed few unexpected reads between exons in FFPE samples. For B-cell samples, poor-quality reads couldn't be aligned to coding regions (Figure 3A). For FFPE samples, the majority of the reads were assigned to exons (in CDS, 3'UTR or 5'UTR) and a small fraction to introns (Figure 3B). None of the reads originated from ribosomal RNA (Figure 3C).

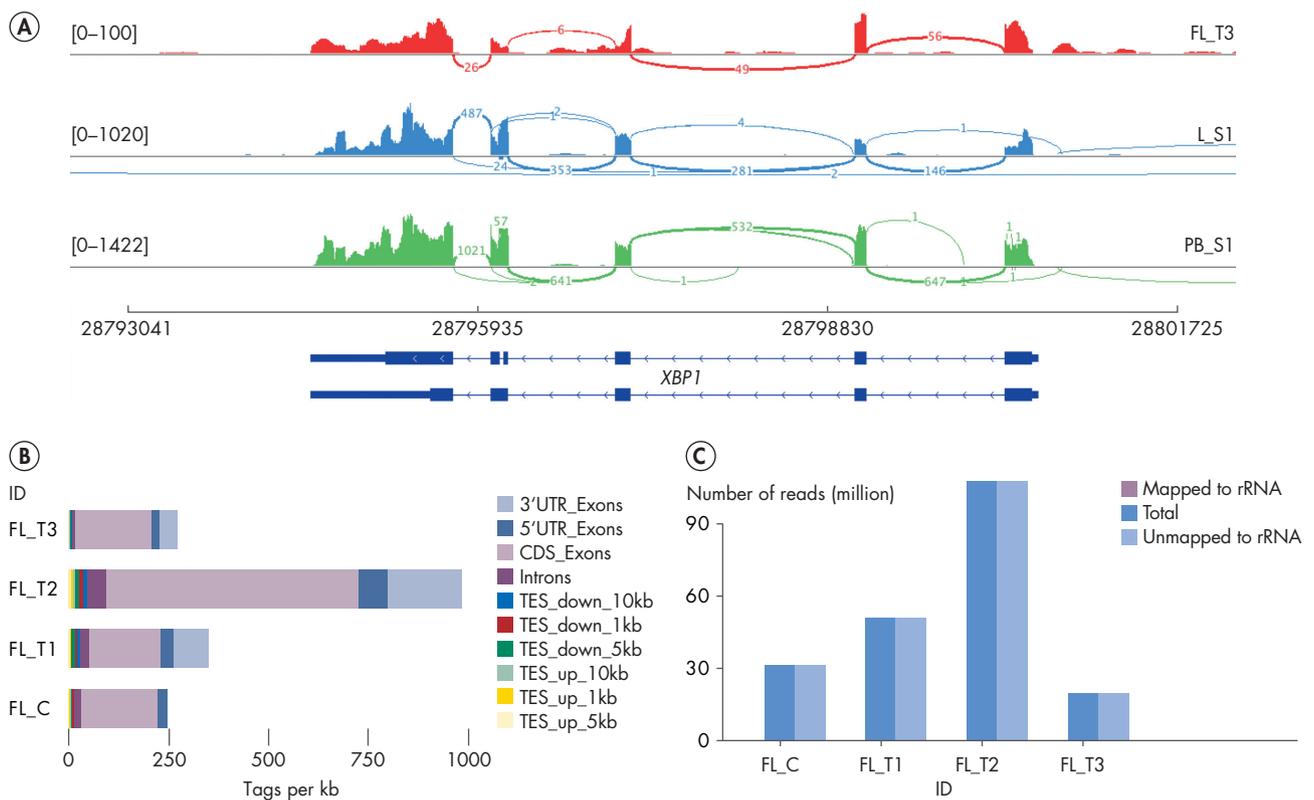


Figure 3. Read distribution and rRNA contamination. [A] Sashimi plot of read density for three different samples along exons of *XBPI* gene; [B] Read distribution over genome features; [C] Estimation of reads mapped on ribosomal RNA. FL-FFPE samples at diagnosis (FL_C) and after treatment (FL_T1, FL_T2 or FL_T3 from 3 different patients); B cell-line samples control (L_C) or in stimulated conditions (L_S1 or L_S2; 2 samples); a primary B-cell in stimulated conditions (PB_S1).

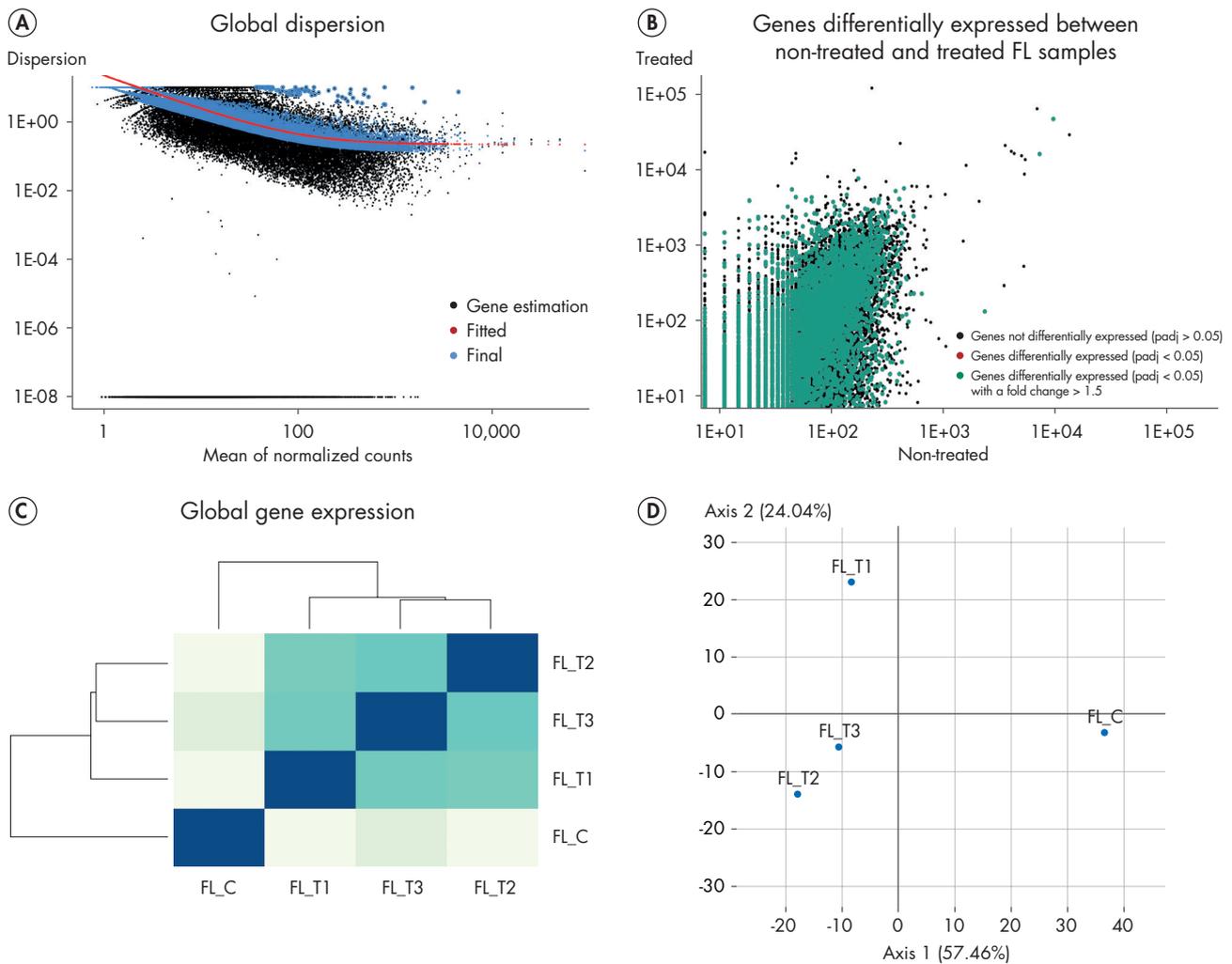


Figure 4. DESeq2 results on FFPE samples. [A] Dispersion plot showing a typical dispersion estimate; [B] Genes differentially expressed between non-treated and treated FL samples; [C] Heatmap of the distance matrix giving an overview of similarities and dissimilarities between samples; [D] Principal component plot of the samples. FL-FFPE samples at diagnosis and after treatment are noted FL_C and FL_T1, _T2 or _T3 (3 different patients), respectively.

Known and novel transcriptomic signatures identified

DESeq2 method was used to compare differential gene expression between HDACi-treated (FL_T1, _T2 and _T3) and non-treated FFPE samples (FL_C), using the number of sequence fragments assigned to each gene. A large number of genes were differentially expressed with at least

a 1.5-fold change (adjusted $p < 0.05$) (Figures 4A and 4B). Interestingly, the heatmap of the distance matrix between samples indicates that treated samples are more similar in global gene expression than non-treated samples (Figure 4C). The x-axis of the principal component plot shows that transcriptomes from patients are modified upon HDACi treatment (Figure 4D). Each patient showing a different

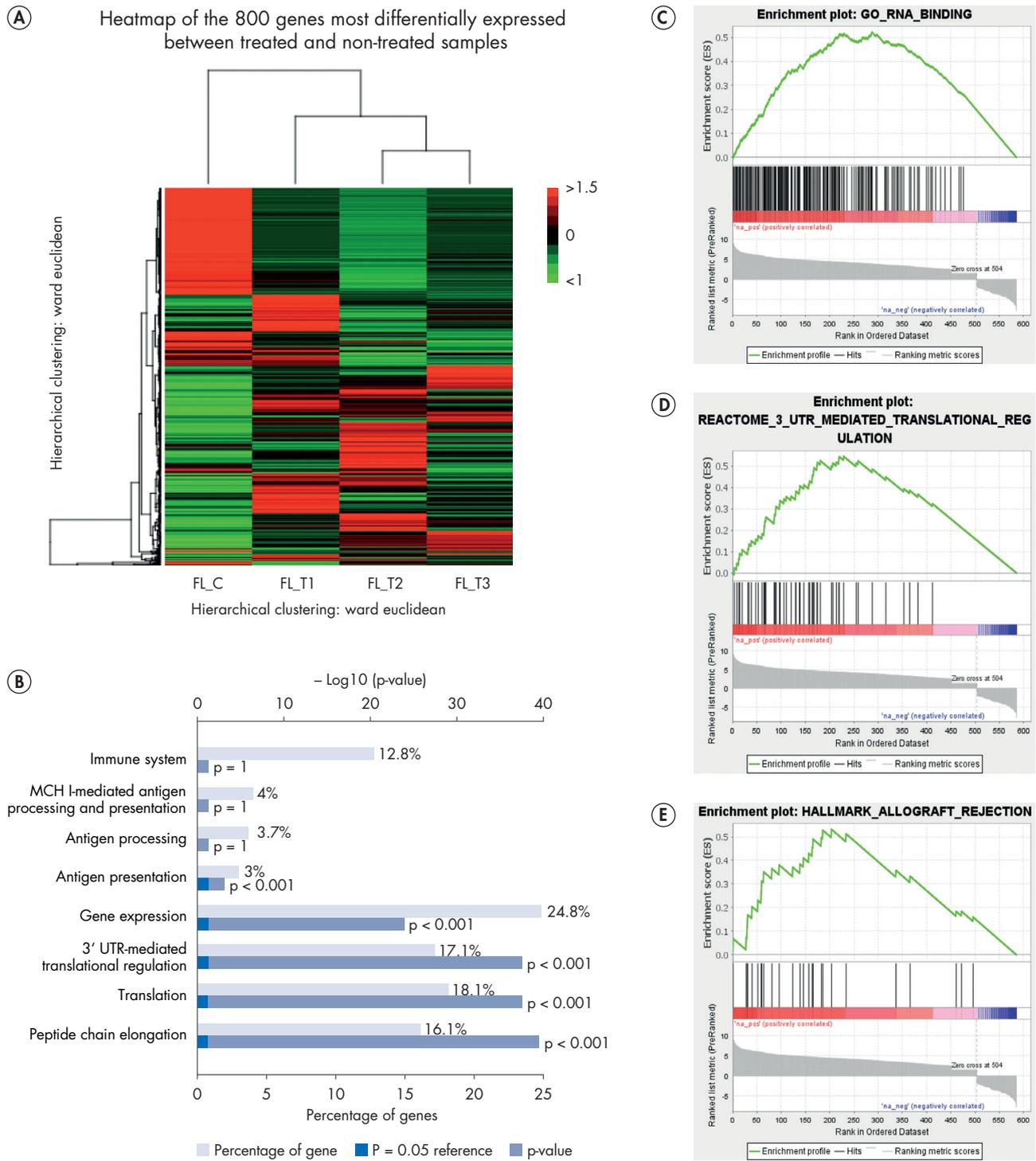


Figure 5. Results of global gene expression profiling. [A] Unsupervised hierarchical clustering; [B] Major pathway enrichment of genes differentially expressed using FunRich tool; [C-E] Major gene set enrichment found with a GSEA analysis. FL-FFPE samples at diagnosis and after treatment are noted FL_C and FL_T1, _T2 or _T3 (3 different patients), respectively.

expression pattern (as shown in the y-axis of the principal component plot) is in accordance with heterogeneous drug responses usually seen in FL patients.

Global gene expression signatures were also compared between HDACi-treated and non-treated samples using unsupervised hierarchical clustering (Figure 5A). This signature corresponds to the global influence of the HDACi treatment on the transcriptome of patients. Profile differences among treated patients involve distinct pathways, which in this case are most likely related to their specific and heterogeneous response to the drug. As expected, the functional enrichment pathways corresponding to the differentially expressed genes are involved in lymphoproliferation, B-cell regulation (Ag processing and presentation) or immune response (Figure 5B). The novel immune system signature discovered indicates that HDACi also regulates crosstalk between immune cells and B-cells. Not surprisingly, we also detected epigenetic modification-related signatures (Figure 5B, C, D), such as gene expression, RNA-binding and 3'UTR-mediated translation pathway signatures. We also identified enrichment in allograft rejection (Figure 5E), which could be attributed to the drug's effect in enhancing the expression of genes that increases suppressive functions [5].

Conclusion

We successfully performed RNA-seq using novel QIAGEN RNA-seq technologies on poor-quality FFPE RNA samples from FL patients, which were originally rejected by two NGS service providers for library preparation and sequencing. We demonstrated in this study that the QIAseq library preparation process is well suited for RNA samples of poor quality and low yield, such as FFPE samples and sorted cultured cells. We also demonstrated that the QIAseq FastSelect –rRNA HMR Kit led to near-complete rRNA removal in FFPE samples. The RNA-seq analysis identified

a new transcriptomic signature in patients receiving an epigenetic treatment. In addition to confirming known targets such as some very important genes that are re-expressed again in patients receiving treatment [6], we identified new target genes that could explain differences in drug response. These findings are highly relevant in the context of HDAC inhibitors being explored as promising drugs for follicular lymphoma treatment.

Acknowledgments

Sequencing was performed in the Biogenouest Genomics/ Human & Environmental Genomics core facility of Rennes (Biosit/OSUR). Patient samples were obtained from the Centre de Ressources Biologiques (CRB)-Santé of Rennes (BB-0033-00056, www.crbsante-rennes.com). INSERM-UMR1236's bioinformatics team developed a data analysis pipeline to process RNA-seq data.

References

1. Bass, P.B., Engel, K.B., Greytak, S.R. and Moore, H.M. (2014) A review of preanalytical factors affecting molecular, protein and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: How well do you know your FFPE specimen? *Arch. Pathol. Lab Med.* **138**, 1520–1530.
2. Morschhauser, F. et al. (2015) Phase 1 study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in patients with Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, or chronic lymphocytic leukemia. *Invest. New Drugs* **33**, 423–43.
3. Dobin, A. et al. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)* **29**, 15–21.
4. Liao, Y., Smyth, G.K. and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930.
5. Hull, E.E., Montgomery, M.R. and Leyva, K.J. (2016) HDAC inhibitors as epigenetic regulators of the immune system: Impacts on cancer therapy and inflammatory diseases. *Biomed. Res. Int.* 1–15.
6. Desmots, F. et al. (2019) Pan-HDAC inhibitors restore PRDM1 response to IL21 in CREBBP-mutated follicular lymphoma. *Clinical Cancer Research* **25**, 735–746.

Ordering Information

Product	Contents	Cat. no.
AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50)	For 50 minipreps: AllPrep DNA Spin Columns, RNeasy® Mini Spin Columns, Collection Tubes, RNase-Free Water and Buffers	80204
QIAseq Stranded Total RNA Lib Kit (24)	For strand-specific RNA-seq library preparation of 24 samples: Kits include magnetized reaction cleanup beads and sample index adapters for Illumina NGS platforms	180743
QIAseq Stranded Total RNA Lib Kit (96)	For strand-specific RNA-seq library preparation of 96 samples: Kits include magnetized reaction cleanup beads and sample index adapters for Illumina NGS platforms	180745
QIAseq FastSelect –rRNA HMR Kit (24)	Includes 3 tubes of QIAseq FastSelect reagent for rRNA removal; sufficient for 24 reactions from human, mouse and rat samples	334386
QIAseq FastSelect –rRNA HMR Kit (96)	Includes 1 tube of QIAseq FastSelect reagent for rRNA removal; sufficient for 96 reactions from human, mouse and rat samples	334387
QIAseq FastSelect –rRNA HMR Kit (384)	Includes 4 tubes of QIAseq FastSelect reagent for rRNA removal; sufficient for 384 reactions from human, mouse and rat samples	334388

Learn more at www.QIAGEN.com

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at www.qiagen.com or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributor.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAseq®, AllPrep®, FastSelect™, RNeasy® (QIAGEN Group); FACSAria™ (BD Biosciences); Illumina®, NextSeq® (Illumina, Inc); NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG); RecoverAll™ (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, may still be protected by law.
1120129 03/2020 PROM 15555-001 © 2020 QIAGEN, all rights reserved.

Ordering www.qiagen.com/shop | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

Titre : Etude de l'hétérogénéité des centrocytes humains à travers l'expression du CD23 : différenciation en plasmablastes et expression d'une signature minimale transcriptionnelle au niveau cellule-unique comportant DEC2.

Mots clés : Lymphocytes B, centre germinatif, différenciation plasmocytaire, CD23, DEC2, Lymphome folliculaire

Résumé : La différenciation terminale des lymphocytes B à travers le centre germinatif conduit à la production de cellules sécrétrices d'anticorps : les plasmocytes (PC) à longue durée de vie et de haute affinité pour l'antigène. Cette réaction implique la formation d'une microstructure anatomique qui comprend une zone sombre : lieu d'intenses proliférations des centroblastes et de maturation d'affinité de leur BCR, et une zone claire dans laquelle ont lieu les commutations de classes isotypiques du BCR et la sélection des centrocytes (CC). Ce processus est finement contrôlé par les lymphocytes T folliculaires auxiliaires (Tfh) notamment à travers la production de molécules comme l'IL-4, le CD40L et l'IL-21. Ce travail de thèse s'intéresse à l'expression du CD23 à la surface des CC lors de leur métamorphose en PC. J'ai d'abord montré que l'expression de ce

récepteur de faible affinité aux IgE est régulée par les signaux Tfh : CD40L et IL-4. De plus j'ai mis en évidence que les CC humains exposés aux signaux Tfh mais négatifs pour le CD23 sont capables de se différencier en PC. Dans ce cadre, la signature transcriptionnelle de ces progéniteurs de PC a été étudiée à l'échelle de la cellule unique et a permis d'identifier un gène jusqu'alors jamais décrit dans les PC qui code pour le facteur de transcription DEC2 et dont la fonction reste à déterminer. J'ai par ailleurs étudié l'expression du CD23 dans le lymphome folliculaire et mis en évidence qu'il existe des différences entre les populations tumorales positives et négatives pour le CD23, suggérant que les cellules CD23neg ont un avantage de survie et une capacité de différenciation supérieure en culture que les cellules CD23pos.

Title: Study of the heterogeneity of human centrocytes from the germinal center through the CD23 expression plasma cell differentiation and expression of a minimal transcriptional signature at the single cell level including DEC2.

Keywords: B lymphocyte, germinal center, plasma cell differentiation, CD23, DEC2, follicular lymphoma

Abstract: Terminal B cell differentiation through the germinal center leads to the production of antibody-secreting cells: plasma cells (PC) with a long lifespan and high affinity for the antigen. This reaction involves the formation of an anatomical microstructure that includes a dark zone: site of intense proliferation and affinity maturation of the BCR of the centroblasts, and a light zone in which the class switch recombination of the BCR and centrocyte (CC) selection take place. This differentiation is finely controlled by follicular helper T cells (Tfh) that produce molecules such as IL-4, CD40L and IL-21. This PhD work focus on the CD23 expression on the surface of CC during their metamorphosis into PC.

Firstly, I showed that the expression of the low affinity IgE receptor is regulated by Tfh derived IL-4 and CD40L. Moreover, I showed that CC exposed to Tfh signals and which do not express the CD23 were the ones that have the ability to differentiate into PC. In this context, I identified at the single cell level a transcriptional signature expressed specifically by these cells which contains a gene never described in PC, encoding the transcription factor DEC2 whose function remains to be determined. In addition, I studied CD23 expression in follicular lymphoma and showed the existence of differences between these two populations, suggesting a preferential survival and differentiation of CD23neg cells compared to CD23pos cells.